(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120225225 A
(43)申请公布日 2025.06.27

(21)申请号 202280032073.1
(22)申请日 2022.04.29
(30)优先权数据
63/181,796 2021.04.29 US
63/186,739 2021.05.10 US
63/273,118 2021.10.28 US
63/311,781 2022.02.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.10.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/027120 2022.04.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/232634 EN 2022.11.03
(71)申请人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔
申请人 加利福尼亚大学董事会
(72)发明人 L·博伊克 D·L·多瓦拉 N·J·海宁 M·J·海塞 G·刘 J·M·麦肯纳 D·K·诺姆拉 M·E·席勒 J·N·斯普拉德林 J·A·塔拉里科 C·C·沃德 M·皮盖蒂
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 邹宗亮
(51)Int.Cl.
A61K 47/55(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)

权利要求书16页 说明书103页 附图22页

(54)发明名称

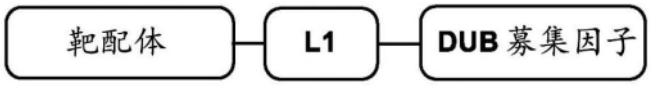
去泛素化酶靶向性嵌合体及相关方法

(57)摘要

本文描述了双功能化合物及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,及其使用方法,这些双功能化合物及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体的功能是向靶蛋白募集某些去泛素化酶以调节(例如,稳定)该靶蛋白。

CN 120225225 A

1.一种具有式(I)的双功能化合物:



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;并且

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

2.根据权利要求1所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白选自由以下组成的组:酶、受体、膜通道和激素或其片段。

3.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白是可溶性蛋白或膜蛋白。

4.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白是突变的或错误折叠的。

5.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白是糖基化的。

6.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白是泛素化的(例如,多泛素化的)。

7.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白是肿瘤抑制因子。

8.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白选自由以下组成的组:肿瘤抑制因子、膜通道、激酶、转录因子、离子通道、凋亡因子、致癌蛋白和表观遗传调节因子。

9.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白选自由以下组成的组:TP53、CDKN1A、CDN1C、BAX、葡糖激酶、囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)、WEE1或其突变体或片段。

10.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白包含所述囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)或其突变体或片段。

11.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白包含ΔF508-CFTR。

12.根据权利要求1-10中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶蛋白包含所述肿瘤抑制激酶WEE1、或其突变体或片段。

13.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶能够切割赖氨酸连接的多泛素链。

14.根据权利要求12所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、

立体异构体或互变异构体,其中所述赖氨酸连接的多泛素链包含K43连接的多泛素链。

15.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶是半胱氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。

16.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶是半胱氨酸蛋白酶。

17.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物结合所述去泛素化酶内催化位点以外的位点。

18.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物结合所述去泛素化酶内的别构位点。

19.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物结合所述去泛素化酶内的半胱氨酸氨基酸残基。

20.根据权利要求19所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述半胱氨酸氨基酸残基是别构半胱氨酸氨基酸残基。

21.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物优先结合别构氨基酸残基(例如,别构氨基酸残基),而不是催化氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸氨基酸残基)。

22.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物基本上不结合所述去泛素化酶的催化位点中的半胱氨酸氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸)。

23.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶选自表1。

24.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶选自WDR48、YOD1、OYUD3、OTUB1、OTUD5、USP8、USP5、USP15、USP16、UCHL3、UCHL1、和USP14。

25.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶包含OTUB1。

26.根据权利要求24所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物结合所述OTUB1序列内的半胱氨酸23(C23)。

27.根据权利要求25-26中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物优先结合所述OTUB1序列内的半胱氨酸23(C23)而不是半胱氨酸91(C91)。

28.根据权利要求25-27中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物基本上不结合所述OTUB1序列内的半胱氨酸91(C91)。

29.根据权利要求1-24中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶包含OTUD5。

30.根据权利要求29所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物结合所述OTUD5序列内的半胱氨酸434(C434)。

31.根据权利要求28-30中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物优先结合所述OTUD5序列内的半胱氨酸434(C434)而不是半胱氨酸244(C244)。

32.根据权利要求28-31中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物基本上不结合所述OTUD5序列内的半胱氨酸244(C244)。

33.根据权利要求1-24中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述去泛素化酶包含USP15。

34.根据权利要求33所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物结合所述USP15序列内的半胱氨酸264(C264)。

35.根据权利要求33-34中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物优先结合所述USP15序列内的半胱氨酸264(C264)而不是半胱氨酸298(C298)。

36.根据权利要求33-35中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述双功能化合物基本上不结合所述USP15序列内的半胱氨酸298(C298)。

37.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶配体结合(例如共价结合)所述靶蛋白。

38.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶配体能够调节所述靶蛋白。

39.根据权利要求38所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述调节包括以下中的一种或多种:

(i)调节所述靶蛋白的折叠;

(ii)调节所述靶蛋白的半衰期;

(iii)调节所述靶蛋白向蛋白酶体的运输;

(iv)调节所述靶蛋白的泛素化水平;

(v)调节所述靶蛋白的降解(例如,蛋白酶体降解);

(vi)调节靶蛋白信号传导;

(vii)调节靶蛋白定位;

(viii)调节所述靶蛋白向溶酶体的运输;以及

(ix)调节靶蛋白与其他蛋白的相互作用。

40.根据权利要求39所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其包含(i)。

41.根据权利要求39所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其包含(ii)。

42.根据权利要求39所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其包含(iii)。

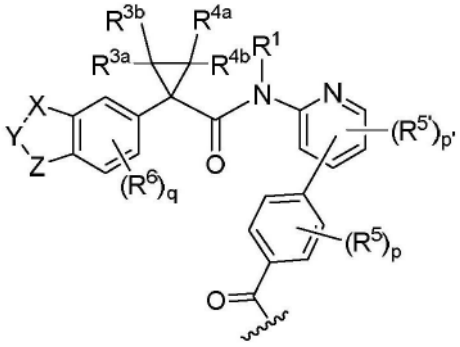
43.根据权利要求39所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其包含(iv)。

44.根据权利要求39所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其包含(v)。

45.根据权利要求39所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其包含(i)-(v)中的每一个。

46.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶配体是化学伴侣。

47.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶配体具有式(I-a)的结构:



(I-a)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

X和Z各自独立地是O、S、或C(R^{7a})(R^{7b});

Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};

R^1是H或C_{1-6}烷基;

R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;

R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);

R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;

R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

p是0、1、2、3或4;

p'是0、1、2、3或4;

q是0、1、2或3;并且

├─表示与式(I)中L1的附接点。

48.根据权利要求47所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O。

49.根据权利要求47-48中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中Y是C(R^{7a})(R^{7b})。

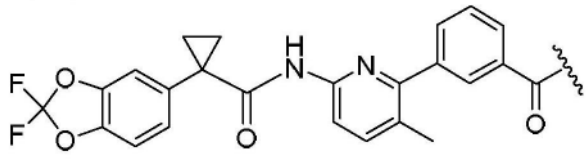
50.根据权利要求47-49中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^{7a}和R^{7b}各自独立地是卤代(例如,氟代)。

51.根据权利要求47-50中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H。

52.根据权利要求47-51中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^{1}是H。

53.根据权利要求47-52中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中p和q各自是0。

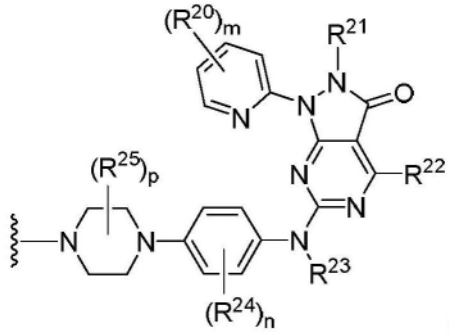
54.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述靶配体具有式(I-f)的结构:



(I-f)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中┠─表示与式(I)中L1的附接点。

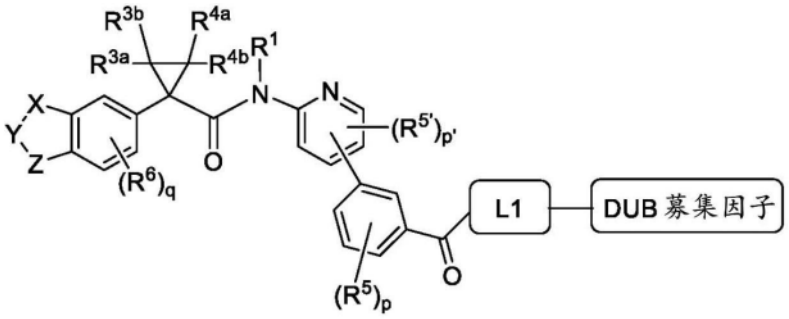
55.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有式(I-h)的结构:



(I-h)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中R^{20}、R^{24}和R^{25}各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^{A}、-C(O)N(R^{B})(R^{C})、或-N(R^{B})CO(R^{D});R^{21}和R^{23}各自独立地是H或C_{1-6}烷基;R^{22}是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^{A}、-C(O)N(R^{B})(R^{C})、或-N(R^{B})CO(R^{D});R^{A}、R^{B}、R^{C}和R^{D}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;m和n各自独立地是0、1、2、3或4;p是0、1、2、3、4、5、6、7或8;并且┠─表示与式(I)中L1的附接点。

56.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-a):



(II-a)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

X和Z各自独立地是O、S、或C(R^{7a})(R^{7b});

Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};

R^1是H或C_{1-6}烷基;

R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;

R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);

R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;

R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

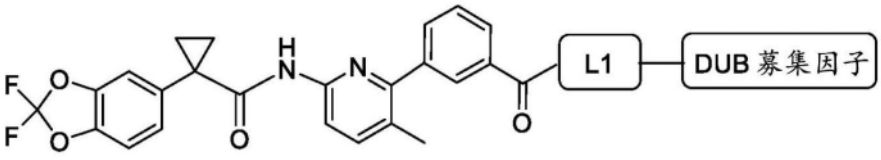
p是0、1、2、3或4;

p'是0、1、2、3或4;

q是0、1、2或3;并且

L1和DUB募集因子如权利要求1中所定义。

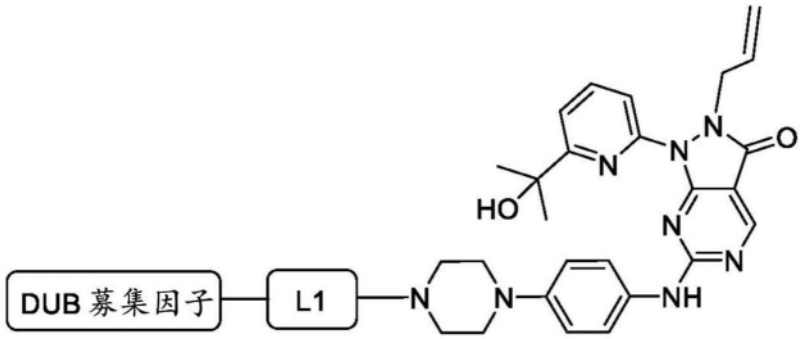
57.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-d):



(II-d)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如权利要求1中所定义。

58.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-k):



(II-k)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

59.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子结合(例如共价结合)所述去泛素化酶。

60.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子与所述去泛素化酶的结合基本上不抑制所述去泛素化酶的活性。

61.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子结合所述去泛素化酶内催化位点以外的位点。

62.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子结合所述去泛素化酶内的别构位点。

63.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子结合所述去泛素化酶内的半胱氨酸氨基酸残基。

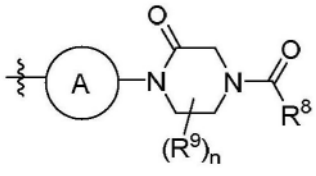
64.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子优先结合别构氨基酸残基(例如,别构氨基酸残基),而不是催化氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸氨基酸残基)。

65.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子基本上不结合所述去泛素化酶的催化位点中的半胱氨酸氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸)。

66.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子包含丙烯酰胺部分。

67.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子包含呋喃部分。

68.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子具有式(V-b)的结构:



(V-b)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;

R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;

每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A;

每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^A是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;并且

n是0、1、2、3、4、5或6。

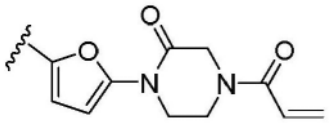
69.根据权利要求68所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中环A是杂芳基(例如,单环杂芳基)。

70.根据权利要求68-69中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中环A是5元杂芳基(例如,呋喃基)。

71.根据权利要求68-70中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^8是亲电部分。

72.根据权利要求68-71中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^8是C_{2-6}烯基(例如,$CH=CH_2$)。

73.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子具有化合物100的结构:



(100)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中表示与式(I)中L1的附接点。

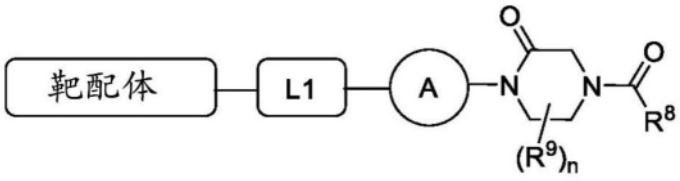
74.根据权利要求1-28和29-65中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子结合所述OTUB1序列内的半胱氨酸23(C23)。

75.根据权利要求1-28和29-66中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子优先结合所述OTUB1序列内的半胱氨酸23(C23)而不是半胱氨酸91(C91)。

76.根据权利要求1-28和29-67中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述DUB募集因子基本上不结合所述OTUB1序列内的半胱氨酸91(C91)。

77.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-

k)：



(II-k)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中：

环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基，其中每个被0-12个R^{10}取代；

R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；

每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A；

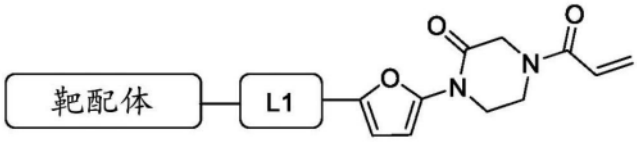
每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；

R^A是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；

n是0、1、2、3、4、5或6；

其中所述靶配体和L1如权利要求1中所定义。

78.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体，其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-l)：



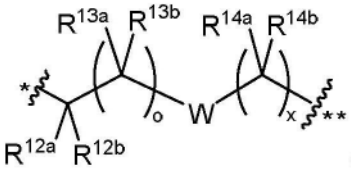
(II-l)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中所述靶配体和L1如权利要求1中所定义。

79.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体，其中L1是不可切割接头。

80.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体，其中L1包含亚烷基或杂亚烷基。

81.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体，其中L1具有式(III-a)的结构：



(III-a)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中：

R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}、R^{13b}、R^{14a}和R^{14b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；或者

R^{12a}和R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}、以及R^{14a}和R^{14b}各自独立地可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；

W是C(R^{15a})(R^{15b})、O、N(R^{16})、或S;

R^{15a}和R^{15b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;或者R^{15a}和R^{15b}可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团;

R^{16}是H或C_{1-6}烷基;

R^A是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

o和x各自独立地是0与10之间的整数;

*├──表示与式(I)中靶配体的附接点;并且

**├──表示与式(I)中DUB募集因子的附接点。

82.根据权利要求81所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}各自独立地是H。

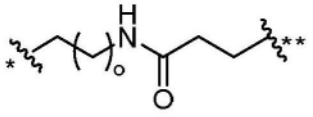
83.根据权利要求81-82中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中R^{14a}和R^{14b}各自与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团。

84.根据权利要求81-83中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中W是N(R^{16})(例如,NH)。

85.根据权利要求81-84中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中o选自2、3、4、5、和6。

86.根据权利要求81-85中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中p选自1、2和3。

87.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中L1具有式(III-b)的结构:



(III-b)

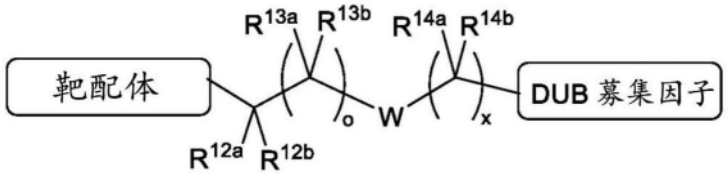
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

o是0与10之间的整数;

*├──表示与式(I)中靶配体的附接点;并且

**├──表示与式(I)中DUB募集因子的附接点。

88.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中L1具有式(III-c)的结构:



(III-c)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}、R^{13b}、R^{14a}和R^{14b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、

氰基或-OR^A;或者

R^{12a}和R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}、以及R^{14a}和R^{14b}各自独立地可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团;

W是C(R^{15a})(R^{15b})、O、N(R^{16})、或S;

R^{15a}和R^{15b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;或者

R^{15a}和R^{15b}可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团;

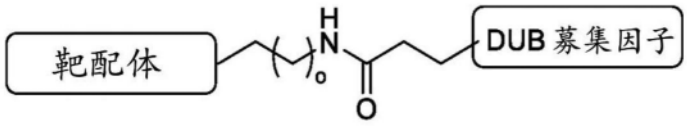
R^{16}是H或C_{1-6}烷基;

R^A是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

o和x各自独立地是0与10之间的整数;并且

所述靶配体和DUB募集因子如权利要求1中所定义。

89.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中L1具有式(III-d)的结构:



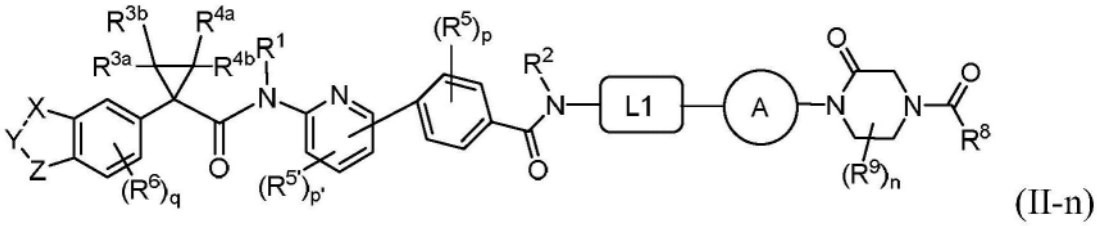
(III-d)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

o是0与10之间的整数;并且

所述靶配体和DUB募集因子如权利要求1中所定义。

90.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-n):



(II-n)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

X和Z各自独立地是O、S、或C(R^{7a})(R^{7b});

Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};

环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;

R^1是H或C_{1-6}烷基;

R^2是H或C_{1-6}烷基;

R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;

R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);

R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;

R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;

每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A;

每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

n是0、1、2、3、4、5或6;

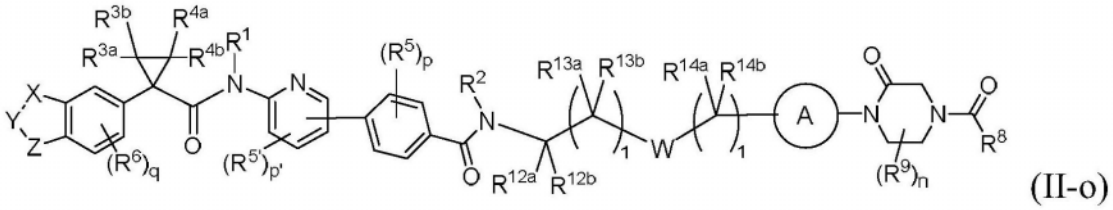
p是0、1、2、3或4;

p'是0、1、2、3或4;

q是0、1、2或3;并且

L1如权利要求1中所定义。

91.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-o):



(II-o)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

X和Z各自独立地是O、S、或C(R^{7a})(R^{7b});

Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};

环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;

R^1是H或C_{1-6}烷基;

R^2是H或C_{1-6}烷基;

R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;

R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);

R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;

R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;

每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A;

每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;

R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}、R^{13b}、R^{14a}和R^{14b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;或者

R^{12a}和R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}、以及R^{14a}和R^{14b}各自独立地可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团;

W是C(R^{15a})(R^{15b})、O、N(R^{16})、或S;

R^{15a}和R^{15b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;或者

R^{15a}和R^{15b}可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团;

R^{16}是H或C_{1-6}烷基;

R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；

n是0、1、2、3、4、5或6；

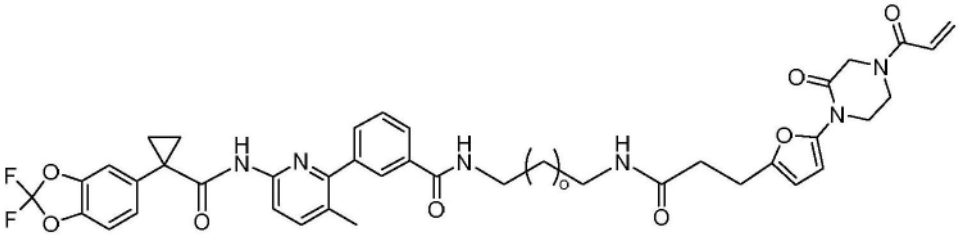
o和x各自独立地是0与10之间的整数；

p是0、1、2、3或4；

p'是0、1、2、3或4;并且

q是0、1、2或3。

92.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-q)：



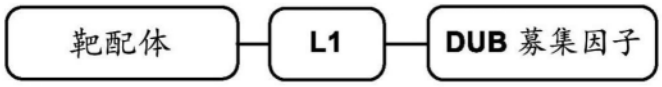
(II-q)

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中o选自0、1、2、3、4、5和6。

93.根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中所述具有式(I)的双功能化合物选自表2中提供的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。

94.一种药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的双功能化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,以及一种或多种药学上可接受的载剂。

95.一种用于向受试者提供化合物的组合物,其中所述组合物包含具有式(I)的双功能化合物：



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中：

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分；

(ii)L1包含接头;并且

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

96.一种用于治疗受试者的疾病、障碍或病症的组合物,其包含具有式(I)的双功能化合物：



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中：

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

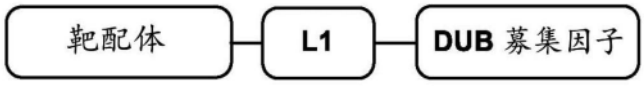
(ii)L1包含接头;

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

97.用于根据权利要求96所述使用的组合物,其中施用所述组合物改善了所述疾病、障碍或病症的症状或要素。

98.用于根据权利要求96-97中任一项所述使用的组合物,其中所述疾病、障碍或病症是囊性纤维化。

99.一种用于治疗受试者的囊性纤维化的组合物,其包含具有式(I)的双功能化合物:



(I),

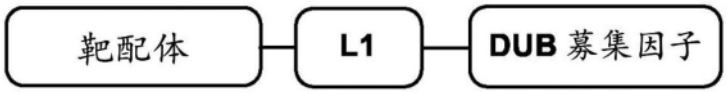
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;并且

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

100.一种用于调节细胞或受试者中蛋白质的组合物,其包含具有式(I)的双功能化合物:



(I),

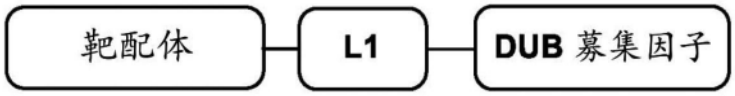
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

101.一种用于向细胞或受试者中靶蛋白募集去泛素化酶的组合物,其中所述组合物包含具有式(I)的双功能化合物:



(I),

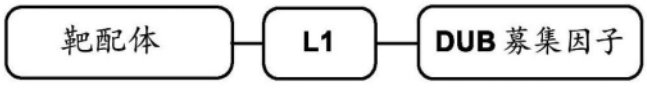
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

102.一种用于蛋白质去泛素化的组合物,其包含具有式(I)的双功能化合物:



(I),

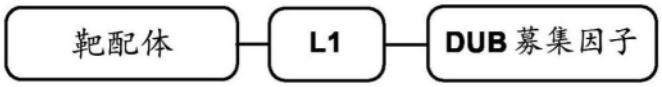
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

103.一种向受试者提供化合物的方法,其中所述化合物包含具有式(I)的双功能化合物:



(I),

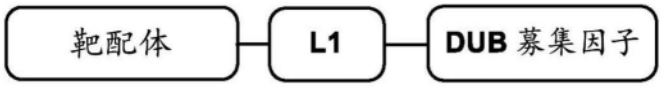
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;并且

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

104.一种治疗受试者的疾病、障碍或病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用具有式(I)的双功能化合物:



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

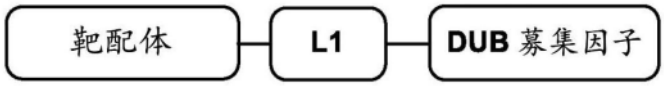
(ii)L1包含接头;

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。

105.根据权利要求104所述的方法,其中所述方法包括改善所述疾病、障碍或病症的症状或要素。

106.根据权利要求104-105中任一项所述的方法,其中所述疾病、障碍或病症是囊性纤维化。

107.一种治疗受试者的囊性纤维化的方法,所述方法包括向所述受试者施用具有式(I)的双功能化合物:



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

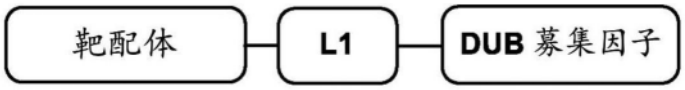
(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;并且

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分,

从而治疗囊性纤维化。

108.一种调节细胞或受试者中蛋白质的方法,所述方法包括使所述细胞接触具有式(I)的双功能化合物或向所述受试者施用所述具有式(I)的双功能化合物:



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中:

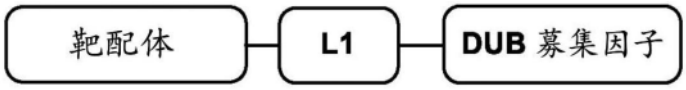
(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;

(ii)L1包含接头;

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分，

从而调节细胞或受试者中蛋白质。

109.一种向靶蛋白募集去泛素化酶的方法,所述方法包括使混合物(例如,在细胞或样品中)与具有式(I)的双功能化合物接触：



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体,其中：

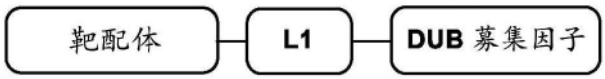
(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分；

(ii)L1包含接头；

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分，

从而在混合物例如细胞或受试者中向靶蛋白募集去泛素化酶。

110.一种蛋白质去泛素化的方法,所述方法包括使细胞或样品与具有式(I)的双功能化合物：



(I),

或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体、或互变异构体接触,其中：

(i)所述靶配体包含能够结合靶蛋白的部分；

(ii)L1包含接头；

(iii)所述DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分，

从而实现细胞或受试者中的蛋白质去泛素化。

去泛素化酶靶向性嵌合体及相关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下文献的权益和优先权:2022年2月18日提交的美国临时申请号63/311,781;2021年10月28日提交的美国临时申请号63/273,118;2021年5月10日提交的美国临时申请号63/186,739;以及2021年4月29日提交的美国临时申请号63/181,796。前述每个申请的全部内容通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本文描述了同时结合靶蛋白和去泛素化酶的双功能化合物,以及相关的组合物和使用方法,例如用于稳定靶蛋白和/或治疗疾病、障碍或病症。

背景技术

[0004] 泛素-蛋白酶体途径(UPP)是一个关键过程,在包括蛋白质降解、质量控制、运输和信号传导在内的多种细胞功能中发挥作用。泛素和其他泛素样蛋白(统称为"Ubl")共价附接到特定的蛋白质底物,根据特定的修饰,最终靶向这些蛋白质以被蛋白酶体降解或以其他方式影响蛋白质功能。然而,这些Ubl可以通过去泛素化酶(DUB)的作用被去除,去泛素化酶从靶蛋白中水解Ubl。从泛素化的靶蛋白中去除Ubl可以以多种方式调节靶蛋白的功能,包括提高稳定性和防止蛋白酶体降解。由于某些细胞蛋白质的降解与疾病进展有关,因此需要新的工具来稳定某些蛋白质并减缓或抑制它们的降解。

附图说明

[0005] 图1中示意图展示本文所述的示例性双功能化合物的一般结构,以及这些双功能化合物用于向靶蛋白(例如,泛素化的靶蛋白)募集去泛素化酶(DUB)以将靶蛋白去泛素化并稳定靶蛋白水平的用途。

[0006] 图2A-2B中圆形图展示本文所述的基于活性的蛋白质分析(ABPP)筛选鉴定候选去泛素化酶的结果。图2A显示,所测试的65种去泛素化酶中有65种含有探针修饰的半胱氨酸。图2B显示,所测试的65种去泛素化酶中有39种在ABPP数据集中显示大于10个总谱图计数,并且这39种去泛素化酶中有24种(62%)显示催化或活性位点半胱氨酸的标记。

[0007] 图3A中图显示,在ABPP筛选中鉴定的10种去泛素化酶含有一种探针修饰的半胱氨酸,该半胱氨酸占特定去泛素化酶中探针修饰的半胱氨酸肽的总谱图计数的50%以上。

[0008] 图3B中图描绘去泛素化酶OTUB1的化学蛋白质组学数据分析,其中与催化半胱氨酸91(C91)相比,鉴定半胱氨酸23(C23)为探针筛选标记的优势位点。

[0009] 图4中图描绘针对重组去泛素化酶(OTUB1)的IA-罗丹明标记竞争的半胱氨酸反应性文库的共价配体筛选以通过ABPP鉴定OTUB1的结合物的结果。在IA-罗丹明标记(500nM,30min室温)之前,将媒介物DMSO或半胱氨酸反应性共价配体(50μM)与OTUB1在室温预孵育30min。然后通过SDS/PAGE分离OTUB1,并如所述评估凝胶内荧光。

[0010] 图5是基于凝胶的ABPP确认的图像,显示了对OTUB1的IA-罗丹明结合的剂量响应

性抑制。在IA-罗丹明标记(500nM,30min室温)之前,将媒介物(DMSO)或示例性DUB募集因子(化合物100)与OTUB1在37℃预孵育30min。然后通过SDS/PAGE分离OTUB1,并评估凝胶内荧光。通过银染色来说明蛋白质负载。显示的凝胶是n＝3个生物学上独立的样品/组的代表性凝胶。

[0011] 图6是共价结合示例性DUB募集因子(化合物100)的OTUB1的胰蛋白酶肽的液相色谱-串联质谱分析(LC-MS/MS),显示化合物100选择性靶向C23,其中没有检测到催化C91的修饰。

[0012] 图7是体外重构的OTUB1去泛素化活性测定的基于凝胶的分析,该分析监测单泛素从双泛素中的释放,该图证明示例性DUB募集因子(化合物100)不抑制OTUB1的去泛素化活性。这些研究是在OTUB1刺激性泛素缀合酶E2 D1(UBE2D1)的存在下进行的,该酶是一种E2泛素连接酶,与OTUB1接合形成复合物以刺激OTUB1活性。

[0013] 图8提供了OTUB1结合另外的示例性DUB募集因子的基于凝胶的分析图像,以探索结构-活性关系(SAR)。

[0014] 图9A-9B显示示例性双功能化合物化合物200和化合物201针对OTUB1的基于凝胶的ABPP分析图像。在每个实验中,在室温添加IA-罗丹明(100nM)30min之前,将媒介物(DMSO)或双功能化合物与重组OTUB1在37℃预孵育30min。OTUB1在SDS/PAGE上运行并评估凝胶内荧光。通过银染色来评估蛋白质负载。

[0015] 图10A-10B中图像描绘示例性双功能化合物对突变体CFTR水平的影响。将表达ΔF508-CFTR的CFBE41o-4.7细胞用媒介物DMSO、化合物200(10μM)、化合物201(10μM)、鲁马卡托(10μM)或化合物100(10μM)处理24h,并通过蛋白质印迹评估突变体CFTR和负载对照GAPDH水平,如图9A-9B所示。图10B显示从图10A获取的数据的量化。

[0016] 图11A-11B中图像显示示例性双功能化合物化合物201的机制分析。将表达ΔF508-CFTR的CFBE41o-4.7细胞用媒介物(DMSO)、鲁马卡托(100μM)或化合物100(100μM)预处理1h,然后用化合物201(10μM)处理24h。通过蛋白质印迹评估突变体CFTR和负载对照GAPDH水平,如图11A所示。图11B显示从图11A获取的数据的量化。

[0017] 图12A-12C中图像展示OTUB1敲低对双功能化合物化合物201介导的突变体CFTR稳定的影响。将表达ΔF508-CFTR的CFBE41o-4.7细胞用si对照或siOTUB1寡核苷酸瞬时转染48h,然后用媒介物DMSO或化合物201(10μM)处理细胞16h。通过蛋白质印迹评估突变体CFTR、OTUB1和负载对照GAPDH水平,如图12A所示。图12B显示从图12A获取的%CFTR水平数据的量化,而图12C总结了%OTUB水平数据。

[0018] 图13中图像描绘用示例性双功能化合物进行的CFTR下拉研究。将表达DF508-CFTR的CFBE41o-4.7细胞用媒介物DMSO或示例性双功能化合物(10mM)处理24h,并通过蛋白质印迹评估CFTR和负载对照GAPDH水平。印迹代表n＝3个生物学上独立的样品/组。

[0019] 图14中图像描绘用示例性双功能化合物进行的CFTR下拉研究。将表达DF508-CFTR的CFBE41o-4.7细胞用媒介物DMSO或表2中提供的示例性双功能化合物(10mM)处理24h,并通过蛋白质印迹评估CFTR和负载对照GAPDH水平。在该图像中,NJH-2-057是指化合物201。

[0020] 图15A-15D是使用重组蛋白和基于天然质谱法(MS)的方法在体外证实CFTR、示例性双功能化合物(化合物201)和OTUB1之间形成三元复合物的图像。图15A-15C描绘在DMSO(图15A)、单独的DUB募集因子化合物100(图15B)或双功能化合物化合物201(图15C)存在下

CFTR-OTUB1复合物形成的天然质谱。虽然最高强度信号对应于本实验中使用的未修饰的OTUB1和带有DF508的CFTR核苷酸结合结构域,潜在地表明在这些实验条件下低水平的靶接合,但是用化合物201处理观察到显著的CFTR-OTUB1复合物形成,而用DMSO媒介物或化合物100处理没有观察到。

[0021] 图16A-16D中图像展示使用本文所述的示例性双功能化合物靶向肿瘤抑制激酶WEE1。将HEP3B细胞用DMSO媒介物或硼替佐米(1mM)处理24h。WEE1和负载对照GAPDH水平通过蛋白质印迹进行评估。图16B描绘设计用于靶向WEE1的四种示例性双功能化合物的结构。图16C显示实验的基于凝胶的分析,在该实验中将HEP3B细胞用DMSO媒介物、四种双功能化合物、硼替佐米、化合物100或AZD1775以1mM处理24h。WEE1和负载对照GAPDH水平通过蛋白质印迹进行评估。(a)和(b)中显示的印迹是来自n=3个生物学上独立的样品/组的代表性印迹。柱状图中的数据显示n=3个生物学上独立的样品/组的单个生物重复值和平均值±sem。

[0022] 图17中图像描绘用示例性双功能化合物进行的CFTR下拉研究。将表达DF508-CFTR的CFBE41o-4.7细胞用媒介物DMSO或表2中提供的示例性双功能化合物(10mM)处理24h,并通过蛋白质印迹评估CFTR和负载对照GAPDH水平。在该图像中,NJH-2-057是指化合物201,LEB-3-162是指化合物230,NJH-02-153是指化合物231。

[0023] 图18A-18C是去泛素化酶USP15结合示例性DUB募集因子的基于凝胶的分析图像,以探索结构-活性关系(SAR)。

[0024] 图18D中图描绘USP15的化学蛋白质组学数据分析,其中与催化半胱氨酸298(C298)相比,鉴定半胱氨酸264(C264)和半胱氨酸381(C381)为探针筛选标记的优势位点。

[0025] 图19A-19B是去泛素化酶OTUD5结合示例性DUB募集因子的基于凝胶的分析图像,以探索结构-活性关系(SAR)。

具体实施方式

[0026] 本文描述了双功能化合物及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,及其使用方法,这些双功能化合物及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体的功能是向靶蛋白募集某些去泛素化酶以调节(例如,稳定)该靶蛋白。癌症、呼吸系统疾病和神经系统疾病等许多疾病的进展需要某些关键蛋白质的主动泛素化和降解。因此,通过有目的的去泛素化来靶向稳定这些关键蛋白可以阻止疾病进展,并在细胞或受试者中赋予治疗益处。本发明人使用化学蛋白质组学共价配体发现方法设计了一组双功能化合物,该组双功能化合物包含能够结合靶蛋白的靶配体和能够结合去泛素化酶的DUB募集因子。这些双功能化合物尤其可以使去泛素化酶接近泛素化蛋白,从而允许定向去除Ub1和实现潜在的靶蛋白稳定。

[0027] 靶蛋白

[0028] 在一方面,本披露提供了能够结合靶蛋白(例如,本文所述的靶蛋白)的双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。靶蛋白可以是任何种类的蛋白质,例如,在细胞(例如,哺乳动物细胞、植物细胞、真菌细胞、昆虫细胞、细菌细胞)或病毒颗粒中发现的任何蛋白质。在一些实施例中,蛋白质是可溶性蛋白或膜蛋白。在一些实施例中,蛋白质是可溶性蛋白。在一些实施例中,蛋白质是膜蛋白。靶蛋白

可以包含翻译后修饰,例如糖部分、酰基部分、脂质部分。在一些实施例中,靶蛋白是糖基化的,例如在天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或色氨酸残基处糖基化。

[0029] 示例性的靶蛋白包括酶(例如,激酶、水解酶、磷酸酶、连接酶、异构酶、氧化还原酶)、受体、膜通道、激素、转录因子、肿瘤抑制因子、离子通道、凋亡因子、致癌蛋白、表观遗传调节因子或其片段。在一些实施例中,靶蛋白是酶(例如,激酶或磷酸酶)。在一些实施例中,靶蛋白是激酶(例如,PKN1、BCR、MAP4K4、TYK2、MAP4K2、EPHB4、MAP4K5、MAP3K2、DDR1、TGFBR1、RIPK2、TNK1、LYN、STK10、PKMYT1、LYN、EGFR、EPHA1、GAK、SIK2、MAP2K2、SLK、PRKACB、EPHA2、WEE1、或葡糖激酶)。在一些实施例中,靶蛋白是肿瘤抑制激酶(例如,WEE1)。在一些实施例中,靶蛋白是WEE1或其片段。在一些实施例中,靶蛋白是连接酶(例如,E3连接酶,例如MDM2)。在一些实施例中,靶蛋白是受体。在一些实施例中,靶蛋白是转录因子(例如,MYC)。在一些实施例中,靶蛋白是激素。在一些实施例中,靶蛋白是肿瘤抑制因子(例如,TP53、AXIN1、BAX、CDKN1A、CKDN1C、PTEN或SMAD4)。在一些实施例中,靶蛋白与遗传疾病相关(例如,SMN1/2、GLUT1、CFTR、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、富马酰乙酰乙酸水解酶(FAH)或酸性α-葡糖苷酶(GAA))。在一些实施例中,靶蛋白是膜通道(例如,CFTR)。在一些实施例中,靶蛋白是CFTR或其片段。在一些实施例中,CFTR包含序列突变(例如,I类、II类、III类、IV类或V类突变)。在一些实施例中,CFTR、SMN1/2、GLUT1、PAH、FAH或GAA包含序列突变,例如,添加突变、缺失突变或取代突变(例如,ΔF508-CFTR)。在一些实施例中,CFTR包含选自由以下组成的组的序列突变:G551D、R177H和A445E。在一些实施例中,靶蛋白是BAX或其片段。在一些实施例中,靶蛋白是STING或其片段。

[0030] 在一些实施例中,靶蛋白有泛素或泛素样蛋白(本文统称为"Ubl")修饰。在一些实施例中,Ubl是泛素。在一些实施例中,Ubl是SUMO、NEDD8或Agp12。在一些实施例中,靶蛋白是单泛素化的或多泛素化的。靶蛋白可以含有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个Ubl链,例如在赖氨酸氨基酸残基上。靶蛋白可以包含以任何方式连接的多泛素链,例如K48连接的多泛素链、K63连接的多泛素连接链、K29连接的多泛素链或K33连接的多泛素链。在一些实施例中,靶蛋白包含多个多泛素链。在一些实施例中,包含Ubl的靶蛋白能够结合包含Ubl结合结构域(例如,泛素结合结构域)的蛋白质。

[0031] 例如,相对于野生型靶蛋白,靶蛋白可能包含增加其不稳定性或削弱其活性的特征。例如,靶蛋白可能突变或错误折叠。在一些实施例中,相对于野生型靶蛋白,靶蛋白与结合配偶体结合的能力降低,例如降低约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或99%。在一些实施例中,靶蛋白的活性比野生型靶蛋白低,例如低约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,靶蛋白的活性比野生型靶蛋白高,例如高约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0032] 去泛素化酶

[0033] 本文描述了包含能够结合去泛素化酶(DUB)的部分的双功能化合物。去泛素化酶包含一个蛋白酶大家族,负责水解Ubl-Ubl键或Ubl-靶蛋白键,并在许多细胞过程中发挥作用。去泛素化酶具有多种功能,包括从多泛素链产生游离泛素单体,调节多泛素链的大小,

以及通过从泛素化的靶蛋白中去除来逆转泛素信号传导。去泛素化酶功能的失调与许多疾病相关,包括癌症、代谢疾病、遗传疾病、单倍剂量不足靶点(haploinsufficiency target)和神经系统疾病。迄今为止,在人类细胞中已经鉴定出大约80种不同的功能性去泛素化酶。

[0034] 本披露的特征在于包含能够结合去泛素化酶的DUB募集因子的双功能化合物。去泛素化酶可以是例如细胞中的任何去泛素化酶,包括半胱氨酸蛋白酶去泛素化酶和金属蛋白酶去泛素化酶。在一些实施例中,去泛素化酶是例如包含催化位点半胱氨酸氨基酸残基的半胱氨酸蛋白酶。去泛素化酶可以是全长蛋白质或其片段。在一些实施例中,去泛素化酶包含单个活性位点。在其他实施例中,去泛素化酶是多功能蛋白质的一种功能。示例性去泛素化酶包括BAP1、CYLD、OTUB1、OTUB2、OTUD3、OTUD5、OTUD7A、OTUD7B、TNFAIP3、UCHL1、UCHL3、UCHL5、USP10、USP11、USP12、USP13、USP14、USP15、USP16、USP17L1、USP17L2、USP17L24、USP17L3、USP17L5、USP18、USP19、USP2、USP20、USP21、USP22、USP24、USP25、USP26、USP27X、USP28、USP3、USP30、USP31、USP33、USP34、USP35、USP36、USP37、USP38、USP4、USP40、USP41、USP42、USP43、USP44、USP45、USP46、USP47、USP48、USP49、USP5、USP50、USP51、USP54、USP7、USP8、USP9X、VCPIP1、WDR48、YOD1、ZRANB1和ZUP1、或其片段或变体。在一些实施例中,去泛素化酶选自由以下组成的组:WDR48、YOD1、OYUD3、OTUB1、USP8、USP5、USP16、UCHL3、UCHL1和USP14、或其片段。在一些实施例中,去泛素化酶选自由以下组成的组:WDR48、YOD1、OYUD3、OTUB1、OTUD5、USP8、USP5、USP14、USP15、USP16、UCHL3和UCHL1、或其片段。在一些实施例中,去泛素化酶是表1中列出的去泛素化酶。在一些实施例中,去泛素化酶包含OTUB1或其片段或变体。在一些实施例中,去泛素化酶包含OTUD5或其片段或变体。在一些实施例中,去泛素化酶包含USP15或其片段或变体。

[0035] 本披露的双功能化合物能以共价或非共价方式结合去泛素化酶。在一些实施例中,双功能化合物(例如,DUB募集因子)结合去泛素化酶内催化位点以外的位点。在一些实施例中,双功能化合物(例如,DUB募集因子)结合去泛素化酶内的别构位点。在一些实施例中,相对于不存在双功能化合物时去泛素化酶的活性,该双功能化合物(例如,DUB募集因子)与去泛素化酶的结合对去泛素化酶活性的调节不超过0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,相对于不存在双功能化合物时去泛素化酶的活性,该双功能化合物(例如,DUB募集因子)与去泛素化酶的结合对去泛素化酶活性的调节不超过0.1%-50%、1%-50%、1%-25%、1%-10%、0.1%-10%、1%-5%、或0.1%-2%。在一些实施例中,双功能化合物(例如,DUB募集因子)与去泛素化酶的结合基本上不调节(例如,抑制)去泛素化酶的活性(例如,去泛素化酶活性)。

[0036] 双功能化合物(例如,本文所述的双功能化合物)能够结合例如去泛素化酶内的半胱氨酸氨基酸残基(例如,硫醇部分)。在一些实施例中,半胱氨酸氨基酸残基是别构半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中,半胱氨酸氨基酸残基存在于去泛素化酶表面。在一些实施例中,半胱氨酸氨基酸残基存在于去泛素化酶上或其内部。在一些实施例中,半胱氨酸氨基酸残基不是催化半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中,双功能化合物优先结合别构半胱氨酸氨基酸残基,而不是催化半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中,双功能化合物基本上不结合去泛素化酶的催化位点中的半胱氨酸氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸)。

[0037] 下表1提供了人类去泛素化酶亚组中的示例性修饰位点。在一些实施例中,双功能化合物结合去泛素化酶内的单个位点(例如,表1中总结的半胱氨酸氨基酸残基之一)。在一些实施例中,双功能化合物结合去泛素化酶内的多个位点(例如,表1中总结的多个半胱氨酸氨基酸残基)。

[0038] 表1.去泛素化酶内的示例性半胱氨酸修饰

[0039]

去泛素化酶	Uniprot ID	修饰位点
BAP1	Q92560	C91、C103、C676、C638、C91、C320
CYLD	Q9NQC7	C655、C853、C751
OTUB1	Q96FW1	C23、C212、C91、C204

[0040]

OTUB2	Q96DC9	C51
OTUD3	Q5T2D3	C49、C245、C76
OTUD5	Q96G74	C491、C434、C519、C247、C142、C143
OTUD7A	Q8TE49	C193、C137、C784、C482、C895
OTUD7B	Q6GQQ9	C720、C133、C708、C819、C821、C345
TNFAIP3	P21580	C521、C536、C495、C498、C103、C483、C387、C657、C158、C590、C627、C612、C404、C407
UCHL1	P09936	C152、C47、C90、C220
UCHL3	P15374	C95、C50、C209
UCHL5	Q5LJA9	C100、C228、C229、C8、C203、C203、C112、C21
USP10	Q14694	C94、C254、C40、C115、C209、C40、C456
USP11	P51784	C694、C951、C468、C894、C428、C34、C802、C701
USP12	O75317	C83、C226、C14、C186
USP13	Q92995	C345、C671、C544、C164、C49、C65
USP14	P54578	C257、C203、C415、C359、C277、C105、C114
USP15	Q9Y4E8	C381、C264、C633、C809、C812、C139、C381、C570、C306、C298、C462、C506、C873、C451、C448、C462、C289
USP16	Q9Y5T5	C618、C205、C24、C631、C191、C191、C471、C104、C119
USP17L1	Q7RTZ2	C89、C257、C123
USP17L2	Q6R6M4	C414、C257、C123
USP17L24	Q0WX57	C126、C473、C97
USP17L3	A6NCW0	C89、C257、C122、C123、C126
USP17L5	A8MUK1	C207、C126、C473、C97
USP18	Q9UMW8	C181、C178、C292、C320、C65
USP19	O94966	C1042、C492、C219、C506、C1138、C102、C466、C1017
USP2	O75604	C428、C431、C276、C191
USP20	Q9Y2K6	C238、C43、C53、C527、C542、C783
USP21	Q9UK80	C564、C229
USP22	Q9UPT9	C171、C23、C44、C211、C76、C61、C66、C219、C84

[0041]

USP24	Q9UPU5	C1393、C1362、C1556、C116、C1080、C1239、C1333、C2423、C2425、C456、C1516、C1202、C2278、C2281、C1580、C153、C873、C1417、C1516、C1873、C1433
USP25	Q9UHP3	C990、C551、C143、C1037
USP26	Q9BXU7	C341、C876、C169、C551、C667
USP27X	A6NNY8	C113、C180、C38
USP28	Q96RU2	C21、C171、C644、C142、C308、C329、C203
USP3	Q9Y6I4	C157、C301、C168、C227、C301；C302、C168
USP30	Q70CQ3	C142、C320、C129、C77
USP31	Q70CQ4	C461、C107、C137、C911、C862、C1263、C330、C333、C292、C307、C93、C507
USP33	Q8TEY7	C194、C766、C492、C603、C206、C278、C321、C324、C216、C79、C613、C338
USP34	Q70CQ2	C2567、C741、C2018、C2809、C5、C907、C3118、C3193、C1674、C3504、C3486、C993、C132、C3118、C2762、C421、C1530、C228、C1903、C1674、C2812、C2941、C856、C2416、C654、C3486、C85、C1017、C3193
USP35	Q9P2H5	C848、C133、C579、C782、C785、C177、C865
USP36	Q9P275	C159、C938、C1002、C93、C224、C977、C994、C777
USP37	Q86T82	C594、C436、C625
USP38	Q8NB14	C432、C157、C454、C1023、C557、C180、C272、C144
USP4	Q13107	C143、C154、C799、C958、C577、C475、C519、C464、C461、C475、C500
USP40	Q9NVE5	C277、C220、C50、C223、C50、C871、C810
USP41	Q3LFD5	C292、C320、C178
USP42	Q9H9J4	C867、C154、C157、C100
USP43	Q70EL4	C540、C757、C774、C468、C566
USP44	Q9H0E7	C604、C605、C616、C429、C515
USP45	Q70EL2	C88、C173、C367、C715、C618、C280、C364、C130、C138、C719

[0042]

USP46	P62068	C10、C79
USP47	Q96K76	C856、C1309、C45、C655、C656、C364
USP48	Q86UV5	C986、C39、C850、C1021、C80、C658、C451、C214、C652、C120、C776、C273、C48、C54、C252、C403、C763
USP49	Q70CQ1	C25、C405、C29、C38、C584
USP5	P45974	C335、C532、C821、C838、C219、C46、C195
USP50	Q70EL3	C332
USP51	Q70EK9	C336、C398、C409
USP54	Q70EL1	C532、C1562、C1452、C69、C88、C1511、C1004、C1009、C1086、C42、C1270、C124、C1096、C225
USP7	Q93009	C961、C90、C223、C315、C510、C896、C799、C702、C917
USP8	P40818	C809、C307、C214
USP9X	Q93008	C2398、C1727、C842、C673、C1237、C1566、C2390、C2239、C193、C1920、C673、C540、C1340、C2293、C577、C2107、C692、C739、C193、C1344、C182
VCPIP1	Q96JH7	C1178、C127、C538、C73、C541、C219、C469、C472
YOD1	Q5VVQ6	C97、C178、C210
ZRANB1	Q9UGI0	C473、C155、C90、C348、C270、C653、C443
ZUP1	Q96AP4	C83、C159、C230、C440、C507、C515

[0043] 在一些实施例中,去泛素化酶是OTUB1(Uniprot ID Q96FW1)。本文所述的双功能化合物可结合(例如,共价结合)OTUB1序列内的任何半胱氨酸残基,例如C23、C91、C204或C212。在一些实施例中,双功能化合物不结合OTUB1序列内的催化半胱氨酸氨基酸。在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1序列内的别构半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1表面上的半胱氨酸残基。在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1上或内部的半胱氨酸残基。

[0044] 在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1序列内的C23。在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1序列内的C91。在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1序列内的C204。在一些实施例中,双功能化合物结合OTUB1序列内的C212。在一些实施例中,双功能化合物优先结合OTUB1序列内的C23,而不是另一个半胱氨酸氨基酸残基(例如,C91、C204或C212)。在一些实施例中,双功能化合物优先结合OTUB1序列内的C23而不是C91。在一些实施例中,双功能化合物基本上不结合OTUB1序列内的C91。

[0045] 在一些实施例中,相对于不存在双功能化合物时OTUB1的活性,该双功能化合物(例如,DUB募集因子)与OTBU1的结合对OTUB1活性的调节不超过0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、

45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％。在一些实施例中，相对于不存在双功能化合物时去泛素化酶的活性，该双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUB1序列内C23的结合对OTUB1活性的调节不超过0.1％-50％、1％-50％、1％-25％、1％-10％、0.1％-10％、1％-5％、或0.1％-2％。在一些实施例中，双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUB1的结合基本上不调节(例如，抑制)OTUB1的活性(例如，去泛素化酶活性)。在一些实施例中，双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUB1序列内C23的结合基本上不调节(例如，抑制)OTUB1的活性(例如，去泛素化酶活性)。

[0046] 在一些实施例中，去泛素化酶是OTUD5(Uniprot ID Q96G74)。本文所述的双功能化合物可结合(例如，共价结合)OTUB1序列内的任何半胱氨酸残基，例如C491、C434、C519、C247、C142或C143。在一些实施例中，双功能化合物不结合OTUD5序列内的催化半胱氨酸氨基酸。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的别构半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5表面上的半胱氨酸残基。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5上或内部的半胱氨酸残基。

[0047] 在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的C491。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的C434。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的C519。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的C247。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的C142。在一些实施例中，双功能化合物结合OTUD5序列内的C143。在一些实施例中，双功能化合物优先结合OTUD5序列内的C434，而不是另一个半胱氨酸氨基酸残基(例如，C491、C519、C247、C142或C143)。在一些实施例中，双功能化合物基本上不结合OTUD5序列内的C244。

[0048] 在一些实施例中，相对于不存在双功能化合物时OTUD5的活性，该双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUD5的结合对OTUD5活性的调节不超过0.1％、0.5％、1％、1.5％、2％、2.5％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％。在一些实施例中，相对于不存在双功能化合物时去泛素化酶的活性，该双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUD5序列内C434的结合对OTUD5活性的调节不超过0.1％-50％、1％-50％、1％-25％、1％-10％、0.1％-10％、1％-5％、或0.1％-2％。在一些实施例中，双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUD5的结合基本上不调节(例如，抑制)OTUD5的活性(例如，去泛素化酶活性)。在一些实施例中，双功能化合物(例如，DUB募集因子)与OTUD5序列内C434的结合基本上不调节(例如，抑制)OTUD5的活性(例如，去泛素化酶活性)。

[0049] 在一些实施例中，去泛素化酶是USP15(Uniprot ID Q9Y4E8)。本文所述的双功能化合物可结合(例如，共价结合)USP15序列内的任何半胱氨酸残基，例如C139、C264、C289、C298、C306、C381、C448、C451、C462、C506、C570、C633、C809、C812或C873。在一些实施例中，双功能化合物不结合USP15序列内的催化半胱氨酸氨基酸。在一些实施例中，双功能化合物结合USP15序列内的别构半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中，双功能化合物结合USP15表面上的半胱氨酸残基。在一些实施例中，双功能化合物结合USP15上或内部的半胱氨酸残基。

[0050] 在一些实施例中，双功能化合物结合USP15序列内的C139。在一些实施例中，双功能化合物结合USP15序列内的C264。在一些实施例中，双功能化合物结合USP15序列内的

C289。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C298。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C306。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C381。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C448。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C451。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C462。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C506。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C570。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C633。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C809。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C812。在一些实施例中,双功能化合物结合USP15序列内的C873。在一些实施例中,双功能化合物优先结合USP15序列内的C264,而不是另一个半胱氨酸氨基酸残基(例如,C139、C264、C289、C298、C306、C381、C448、C451、C462、C506、C570、C633、C809、C812或C873)。在一些实施例中,双功能化合物基本上不结合USP15序列内的C298。

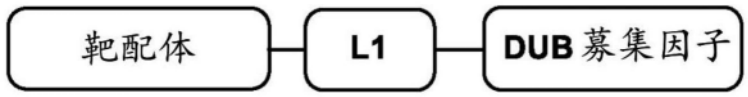
[0051] 在一些实施例中,相对于不存在双功能化合物时USP15的活性,该双功能化合物(例如,DUB募集因子)与USP15的结合对USP15活性的调节不超过0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,相对于不存在双功能化合物时去泛素化酶的活性,该双功能化合物(例如,DUB募集因子)与USP15序列内C264或C381的结合对USP15活性的调节不超过0.1%-50%、1%-50%、1%-25%、1%-10%、0.1%-10%、1%-5%、或0.1%-2%。在一些实施例中,双功能化合物(例如,DUB募集因子)与USP15的结合基本上不调节(例如,抑制)USP15的活性(例如,去泛素化酶活性)。在一些实施例中,双功能化合物(例如,DUB募集因子)与OTUD5序列内C264或C381的结合基本上不调节(例如,抑制)OTUD5的活性(例如,去泛素化酶活性)。

[0052] 双功能化合物

[0053] 本披露描述了能够结合靶蛋白和去泛素化酶(例如,同时结合靶蛋白和去泛素化酶)的双功能化合物。不受理论的束缚,这些双功能化合物使去泛素化酶接近泛素化的靶蛋白,使得去泛素化酶能够从泛素化的靶蛋白中去除一种或多种Ubl蛋白以调节靶蛋白(例如,稳定靶蛋白和/或防止靶蛋白降解)。

[0054] 在一些实施例中,调节包括以下一项或多项:(i)调节所述靶蛋白的折叠;(ii)调节所述靶蛋白的半衰期;(iii)调节所述靶蛋白向蛋白酶体的运输;(iv)调节所述靶蛋白的泛素化水平;(v)调节所述靶蛋白的降解(例如,蛋白酶体降解);(vi)调节靶蛋白信号传导;(vii)调节靶蛋白定位;(viii)调节靶蛋白向溶酶体的运输;以及(ix)调节靶蛋白与另一种蛋白的相互作用。在实施例中,调节包括(i)。在实施例中,调节包括(ii)。在实施例中,调节包括(i)。在实施例中,调节包括(iii)。在实施例中,调节包括(iv)。在实施例中,调节包括(v)。在实施例中,调节包括(vi)。在实施例中,调节包括(vii)。在实施例中,调节包括(viii)。在实施例中,调节包括(ix)。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的两项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的三项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的四项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的五项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的六项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的七项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的八项。在实施例中,调节包括(i)-(ix)中的每一项。

[0055] 在一些实施例中,双功能化合物具有式(I)的结构:

[0056] 

(I),

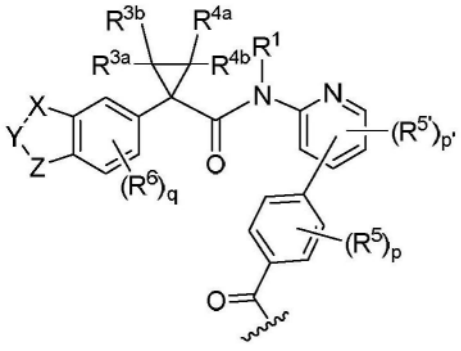
[0057] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、立体异构体或互变异构体,其中(i)靶配体包含能够结合靶蛋白的部分;(ii)L1包含接头;并且(iii)DUB募集因子包含能够结合去泛素化酶的部分。本文依次描述了具有式(I)的双功能化合物的每种组分。

[0058] 靶配体

[0059] 双功能化合物中的靶配体是能够结合靶蛋白或其他目的蛋白的小分子部分。在一些实施例中,靶配体结合本文所述的靶蛋白,例如酶、受体、膜通道、激素、转录因子、肿瘤抑制因子、离子通道、凋亡因子、致癌蛋白、表观遗传调节因子或其片段。在一些实施例中,靶配体结合激酶(例如,PKN1、BCR、MAP4K4、TYK2、MAP4K2、EPHB4、MAP4K5、MAP3K2、DDR1、TGFBR1、RIPK2、TNK1、LYN、STK10、PKMYT1、LYN、EGFR、EPHA1、GAK、SIK2、MAP2K2、SLK、PRKACB、EPHA2、WEE1、或葡糖激酶)。在一些实施例中,靶配体结合肿瘤抑制激酶(例如,WEE1)。在一些实施例中,靶配体结合连接酶(例如,E3连接酶,例如MDM2)。在一些实施例中,靶配体结合转录因子(例如,MYC)。在一些实施例中,靶配体结合肿瘤抑制因子(例如,TP53、AXIN1、BAX、CDKN1A、CKDN1C、PTEN或SMAD4)。在一些实施例中,靶配体结合单倍剂量不足靶点(例如,SMN1/2、GLUT1、CFTR、PAH、FAH或GAA)。在一些实施例中,靶配体结合膜通道(例如,CFTR)。在一些实施例中,靶配体结合CFTR或其片段(例如,ΔF508-CFTR)。在一些实施例中,靶配体结合包含序列突变(例如,I类、II类、III类、IV类或V类突变)的CFTR。在一些实施例中,靶配体结合包含以下的CFTR:选自由G551D、R177H和A445E组成的组的序列突变。

[0060] 在一些实施例中,靶配体是CFTR增效剂。在一些实施例中,靶配体包括依伐卡托(ivacaftor)、鲁马卡托(lumacaftor)、替扎卡托(tezacaftor)、埃莱克萨卡托(elexacafor)或阿森替卡托(icenticaftor)或其衍生物。在一些实施例中,靶配体是以下一项或多项中披露的化合物:美国专利号7,999,113;美国专利号8,247,436;U.S.8,410,274;WO 2011/133953;以及WO 2018/037350,其中各项通过引用以其全文并入。

[0061] 在一些实施例中,靶配体具有式(I-a)的结构:

[0062] 

(I-a)

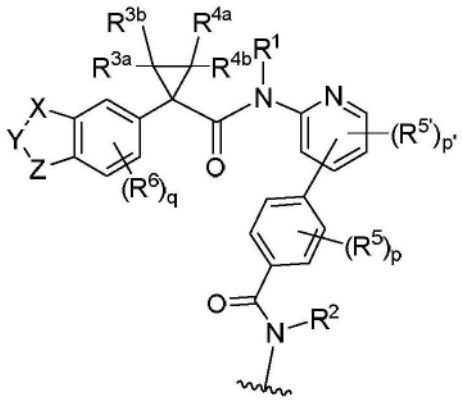
[0063] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b});Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};R^1是H或C_{1-6}烷基;R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;

R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;q是0、1、2或3;并且┣━表示与式(I)中L1的附接点。

[0064] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,Z是O。在一些实施例中,X和Z各自独立地是O。在一些实施例中,Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,R^{7a}和R^{7b}各自独立地是卤代(例如,氟代)。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是CF_2。在一些实施例中,R^{3a}和R^{3b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{4a}和R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,$R^{5'}$是C_{1-6}烷基(例如,甲基)。在一些实施例中,R^1是H。在一些实施例中,p是0。在一些实施例中,p'是1。在一些实施例中,q是0。在一些实施例中,p和q各自独立地是0。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是C_{1-6}烷基。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是甲基。

[0065] 在一些实施例中,靶配体具有式(I-b)的结构:

[0066]

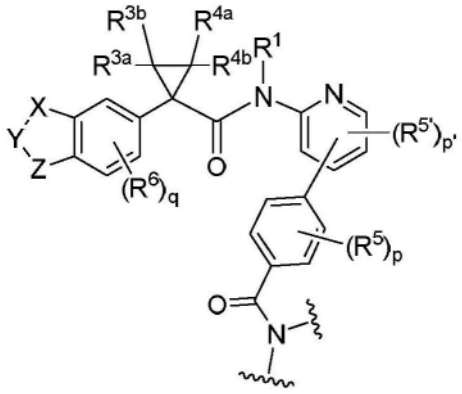


(I-b)

[0067] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b});Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};R^1是H或C_{1-6}烷基;R^2是H或C_{1-6}烷基;R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;q是0、1、2或3;并且┣━表示与式(I)中L1的附接点。

[0068] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,Z是O。在一些实施例中,X和Z各自独立地是O。在一些实施例中,Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,R^{7a}和R^{7b}各自独立地是卤代(例如,氟代)。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是CF_2。在一些实施例中,R^{3a}和R^{3b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{4a}和R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,$R^{5'}$是C_{1-6}烷基(例如,甲基)。在一些实施例中,R^1是H。在一些实施例中,R^2是H。在一些实施例中,R^1和R^2各自独立地是H。在一些实施例中,p是0。在一些实施例中,p'是1。在一些实施例中,q是0。在一些实施例中,p和q各自独立地是0。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是C_{1-6}烷基。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是甲基。

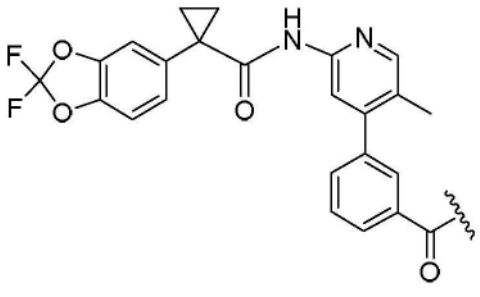
[0069] 在一些实施例中,靶配体具有式(I-c)的结构:

[0070] 

(I-c)

[0071] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b});Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};R^1是H或C_{1-6}烷基;R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;q是0、1、2或3;并且每个├─表示与式(I)中L1的附接点。

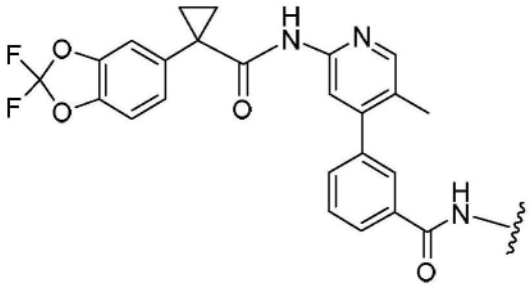
[0072] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-d)的结构:

[0073] 

(I-d)

[0074] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中├─表示与式(I)中L1的附接点。

[0075] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-ei)的结构:

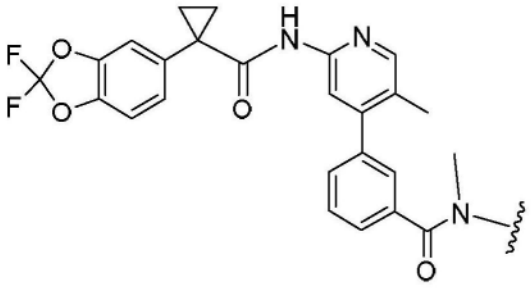
[0076] 

(I-ei)

[0077] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中

表示与式(I)中L1的附接点。

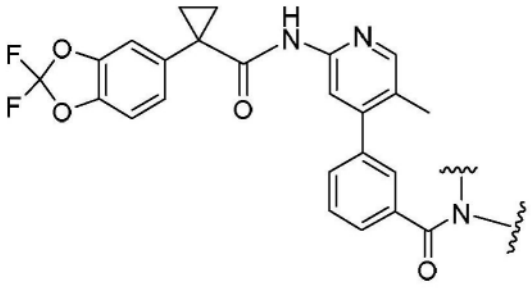
[0078] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-e-ii)的结构:

[0079] 

(I-e-ii)

[0080] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中表示与式(I)中L1的附接点。

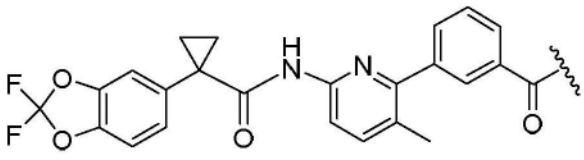
[0081] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-e-iii)的结构:

[0082] 

(I-e-iii)

[0083] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中每个独立地表示与式(I)中L1的附接点。

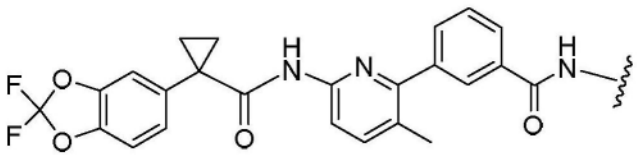
[0084] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-f)的结构:

[0085] 

(I-f)

[0086] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中表示与式(I)中L1的附接点。

[0087] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-g-i)的结构:

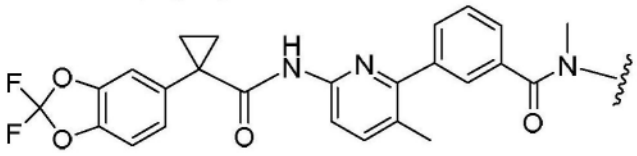
[0088] 

(I-g-i)

[0089] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中

┣━表示与式(I)中L1的附接点。

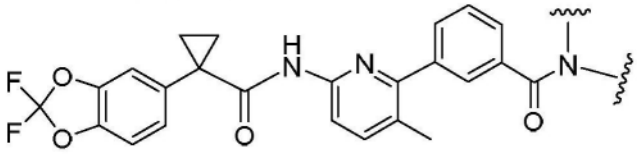
[0090] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-g-ii)的结构:

[0091] 

(I-g-ii)

[0092] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中┣━表示与式(I)中L1的附接点。

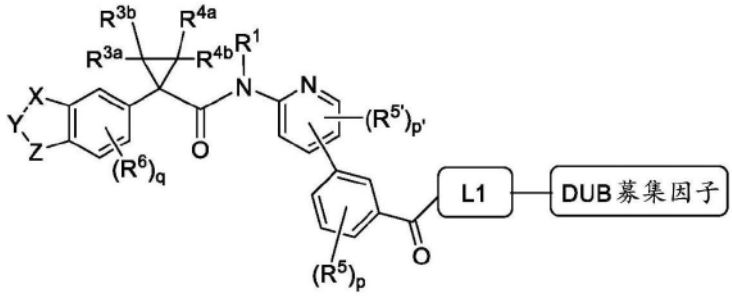
[0093] 在一些实施例中,靶配体是鲁马卡托或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-g-iii)的结构:

[0094] 

(I-g-iii)

[0095] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中┣━表示与式(I)中L1的附接点。

[0096] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-a):

[0097] 

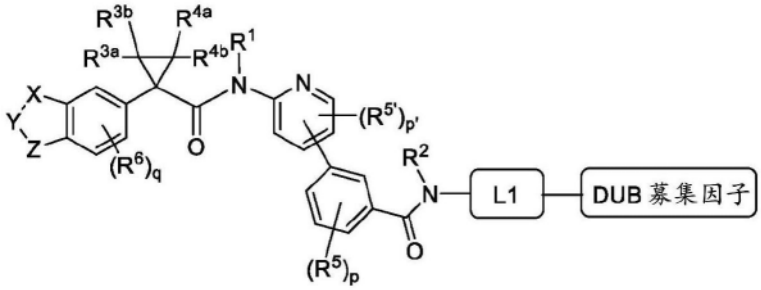
(II-a)

[0098] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b});Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c};R^1是H或C_{1-6}烷基;R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A;R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;q是0、1、2或3;并且L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

[0099] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,Z是O。在一些实施例中,X和Z各自独立地是O。在一些实施例中,Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,R^{7a}和R^{7b}各自独立地是卤代(例如,氟代)。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是CF_2。在一些实施例中,R^{3a}和R^{3b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{4a}和R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,$R^{5'}$是C_{1-6}烷基(例

如,甲基)。在一些实施例中,R^1是H。在一些实施例中,p是0。在一些实施例中,p'是1。在一些实施例中,q是0。在一些实施例中,p和q各自独立地是0。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是C_{1-6}烷基。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是甲基。

[0100] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-b-i):

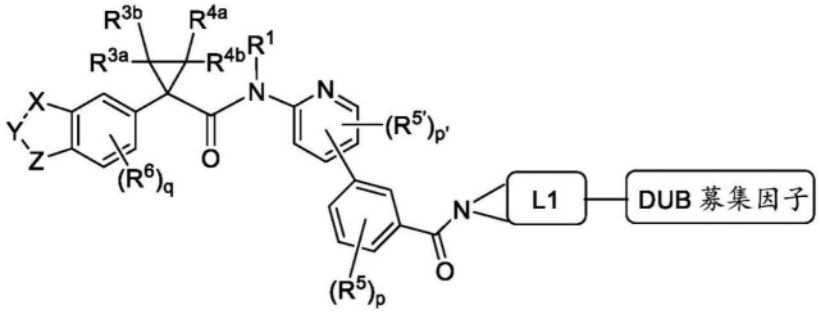
[0101] 

(II-b-i)

[0102] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O、S或$C(R^{7a})(R^{7b})$;Y是$C(R^{7a})(R^{7b})$或NR^{7c};R^1是H或C_{1-6}烷基;R^2是H或C_{1-6}烷基;R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或$-OR^A$;R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、$-OR^A$、$-C(O)N(R^B)(R^C)$、或$-N(R^B)CO(R^D)$;R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;q是0、1、2或3;并且L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

[0103] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,Z是O。在一些实施例中,X和Z各自独立地是O。在一些实施例中,Y是$C(R^{7a})(R^{7b})$。在一些实施例中,R^{7a}和R^{7b}各自独立地是卤代(例如,氟代)。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是$C(R^{7a})(R^{7b})$。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是CF_2。在一些实施例中,R^{3a}和R^{3b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{4a}和R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,$R^{5'}$是C_{1-6}烷基(例如,甲基)。在一些实施例中,R^1是H。在一些实施例中,R^2是H。在一些实施例中,R^1和R^2各自独立地是H。在一些实施例中,p是0。在一些实施例中,p'是1。在一些实施例中,q是0。在一些实施例中,p和q各自独立地是0。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是C_{1-6}烷基。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是甲基。

[0104] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-b-ii):

[0105] 

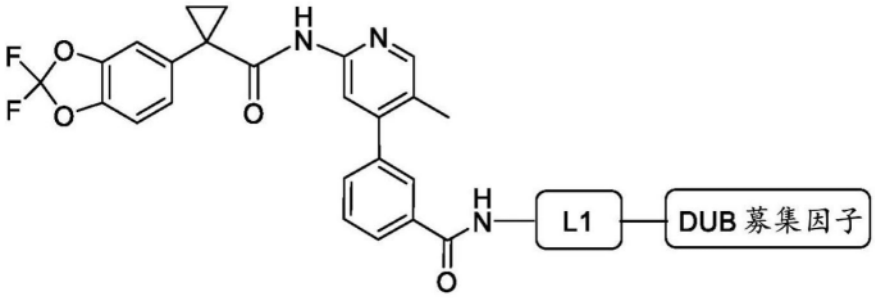
(II-b-ii)

[0106] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中X和Z各自独立地是O、S或$C(R^{7a})(R^{7b})$;Y是$C(R^{7a})(R^{7b})$或NR^{7c};R^1是H或C_{1-6}烷基;R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或$-OR^A$;R^5、$R^{5'}$和R^6各自独

立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{7c}是H或C_{1-6}烷基;R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;q是0、1、2或3;并且L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

[0107] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,Z是O。在一些实施例中,X和Z各自独立地是O。在一些实施例中,Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,R^{7a}和R^{7b}各自独立地是卤代(例如,氟代)。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是C(R^{7a})(R^{7b})。在一些实施例中,X是O,Z是O,并且Y是CF_2。在一些实施例中,R^{3a}和R^{3b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{4a}和R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H。在一些实施例中,$R^{5'}$是C_{1-6}烷基(例如,甲基)。在一些实施例中,R^1是H。在一些实施例中,R^2是H。在一些实施例中,R^1和R^2各自独立地是H。在一些实施例中,p是0。在一些实施例中,p'是1。在一些实施例中,q是0。在一些实施例中,p和q各自独立地是0。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是C_{1-6}烷基。在一些实施例中,p是0,q是0,p'是1,并且$R^{5'}$是甲基。

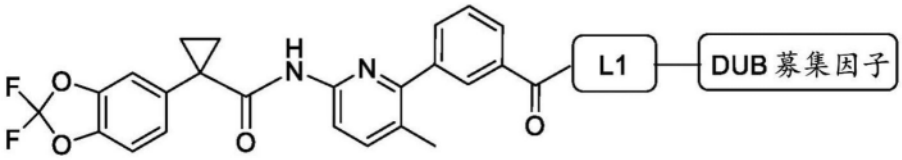
[0108] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-c):

[0109] 

(II-c)

[0110] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

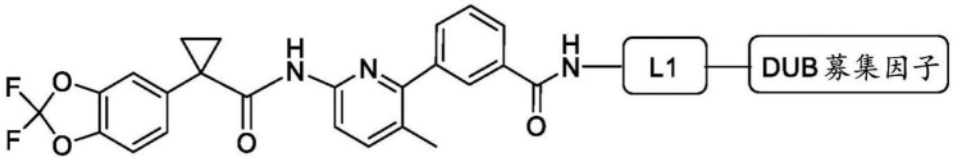
[0111] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-d):

[0112] 

(II-d)

[0113] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

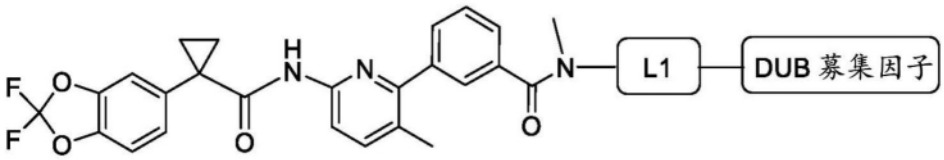
[0114] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-ei):

[0115] 

(II-ei)

[0116] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

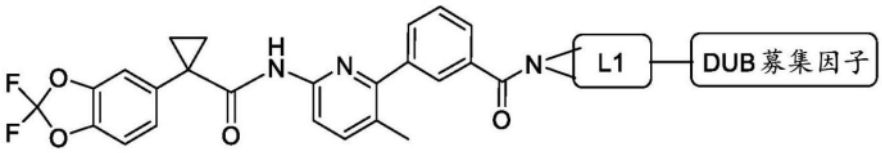
[0117] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-e-ii):

[0118] 

(II-e-ii)

[0119] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

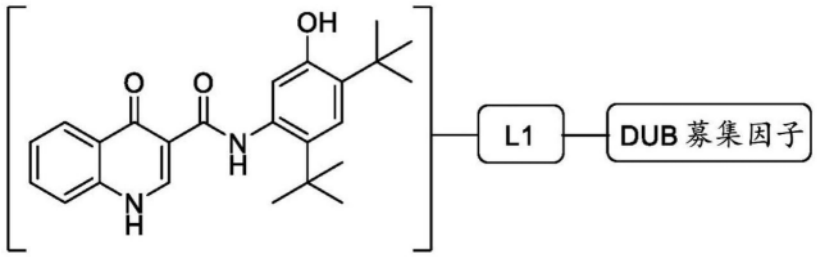
[0120] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-e-iii)：

[0121] 

(II-e-iii)

[0122] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

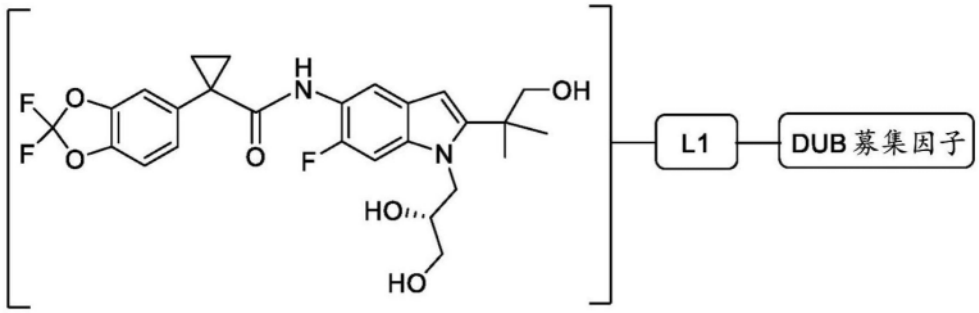
[0123] 在一些实施例中，靶配体是依伐卡托的衍生物。在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-f)：

[0124] 

(II-f)

[0125] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

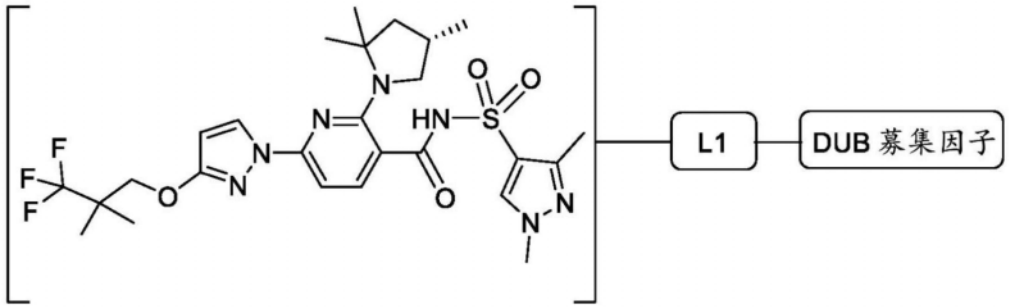
[0126] 在一些实施例中，靶配体是替扎卡托的衍生物。在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-g)：

[0127] 

(II-g)

[0128] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

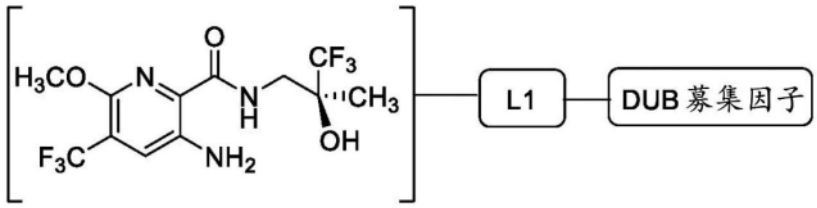
[0129] 在一些实施例中，靶配体是埃莱克萨卡托的衍生物。在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-h)：

[0130] 

(II-h)

[0131] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

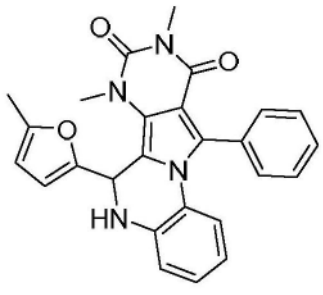
[0132] 在一些实施例中,靶配体是阿森替卡托的衍生物。在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-i):

[0133] 

(II-i)

[0134] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

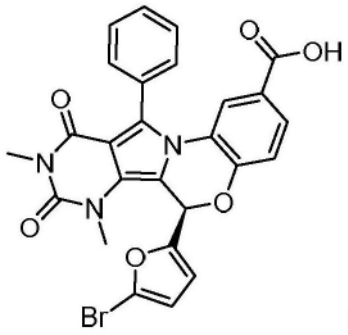
[0135] 靶配体可以调节或不调节靶蛋白的活性(例如,降低或抑制活性)。在一些实施例中,靶配体是CFTR抑制剂,其中靶配体与CFTR的结合降低其活性,例如降低约1%、2%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。在一些实施例中,靶配体是以下任一项中描述的CFTR抑制剂:WO 2014/097147;WO2014/097148;Verkman等人(2009)J Med Chem[药物化学杂志]6447;以及Verkman等人(2013)ACS Med Chem Lett[ACS药物化学快报]456,其中各项通过引用以其全文并入本文。在一些实施例中,靶向性配体是三环CFTR抑制剂。在一些实施例中,靶配体是式(IV-a)的结构:

[0136] 

(IV-a)

[0137] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体。在一些实施例中,靶配体是PPQ-102或其衍生物。

[0138] 在一些实施例中,靶配体是式(IV-b)的结构:

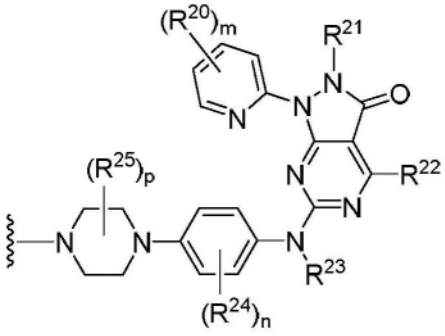
[0139] 

(IV-b)

[0140] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体。在一些实施例中,靶配体是BPO-27或其衍生物。

[0141] 在一些实施例中,靶配体是激酶抑制剂。在一些实施例中,靶配体是肿瘤抑制激酶抑制剂,例如WEE1抑制剂。示例性WEE1抑制剂包括AZD1775(即,MK1775、阿达沃塞替布(adavosertib))、MK-3652、或其相关衍生物。在一些实施例中,靶配体是AZD1775或其相关衍生物。在一些实施例中,靶配体是以下一项或多项中披露的化合物:WO 2007/126122、WO 2011/035743、WO 2008/153207、WO 2009/151997和US 2011/1035601,其中各项通过引用以其全文并入。

[0142] 在一些实施例中,靶配体具有式(I-h)的结构:

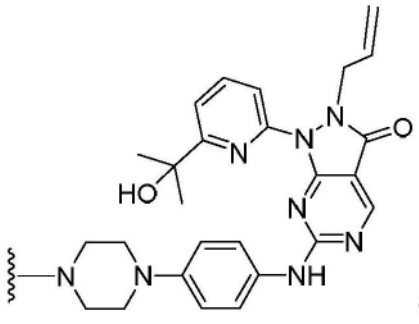
[0143] 

(I-h)

[0144] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中R^{20}、R^{24}和R^{25}各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^{21}和R^{23}各自独立地是H或C_{1-6}烷基;R^{22}是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D);R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;m和n各自独立地是0、1、2、3或4;p是0、1、2、3、4、5、6、7或8;并且├─表示与式(I)中L1的附接点。

[0145] 在一些实施例中,R^{20}是C_{1-6}杂烷基(例如,$C(CH_3)_2OH$)。在一些实施例中,R^{21}是C_{1-6}烯基(例如,$CH_2CH=CH_2$)。在一些实施例中,R^{22}是H。在一些实施例中,R^{23}是H。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,n和p各自独立地是0。

[0146] 在一些实施例中,靶配体是AZD1775或其衍生物。在一些实施例中,靶配体具有式(I-i)的结构:

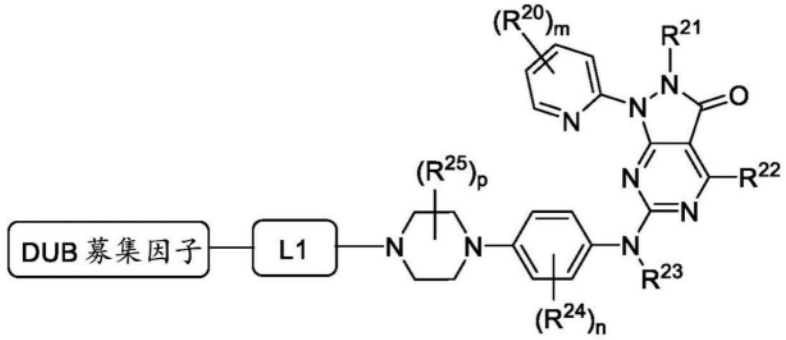
[0147] 

(I-i)

[0148] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中┣━表示与式(I)中L1的附接点。

[0149] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中┣━表示与式(I)中L1的附接点。

[0150] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-j)：

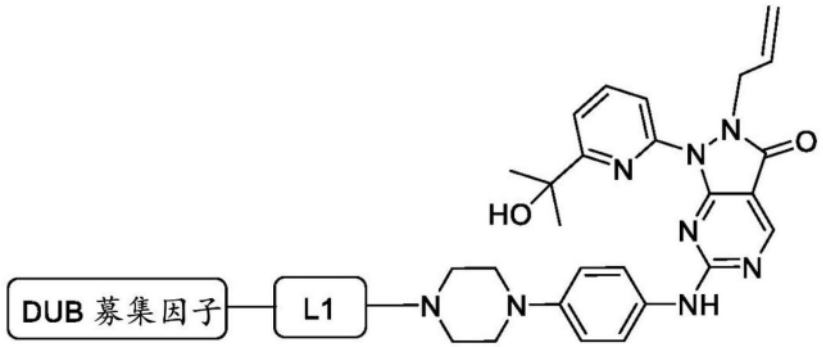
[0151] 

(II-j)

[0152] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中R^{20}、R^{24}和R^{25}各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^{21}和R^{23}各自独立地是H或C_{1-6}烷基；R^{22}是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；m和n各自独立地是0、1、2、3或4；p是0、1、2、3、4、5、6、7或8；并且L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

[0153] 在一些实施例中，R^{20}是C_{1-6}杂烷基(例如，$C(CH_3)_2OH$)。在一些实施例中，R^{21}是C_{1-6}烯基(例如，$CH_2CH=CH_2$)。在一些实施例中，R^{22}是H。在一些实施例中，R^{23}是H。在一些实施例中，m是1。在一些实施例中，n和p各自独立地是0。

[0154] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-k)：

[0155] 

(II-k)

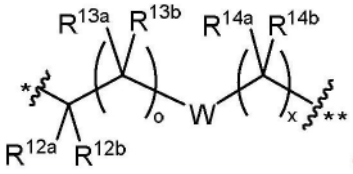
[0156] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中L1和DUB募集因子如针对式(I)所定义。

[0157] 接头

[0158] 本披露的特征在于双功能化合物，其包含由接头(即，L1)分开的靶配体和DUB募集因子。在一些实施例中，接头与靶配体共价结合。在一些实施例中，接头与DUB募集因子共价结合。在一些实施例中，接头与靶配体和DUB募集因子均共价结合。

[0159] 接头可以是可切割接头或不可切割接头。在一些实施例中，接头是不可切割接头。在一些实施例中，接头在生理条件下不会降解或水解。在一些实施例中，接头包含在例如样品或受试者的细胞(例如细胞器)或血清中不可切割的键。在一些实施例中，接头包含烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤代烷基、醚、胺、烷氧基、芳基、杂芳基、环烷基或杂环基。在一些实施例中，接头包含亚烷基或杂亚烷基。

[0160] 在一些实施例中，接头(例如，L1)具有式(III-a)的结构：

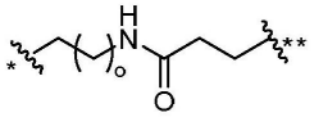
[0161] 

(III-a)

[0162] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体，其中R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}、R^{13b}、R^{14a}和R^{14b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或$-OR^{A}$；或R^{12a}和R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}、以及R^{14a}和R^{14b}各自独立地可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；W是C(R^{15a})(R^{15b})、O、N(R^{16})、或S；R^{15a}和R^{15b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或$-OR^{A}$；或R^{15a}和R^{15b}可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；R^{16}是H或C_{1-6}烷基；R^{A}是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；o和x各自独立地是0与10之间的整数；*┠─表示与式(I)中靶配体的附接点；并且**┠─表示与式(I)中DUB募集因子的附接点。

[0163] 在一些实施例中，R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}各自独立地是H。在一些实施例中，R^{14a}和R^{14b}各自与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团。在一些实施例中，W是N(R^{16})(例如，NH)。在一些实施例中，o选自2、3、4、5、和6。在一些实施例中，p选自1、2和3。

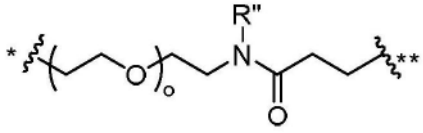
[0164] 在一些实施例中，L1具有式(III-b)的结构：

[0165] 

(III-b)

[0166] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中o是0与10之间的整数;*—表示与式(I)中靶配体的附接点;并且**—表示与式(I)中DUB募集因子的附接点。

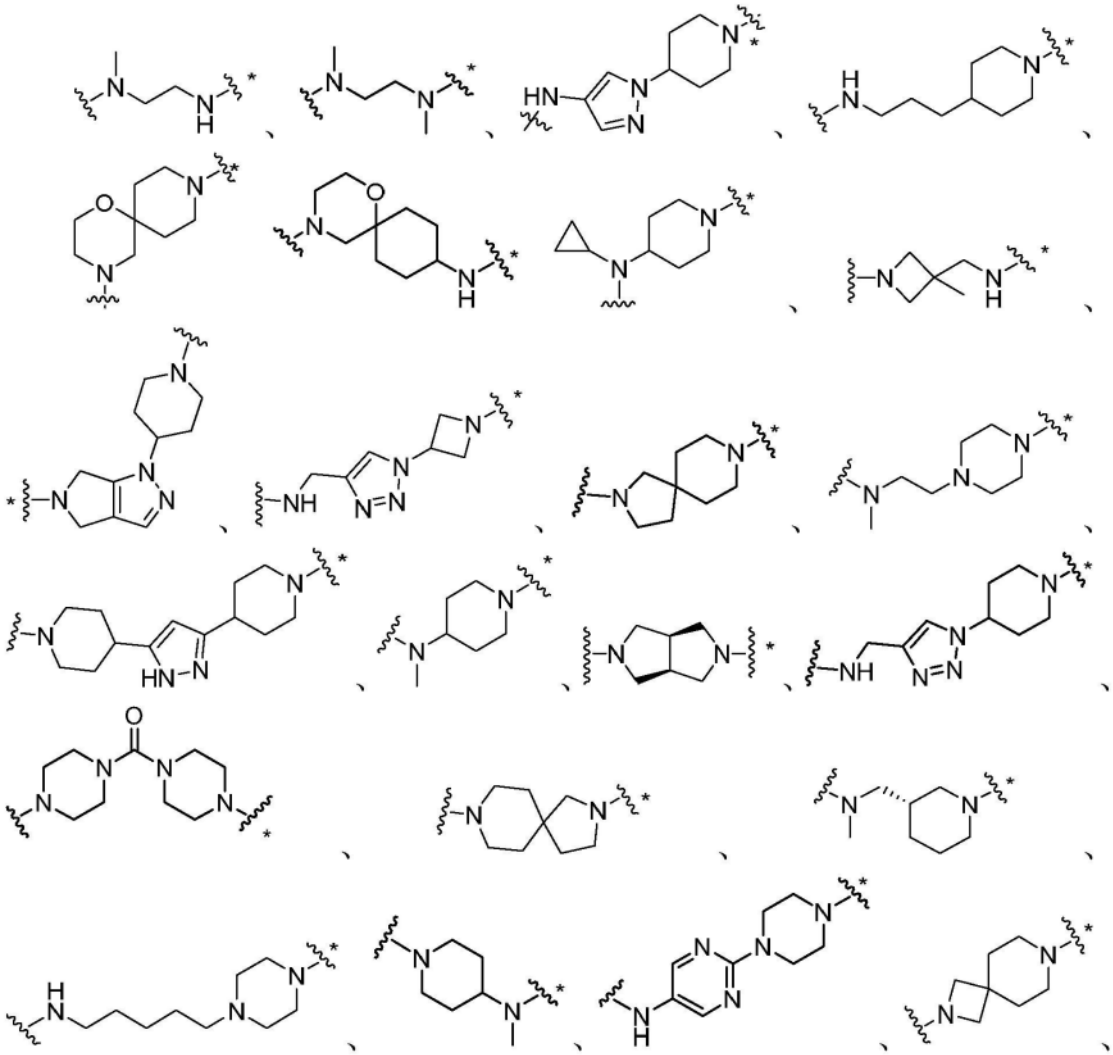
[0167] 在一些实施例中,L1具有式(III-c)的结构:

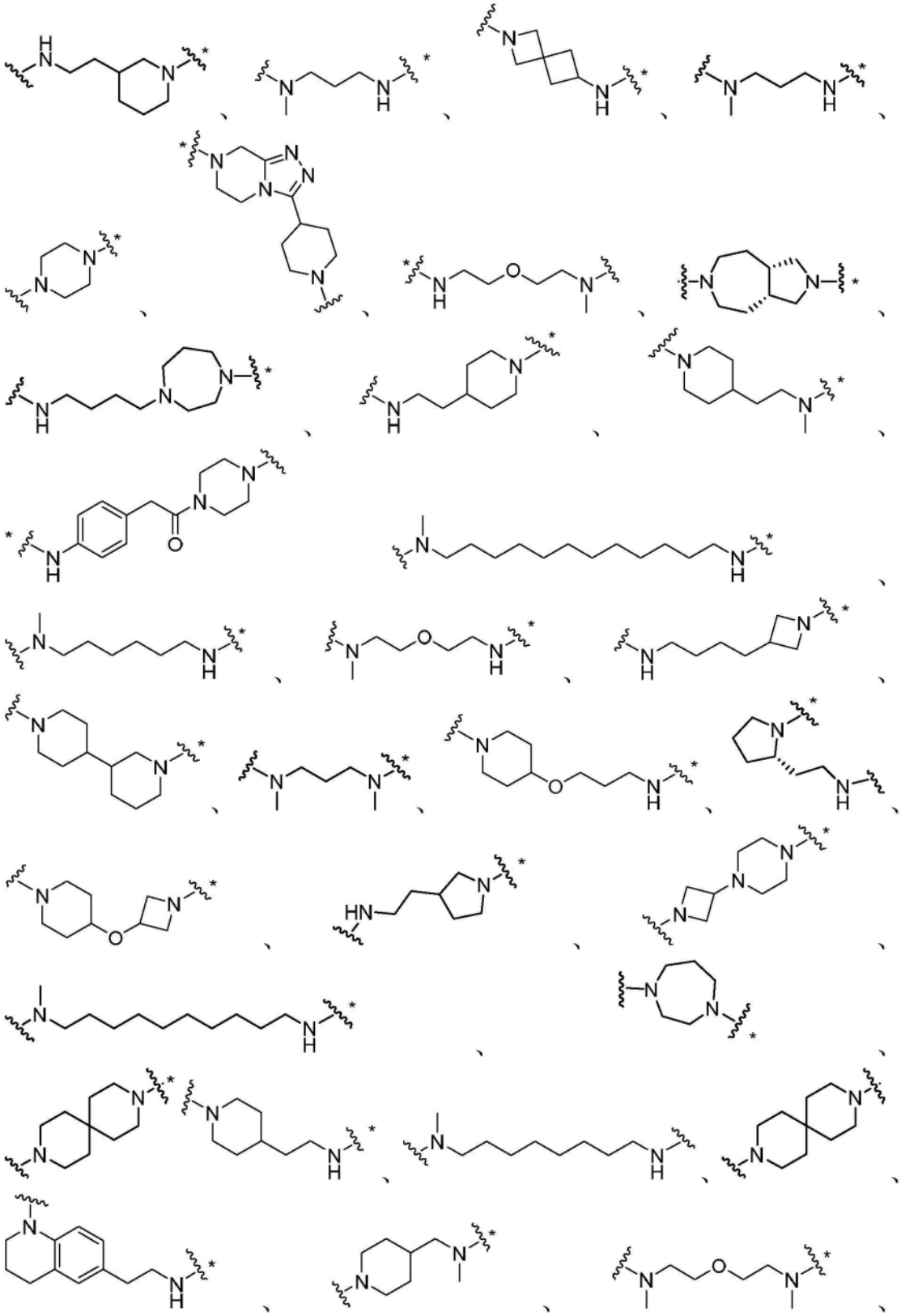
[0168] 

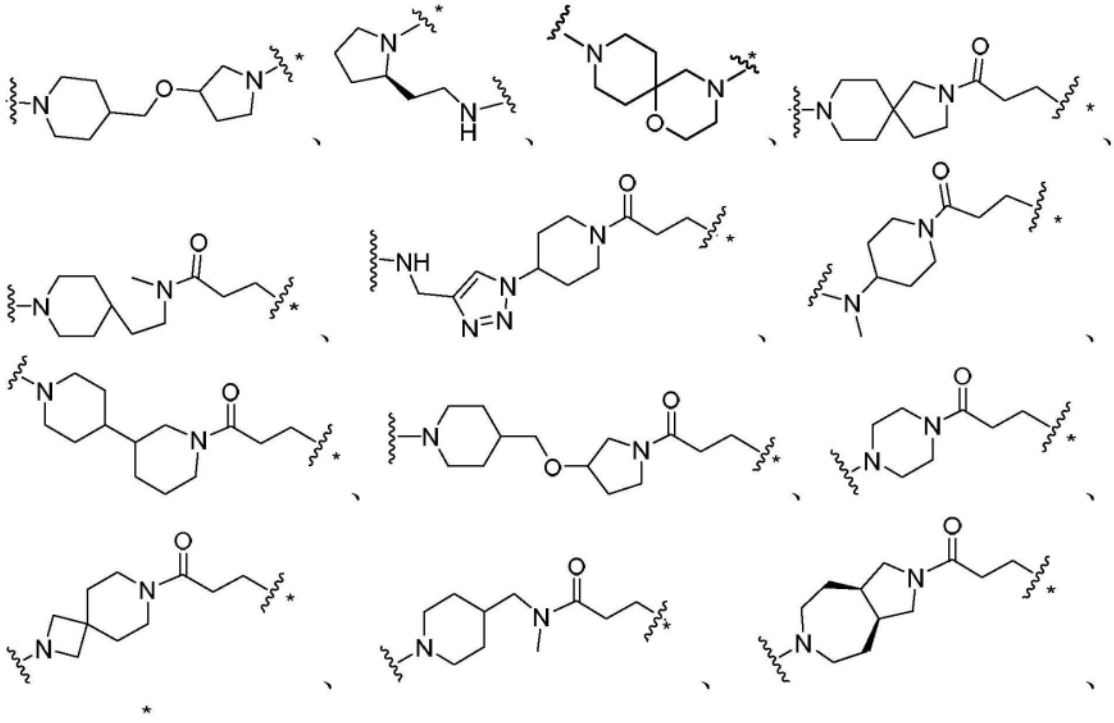
(III-c)

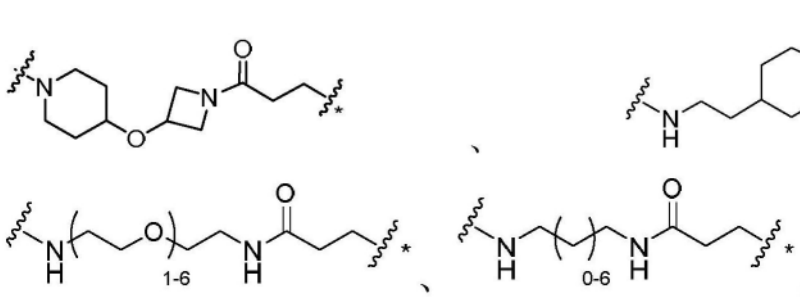
[0169] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中R”是H或C_{1-6}烷基,并且o是0与10之间的整数;*—表示与式(I)中靶配体的附接点;并且**—表示与式(I)中DUB募集因子的附接点。在一些实施例中,o是1。在一些实施例中,o是2。在一些实施例中,o是3。

[0170] 在一些实施例中,接头(例如,L1)选自由以下组成的组:

[0171] 

[0172] 

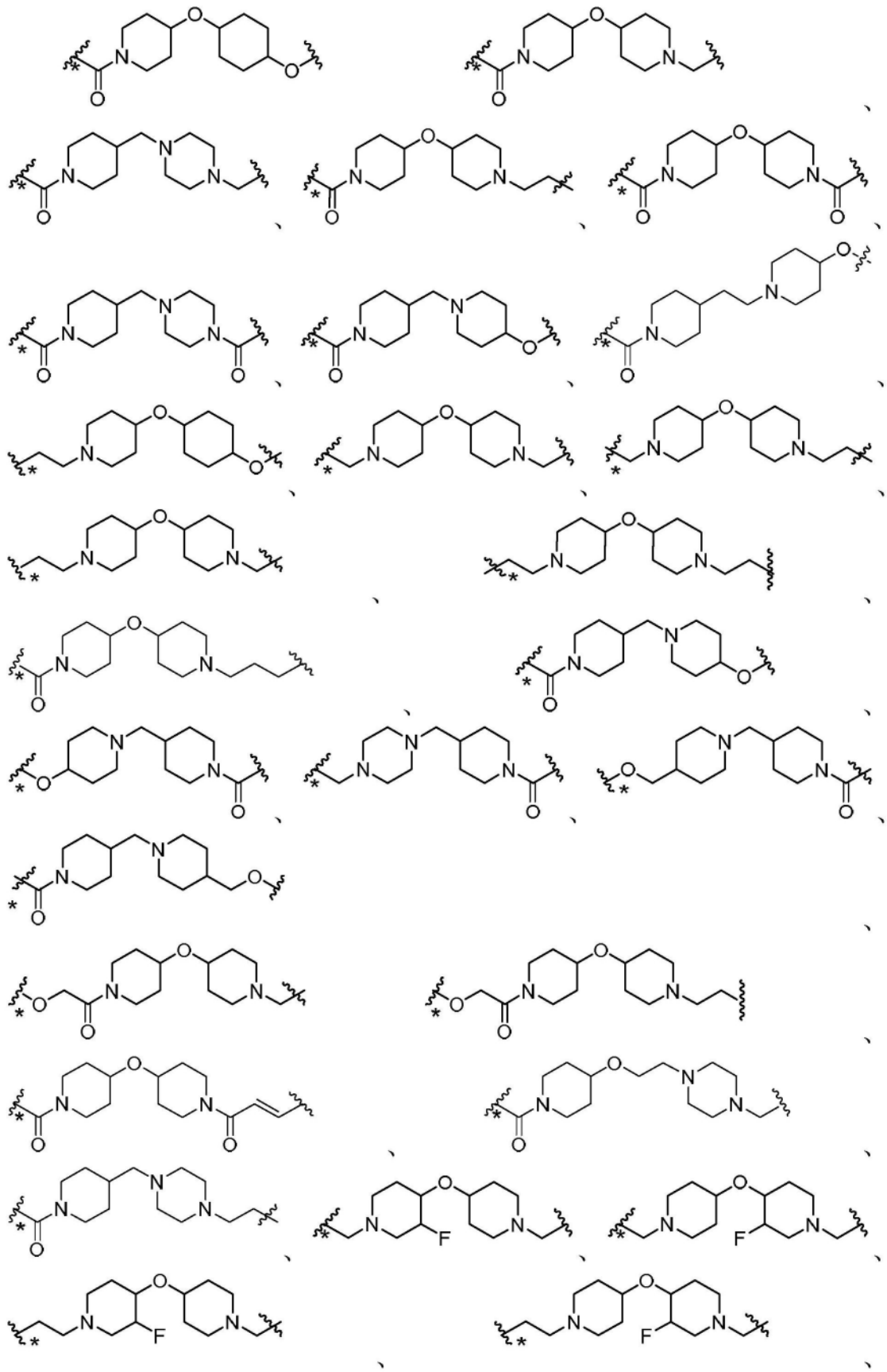
[0173] 

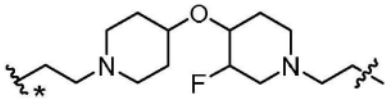
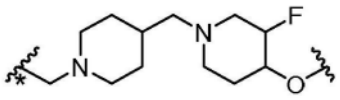
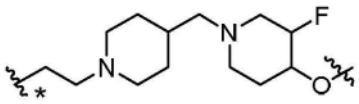
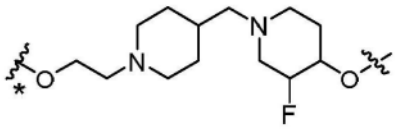
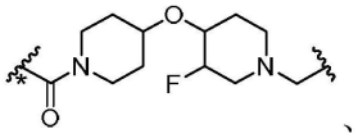
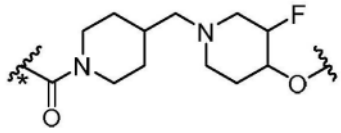
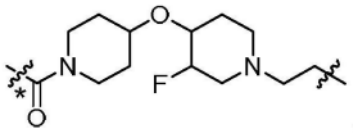
[0174] 

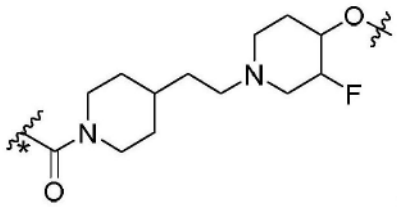
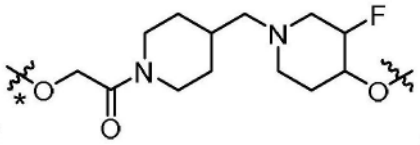
或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中“*”表示与靶配体或DUB募集因子的附接点。在一些实施例中，接头(例如，L1)是本文所述接头的变体，例如，其中接头(例如，L1)在例如与靶配体或DUB募集因子的附接点包含另外的C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基部分。

[0175] 在一些实施例中，接头是可切割接头，例如在生理条件下降解或水解的接头。在一些实施例中，接头包含在例如样品或受试者的细胞(例如细胞器)或血清中可切割的键。例如，接头可以是pH敏感的(例如，酸不稳定或碱不稳定)或通过酶的作用被切割。在实施例中，与不存在酶时接头的水解速率相比，接头的水解速率增加了至少0.5倍(例如，至少1、1.5、2、2.5、3、4、5、7.5、10、12.5、15、20、25、50、75、100、250、500、750、1000倍或更多)。在一些实施例中，酶是酯酶。在实施例中，接头包括酯、二硫化物、硫醇、腙、醚或酰胺。

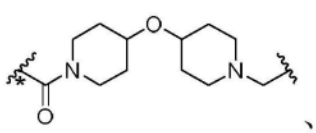
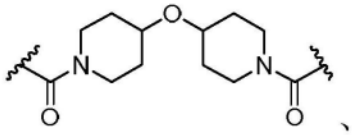
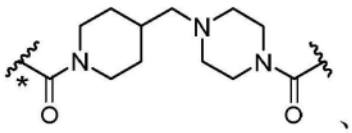
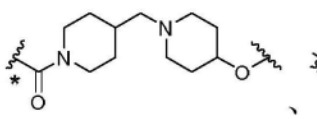
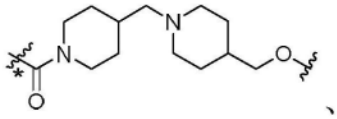
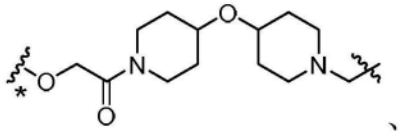
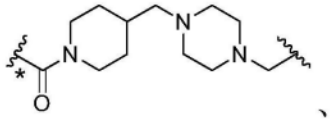
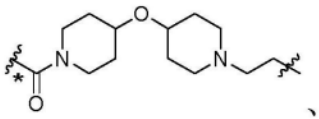
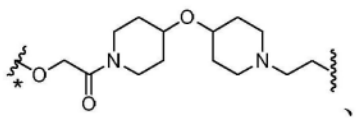
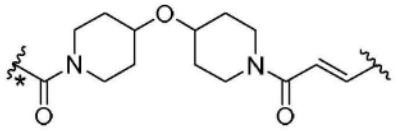
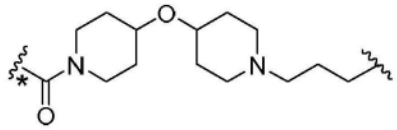
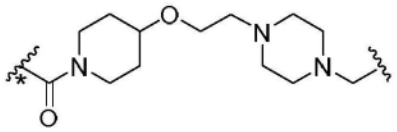
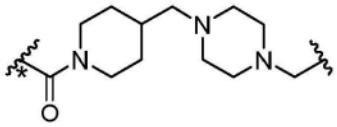
[0176] 在实施例中，接头(例如，L1)选自由以下组成的组：

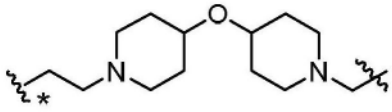
[0177] 

[0178] 、、、、、、、

[0179] 、和，或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体，其中“*”表示与靶配体或DUB募集因子的附接点。在一些实施例中，接头(例如，L1)是本文所述接头的变体，例如，其中接头(例如，L1)在例如与靶配体或DUB募集因子的附接点包含另外的C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基部分。

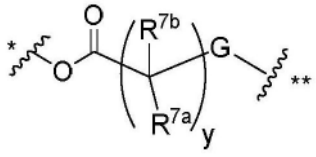
[0180] 在实施例中，接头(例如，L1)选自由以下组成的组：

[0181] 、、、、、、、、、、、、、和

[0182] ，或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体，其中“*”表示与靶配体或DUB募集因子的附接点。在一些实施例中，接头(例如，L1)是本文所述接头的变体，例如，其中接头(例如，L1)在例如与靶配体或

DUB募集因子的附接点包含另外的C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基部分。

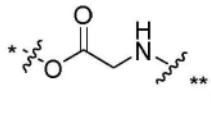
[0183] 在实施例中,L1具有式(L1-I)的结构:

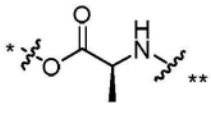
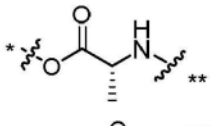
[0184] 

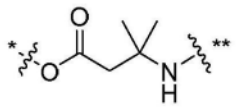
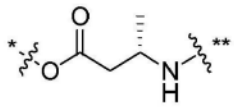
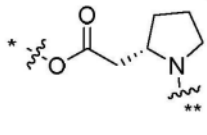
(L1-I)

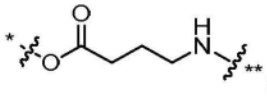
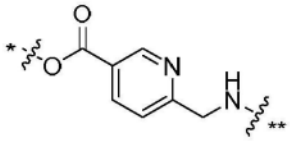
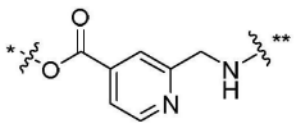
[0185] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体,其中R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基和卤代;G不存在、是C_{1-6}烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、芳基-(C_{1-6})亚烷基、杂芳基-(C_{1-6})亚烷基、芳基-(C_{1-6})杂亚烷基、杂芳基-(C_{1-6})杂亚烷基或-NR'-,其中R'是H、C_{1-6}烷基或-$(CH_2)_{1-2}$-C(O)$_2$H,其中烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基各自被0-6次出现的R^c取代,其中R^c选自由以下组成的组:卤代、-C(O)OCH_2-芳基和-C(O)OCH_2-杂芳基;y是0、1、2、3、4或5;并且"*"和"**"各自独立地表示与式(I)中靶配体或DUB募集因子的附接点。

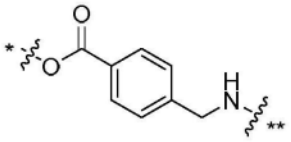
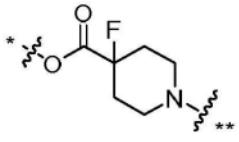
[0186] 在实施例中,L1选自由以下组成的组:

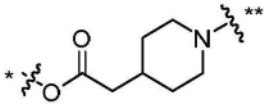
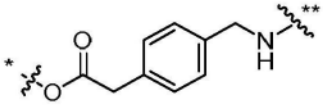


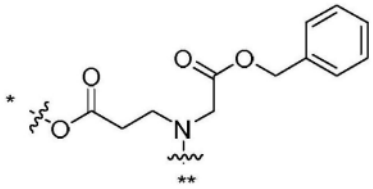
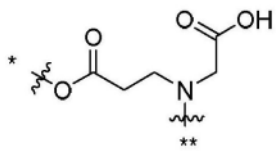
(L1-1)、(L1-2)、(L1-3)、

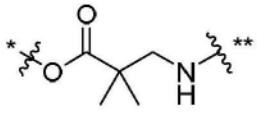
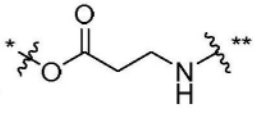
(L1-4)、(L1-5)、(L1-6)、

[0187] (L1-7)、(L1-8)、

(L1-9)、(L1-10)、(L1-11)、

(L1-12)、(L1-13)、

[0188] (L1-14)、(L1-15)、

[0189] (L1-16)、和(L1-17),或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体,其中"*"和"**"各自独立地表示与靶配体或DUB募集因子的附接点。在一些实施例中,接头(例如,L1)是本文所述接头的

变体,例如,其中接头(例如,L1)在例如与靶配体或DUB募集因子的附接点包含另外的C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基部分。

[0190] DUB募集因子

[0191] 双功能化合物中的DUB募集因子是能够结合去泛素化酶中半胱氨酸氨基酸残基的小分子部分。DUB募集因子可以共价或非共价结合去泛素化酶。在一些实施例中,DUB募集因子例如通过硫醇或硫酯键共价结合去泛素化酶。在一些实施例中,DUB募集因子非共价结合(例如离子结合)去泛素化酶。

[0192] 在一些实施例中,DUB募集因子结合例如细胞中的任何去泛素化酶,包括半胱氨酸蛋白酶去泛素化酶和金属蛋白酶去泛素化酶。在一些实施例中,DUB募集因子结合例如包含催化位点半胱氨酸氨基酸残基的半胱氨酸蛋白酶去泛素化酶。DUB募集因子可以结合全长去泛素化酶或其片段。在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶的表面。在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶的内腔。在一些实施例中,DUB募集因子结合选自由以下组成的组的去泛素化酶:BAP1、CYLD、OTUB1、OTUB2、OTUD3、OTUD5、OTUD7A、OTUD7B、TNFAIP3、UCHL1、UCHL3、UCHL5、USP10、USP11、USP12、USP13、USP14、USP15、USP16、USP17L1、USP17L2、USP17L24、USP17L3、USP17L5、USP18、USP19、USP2、USP20、USP21、USP22、USP24、USP25、USP26、USP27X、USP28、USP3、USP30、USP31、USP33、USP34、USP35、USP36、USP37、USP38、USP4、USP40、USP41、USP42、USP43、USP44、USP45、USP46、USP47、USP48、USP49、USP5、USP50、USP51、USP54、USP7、USP8、USP9X、VCPIP1、WDR48、YOD1、ZRANB1和ZUP1、或其片段或变体。在一些实施例中,DUB募集因子结合选自由以下组成的组的去泛素化酶:WDR48、YOD1、OYUD3、OTUB1、USP8、USP5、USP16、UCHL3、UCHL1和USP14、或其片段。在一些实施例中,DUB募集因子结合选自由以下组成的组的去泛素化酶:WDR48、YOD1、OYUD3、OTUB1、OTUD5、USP8、USP5、USP14、USP15、USP16、UCHL3和UCHL1、或其片段。在一些实施例中,DUB募集因子结合OTUB1或其片段或变体。在一些实施例中,DUB募集因子结合OTUD5或其片段或变体。在一些实施例中,DUB募集因子结合USP15或其片段或变体。在一些实施例中,DUB募集因子结合表1中所列去泛素化酶。

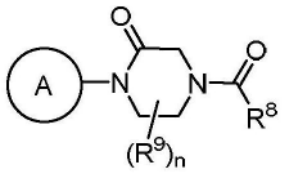
[0193] 在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶中催化位点以外的位点。在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶中的别构位点。在一些实施例中,相对于不存在DUB募集因子时去泛素化酶的活性,该DUB募集因子与去泛素化酶的结合对去泛素化酶活性的调节不超过0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,相对于不存在DUB募集因子时去泛素化酶的活性,该DUB募集因子与去泛素化酶的结合对去泛素化酶活性的调节不超过0.1%-50%、1%-50%、1%-25%、1%-10%、0.1%-10%、1%-5%、或0.1%-2%。在一些实施例中,DUB募集因子与去泛素化酶的结合基本上不调节(例如,抑制)去泛素化酶的活性(例如,去泛素化酶活性)。

[0194] 在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶中催化位点以外的位点。在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶中的别构位点。在一些实施例中,DUB募集因子结合去泛素化酶中的半胱氨酸氨基酸残基。在一些实施例中,DUB募集因子优先结合别构氨基酸残基(例如,别构半胱氨酸氨基酸残基),而不是催化氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸氨基酸残基)。在一些实施例中,DUB募集因子基本上不结合去泛素化酶的催化位点中的半胱氨酸

氨基酸残基(例如,催化半胱氨酸)。

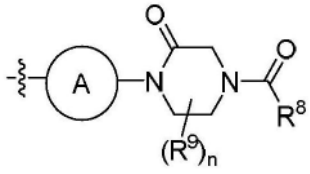
[0195] 在一些实施例中,DUB募集因子包含选自由以下组成的组的官能团:酰胺、杂环基、环烷基、杂环基、环烷基、羰基、酯、烷基、烯基、炔基、酰基或丙烯酰胺。在一些实施例中,DUB募集因子包含杂环基(例如,哌嗪壬基)。在一些实施例中,DUB募集因子包含丙烯酰胺部分。在一些实施例中,DUB募集因子包含杂芳基(例如,呋喃部分)。

[0196] 在一些实施例中,DUB募集因子具有式(V-a)的结构:

[0197] 
(V-a)

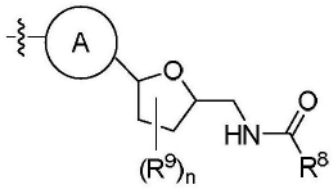
[0198] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中环A是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;R^{8}是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;每个R^{9}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^{A};每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{A}是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;并且n是0、1、2、3、4、5或6。

[0199] 在一些实施例中,DUB募集因子具有式(V-b)的结构:

[0200] 
(V-b)

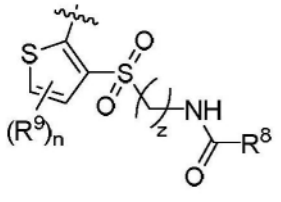
[0201] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中环A是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;R^{8}是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;每个R^{9}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^{A};每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{A}是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;并且n是0、1、2、3、4、5或6,其中表示与式(I)中L1的附接点。

[0202] 在一些实施例中,DUB募集因子具有式(V-d)的结构:

[0203] 
(V-d)

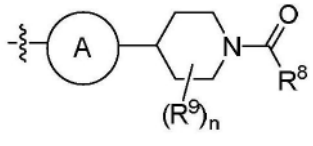
[0204] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中环A是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;R^{8}是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;每个R^{9}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^{A};每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^{A}是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;并且n是0、1、2、3、4、5或6,其中表示与式(I)中L1的附接点。

[0205] 在一些实施例中,DUB募集因子具有式(V-e)的结构:

[0206] 
(V-e)

[0207] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A;并且n是0、1或2,其中├─表示与式(I)中L1的附接点。

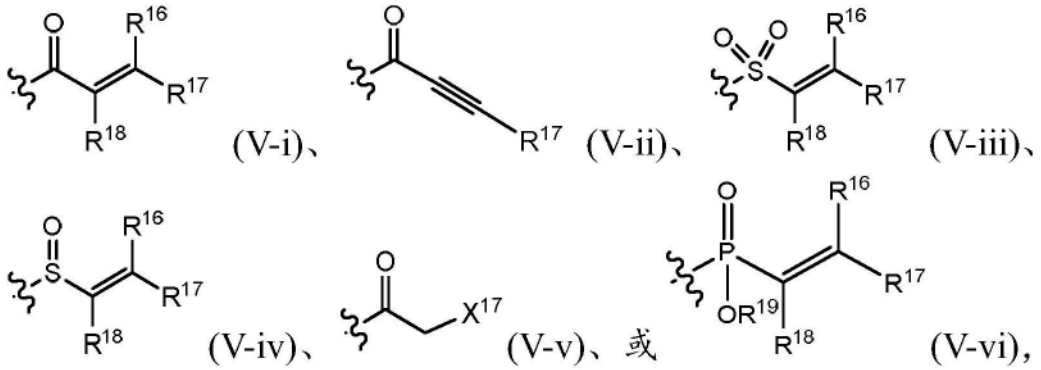
[0208] 在一些实施例中,DUB募集因子具有式(V-f)的结构:

[0209] 
(V-f)

[0210] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中环A是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A;每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^A是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;并且n是0、1、2、3、4、5、6、7、8或9,其中├─表示与式(I)中L1的附接点。

[0211] 在一些实施例中,环A是杂芳基(例如,单环杂芳基)。在一些实施例中,环A是5元杂芳基(例如,呋喃基)。在一些实施例中,R^8是亲电部分。在一些实施例中,R^8是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、叠氮基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中烷基、烯基、炔基、卤代烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基被0-12个R^{10}取代。在一些实施例中,R^8是C_{2-6}烯基(例如,$CH=CH_2$)。在一些实施例中,n是0。

[0212] 在一些实施例中,R^8是亲电部分。在一些实施例中,R^8是选自以下之一的结构:

[0213] 
(V-i)、(V-ii)、(V-iii)、(V-iv)、(V-v)、或(V-vi),

[0214] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中:

[0215] R^{16}是H、卤素、-CX^{16}_3、-CHX^{16}_2、-CH_2X^{16}、-CN、-$SO_{n16}R^{16A}$、-$SO_{v16}NR^{16A}R^{16B}$、-$NHNR^{16A}R^{16B}$、-$ONR^{16A}R^{16B}$、-NHC(O)$NHNR^{16A}R^{16B}$、-N(O)$_{m16}$、-$NR^{16A}R^{16B}$、--C(O)R^{16A}、-C(O)-OR^{16A}、-C(O)$NR^{16A}R^{16B}$、-OR^{16A}、NHC(O)$NR^{16A}R^{16B}$、-$NR^{16A}SO_2R^{16B}$、-NR^{16A}C(O)R^{16B}、-NR^{16A}C(O)OR^{16B}、-

$NR^{16A}OR^{16B}$、$-OCX^{16}_3$、$-OCHX^{16}_2$、$-OCH_2X^{16}$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基，其中烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自被0-12个R^{25}取代；

[0216] R^{17}是H、卤素、$-CX^{17}_3$、$-CHX^{17}_2$、$-CH_2X^{17}$、-CN、$-SO_{n17}R^{17A}$、$-SO_{v17}NR^{17A}R^{17B}$、$-NHNR^{17A}R^{17B}$、$-ONR^{17A}R^{17B}$、$-NHC(O)NHNR^{17A}R^{17B}$、$-NHC(O)NR^{17A}R^{17B}$、$-N(O)_{m17}$、$-NR^{17A}R^{17B}$、$-C(O)R^{17A}$、$-C(O)-OR^{17A}$、$-C(O)NR^{17A}R^{17B}$、$-OR^{17A}$、$-NR^{17A}SO_2R^{17B}$、$-NR^{17A}C(O)R^{17B}$、$-NR^{17A}C(O)OR^{17B}$、$-NR^{17A}OR^{17B}$、$-OCX^{17}_3$、$-OCHX^{17}_2$、$-OCH_2X^{17}$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，其中烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自被0-12个R^{25}取代；

[0217] R^{18}是H、卤素、$-CX^{18}_3$、$-CHX^{18}_2$、$-CH_2X^{18}$、-CN、$-SO_{n18}R^{18A}$、$-SO_{v18}NR^{18A}R^{18B}$、$-NHNR^{18A}R^{18B}$、$-ONR^{18A}R^{18B}$、$-NHC(O)NHNR^{18A}R^{18B}$、$-NHC(O)NR^{18A}R^{18B}$、$-N(O)_{m18}$、$-NR^{18A}R^{18B}$、$-C(O)R^{18A}$、$-C(O)-OR^{18A}$、$-C(O)NR^{18A}R^{18B}$、$-OR^{18A}$、$-NR^{18A}SO_2R^{18B}$、$-NR^{18A}C(O)R^{18B}$、$-NR^{18A}C(O)OR^{18B}$、$-NR^{18A}OR^{18B}$、$-OCX^{18}_3$、$-OCHX^{18}_2$、$-OCH_2X^{18}$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，其中烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自被0-12个R^{25}取代；

[0218] R^{19}是H、卤素、$-CX^{19}_3$、$-CHX^{19}_2$、$-CH_2X^{19}$、-CN、$-SO_{n19}R^{19A}$、$-SO_{v19}NR^{19A}R^{19B}$、$-NHNR^{19A}R^{19B}$、$-ONR^{19A}R^{19B}$、$-NHC(O)NHNR^{19A}R^{19B}$、$-NHC(O)NR^{19A}R^{19B}$、$-N(O)_{m19}$、$-NR^{19A}R^{19B}$、$-C(O)R^{19A}$、$-C(O)-OR^{19A}$、$-C(O)NR^{19A}R^{19B}$、$-OR^{19A}$、$-NR^{19A}SO_2R^{19B}$、$-NR^{19A}C(O)R^{19B}$、$-NR^{19A}C(O)OR^{19B}$、$-NR^{19A}OR^{19B}$、$-OCX^{19}_3$、$-OCHX^{19}_2$、$-OCH_2X^{19}$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，其中烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自被0-12个R^{25}取代；

[0219] R^{16A}、R^{16B}、R^{17A}、R^{17B}、R^{18A}、R^{18B}、R^{19A}和R^{19B}各自独立地是H、$-CX_3$、$-CHX_2$、$-CH_2X$、-CN、-OH、-COOH、$-CONH_2$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基；或者

[0220] 与相同氮原子键合的R^{16A}和R^{16B}取代基可以任选地连接形成杂环基或杂芳基；

[0221] 与相同氮原子键合的R^{17A}和R^{17B}取代基可以任选地连接形成杂环基或杂芳基；

[0222] 与相同氮原子键合的R^{18A}和R^{18B}取代基可以任选地连接形成杂环基或杂芳基；

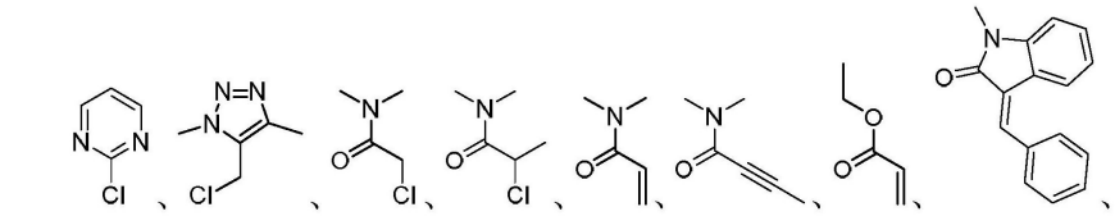
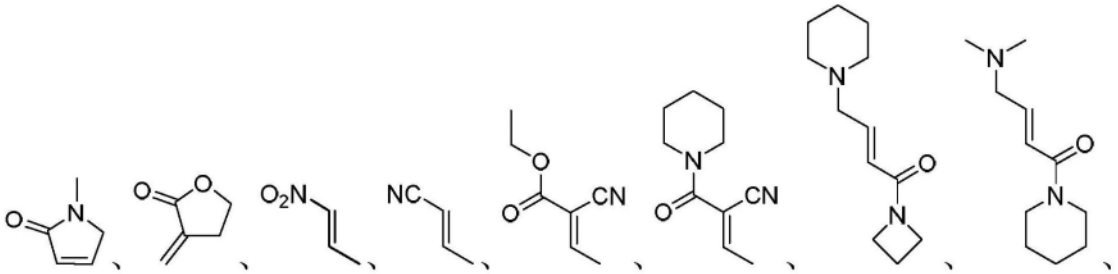
[0223] 与相同氮原子键合的R^{19A}和R^{19B}取代基可以任选地连接形成杂环基或杂芳基；

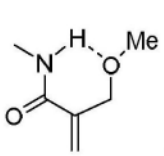
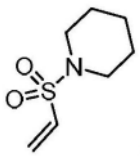
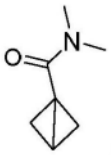
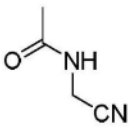
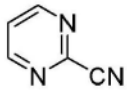
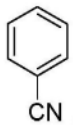
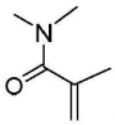
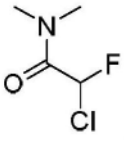
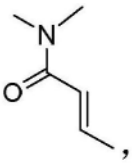
[0224] X、X^{16}、X^{17}、X^{18}和X^{19}各自独立地是-F、-Cl、-Br或-I；

[0225] n16、n17、n18和n19独立地是0至4的整数；并且

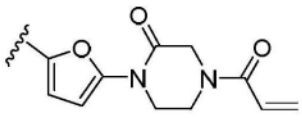
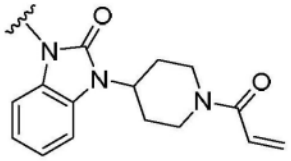
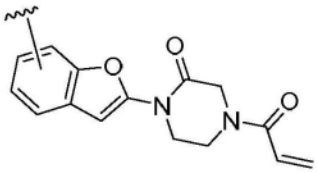
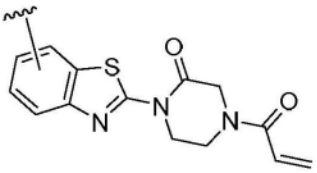
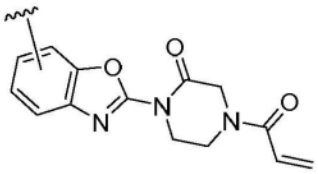
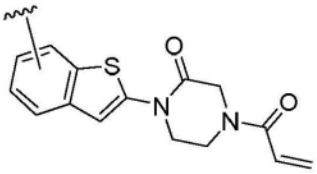
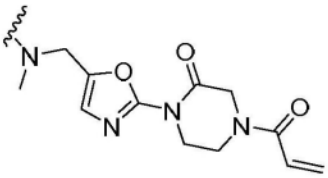
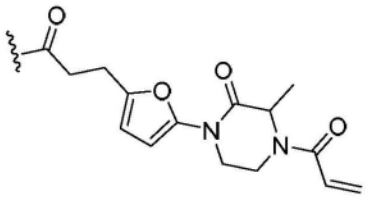
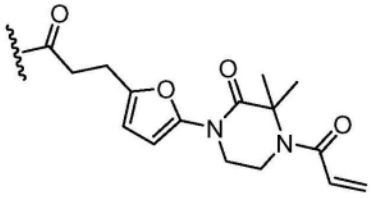
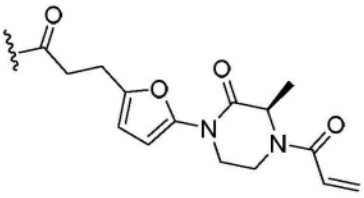
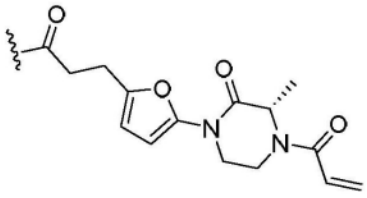
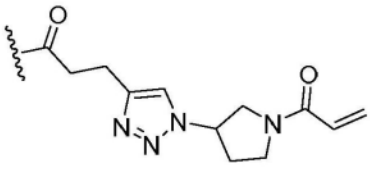
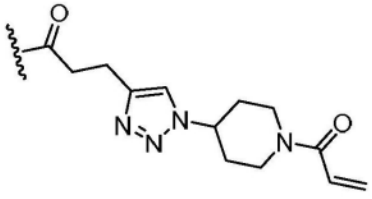
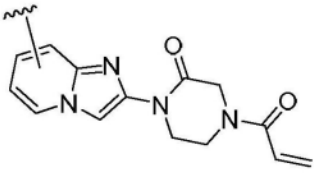
[0226] m16、m17、m18、m19、v16、v17、v18和v19独立地是1或2。

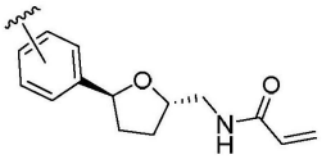
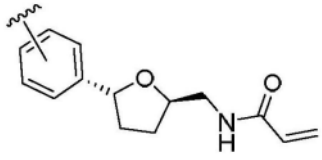
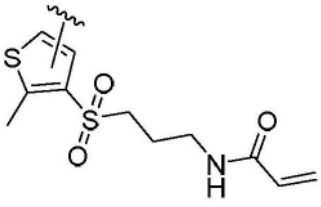
[0227] 在一些实施例中，R^8选自由以下组成的组：

[0228] 


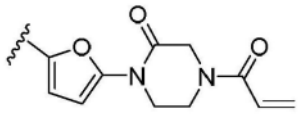
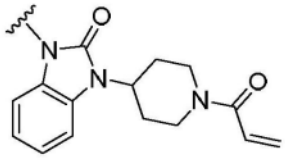
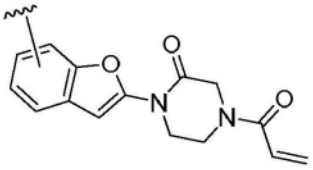
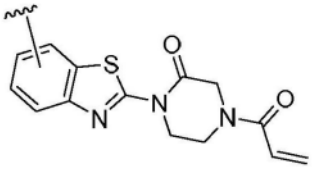
[0229] 、、、、、、、、和，其中亲电部分在任何位置与具有式(V-a)的结构结合。

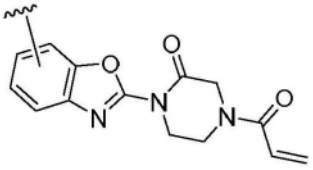
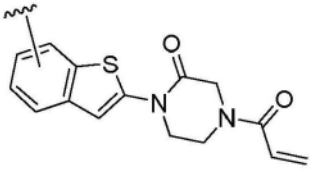
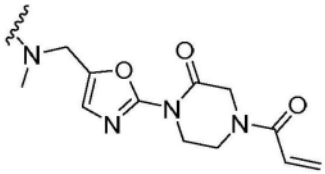
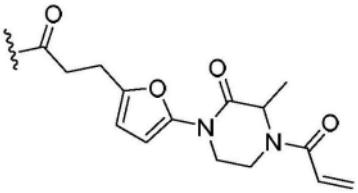
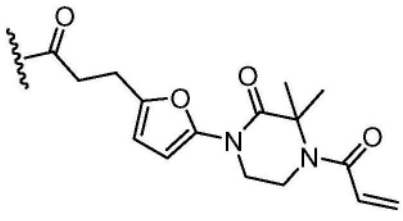
[0230] 在一些实施例中,DUB募集因子选自由以下组成的组：

[0231] (100)、(101)、(102)、(103)、(104)、(105)、(106)、(107)、(108)、(109)、(110)、(111)、(112)、(113)、

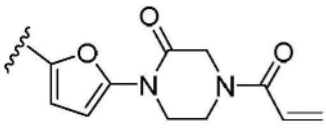
[0232]  (114) 、  (115) 、 和  (116), 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中┣━表示与式(I)中L1的附接点。

[0233] 在一些实施例中,DUB募集因子选自由以下组成的组:

 (100) 、  (101) 、  (102) 、  (103) 、

[0234]  (104) 、  (105) 、  (106) 、  (107) 、 和  (108), 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中┣━表示与式(I)中L1的附接点。

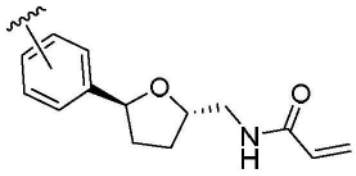
[0235] 在一些实施例中,DUB募集因子是化合物100:

[0236]  (100)

[0237] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中

├─表示与式(I)中L1的附接点。

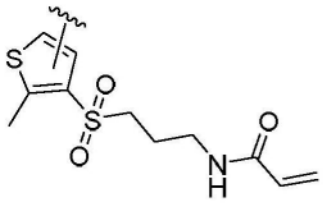
[0238] 在一些实施例中,DUB募集因子是化合物114:

[0239] 

(114)

[0240] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中├─表示与式(I)中L1的附接点。

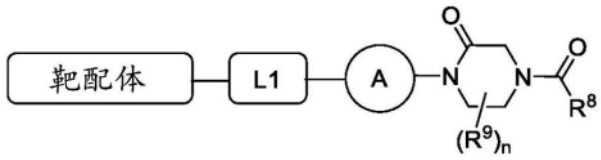
[0241] 在一些实施例中,DUB募集因子是化合物116:

[0242] 

(116)

[0243] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中├─表示与式(I)中L1的附接点。

[0244] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-k):

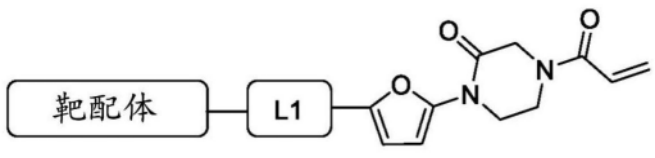
[0245] 

(II-k)

[0246] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中环A是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个被0-12个R^{10}取代;R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分;每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A;每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代;R^A是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;n是0、1、2、3、4、5或6;其中靶配体和L1如针对式(I)所定义。

[0247] 在一些实施例中,环A是杂芳基(例如,单环杂芳基)。在一些实施例中,环A是5元杂芳基(例如,呋喃基)。在一些实施例中,R^8是亲电部分。在一些实施例中,R^8是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、叠氮基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中烷基、烯基、炔基、卤代烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基被0-12个R^{10}取代。在一些实施例中,R^8是C_{2-6}烯基(例如,$CH=CH_2$)。在一些实施例中,n是0。

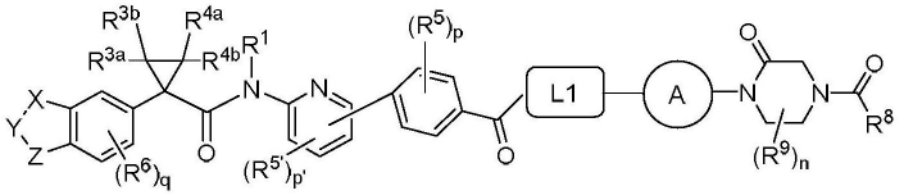
[0248] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-l):

[0249] 

(II-l)

[0250] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中靶配体和L1如针对式(I)所定义。

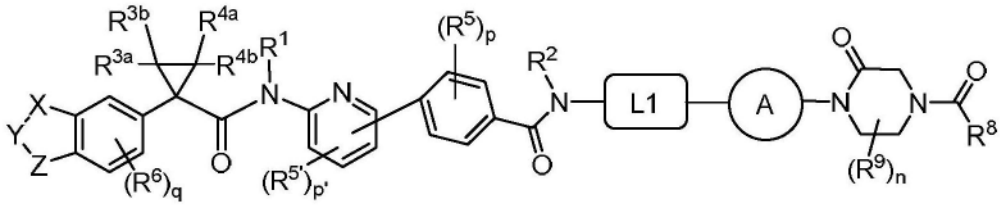
[0251] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-m)：

[0252] 

(II-m)

[0253] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b})；Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c}；环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基，其中每个被0-12个R^{10}取代；R^1是H或C_{1-6}烷基；R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^{7c}是H或C_{1-6}烷基；R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A；每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；n是0、1、2、3、4、5或6；p是0、1、2、3或4；p'是0、1、2、3或4；q是0、1、2或3；并且L1如式(I)中所定义。

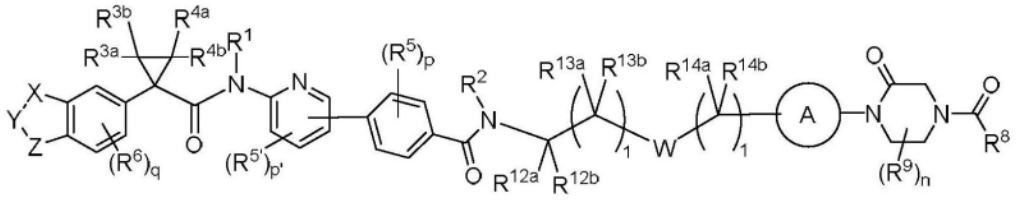
[0254] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-n)：

[0255] 

(II-n)

[0256] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b})；Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c}；环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基，其中每个被0-12个R^{10}取代；R^1是H或C_{1-6}烷基；R^2是H或C_{1-6}烷基；R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^{7c}是H或C_{1-6}烷基；R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A；每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；n是0、1、2、3、4、5或6；p是0、1、2、3或4；p'是0、1、2、3或4；q是0、1、2或3；并且L1如式(I)中所定义。

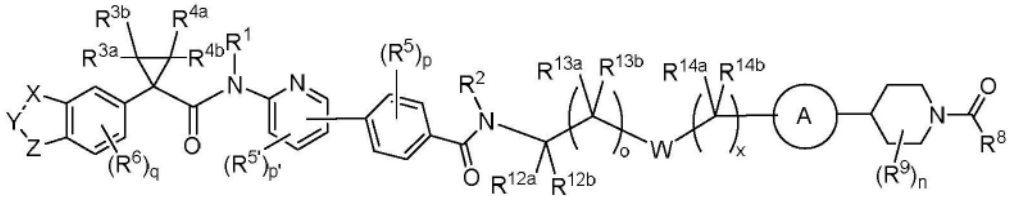
[0257] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-o)：

[0258] 

(II-o)

[0259] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b})；Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c}；环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基，其中每个被0-12个R^{10}取代；R^1是H或C_{1-6}烷基；R^2是H或C_{1-6}烷基；R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^{7c}是H或C_{1-6}烷基；R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A；每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}、R^{13b}、R^{14a}和R^{14b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；或R^{12a}和R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}、以及R^{14a}和R^{14b}各自独立地可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；W是C(R^{15a})(R^{15b})、O、N(R^{16})、或S；R^{15a}和R^{15b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；或R^{15a}和R^{15b}可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；R^{16}是H或C_{1-6}烷基；R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；n是0、1、2、3、4、5或6；o和x各自独立地是0与10之间的整数；p是0、1、2、3或4；p'是0、1、2、3或4；并且q是0、1、2或3。

[0260] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-v)：

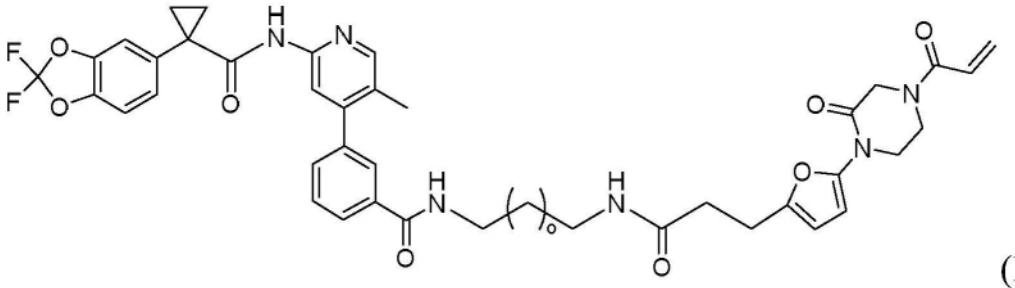
[0261] 

(II-v)

[0262] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中X和Z各自独立地是O、S或C(R^{7a})(R^{7b})；Y是C(R^{7a})(R^{7b})或NR^{7c}；环A是环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基，其中每个被0-12个R^{10}取代；R^1是H或C_{1-6}烷基；R^2是H或C_{1-6}烷基；R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；R^5、$R^{5'}$和R^6各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^{7a}和R^{7b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^{7c}是H或C_{1-6}烷基；R^8是H、C_{1-6}烷基或亲电部分；每个R^9独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代或-OR^A；每个R^{10}独立地是C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基或卤代；R^{12a}、R^{12b}、R^{13a}、R^{13b}、R^{14a}和R^{14b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；或R^{12a}和R^{12b}、R^{13a}和R^{13b}、以及R^{14a}和R^{14b}各自独立地可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；W是C(R^{15a})(R^{15b})、O、N(R^{16})、或S；R^{15a}和R^{15b}各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基或-OR^A；或R^{15a}和R^{15b}可以与它们所附接的碳原子一起形成氧代基团；R^{16}是H或C_{1-6}烷基；R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环

基、芳基或杂芳基;n是0、1、2、3、4、5或6;o和x各自独立地是0与10之间的整数;p是0、1、2、3或4;p'是0、1、2、3或4;并且q是0、1、2或3。

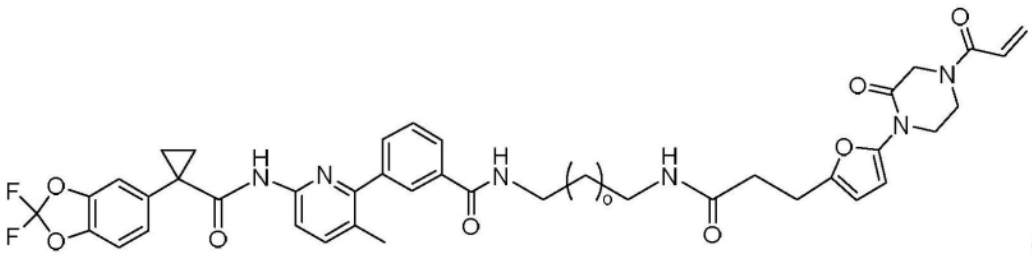
[0263] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-p):

[0264] 

(II-p)

[0265] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中o选自0、1、2、3、4、5和6。在一些实施例中,o是0。在一些实施例中,o是1。在一些实施例中,o是2。在一些实施例中,o是3。在一些实施例中,o是4。

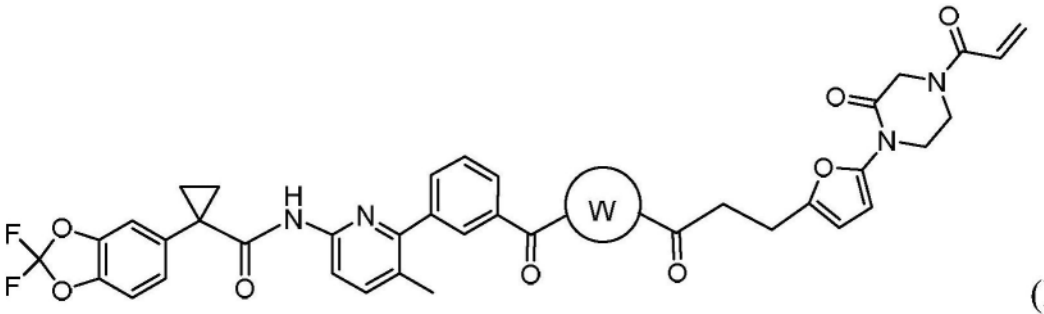
[0266] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-q):

[0267] 

(II-q)

[0268] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中o选自0、1、2、3、4、5和6。在一些实施例中,o是0。在一些实施例中,o是1。在一些实施例中,o是2。在一些实施例中,o是3。在一些实施例中,o是4。

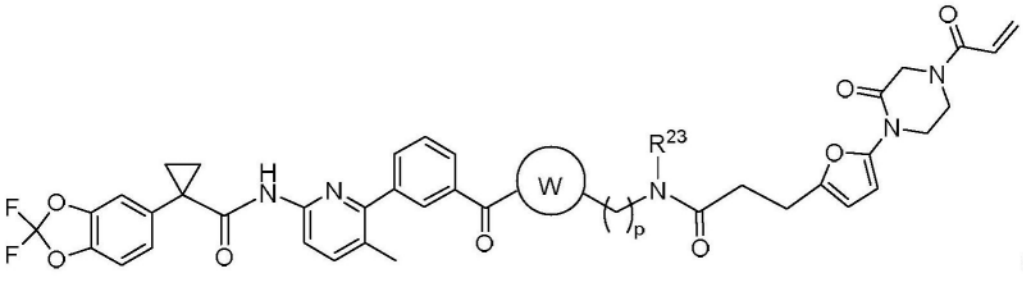
[0269] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-r):

[0270] 

(II-r)

[0271] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,其中W是杂环基(例如,单环杂环基或双环杂环基)。在一些实施例中,W是含氮杂环基。

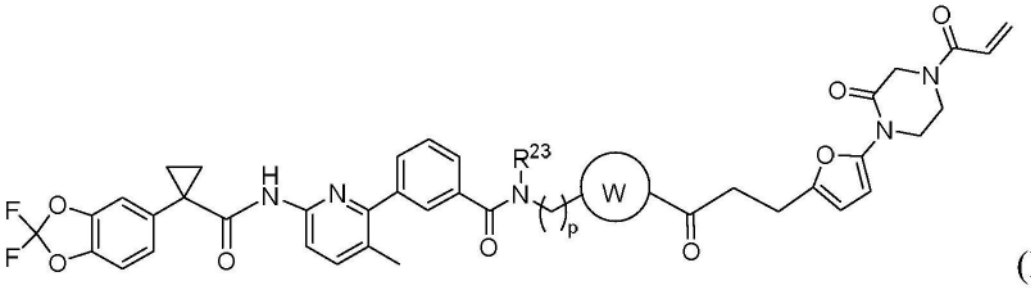
[0272] 在一些实施例中,具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-s):

[0273] 

(II-s)

[0274] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中W是杂环基(例如，单环杂环基或双环杂环基)；R^{23}是H或C_{1-6}烷基；并且p选自0、1、2、3或4。在一些实施例中，W是含氮杂环基。在一些实施例中，R^{23}是C_{1-6}烷基。在一些实施例中，p是1或2。

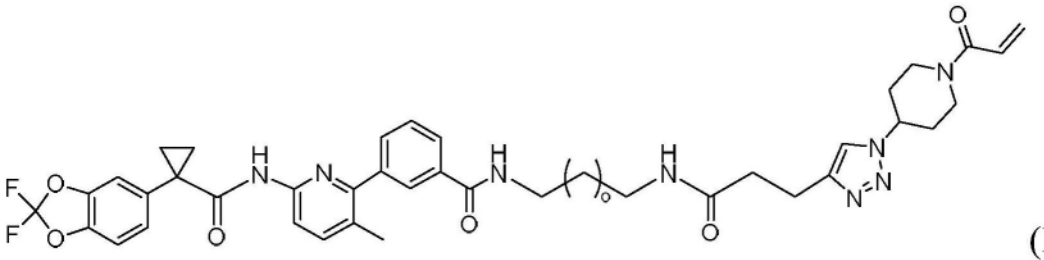
[0275] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-t)：

[0276] 

(II-t)

[0277] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中W是杂环基(例如，单环杂环基或双环杂环基)；R^{23}是H或C_{1-6}烷基；并且p选自0、1、2、3或4。在一些实施例中，W是含氮杂环基。在一些实施例中，R^{23}是H。在一些实施例中，p是1或2。

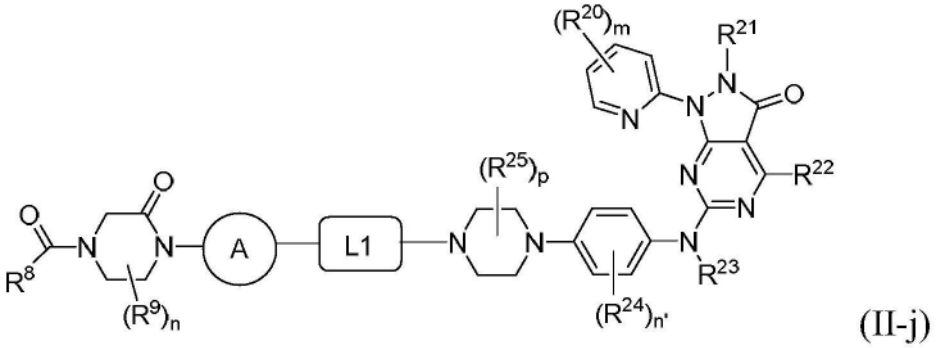
[0278] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-u)：

[0279] 

(II-u)

[0280] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中o选自0、1、2、3、4、5和6。在一些实施例中，o是0。在一些实施例中，o是1。在一些实施例中，o是2。在一些实施例中，o是3。在一些实施例中，o是4。

[0281] 在一些实施例中，具有式(I)的双功能化合物具有结构(II-j)：

[0282] 

(II-j)

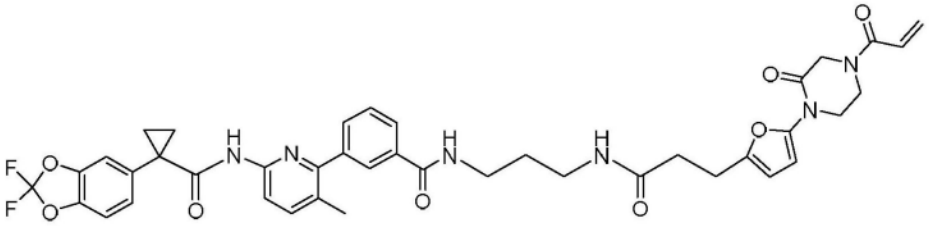
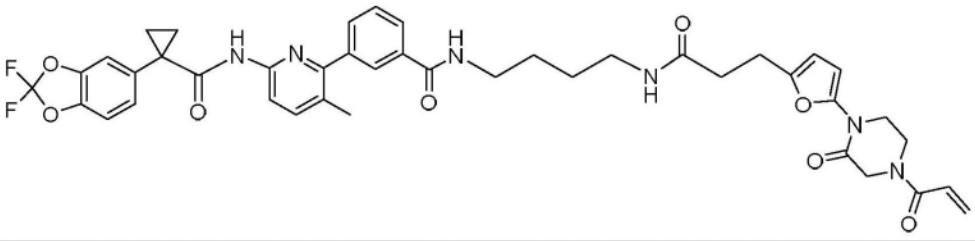
[0283] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体，其中

R^{20}、R^{24}和R^{25}各自独立地是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^{21}和R^{23}各自独立地是H或C_{1-6}烷基；R^{22}是C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、卤代、氰基、-OR^A、-C(O)N(R^B)(R^C)、或-N(R^B)CO(R^D)；R^A、R^B、R^C和R^D各自独立地是H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；m和n'各自独立地是0、1、2、3或4；p是0、1、2、3、4、5、6、7或8；L1如式(I)中所定义。

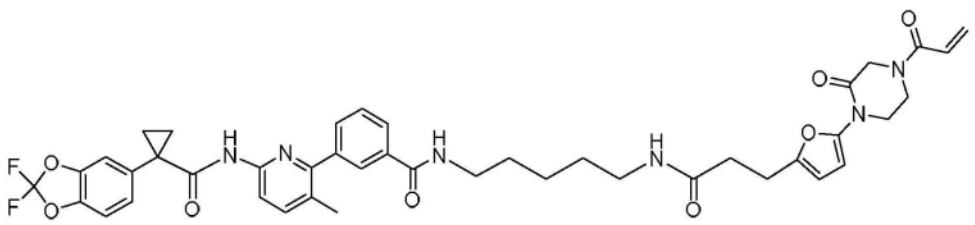
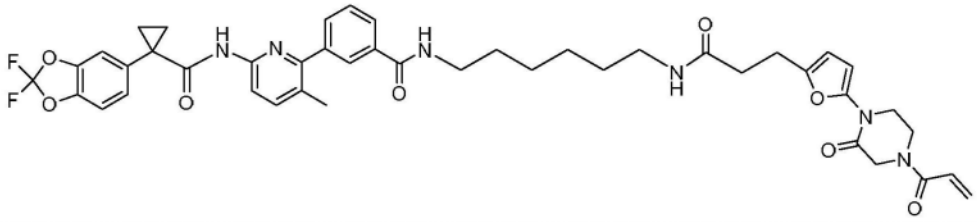
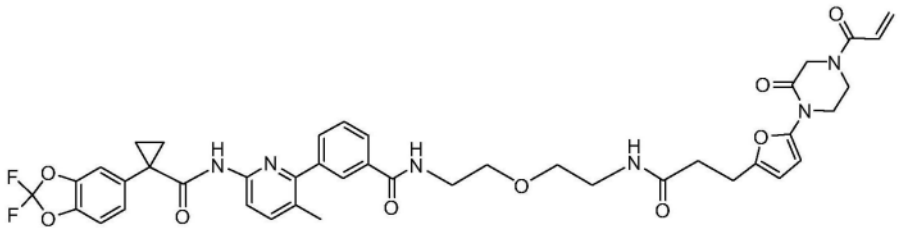
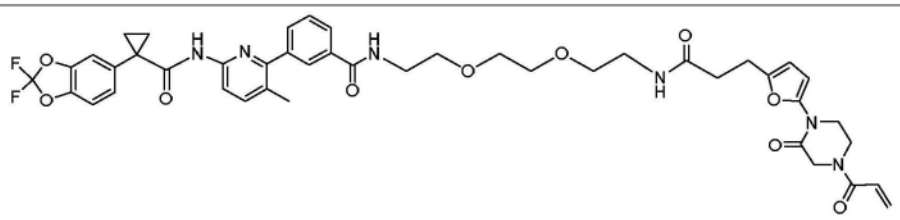
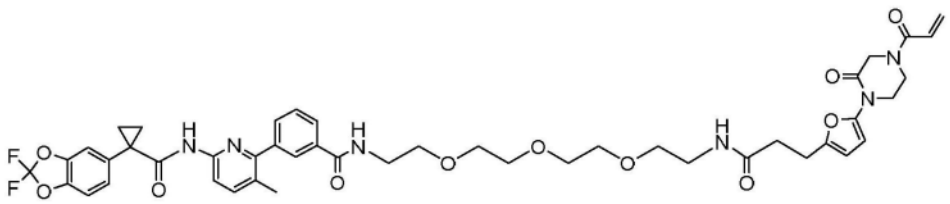
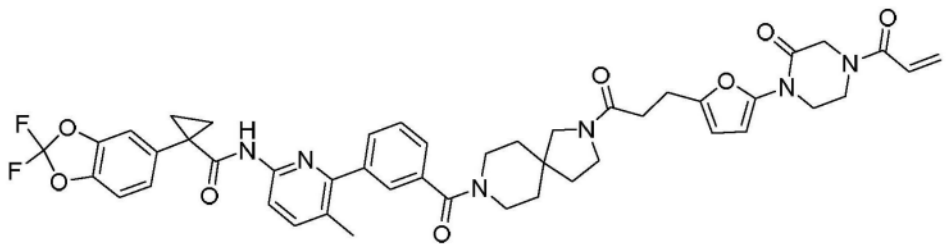
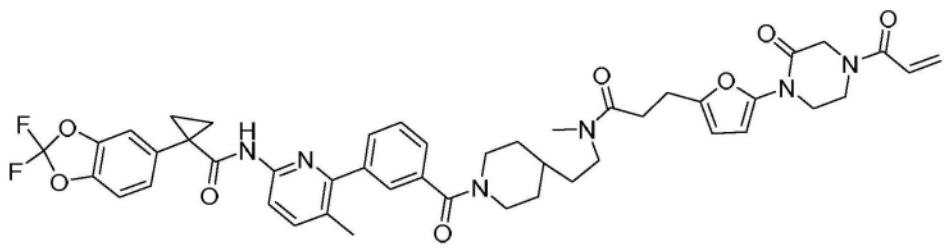
[0284] 在一些实施例中，双功能化合物选自表2中所列双功能化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。

[0285] 表2：示例性双功能化合物

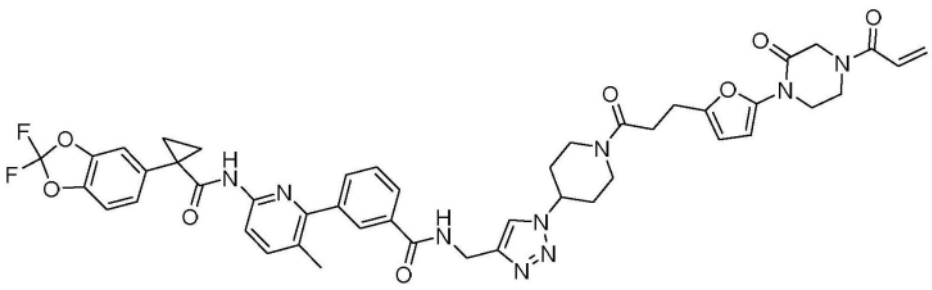
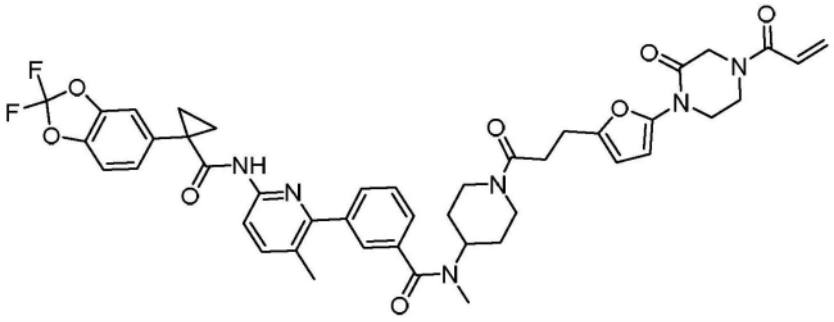
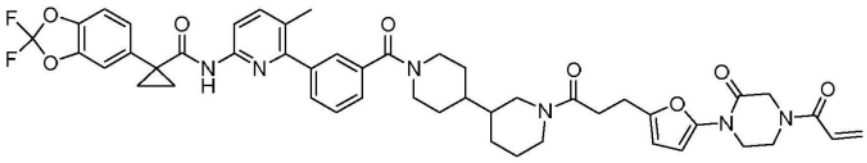
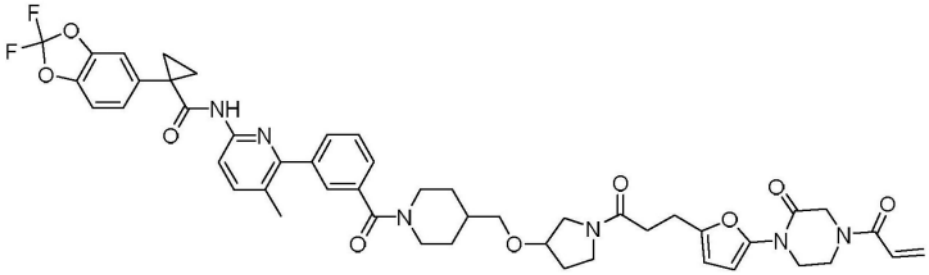
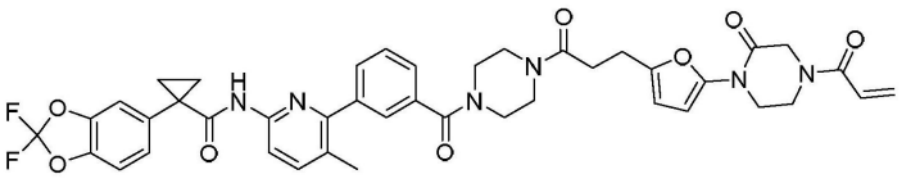
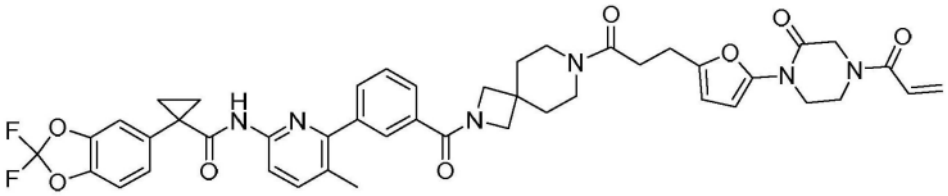
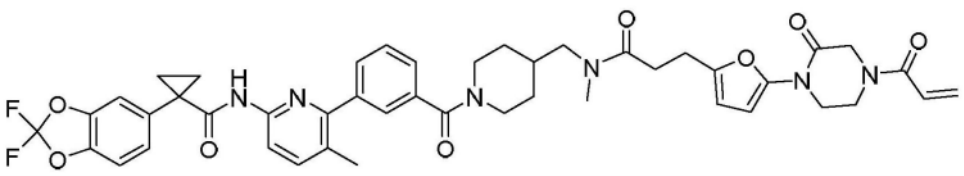
[0286]

化合物编号	结构
200	
202	

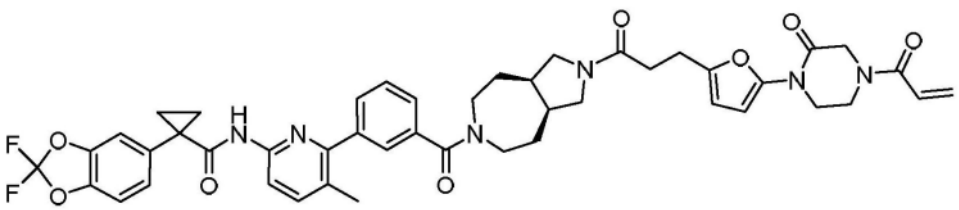
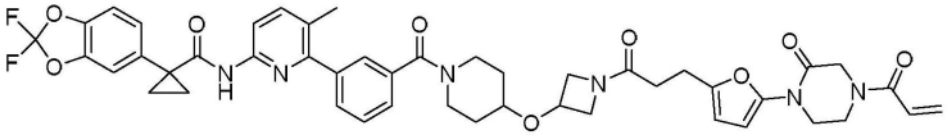
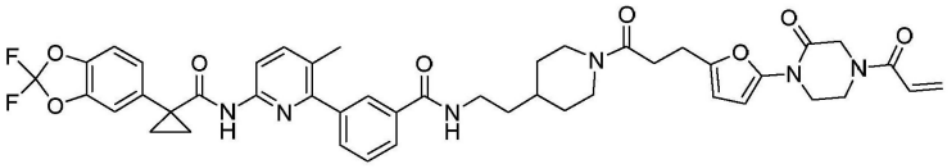
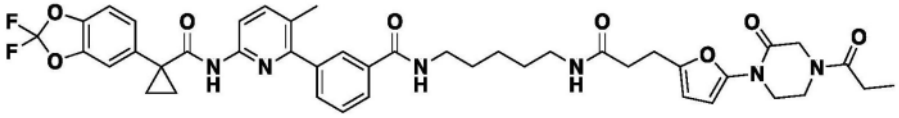
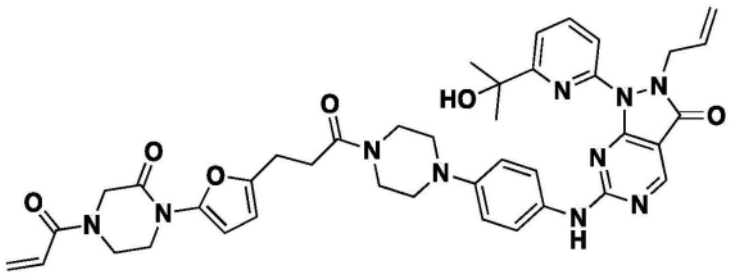
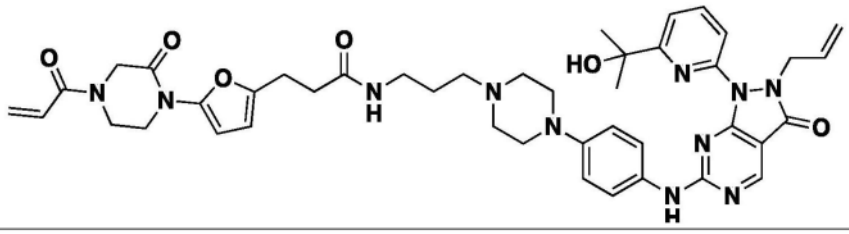
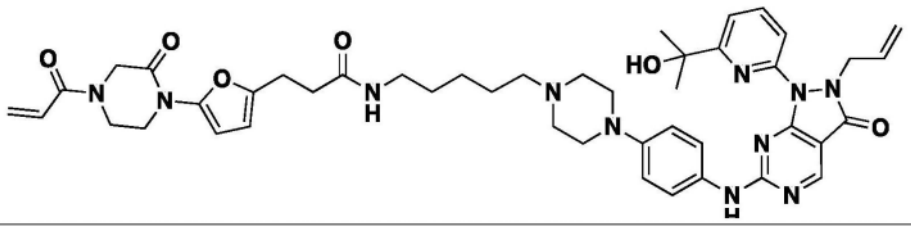
[0287]

201	
203	
204	
205	
206	
207	
208	

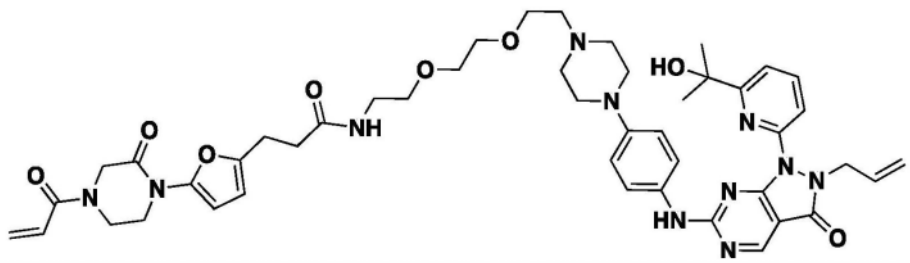
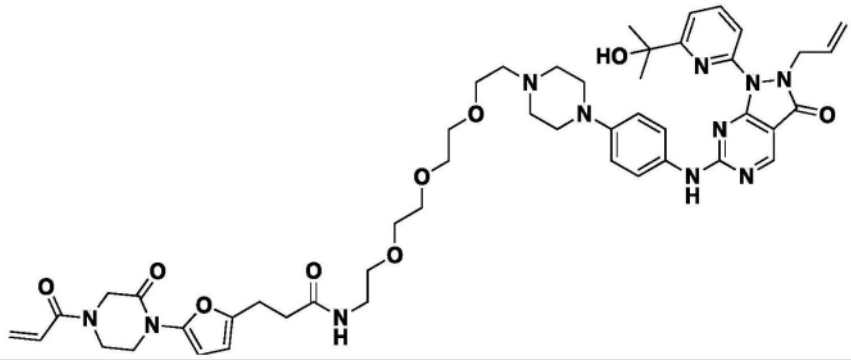
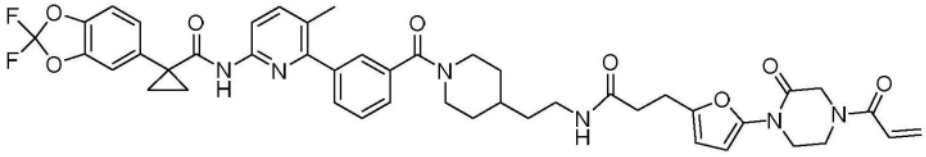
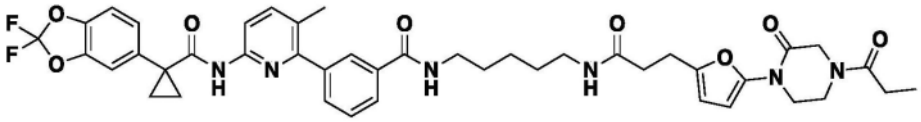
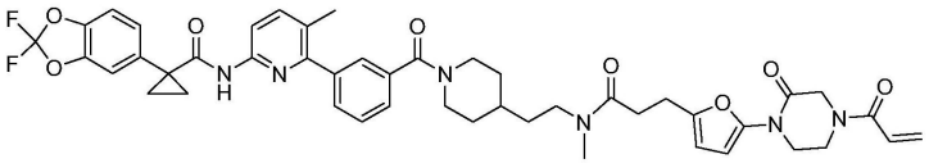
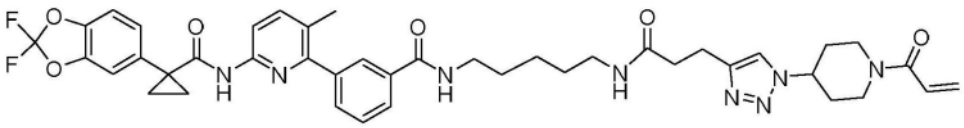
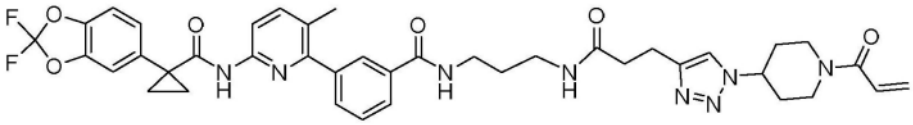
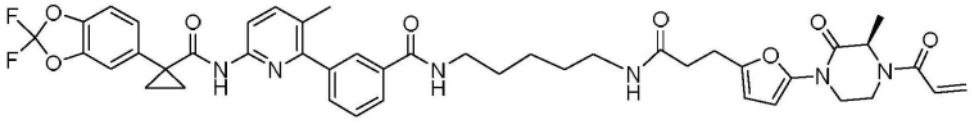
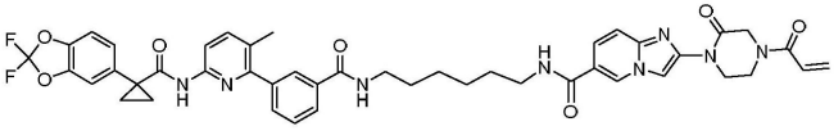
[0288]

209	
210	
211	
212	
213	
214	
215	

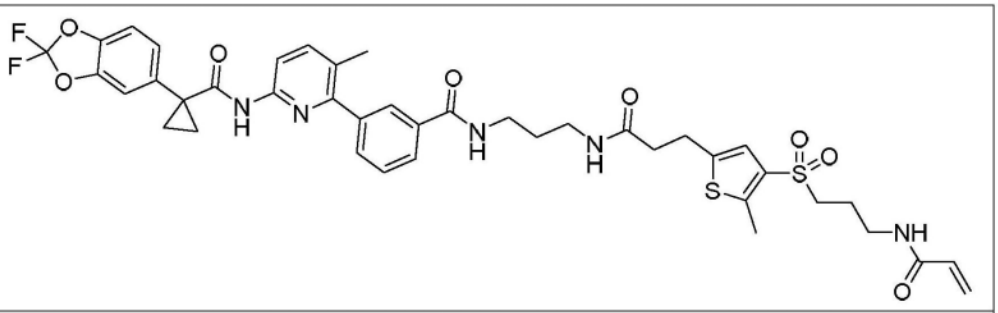
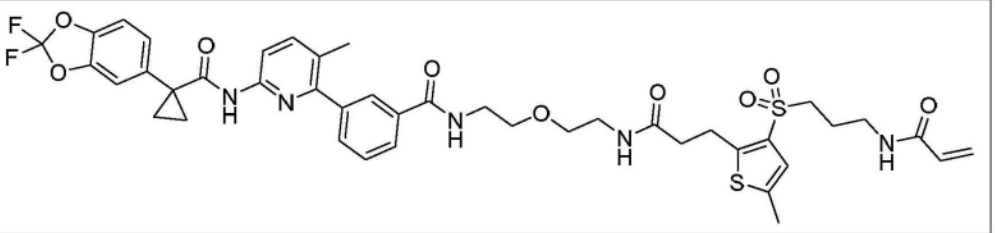
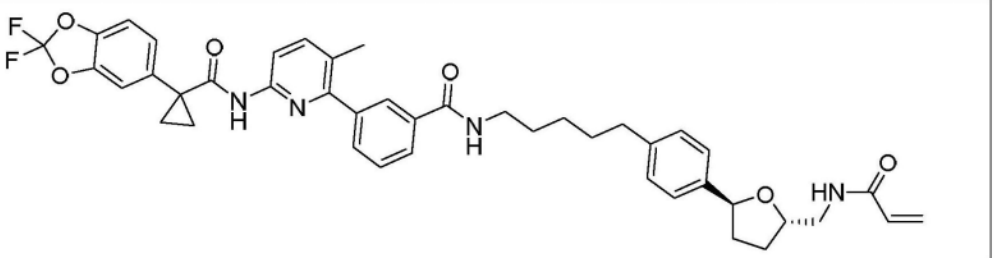
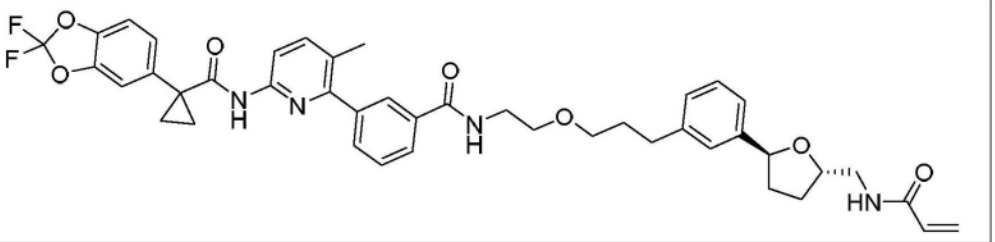
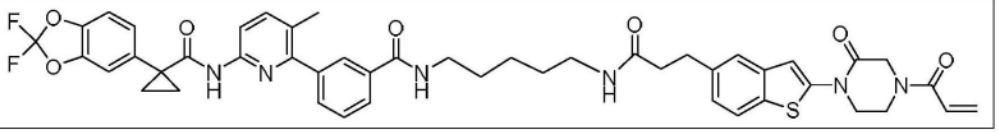
[0289]

216	
217	
218	
219	
220	
221	
222	

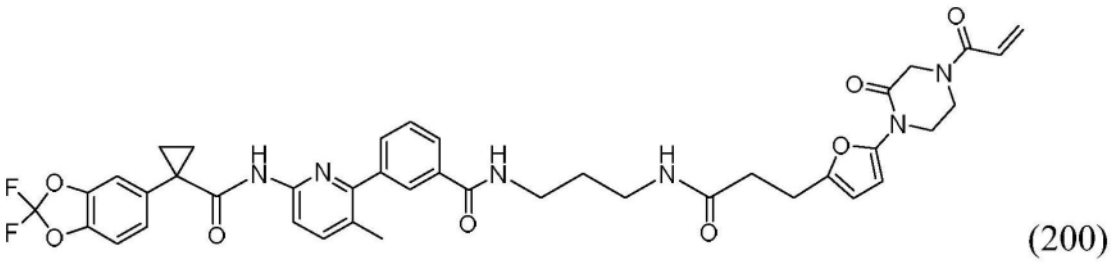
[0290]

223	
224	
225	
226	
227	
228	
229	
230	
231	

[0291]

232	
233	
234	
235	
236	

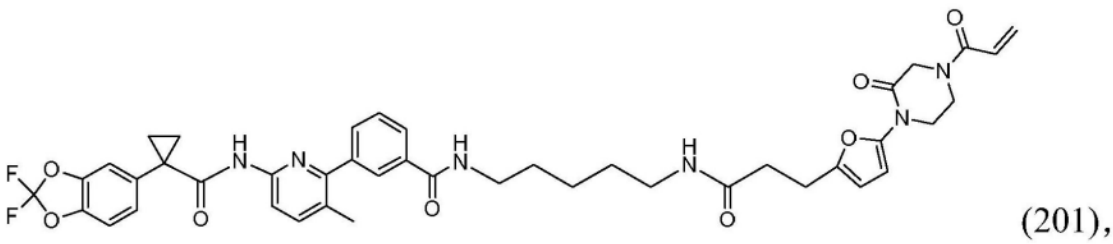
[0292] 在一些实施例中，双功能化合物选自由以下组成的组：



(200)

[0293] 以及

[0294]



(201),

[0295] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体。

[0296] 在一些实施例中,双功能化合物是化合物200或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物201或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物202或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物203或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物204或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物205或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物206或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物207或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物208或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物209或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物210或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物211或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物212或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物213或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物214或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物215或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物216或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物217或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物218或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物219或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物220或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物221或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物222或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物223或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物224或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物225或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物226或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物227或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实

施例中,双功能化合物是化合物228或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物229或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物230或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物231或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物232或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物233或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物234或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物235或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,双功能化合物是化合物236或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。

[0297] 定义

[0298] 选定的化学定义

[0299] 以下更详细地描述特定官能团和化学术语的定义。化学元素根据元素周期表,CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics[物理化学手册],第75版,内封面进行鉴定,并且特定官能团通常如其中所述被定义。另外,有机化学的一般原理以及特定功能性部分和反应性描述在Thomas Sorrell,Organic Chemistry[有机化学],University Science Books[大学科学书籍出版社],索萨利托,1999;Smith和March,March's Advanced Organic Chemistry[March高级有机化学],第5版,John Wiley&Sons,Inc.[约翰威利父子出版公司],纽约,2001;Larock,Comprehensive Organic Transformations[有机官能团转换],VCH Publishers,Inc.[VCH出版社有限公司],纽约,1989;以及Carruthers,Some Modern Methods of Organic Synthesis[有机合成的一些现代方法],第3版,Cambridge University Press[剑桥大学出版社],剑桥,1987中。

[0300] 本文使用的缩写在化学和生物学领域具有其常规含义。本文阐述的化学结构和化学式根据化学领域已知的化学价的标准规则构建。

[0301] 当列出值的范围时,其旨在涵盖该范围内的每个值和子范围。例如,"C_1-C_6烷基"或"C_{1-6}烷基"旨在涵盖C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_1-C_6、C_1-C_5、C_1-C_4、C_1-C_3、C_1-C_2、C_2-C_6、C_2-C_5、C_2-C_4、C_2-C_3、C_3-C_6、C_3-C_5、C_3-C_4、C_4-C_6、C_4-C_5和C_5-C_6烷基。

[0302] 以下术语旨在具有下文呈现的含义并且可用于理解本发明的描述和预期范围。

[0303] 术语"烷基"是指具有1至6个碳原子的直链或支链饱和烃基的基团("C_{1-6}烷基")。在一些实施例中,烷基基团具有1至5个碳原子("C_{1-5}烷基")。在一些实施例中,烷基基团具有1至4个碳原子("C_{1-4}烷基")。在一些实施例中,烷基基团具有1至3个碳原子("C_{1-3}烷基")。在一些实施例中,烷基基团具有1至2个碳原子("C_{1-2}烷基")。在一些实施例中,烷基基团具有1个碳原子("C_1烷基")。在一些实施例中,烷基基团具有2至6个碳原子("C_{2-6}烷基")。C_{1-6}烷基基团的实例包括甲基(C_1)、乙基(C_2)、丙基(C_3)(例如,正丙基、异丙基)、丁基(C_4)(例如,正丁基、叔丁基、仲丁基、异丁基)、戊基(C_5)(例如,正戊基、3-戊烷基、戊基(amyl)、新戊基、3-甲基-2-丁烷基、叔戊基)、和己基(C_6)(例如,正己基)。

[0304] “亚烷基”是指烷基基团的二价基团,例如-CH_2-、-CH_2CH_2-和-$CH_2CH_2CH_2$-。

[0305] “杂烷基”是指烷基基团,其进一步包括在母链的一个或多个末端位置内(即插入在相邻碳原子之间)和/或位于母链的一个或多个末端位置的至少一个选自氧、氮或硫的杂原子(例如,1、2、3或4个杂原子)。在某些实施例中,杂烷基基团是指在母链内具有1至10个碳原子和1个或多个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-10}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至9个碳原子和1个或多个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-9}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至8个碳原子和1个或多个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-8}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至7个碳原子和1个或多个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-7}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至6个碳原子和1个或多个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-6}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至5个碳原子和1个或2个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-5}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至4个碳原子和1或2个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-4}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至3个碳原子和1个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-3}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有1至2个碳原子和1个杂原子的饱和基团(“杂C_{1-2}烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是具有1个碳原子和1个杂原子的饱和基团(“杂C1烷基”)。在一些实施例中,杂烷基基团是在母链内具有2至6个碳原子和1个或2个杂原子的饱和基团(“杂C_{2-6}烷基”)。除非另有说明,否则杂烷基基团的每个实例独立地是未取代的(“未取代的杂烷基”)或取代的(“取代的杂烷基”),其具有一个或多个取代基。在某些实施例中,杂烷基基团是未取代的杂C_{1-10}烷基。在某些实施例中,杂烷基基团是取代的杂C_{1-10}烷基。

[0306] “杂亚烷基”是指杂烷基基团的二价基团。

[0307] “烷氧基(alkoxy或alkoxyl)”是指-O-烷基基团。在一些实施例中,烷氧基基团是甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基、和1,2-二甲基丁氧基。在一些实施例中,烷氧基基团是低级烷氧基,即具有1和6之间个碳原子。在一些实施例中,烷氧基基团具有1和4之间个碳原子。

[0308] 如本文所用,术语“芳基”是指具有指定的环碳原子数的稳定的芳族单环基或双环基。芳基基团的实例包括但不限于苯基、1-萘基、2-萘基等等。相关术语“芳基环”同样是指具有指定的环碳原子数的稳定的芳族单环或双环。

[0309] 如本文所用,术语“杂芳基”是指具有指定的环原子数并且包含一个或多个单独地选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的芳族单环基或双环基。杂芳基基团可以经由碳原子或杂原子键合。杂芳基基团的实例包括但不限于呋喃基、吡咯基、噻吩基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、吲唑基、噁二唑基、苯并噻唑基、喹喔啉基等等。相关术语“杂芳基环”同样是指具有指定的环原子数并且包含一个或多个单独地选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的芳族单环或双环。

[0310] 如本文所用,术语“环烷基”是指具有指定的环碳原子数的稳定的饱和或不饱和非芳族单环或双环(稠合、桥接或螺)环基。环烷基基团的实例包括但不限于上文确定的环烷基基团,环丁烯基、环戊烯基、环己烯基等等。在实施例中,指定数量是C_3-C_{12}个碳。相关术语“碳环”同样是指具有指定的环碳原子数的稳定的饱和或不饱和非芳族单环或双环(稠合、桥接或螺)环。在实施例中,环烷基可以是经取代的或未取代的。在实施例中,环烷基可以被

0-4次出现的R^a取代,其中每个R^a独立地选自由以下组成的组:C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、和卤素。

[0311] 如本文所用,术语“杂环基”是指具有指定的环原子数并且包含一个或多个单独地选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的饱和或不饱和非芳族单环或双环(稠合、桥接或螺)环基。杂环基基团可以经由碳原子或杂原子键合。在实施例中,指定数量是C_3-C_{12}个碳。杂环基基团的实例包括但不限于氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、吡咯啉基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、吗啉基、全氢氮杂䓬基、四氢吡啶基、四氢氮杂䓬基、八氢吡咯并吡咯基等等。相关术语“杂环”同样是指具有指定的环原子数并且包含一个或多个单独地选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的饱和或不饱和非芳族单环或双环(稠合、桥接或螺)环。在实施例中,杂环基可以是经取代的或未取代的。在实施例中,杂环基可以被0-4次出现的R^a取代,其中每个R^a独立地选自由以下组成的组:C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、和卤素。

[0312] 如本文所用,“螺环烷基”或“螺环基”意指具有通过单个原子连接的两个环的碳双环的环系统。这些环的尺寸和性质可以是不同的、或者尺寸和性质是相同的。实例包括螺戊烷、螺己烷、螺庚烷、螺辛烷、螺壬烷、或螺癸烷。螺环中的一个或两个环可以与另一个环碳环、杂环、芳族环、或杂芳族环稠合。例如,(C_3-C_{12})螺环烷基是含有在3与12个之间碳原子的螺环。

[0313] 如本文所用,“螺杂环烷基”或“螺杂环基”意指其中至少一个环是杂环(其中碳原子中的一个或多个可以被杂原子取代(例如,在至少一个环中,碳原子中的一个或多个可以被杂原子取代))的螺环。螺杂环中的一个或两个环可以与另一个环碳环、杂环、芳族环、或杂芳族环稠合。

[0314] 如本文所用,“卤代(halo)”或“卤素(halogen)”是指氟(氟代,-F)、氯(氯代,-Cl)、溴(溴代,-Br)、或碘(碘代,-I)。

[0315] 如本文所用,“卤代烷基”是指被一个或多个卤素取代的烷基基团。卤代烷基基团的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、五氟乙基、和三氯甲基。

[0316] 如本文所用,“经取代的”,无论术语“任选地”是否在其之前,表示指定部分的一个或多个氢被合适的取代基替代。

[0317] 如本文所用,每个表述(例如烷基、m、n等)的定义,当它在任何结构中出现多于一次时,旨在独立于其在同一结构中其他地方的定义。

[0318] 本文描述了本披露的各种实施例。将认识到,每个实施例中指定的特征可以与其他指定特征(包括如下文的实施例中所指示的)组合,以提供本披露的另外的实施例。

[0319] 应当理解,在以下实施例中,仅当所描绘式的取代基或变量的组合产生稳定化合物时,此类组合才是被允许的。

[0320] 本文所述的某些化合物可以以特定的几何或立体异构形式存在。例如,如果需要本文所述的化合物的特定对映异构体,则可以通过不对称合成或通过手性助剂衍生来制备,其中将所得非对映异构体混合物分离并且将辅助基团切割以提供所希望的纯对映异构体。可替代地,在分子含有碱性官能团(例如氨基)、或酸性官能团(例如羧基)的情况下,与适当的光学活性酸或碱形成非对映异构体盐,然后通过分级结晶或本领域熟知的色谱方法拆分由此形成的非对映异构体,以及随后回收纯对映异构体。

[0321] 除非另有说明,否则本文所描绘的结构还意在包括结构的几何(或构象)形式;例如,每个不对称中心的R和S构型、Z和E双键异构体以及Z和E构象异构体。因此,本披露化合

物的单一立体化学异构体以及对映异构体、非对映异构体和几何(或构象)混合物都在本披露的范围内。除非另有说明,否则本文所述的化合物的所有互变异构体形式都在本披露的范围内。另外,除非另有说明,否则本文描绘的结构还意在包括仅在存在一个或多个同位素富集的原子的情况下不同的化合物。例如,具有本披露结构的化合物(包括用氘或氚替代氢,或用富含^{13}C或^{14}C的碳替代碳)都在本披露的范围内。这样的化合物例如可用作分析工具,用作生物学测定中的探针或用作根据本披露的治疗剂。

[0322] 组合物的"对映异构体过量"或"%对映异构体过量"可使用以下所示的等式计算。在下文所示的实例中,组合物含有90%的一种对映体(例如S对映异构体),和10%的另一种对映异构体(即R对映异构体)。ee=(90-10)/100×100=80%。

[0323] 因此,含有90%的一种对映异构体和10%的另一种对映体的组合物称为具有80%的对映异构体过量。本文所述的化合物或组合物可含有化合物的一种形式(例如,S-对映异构体)的至少50%、75%、90%、95%、或99%的对映异构体过量。换句话说,这种化合物或组合物含有S对映异构体超过R对映异构体的对映异构体过量。

[0324] 在特定对映异构体是优选的情况下,在一些实施例中,它可以基本上不含相应的对映异构体,并且也可以称为"光学富集的"提供。如本文所用,"光学富集的"意指化合物由显著更大比例的一种对映异构体组成。在某些实施例中,化合物由按重量计至少约90%的优选的对映异构体组成。在其他实施例中,化合物由按重量计至少约95%、98%或99%的优选的对映异构体组成。优选的对映异构体可以通过本领域技术人员已知的任何方法(包括手性高压液相色谱法(HPLC)和手性盐的形成和结晶)从外消旋混合物中分离,或通过不对称合成制备。参见,例如Jacques等人,Enantiomers,Racemates and Resolutions[对映异构体、外消旋体和分辨率](Wiley Interscience[威利国际科学出版社],纽约,1981);Wilen,等人,Tetrahedron[四面体]33:2725(1977);Eliel,E.L.Stereochemistry of Carbon Compounds[碳化合物的立体化学](McGraw Hill[麦格劳希尔出版社],纽约州,1962);Wilen,S.H.Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions[拆分剂和光学拆分的表]第268页(E.L.Eliel,编辑,Univ.of Notre Dame Press[圣母大学出版社],Notre Dame,IN[印第安纳州诺特丹]1972)。

[0325] 在本文描述的所有方法能够以任何合适的顺序进行,除非本文中另外指示或另外与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(如"例如")的应用仅旨在更好地说明本披露,而不对另外要求保护的本披露范围做出限制。

[0326] 任何所得的异构体混合物可以基于成分的物理化学差异例如通过色谱法和/或分级结晶被分离成纯的或基本上纯的几何或光学异构体、非对映异构体、外消旋体。

[0327] 可以通过已知方法将任何所得的最终产物或中间体的外消旋体拆分成光学对映体,例如通过分离用光学活性酸或碱获得的其非对映异构体盐,并释放出光学活性的酸性或碱性化合物来拆分。特别地,因此可以采用碱性部分将本文所述的化合物拆分成它们的光学对映体,例如通过分级结晶用光学活性酸例如酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、二乙酰基酒石酸、二-O,O'-对甲苯酰基酒石酸、扁桃酸、苹果酸或樟脑-10-磺酸形成的盐来拆分。外消旋产物还可以通过手性色谱法拆分,例如使用手性吸附剂的高压液相色谱法(HPLC)。

[0328] 其他定义

[0329] 以下定义是本披露全文中使用的更通用的术语。

[0330] 如本文所用,术语“一个/种(a,an)”,“所述/该(the)”以及在本披露的上下文中使用的类似术语(特别是在权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数两者,除非本文中另外指示或与上下文明显相矛盾。

[0331] 如本文所用,术语“约”意指在本领域的典型公差范围内。例如,“约”可以理解为与平均值的约2个标准差。在某些实施例中,约意指±10%。在某些实施例中,约意指±5%。当约出现在一系列数字或范围之前时,应理解“约”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0332] 如本文所用的“获取”(“acquire”或“acquiring”)是指通过“直接获取”或“间接获取”值或物理实体来获得值(例如,数值)或图像或物理实体(例如,样品)。“直接获取”意指执行某个过程(例如,执行分析方法或方案)来获得值或物理实体。“间接获取”是指从另一方或来源(例如,直接获取物理实体或值的第三方实验室)接收值或物理实体。直接获取值或物理实体包括执行包括物理物质的物理变化或机器或设备的使用的过程。直接获取值的实例包括从人受试者获得样品。直接获取值包括执行使用机器或设备(例如,质谱仪)的过程,用于获取质谱数据。

[0333] 如本文所用,术语“施用(administer、administering或administration)”是指植入、吸收、摄取、注射、吸入、或以其他方式引入本发明化合物或其药物组合物。

[0334] 如本文所用,术语“病症”、“疾病”和“障碍”可互换使用。

[0335] 如本文所用,术语“降解(degrades、degrading或degradation)”是指细胞蛋白酶体系统将靶蛋白部分或全部降解至降低或消除靶蛋白的生物学活性(特别是异常活性)的程度。

[0336] 如本文所用,术语“抑制(inhibit、inhibition或inhibiting)”是指减少或抑制给定的病症、症状、或障碍或疾病,或者生物学活性或过程的基线活性显著降低。

[0337] 如本文所用,术语“调节靶蛋白”或“调节靶蛋白活性”意指改变靶蛋白的至少一种特征。例如,调节可以包括以下一项或多项:(i)调节所述靶蛋白的折叠;(ii)调节所述靶蛋白的半衰期;(iii)调节所述靶蛋白向蛋白酶体的运输;(iv)调节所述靶蛋白的泛素化水平;(v)调节所述靶蛋白的降解(例如,蛋白酶体降解);(vi)调节靶蛋白信号传导;(vii)调节靶蛋白定位;(viii)调节靶蛋白向溶酶体的运输;以及(ix)调节靶蛋白与另一种蛋白的相互作用。在实施例中,调节靶蛋白是指以下一项或多项:改善蛋白质的折叠,增加蛋白质的半衰期,防止靶蛋白运输到蛋白酶体,降低靶蛋白的泛素化水平,防止靶蛋白的降解,改善靶蛋白信号传导,改善靶蛋白信号传导,防止靶蛋白运输到溶酶体,以及改善靶蛋白与另一种蛋白的相互作用。

[0338] 调节靶蛋白可以通过体内或体外稳定靶蛋白的水平来实现。可以通过将用本文所述的双功能化合物处理后剩余的靶蛋白的量与用本文所述的双功能化合物处理前测量的存在的靶蛋白的初始量或水平进行比较来测量稳定的靶蛋白的量。在实施例中,与初始水平相比,至少约30%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约40%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约50%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约60%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约70%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约80%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约90%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约95%的靶

蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,超过95%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,至少约99%的靶蛋白被调节(例如,稳定)。

[0339] 在实施例中,与初始水平相比,约30%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约40%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约50%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约60%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约70%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约80%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约90%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约95%至约99%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。在实施例中,与初始水平相比,约90%至约95%的量的靶蛋白被调节(例如,稳定)。

[0340] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指包含由肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对其中可以包含的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含由肽键彼此相连的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链,例如其在本领域中通常也称为肽、寡肽和寡聚体;并且也指较长的链,其在本领域中通常称为蛋白质,这些蛋白质有很多类型。

[0341] 如本文所用,术语“对靶蛋白的选择性”意指例如本文所述的双功能化合物优先于另一种或多种蛋白结合靶蛋白,或在更大程度上结合靶蛋白。

[0342] 如本文所用,术语“受试者”是指动物。典型地,动物是哺乳动物。受试者还指例如灵长类动物(例如人,男性或女性)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟等。在实施例中,受试者是灵长类动物。在优选的实施例中,受试者是人。

[0343] 如本文所用,术语本文所述的化合物的“治疗有效量”是指将引起受试者的生物学或医学应答(例如,酶或蛋白活性的降低或抑制,或改善症状、缓解病症、减慢或延迟疾病进展或预防疾病等)的本文所述的化合物的量。在一个实施例中,术语“治疗有效量”是指本文所述的化合物的如下量,当施用于受试者时,该量有效地:(1)至少部分缓解、预防和/或改善病症或障碍或疾病,该病症或障碍或疾病(i)由靶蛋白介导,(ii)与靶蛋白的活性相关,或(iii)特征在于靶蛋白的活性(正常或异常);或(2)降低或抑制靶蛋白的活性;或(3)降低或抑制靶蛋白表达。这些效果可以例如通过稳定靶蛋白或防止靶蛋白降解来增加靶蛋白的量来实现。在一个实施例中,术语“治疗有效量”是指本文所述化合物的以下量,当施用于细胞、或组织、或非细胞生物学材料、或介质时,该量有效地至少防止或部分防止靶蛋白水平降低;或至少保持或部分增加靶蛋白的活性,例如通过去除与靶蛋白共价结合的Ubl。

[0344] 如本文所用,术语任何疾病或障碍的“治疗(treat、treating或treatment)”在实施例中是指改善疾病或障碍(即,减慢或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在实施例中,“治疗(treat、treating或treatment)”是指减轻或改善至少一种身体参数,包括不能被患者辨别的那些。

[0345] 如本文所用,术语“预防”是指使病症或疾病的症状的频率减少或发作延迟。

[0346] 如本文所用,如果受试者将在生物学上、在医学上或在生活质量上从治疗中受益,则此类受试者是“需要”此类治疗的。

[0347] 药学上可接受的盐

[0348] 也考虑本文所述的化合物的药学上可接受的盐用于本文所述的用途。如本文所用,术语“盐”是指本文所述的化合物的酸加成盐或碱加成盐。“盐”特别包括“药学上可接受的盐”。术语“药学上可接受的盐”是指保留本文披露的化合物的生物学有效性和特性的盐,并且这些盐典型地不是生物学上或其他方面不希望的。在许多情况下,由于氨基和/或羧基基团或与其类似的基团的存在,本文披露的化合物能够形成酸和/或碱盐。

[0349] 可以用无机酸和有机酸形成药学上可接受的酸加成盐。

[0350] 可以衍生出盐的无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。

[0351] 可以衍生出盐的有机酸包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、磺基水杨酸等。

[0352] 可以用无机碱和有机碱形成药学上可接受的碱加成盐。

[0353] 可以衍生出盐的无机碱包括例如铵盐和来自元素周期表第I至XII列的金属。在某些实施例中,盐衍生自钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌和铜;特别适合的盐包括铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。

[0354] 可以衍生出盐的有机碱包括例如伯胺、仲胺和叔胺;经取代的胺(包括天然存在的经取代的胺);环胺;碱性离子交换树脂等。某些有机胺包括异丙胺、苄星(benzathine)、胆碱盐、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪、和氨丁三醇。

[0355] 在一些实施例中,提供了呈以下形式的具有式(I)的双功能化合物:乙酸盐、抗坏血酸盐、已二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、癸酸盐、氯化物/盐酸盐、氯脲嘧酸盐(chlortheophyllonate)、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、谷氨酸盐、戊二酸盐、乙醇酸、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、黏酸盐、萘甲酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、十八烷酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、癸二酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、磺基水杨酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐三氟甲磺酸盐、三氟乙酸盐或昔萘酸盐形式。

[0356] 药物组合物

[0357] 另一个实施例是药物组合物,该药物组合物包含本文所述的一种或多种化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,以及一种或多种药学上可接受的载剂。术语“药学上可接受的载剂”是指涉及携带或运输任何主题组合物或其组分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料。每种载剂在与主题组合物及其组分相容且对患者无害的意义上必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括:(1)糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)粉状黄芪胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油、大豆油等;(10)二醇类,如丙二醇;(11)多元醇类,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲液;以及(21)在药物配制品

中采用的其他无毒相容物质。

[0358] 本文所述的组合物可以口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻、颊、阴道或经由植入的储库施用。如本文所用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、骨内、鞘内、肝内、病变内和颅内注射或输注技术。在一些实施例中,本披露的组合物口服、腹膜内或静脉内施用。本披露的组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性悬浮液。可以根据本领域已知的技术,使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制这些悬浮液。无菌可注射制剂还可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液(例如在1,3-丁烷二醇中的溶液)。可接受的媒介物和溶剂中可使用的是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,常规地可以使用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。

[0359] 为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。脂肪酸(例如油酸及其甘油酯衍生物)因为是天然药学上可接受的油(例如橄榄油或蓖麻油)可用于制备可注射剂,尤其是其聚氧乙烯化形式也可用于制备注射剂。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂(例如羧甲基纤维素或类似的分散剂),其通常用于配制药学上可接受的剂型(包括乳剂和悬浮液)。出于配制的目的,也可以使用其他常用的表面活性剂,例如Tween®、Spans和其他乳化剂或生物利用度增强剂,它们通常用于制造药学上可接受的固体、液体或其他剂型。

[0360] 本文所述的药学上可接受的组合物能以任何口服可接受的剂型口服施用,这些剂型包括但不限于胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。对于口服使用的片剂,常用的载剂包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要口服水性悬浮液时,将活性成分与乳化剂和悬浮剂混合。如果需要,也可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0361] 可替代地,本披露的药学上可接受的组合物能以栓剂的形式用于直肠施用。这些可以通过将药剂与合适的无刺激性赋形剂混合来制备,该赋形剂在室温下为固体,但在直肠温度下为液体,因此将在直肠中融化以释放药物。这些材料包括可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0362] 本披露的药学上可接受的组合物也可以局部施用,尤其是当治疗的目标包括通过局部施用容易达到的区域或器官(包括眼、皮肤或下肠道疾病)时。针对这些区域或器官中的每一个容易制备合适的局部配制品。下肠道的局部应用可以直肠栓剂配制品(见上文)或以合适的灌肠配制品进行。也可以使用局部透皮贴剂。

[0363] 对于局部应用,可将药学上可接受的组合物配制成含有悬浮或溶于一种或多种载剂中的活性组分的合适的软膏剂。用于本披露化合物的局部施用的载剂包括但不限于矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替代地,可将药学上可接受的组合物配制成含有悬浮或溶于一种或多种药学上可接受的载剂中的活性组分的合适的洗剂或乳膏。合适的载剂包括但不限于矿物油、山梨聚糖单硬脂酸酯、聚山梨酯60、鲸蜡酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苄醇和水。

[0364] 本披露的药学上可接受的组合物也可以通过鼻喷雾或吸入施用。此类组合物是根据药物配制品领域中熟知的技术制备的,并且可以使用苄醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或其他常规的增溶剂或分散剂,以盐溶液的形式制备。可以与载剂材料组合以产生单个剂型的组合物的本披露的化合物的量将取决于所治疗

的宿主、特定的施用方式而变化。优选地,组合物应该被配制为使得可以将0.01-100mg/kg体重/天剂量的抑制剂施用于接受这些组合物的患者。

[0365] 同位素标记的化合物

[0366] 本文所述的化合物或者其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体还旨在代表化合物的未标记的形式以及同位素标记的形式。同位素标记的化合物具有由本文给出的式表示的结构,除了一个或多个原子被具有所选原子质量或质量数的原子替代。可掺入本文所述化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素,例如,分别是^{2}H、3H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}F、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{36}Cl、^{123}I、^{124}I、^{125}I。本披露包括如本文所定义的各种同位素标记的化合物,例如其中存在放射性同位素(例如^{3}H和^{14}C)的那些化合物,或其中存在非放射性同位素(例如^{2}H和^{13}C)的那些化合物。这种同位素标记的化合物可用于代谢研究(用^{14}C)、反应动力学研究(用例如^{2}H或^{3}H)、检测或成像技术(诸如正电子发射断层扫描(PET)或单光子发射计算机断层扫描(SPECT),包括药物或底物组织分布测定),或用于患者的放射性治疗。特别地,^{18}F或标记的化合物可能对于PET或SPECT研究是特别希望的。本文所述的同位素标记的化合物或者其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与所附实例和制备中所述的那些类似的方法,使用适当的同位素标记的试剂代替未标记的先前使用的试剂来制备。

[0367] 此外,用较重的同位素,特别是氘(即,^{2}H或D)取代可以提供来源于更大的代谢稳定性(例如,体内半衰期延长或剂量需求减少或治疗指数改进)的某些治疗优点。应理解,在此上下文中的氘被认为是具有本文所述的化合物或者其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体、或互变异构体的取代基。这种较重的同位素(特别是氘)的浓度可以由同位素富集因子来定义。如本文所用,术语“同位素富集因子”意指同位素丰度与特定同位素的天然丰度之间的比率。如果本文所述的化合物中的取代基指示氘,则这种化合物具有针对每个指定的氘原子的同位素富集因子为至少3500(在每个指定的氘原子上52.5%氘掺入)、至少4000(60%氘掺入)、至少4500(67.5%氘掺入)、至少5000(75%氘掺入)、至少5500(82.5%氘掺入)、至少6000(90%氘掺入)、至少6333.3(95%氘掺入)、至少6466.7(97%氘掺入)、至少6600(99%氘掺入)、或至少6633.3(99.5%氘掺入)。

[0368] 剂量

[0369] 可以通过标准药学方法在细胞培养物或实验动物中确定本文所述的化合物(包括药学上可接受的盐和氘化的变体)的毒性和治疗功效。LD_{50}是50%群体的致死剂量。ED_{50}是50%群体的治疗有效剂量。毒性和治疗效果之间的剂量比(LD_{50}/ED_{50})是治疗指数。表现出大的治疗指数的化合物是优选的。尽管可以使用表现出毒副作用的化合物,但是应小心设计将此类化合物靶向至受累组织的位点的递送系统,从而将对未感染的细胞的潜在损伤最小化,并且由此减少副作用。

[0370] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制一系列的用于在人类中使用的剂量。此类化合物的剂量处于包括ED_{50}在内的有很小毒性或没有毒性的循环浓度范围内。该剂量可根据所应用的剂型和所使用的施用途径在该范围内变化。对于任何化合物,均可根据细胞培养测定初步估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量,以达到在细胞培养中确定的循环血浆浓度范围,该范围包括IC_{50}(即,供试化合物达到半数最大症状抑制

的浓度)。此类信息可用于更精确地确定在人中可用的剂量。可以例如通过高效液相色谱法来测量血浆中的水平。

[0371] 还应理解,针对任何特定患者的特定剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用时间、排泄率、药物组合以及治疗医师的判断、以及所治疗特定疾病的严重性。本文所述的化合物在组合物中的量也将取决于组合物中的特定化合物。

[0372] 使用方法

[0373] 在一方面,本披露的特征在于一种在有需要的受试者中调节靶蛋白(例如本文所述的靶蛋白)的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,调节包括以下一项或多项:(i)调节所述靶蛋白的折叠;(ii)调节所述靶蛋白的半衰期;(iii)调节所述靶蛋白向蛋白酶体的运输;(iv)调节所述靶蛋白的泛素化水平;(v)调节所述靶蛋白的降解(例如,蛋白酶体降解);(vi)调节靶蛋白信号传导;(vii)调节靶蛋白定位;(viii)调节靶蛋白向溶酶体的运输;以及(ix)调节靶蛋白与另一种蛋白的相互作用。

[0374] 在另一方面,本披露的特征在于一种在有需要的受试者中稳定靶蛋白(例如本文所述的靶蛋白)的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,稳定包括例如与参考标准相比,增加靶蛋白的半衰期或从靶蛋白中去除Ubl。在一些实施例中,该稳定改善靶蛋白的功能。

[0375] 在另一方面,本披露的特征在于一种在施用具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体后,形成包含去泛素化酶(例如,本文所述的去泛素化酶)和靶蛋白的蛋白复合物的方法。在一些实施例中,蛋白复合物在体外(例如,在样品中)或体内(例如,在细胞或组织中,例如,在受试者中)形成。可以通过本领域已知的任何方法(例如质谱法(天然质谱法)或SDS PAGE)观察和表征蛋白复合物的配制品。在一些实施例中,形成蛋白复合物调节靶蛋白的水平,例如,与参考标准相比,例如增加靶蛋白的半衰期。在一些实施例中,例如,与参考标准相比,形成蛋白质增强Ubl从靶蛋白的去除。在一些实施例中,去泛素化酶是OTUB1。在一些实施例中,靶蛋白包含CFTR。

[0376] 另一个实施例是一种用于从有需要的受试者的靶蛋白(例如本文所述的靶蛋白)中去除Ubl(例如,泛素或泛素样蛋白)的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。

[0377] 在另一方面,本披露提供了一种维持、改善或增加靶蛋白(例如本文所述的靶蛋白)活性的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。

[0378] 在实施例中,维持、改善或增加靶蛋白的活性包括用本文所述的双功能化合物(例如,该双功能化合物内的DUB募集因子),例如具有式(I)的化合物募集去泛素化酶(例如,表1的去泛素化酶),形成靶蛋白、双功能化合物和去泛素化酶的三元复合物,从而维持、改善或增加靶蛋白的活性。

[0379] 在另一方面,本披露的特征在于一种治疗或预防由靶蛋白(例如本文所述的靶蛋

白)介导的疾病、障碍或病症的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症选自由以下组成的组:呼吸系统障碍、增殖性障碍、自身免疫性障碍、自身炎性障碍、炎性障碍、代谢障碍、神经系统障碍和感染性疾病。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症选自由以下组成的组:呼吸系统障碍、增殖性障碍、自身免疫性障碍、自身炎性障碍、炎性障碍、神经系统障碍和感染性疾病。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含呼吸系统障碍。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含增殖性障碍。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含自身炎性障碍。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含炎性障碍。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含代谢障碍。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含神经系统障碍。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症包含感染性疾病。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症是癌症。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症是囊性纤维化。在一些实施例中,该疾病、障碍或病症是糖尿病(例如,青少年发病的成人型2型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young type 2),MODY2)。

[0380] 在另一方面,本披露提供了一种具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体,用于抑制或调节有需要的受试者中的靶蛋白。

[0381] 另一个实施例是具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、前药、立体异构体或互变异构体在制造用于治疗或预防有需要的受试者的呼吸系统障碍、增殖性障碍、自身免疫性障碍、自身炎性障碍、炎性障碍、神经系统障碍和感染性疾病或障碍的药物中的用途。

[0382] 实例

[0383] 通过以下实例和合成方案进一步说明本披露,这些实例和合成方案不应解释为将本披露的范围或精神限制于本文所述的具体程序。应理解,提供这些实例来说明某些实施例,并且本披露的范围不旨被其限制。应进一步理解,在不脱离本披露的精神和/或所附权利要求的范围的情况下,可以采用本领域技术人员自身可以想到的各种其他实施例、修改及其等效物。

[0384] 本披露的化合物可通过有机合成领域中已知的方法制备。在所有方法中,应理解,可以在必要时根据化学的一般原理使用针对敏感性基团或反应性基团的保护基团。根据有机合成的标准方法操作保护基团(T.W.Green和P.G.M.Wuts(1999)Protective Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护基团],第3版,John Wiley&Sons[约翰威利父子出版公司])。使用对本领域技术人员显而易见的方法,在化合物合成的方便阶段去除这些基团。

[0385] 通用方法

[0386] 半胱氨酸反应性共价配体文库是以前合成和描述的,或者购自Enamine公司。鲁马卡托购自Medchemexpress公司。

[0387] 细胞培养

[0388] CFBE41o-4.7ΔF508-CFTR人CF支气管上皮细胞购自密理博西格玛公司(Millipore Sigma,SCC159)。将CFBE41o-4.7ΔF508-CFTR人CF支气管上皮细胞在含有10%(v/v)胎牛血清(FBS)的MEM(吉布科公司(Gibco))中培养,并在37℃和5% CO_2下维持。

[0389] 基于凝胶的基于活性的蛋白质分析(ABPP)

[0390] 将重组OTUB1(0.1μg/样品)在25μL的PBS中用DMSO媒介物或共价配体或双功能化合物在37℃预处理30min,随后在室温用IA-罗丹明(Setareh Biotech公司)处理1h。通过添加4×还原Laemmli SDS样品上样缓冲液(阿法埃莎公司(Alfa Aesar))终止反应。在95℃煮沸5min后,将样品在预制的4%-20% Criterion TGX凝胶(伯乐公司(Bio-Rad))上分离。使用ChemiDoc MP(伯乐公司)通过凝胶内荧光分析探针标记的蛋白质。

[0391] 去泛素化酶活性测定

[0392] 使用先前所述的方法评估DUB募集因子对OTUB1活性的影响。将重组OTUB1(500nM)与DMSO或化合物100(50mM)一起预孵育1h。为了开始测定,将预处理的OTUB1酶与双Ub反应混合物1:1混合,最终浓度为250nM OTUB1、1.5μM双Ub、12.5μM UBE2D1和5mM DTT。通过去除一部分反应混合物并添加Laemmli缓冲液以终止反应,随时间推移通过蛋白质印迹监测单Ub的出现。显示的印迹是来自n=3个生物学上独立的实验/组的代表性凝胶。

[0393] 蛋白质印迹

[0394] 将蛋白质通过SDS/PAGE分离,并使用Trans-Blot Turbo转移系统(伯乐公司)转移到硝酸纤维素膜上。在RT,将膜用5% BSA的含Tween 20的Tris缓冲盐水(TBS-T)溶液封闭30min,在TBS-T中洗涤,并用在制造商推荐的稀释剂中稀释的一抗在4℃探测过夜。用TBS-T洗涤3次后,将膜与IR680-或IR800-缀合的二抗在室温黑暗中孵育1h,这些二抗在5% BSA的TBS-T溶液中1:10,000稀释。用TBST另外洗涤3次后,使用Odyssey Li-Cor荧光扫描仪观察印迹。当进行另外的一抗孵育时,使用ReBlot Plus强抗体剥离溶液(EMD密理博公司(EMD Millipore))剥离膜。本研究中使用的抗体是CFTR(细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technologies),Rb mAb#78335)、CFTR(R&D系统公司(R&D Systems),Ms mAb,#MAB25031)、CFTR(密理博公司,Ms mAb,#MAB3484)、CFTR(Prestige公司,Rb pAb,#HPA021939)、GAPDH(Proteintech公司,Ms mAb,#60004-1-Ig)、OTUB1(艾博抗公司(Abcam),Rb mAb,#ab175200,[EPR13028(B)])、CTNNB1(细胞信号传导技术公司,Rb mAb,#8480)和WEE1(细胞信号传导技术公司,#4936)。

[0395] IsoTOP-ABPP化学蛋白质组学实验

[0396] IsoTOP-ABPP研究如先前报道的那样进行。我们对DUB的总化学蛋白质组学数据分析获自先前评估的455个不同的isoTOP-ABPP实验。这些数据是从各种人类细胞系汇总的,包括231MFP、A549、HeLa、HEK293T、HEK293A、UM-Chor1、PaCa2、PC3、HUH7、NCI-H460、THP1、SKOV3、U2OS和K562细胞。所有的isoTOP-ABPP数据集如先前所述使用IA-炔烃探针生成。通过在PBS中进行探针超声处理将细胞裂解,并通过BCA测定测量蛋白质浓度。将细胞用DMSO媒介物或共价配体(来自1,000x DMSO储备液)处理4h,然后进行细胞收集和裂解。蛋白质组随后在室温用IA-炔烃标记(100μM用于DUB配体能力分析,200mM用于分析化合物201的半胱氨酸反应性)标记1h。通过依次添加三(2-羧乙基)膦(1mM,Strem公司,15-7400)、三[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(34μM,西格玛公司(Sigma),678937)、硫酸铜(II)(1mM,西格玛公司,451657)和生物素-接头-叠氮化物(该接头用烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶识别序列以及同位素轻或重缬氨酸功能化,分别用于处理对照或经处理的蛋白质组)使用CuAAC。在CuAAC后,通过以6,500g离心沉淀蛋白质组,将其在冰冷的甲醇中洗涤,以1:1的对照:处理比率合并,再次洗涤,然后通过在1.2%SDS-PBS中加热至80℃变性和再溶解,持续

5min。通过以6,500g离心沉淀不溶性组分,并在5ml 0.2% SDS-PBS中稀释可溶性蛋白质组。标记的蛋白质与链霉亲和素-琼脂糖珠(每个样品170μl重悬珠,赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),20349)结合,同时在4℃旋转过夜。通过在PBS和水中各洗涤三次来富集珠连接的蛋白质,然后将这些蛋白质重悬于6M尿素/PBS中,在TCEP(1mM,Strem公司,15-7400)中还原,用碘乙酰胺(18mM,西格玛公司)烷基化,然后洗涤并重悬于2M尿素/PBS中,并用0.5μg/μL测序级胰蛋白酶(普洛麦格公司(Promega),V5111)进行胰蛋白酶化过夜。胰蛋白酶肽被洗脱下来。将珠在PBS和水中各洗涤三次,在TEV缓冲液(水、TEV缓冲液、100μM二硫苏糖醇)中洗涤,并重悬于含有Ac-TEV蛋白酶(英杰公司(Invitrogen),12575-015)的缓冲液中,并孵育过夜。将肽在水中稀释,用甲酸(1.2M,飞世尔公司(Fisher),A117-50)酸化,并准备用于分析。

[0397] IsoTOP-ABPP质谱分析

[0398] 将来自所有化学蛋白质组学实验的肽压力加载到250μm内径的熔融石英毛细管上,该毛细管填充有4cm的Aqua C18反相树脂(飞诺美公司(Phenomenex),04A-4299),预先在Agilent 600系列高效液相色谱仪上使用10min内从100%缓冲液A到100%缓冲液B的梯度进行平衡,随后用100%缓冲液B洗涤5min,并用100%缓冲液A洗涤5min。然后使用MicroTee PEEK 360μm配件(赛默飞世尔科技公司p-888)将样品附接到13cm激光牵引柱(laser pulled column)上,该柱填充有10cm Aqua C18反相树脂和3cm强阳离子交换树脂,用于isoTOP-ABPP研究。使用Q Exactive Plus质谱仪(赛默飞世尔科技公司)分析样品,其中使用五步多维蛋白质鉴定技术(MudPIT)程序,使用0%、25%、50%、80%和100%盐块的500mM乙酸铵水溶液,并使用缓冲液A中5%-55%缓冲液B的梯度(缓冲液A:95:5水:乙腈,0.1%甲酸;缓冲液B:80:20乙腈:水,0.1%甲酸)。在启用动态排除(60s)的数据依赖采集模式下收集数据。一次全质谱(MS1)扫描(400-1,800质荷比(m/z))之后进行第n个最丰富的离子的15次MS2扫描。加热的毛细管温度设定为200℃,纳喷雾电压设定为2.75kV。使用Raw Extractor v.1.9.9.2(斯克利普斯研究所(Scripps Research Institute))以MS1和MS2文件的形式提取数据,并使用IP2 v.3(集成蛋白质组学应用公司(Integrated Proteomics Applications,Inc.))中的ProLuCID搜索方法对Uniprot人类数据库进行搜索。半胱氨酸残基用羧氨基甲基化的静态修饰(+57.02146)和甲硫氨酸氧化以及轻或重TEV标签的多达两个差异修饰(分别为+464.28596或+470.29977)进行搜索。要求肽是完全胰蛋白酶肽,并且含有TEV修饰。通过DTASelect过滤ProLUCID数据,以实现低于5%的肽假阳性率。只有那些在三分之二的生物重复中显而易见的探针修饰的肽才解释其同位素轻重比(isotopic light to heavy ratio)。对于那些显示比率大于2的探针修饰的肽,我们仅解释了那些在所有三个生物重复中存在的、具有统计学显著性并在所有生物重复中显示高质量MS1峰形的靶点。通过对与肽相关的所有肽谱匹配的每个重复配对的轻与重前体丰度的比率取平均值,计算轻与重同位素探针修饰的肽比率。配对丰度也用于计算配对样本t-检验P值,以评估配对丰度的稳定性以及处理与对照之间变化的显著性。使用Benjamini-Hochberg方法校正P值。

[0399] 敲低研究

[0400] 使用购自Dharmacon公司的siRNA进行RNA干扰。将CFBE41o-4.7细胞以每6cm板400,000个细胞接种,并使其粘附过夜。使用8mL转染试剂:DharmaFECT 1(Dharmacon公司#

T-2001-02)、DharmaFECT 4(Dharmacon公司,T-2004-02)或Lipofectamine 2000(赛默飞世尔公司(ThermoFisher)#11668027),用33nM的非靶向(ON-TARGETplus非靶向对照库,Dharmacon公司#D-001810-10-20)或抗CFTR siRNA(Dharmacon公司,定制)转染细胞。将转染试剂添加到OPTIMEM(赛默飞世尔公司#31985070)培养基中,在室温孵育5分钟。同时将siRNA添加到等量的OPTIMEM中。然后将转染试剂和siRNA在OPTIMEM中的溶液合并,并在室温孵育30分钟。将这些合并的溶液用完全MEM稀释,以提供每4mL MEM中33nM siRNA和8mL转染试剂,并交换培养基。将细胞与转染试剂一起孵育24h,此时用含有DMSO或10mM化合物201的培养基替换培养基,并再孵育24h。然后收获细胞,并通过蛋白质印迹分析蛋白质丰度。

[0401] 定量TMT蛋白质组学分析

[0402] 如先前所述进行基于TMT的定量蛋白质组学分析。使用Proteome Discoverer v.2.2.0.388软件(赛默公司(Thermo)),利用Mascot v 2.5.1搜索引擎(Matrix Science公司,英国伦敦)和肽谱匹配过滤的Percolator验证节点处理获取的MS数据。对补充了常见污染物序列的Uniprot蛋白质数据库(典型人和小鼠序列,EBI,英国剑桥)进行数据搜索。前体的肽搜索容差设置为10ppm,片段的容差设置为0.8Da。胰蛋白酶切割特异性(在K,R切割,除非后面是P)允许最多2次漏切。半胱氨酸的脲甲基化被设定为固定修饰,甲硫氨酸氧化和N-末端和赖氨酸残基的TMT修饰被设定为可变修饰。通过Proteome Discoverer中的Percolator验证节点,在完整数据集水平上完成肽和蛋白质鉴定的数据验证,该数据集由每次实验的所有单个样品的组合Mascot搜索结果组成。使用总和丰度进行报告基团离子比率计算,其中最可靠的质心选自20ppm窗口。对于蛋白质定量,仅考虑在总数据集中对给定的已鉴定蛋白质进行独特分配的肽谱匹配(peptide-to-spectrum match)。使用Percolator估计的<1%的错误发现率(FDR)截止值,报告了高置信度的蛋白质鉴定。使用基于背景的ANOVA和Benjamini-Hochberg校正来确定调整后的p值,从而评估差异丰度显著性。

[0403] 实例1:具有可配合(ligandable)半胱氨酸残基的去泛素化酶的鉴定

[0404] 在各种复杂蛋白质组中用IA-炔烃标记的半胱氨酸反应性探针的化学蛋白质组学数据集中挖掘出的65种DUB中,所有100%的65种DUB中均鉴定出探针修饰的半胱氨酸(图2A)。在显示探针修饰的半胱氨酸的65种DUB中,这些DUB中的39种在我们的化学蛋白质组学数据集中显示>10的总谱图计数(图2B)。这39种DUB中的24种DUB或62%显示DUB催化或活性位点半胱氨酸的标记。鉴定了10种DUB,其中有一种探针修饰的半胱氨酸,其占特定DUB的探针修饰的半胱氨酸肽的总谱图计数的>50%。这10种DUB中的7种不靶向已知的催化半胱氨酸,3种靶向催化半胱氨酸(缩写为cat,图3A)。OTUB1 IA-炔烃标记的总化学蛋白质组学数据分析显示,与催化(cat)C91相比,C23是IA-炔标记的优势位点(图3B)。

[0405] 实例2:靶向示例性去泛素化酶(OTUB1)的半胱氨酸标记剂的鉴定

[0406] 进行针对重组示例性去泛素化酶OTUB1的IA-罗丹明标记竞争的半胱氨酸反应性文库的共价配体筛选以通过基于凝胶的基于活性的蛋白质分析(ABPP)鉴定OTUB1的小分子结合物。在IA-罗丹明标记(500nM,30min室温)之前,将媒介物DMSO或半胱氨酸反应性共价配体(50mM)与OTUB1在室温预孵育30min;参见图4。然后通过SDS/PAGE分离OTUB1,并评估凝胶内荧光并定量。凝胶内荧光的基于凝胶的ABPP数据如图5所示。

[0407] 实例3:示例性双功能化合物的合成

[0408] 化学合成和表征

[0409] 起始材料、试剂和溶剂购自商业供应商,除非另有说明,否则无需进一步纯化即可使用。所有反应通过薄层色谱法(TLC;TLC硅胶60F_{254},Sepulco密理博西格玛公司)监测。使用Biotage Isolera用Biotage Sfar®或Silicycle正相硅胶快速柱(5g、10g、25g或40g),通过快速柱色谱法纯化反应产物。1H NMR和13C NMR谱记录在400MHz Bruker Avance I光谱仪或600MHz Bruker Avance III光谱仪上,该光谱仪配有5mm 1H/BB Prodigy低温探针。化学位移以四甲基硅烷(TMS)的低场百万分率(ppm,δ)报告。偶合常数(J)以Hz报告。自旋多重性被描述为br(宽)、s(单重态)、d(双重态)、t(三重态)、q(四重态)和m(多重态)。

[0410] 通用程序A:

[0411] 将羧酸(1.0eq.)溶于二氯甲烷(DCM;0.1M)。添加胺(1.25eq.),然后添加二异丙基乙胺(DIEA;4.0eq.)、氢苯并三唑(HOBt;0.2eq.)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI;2.0eq.)。将反应混合物在室温搅拌过夜,添加水,并将混合物用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用1M HCl洗涤,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法纯化,得到酰胺。

[0412] 通用程序B:

[0413] 将Boc保护的胺溶于DCM(0.1M),并添加三氟乙酸(TFA)以得到1:2的TFA:DCM比率。允许溶液搅拌1h。然后蒸发挥发物,将所得油再溶解于DCM中,并用饱和$NaHCO_3$水溶液处理。然后将所得混合物用DCM萃取三次,然后将合并的有机萃取物用Na_2SO_4干燥并浓缩,得到胺,无需进一步纯化。

[0414] 通用程序C:

[0415] 将叔丁基酯如中间体3(30mg,0.086mmol,3.0eq)溶于DCM(600mL)。添加TFA(300mL)并将溶液搅拌1h。在真空下蒸发挥发物,添加DCM(1mL)并蒸发,得到羧酸中间体,但仍有一些过量的TFA。将该中间体溶于二甲基甲酰胺(DMF;500mL),并添加DIEA(150mL,30eq.)和适当的胺(0.029mmol,1.0eq),随后添加1-(双(二甲基氨基)亚甲基-1H-1,2,3-三唑并(4,5-b)吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU;30mg,0.079mmol,2.7eq.)。允许反应混合物在室温搅拌1h。添加水,并将混合物用EtOAc或4:1$CHCl_3$:IPA萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法纯化,得到最终化合物。

[0416] 通用程序D:

[0417] 向溶于二噁烷中的适当溴化物溶液中添加N,N'-二甲基乙二胺(0.25eq)、K_2CO_3(3.0eq)、CuI(0.1eq)和适当的酰胺偶联配偶体(1.0eq)。将反应混合物脱气,将气氛换成氮气,并在100℃搅拌过夜。一旦冷却,向完成的反应混合物中添加饱和NH_4Cl,搅拌20分钟,然后通过硅藻土过滤,并将硅藻土垫用乙酸乙酯(EtOAc)洗涤。将混合物用EtOAc萃取三次,用盐水洗涤两次,用$NaSO_4$干燥,然后真空浓缩。将所得粗混合物通过硅胶柱色谱法纯化。

[0418] 通用程序E:

[0419] 将适当的胺溶于含碳酸钾(3.0eq)的四氢呋喃(THF)和水(2:1THF:H_2O)中。将氯甲酸苄酯(1-2eq)滴加到反应混合物中,然后在室温剧烈搅拌过夜。添加水,并将混合物用EtOAc萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤两次,浓缩,并使用快速柱色谱法纯化所得粗品。

[0420] 通用程序F:

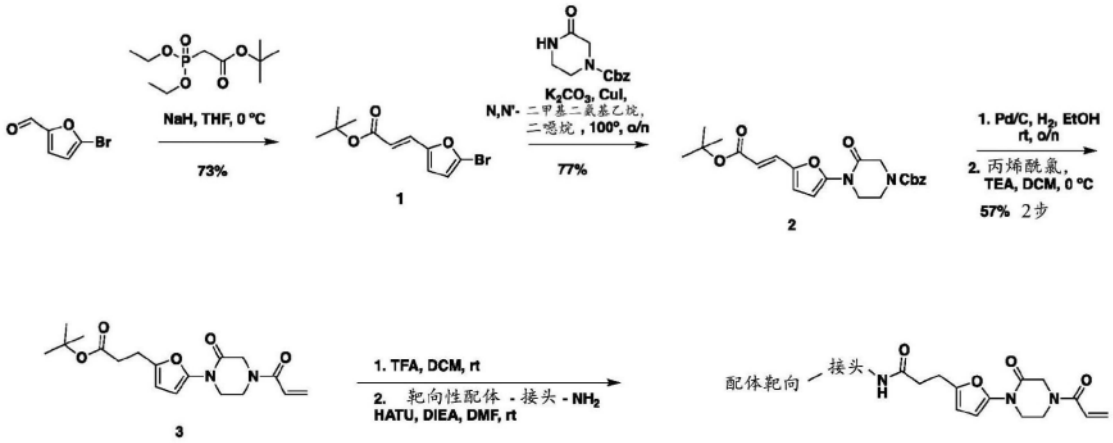
[0421] 将偶联的产物溶于DCM,然后滴加TFA(1:2TFA:DCM),直到通过TLC观察到起始材料的消耗(15-30min)。然后将混合物用DCM洗涤两次,无需进一步纯化立即使用。

[0422] 通用程序G:

[0423] 将Pd/C(10%wt.)添加到Cbz保护的化合物在乙醇(EtOH;0.2M)中的混合物中,并将气氛换成H_2(气球)。将反应混合物剧烈搅拌过夜,然后用DCM稀释,通过注射器过滤器(0.45μm)过滤,浓缩,并使用硅胶柱色谱法纯化。

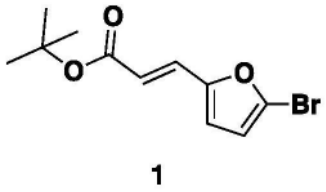
[0424] 通用程序H:

[0425] 在冰上将胺起始材料溶于DCM。然后将三乙胺(TEA;3.0eq)和丙烯酰氯(1.5eq)添加到反应混合物中,直到通过TLC观察到起始材料的消耗(0.5-2h)。添加水,并将反应混合物用DCM萃取三次。将有机萃取物合并,用H_2O洗涤,然后用盐水洗涤,浓缩,并通过硅胶柱色谱法纯化。

[0426] 

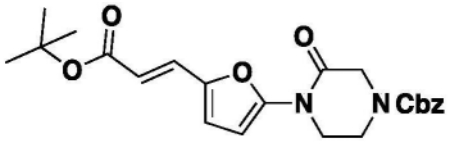
[0427] 方案1.描述本文所述示例性双功能化合物的合成路线的通用方案。

[0428] 化合物200的合成

[0429] 

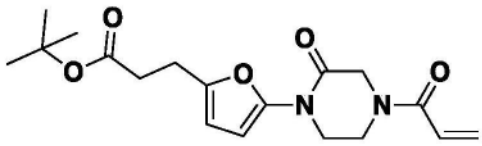
1

[0430] (E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯(1):将二乙基磷酰乙酸叔丁酯(971mg,0.908mL,3.85mmol)溶于THF(22mL),并将溶液冷却至0℃。然后在5分钟内分批添加2-溴呋喃-2甲醛(613mg,3.50mmol)。将反应在0℃搅拌20分钟,有胶状固体沉淀,然后添加水。将所得混合物用EtOAc萃取三次,将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(0-15% EtOAc/Hex)纯化,得到呈油状物的标题化合物(782mg,2.86mmol,82%)。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.26(d,J=15.7Hz,1H),6.55(d,J=3.5Hz,1H),6.42(d,J=3.4Hz,1H),6.29(d,J=15.7Hz,1H),1.55(s,9H)。

[0431] 

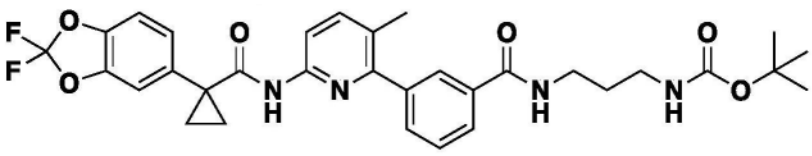
2

[0432] (E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(2):将(E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯(1.62g,5.94mmol)溶于二噁烷(30mL),并添加3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(1.4g,5.94mmol)、K_2CO_3(2.46g,17.8mmol)、N,N'-二甲基二氨基乙烷(0.167mL,1.49mmol)、和CuI(114mg,0.59mmol)。将混合物在氮气下回流搅拌40h,然后冷却至室温。添加5mL饱和NH_4Cl水溶液并将混合物搅拌30min。然后将混合物在EtOAc中稀释,通过硅藻土过滤,添加水,分配混合物,并用EtOAc萃取水层。将萃取物合并,用盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并通过硅胶色谱法(0-35% EtOAc/Hex)纯化,得到呈油状物的标题化合物(1.95g,4.59mmol,77%)。LC/MS[M+2H-tBu]$^+$m/z计算值:371.18,实际值:373.1。1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ7.45-7.24(m,6H),6.98(s,1H),6.57(s,1H),6.08(dd,J=15.7,3.4Hz,1H),5.14(dd,J=4.4,2.3Hz,2H),4.22(s,2H),4.01(s,2H),3.77(s,2H),1.47(s,9H)。

[0433] 

3

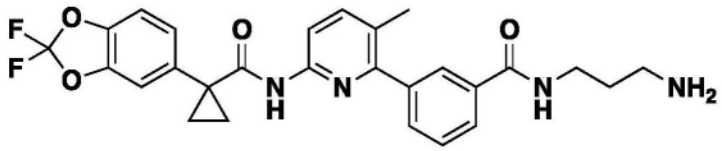
[0434] 3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯(3,或中间体1):将(E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(1.95g,4.59mmol)溶于EtOH(25mL),并添加Pd/C(200mg,10%wt.Pd)。将反应置于H_2气氛下并剧烈搅拌过夜,然后通过硅藻土过滤两次并浓缩。然后将粗产物再溶解在DCM(25mL)中,冷却至0℃并用TEA(1.28mL,9.18mmol)处理,然后在2分钟内添加丙烯酰氯(445mL,5.51mmol)在DCM(5mL)中的溶液。搅拌20min后,添加水,并将混合物用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并将所得粗油状物通过硅胶色谱法(0-75% EtOAc/Hex)纯化,获得呈油状物的标题化合物(3)(846mg,2.43mmol,53%,两步产率)。标题化合物(3)储存在-20℃以避免分解。LC/MS[M+2H-tBu]$^+$m/z计算值:293.1,实际值:293.1。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ6.64-6.46(m,1H),6.41(dd,J=16.7,2.0Hz,1H),6.29(d,J=3.2Hz,1H),6.04(d,J=3.3Hz,1H),5.82(dd,J=10.2,2.0Hz,1H),4.42(d,J=24.9Hz,2H),4.06-3.82(m,4H),2.88(t,J=7.8Hz,2H),2.54(d,J=7.6Hz,2H),1.44(s,9H)。

[0435] 

4a

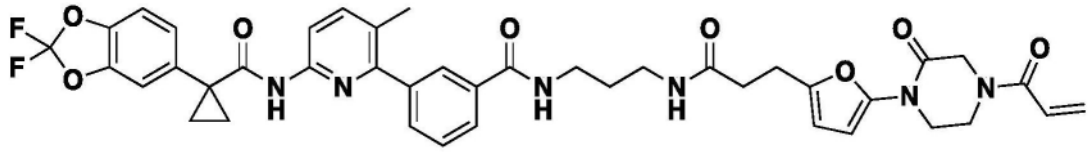
[0436] (3-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)丙基)氨基甲酸叔丁酯(4a):将鲁马卡托(3-(6-(1-(2,

2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸)(18mg,0.04mmol)、(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(14mg,0.08mmol)、DIEA(35mL,0.20mmol)、和HOBt(5.4mg,0.04mmol)溶于DCM(1mL),然后添加EDCI HCl(15mg,0.05mmol)。将反应在室温搅拌2天,然后添加水,将混合物分配,并将水层用DCM萃取两次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并将所得粗油状物通过硅胶色谱法(0-60% EtOAc/Hex)纯化,获得呈澄清油状物的标题化合物(4a)(23mg,0.038mmol,94%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:609.24,实际值:609.3。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.13(d,J=8.4Hz,1H),7.95(s,1H),7.88(d,J=7.6Hz,1H),7.74(s,1H),7.62(d,J=8.5Hz,1H),7.60-7.49(m,2H),7.34(s,1H),7.30-7.18(m,2H),7.11(d,J=8.2Hz,1H),4.96(s,1H),3.54(q,J=6.2Hz,2H),3.27(q,J=6.3Hz,2H),2.31(s,3H),1.78(q,J=3.9Hz,2H),1.76-1.70(m,2H),1.47(s,9H),1.19(q,J=3.9Hz,2H)。

[0437] 

5a

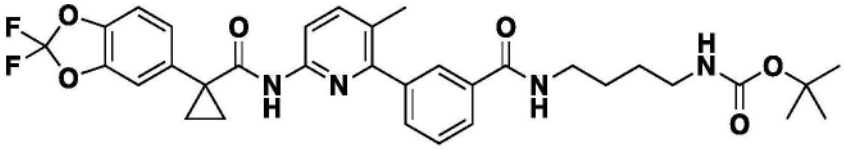
[0438] N-(3-氨基丙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5a):将Boc保护的胺4a(23mg,0.038mmol)溶于DCM(1mL),并添加TFA(1mL),并将溶液搅拌2小时。然后蒸发挥发物,将所得油再溶解于DCM中,并用饱和$NaHCO_3$水溶液处理。然后将所得混合物用DCM萃取三次,将合并的有机萃取物用Na_2SO_4干燥,浓缩,得到呈无色油状物的标题化合物5a(15mg,0.029mmol,78%),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:509.19,实际值:509.2。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ10.73(s,1H),8.96(s,1H),8.66(t,J=5.7Hz,1H),7.95-7.85(m,3H),7.79-7.66(m,2H),7.60(d,J=7.6Hz,1H),7.56-7.49(m,2H),7.41-7.30(m,2H),3.33(q,J=6.4Hz,2H),2.88-2.77(m,2H),2.21(s,3H),1.79(p,J=6.9Hz,2H),1.52(dd,J=4.9,2.5Hz,2H),1.19-1.15(m,2H)。

[0439] 

[0440] N-(3-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)丙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物200):将中间体1(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯)(14mg,0.04mmol)溶于DCM(0.6mL),并添加TFA(0.3mL),并将溶液在室温搅拌1h,直到通过TLC监测到起始材料被消耗。蒸发挥发物,添加DCM并再次蒸发。将残余物溶于DCM(1.5mL),并添加DIEA(140mL,0.80mmol),然后添加N-(3-氨基丙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5.4mg,0.1mmol)。然后添加EDCI HCl(15mg,0.08mmol),并将混合物搅拌16h。添加水,并将所得悬浮液用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用Na_2SO_4干燥,然后浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(0-5% MeOH/DCM)纯化,获得标题化合物(化合物200,9.5mg,

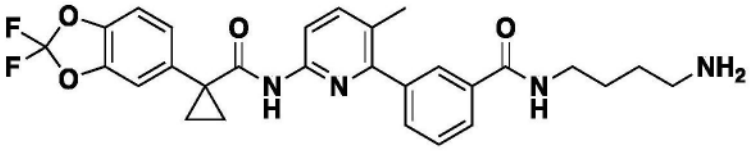
0.012mmol,30%),其为在1:1水:乙腈(2mL)中冻干后的粉末。HRMS[M+H]$^+$m/z计算值:783.2949,实际值:783.2954。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.09(d,J=8.4Hz,1H),7.93-7.87(m,1H),7.83(dt,J=7.5,1.6Hz,1H),7.72(s,1H),7.59(d,J=8.5Hz,1H),7.57-7.45(m,2H),7.29(s,1H),7.23(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.19(d,J=1.7Hz,1H),7.07(d,J=8.1Hz,1H),6.50(s,1H),6.43-6.33(m,2H),6.19(d,J=3.2Hz,1H),6.07(d,J=3.3Hz,1H),5.81(d,J=10.1Hz,1H),4.47-4.31(m,2H),4.04-3.78(m,4H),3.36(q,J=6.2Hz,2H),3.32-3.23(m,2H),2.96(t,J=7.2Hz,2H),2.55(t,J=7.2Hz,2H),2.26(s,3H),1.74(q,J=3.9Hz,2H),1.69-1.58(m,2H),1.16(q,J=3.9Hz,2H)。13C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ172.5,171.8,167.4,165.0,155.5,149.8,148.9,145.0,144.1,143.6,141.0,140.2,134.9,134.6,131.8,131.7,130.0,128.5,127.8,127.0,126.6,126.5,126.3,112.9,112.4,110.2,107.6,101.3,36.0,35.9,35.2,31.2,29.5,24.4,19.2,17.2

[0441] 化合物202的合成

[0442] 

4b

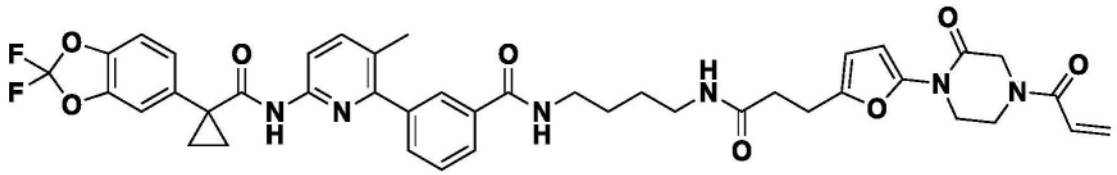
[0443] (4-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(4b):使鲁马卡托(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸)(181mg,0.40mmol)、(5-氨基戊基)氨基甲酸叔丁酯(121mg,0.60mmol)、DIEA(350mL,2.00mmol)、和HOBt(54mg,0.4mmol)根据通用程序A反应,并通过硅胶色谱法纯化,获得呈澄清油状物的标题化合物4b(240mg,0.38mmol,95%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:637.28,实际值:637.3。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J=8.4Hz,1H),7.84(s,1H),7.80(dt,J=7.6,1.6Hz,1H),7.73(s,1H),7.63(d,J=8.5Hz,1H),7.57(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.51(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.1,1.8Hz,1H),7.23(d,J=1.7Hz,1H),7.12(d,J=8.2Hz,1H),6.25(s,1H),3.17(d,J=6.8Hz,2H),4.61(s,1H),3.49(q,J=7.0,6.8,6.3Hz,2H),2.29(s,3H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.56(q,J=7.2Hz,2H),1.46(s,11H),1.36-1.27(m,2H),1.20(q,J=3.9Hz,2H),0.97-0.89(m,2H)。

[0444] 

5b

[0445] N-(4-氨基丁基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5b):根据通用程序B将Boc保护的胺4b(240mg,0.038mmol)去保护,得到呈无色油状物的胺5b(104mg,0.20mmol,定量)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:523.2,实际值:523.2。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.13(dd,J=8.4,1.7Hz,1H),7.85(tt,J=8.5,1.8Hz,1H),7.81(dt,J=7.6,1.6Hz,1H),7.73(s,1H),7.62(dd,J=8.5,

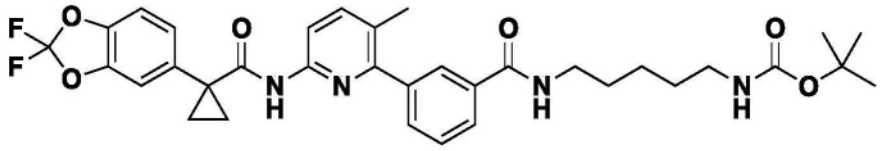
2.1Hz,1H),7.56(ddt,J=7.7,2.9,1.5Hz,1H),7.50(td,J=7.6,3.0Hz,1H),7.27(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.22(t,J=1.8Hz,1H),7.11(d,J=8.1Hz,1H),7.03(d,J=5.3Hz,1H),3.57-3.46(m,2H),3.27(d,J=6.7Hz,1H),2.80(t,J=6.7Hz,1H),2.28(d,J=2.5Hz,3H),1.98(d,J=1.4Hz,1H),1.86(s,1H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.72(dd,J=8.1,6.3Hz,1H),1.63-1.53(m,1H),1.20(qd,J=4.0,1.1Hz,2H))。

[0446] 

[0447] N-(5-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)戊基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物202):将中间体1(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯)(30mg,0.086mmol)溶于DCM(0.6mL),并添加TFA(0.3mL),并将溶液搅拌1h,直到起始材料被消耗。蒸发挥发物,添加DCM并再次蒸发。将残余物溶于DCM(1.5mL),并添加DIEA(150mL,0.86mmol),然后添加N-(4-氨基丁基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5b)(15mg,0.029mmol)。然后添加HATU(30mg,0.079mmol),并将混合物搅拌16h。添加水,并将所得悬浮液用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,浓缩,然后将粗残余物通过硅胶色谱法(0-5% MeOH/DCM)纯化,获得呈固体的化合物202(9.5mg,0.012mmol,30%)。HRMS(ESI):m/z计算值:797.3032,实际值:797.3109。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.12(d,J=8.4Hz,1H),7.88(t,J=1.8Hz,1H),7.84(dt,J=7.6,1.6Hz,1H),7.74(s,1H),7.62(d,J=8.5Hz,1H),7.56(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.51(t,J=7.6Hz,1H),7.26(dd,J=8.2,1.7Hz,1H),7.22(d,J=1.7Hz,1H),7.11(d,J=8.2Hz,1H),6.80(s,1H),6.53(d,J=24.7Hz,1H),6.41(dd,J=16.7,2.0Hz,1H),6.20(d,J=3.2Hz,1H),6.07(d,J=3.3Hz,2H),5.83(dd,J=10.2,2.0Hz,1H),4.38(d,J=28.2Hz,2H),4.07-3.79(m,4H),3.73(tt,J=9.8,4.9Hz,1H),3.45(q,J=6.4Hz,2H),3.27(q,J=6.2Hz,2H),3.20(qd,J=7.4,3.4Hz,1H),2.94(q,J=6.1,5.0Hz,2H),2.52(t,J=7.2Hz,2H),2.28(s,3H),1.77(q,J=3.9Hz,2H),1.63-1.51(m,2H),1.19(q,J=3.9Hz,2H)。

[0448] 13C NMR(151MHz,CDCl3)δ171.8,167.4,165.0,155.5,149.9,148.9,144.7,144.1,143.6,141.0,140.2,134.9,134.7,133.4,131.8,131.7,128.5,127.6,127.0,126.6,126.4,112.9,112.4,110.2,107.4,101.2,55.5,43.5,39.6,39.0,34.9,31.2,26.8,26.7,24.3,19.2,18.6,17.2,17.2,12.5。

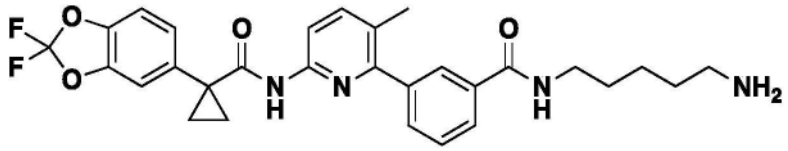
[0449] 化合物201的合成

[0450] 

4c

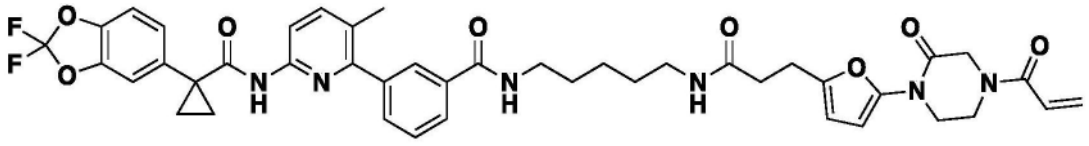
[0451] (5-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺

基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(4c):将鲁马卡托(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸)(181mg,0.40mmol)、(5-氨基戊基)氨基甲酸叔丁酯(121mg,0.60mmol)、DIEA(350μL,2.00mmol)、和HOBt(54mg,0.4mmol)溶于DCM(6mL),然后添加EDCI HCl(153mg,0.50mmol)。将反应在室温搅拌16小时,然后添加水,将混合物分配,并将水层用DCM萃取两次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并将所得粗油状物通过硅胶色谱法(0-50%EtOAc/Hex)纯化,获得呈油状物的4c(240mg,0.38mmol,95%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:637.28,实际值:637.3。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J=8.4Hz,1H),7.84(s,1H),7.80(dt,J=7.6,1.6Hz,1H),7.73(s,1H),7.63(d,J=8.5Hz,1H),7.57(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.51(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.1,1.8Hz,1H),7.23(d,J=1.7Hz,1H),7.12(d,J=8.2Hz,1H),6.25(s,1H),3.17(d,J=6.8Hz,2H),4.61(s,1H),3.49(q,J=7.0,6.8,6.3Hz,2H),2.29(s,3H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.56(q,J=7.2Hz,2H),1.46(s,11H),1.36-1.27(m,2H),1.20(q,J=3.9Hz,2H),0.97-0.89(m,2H)。

[0452] 

5c

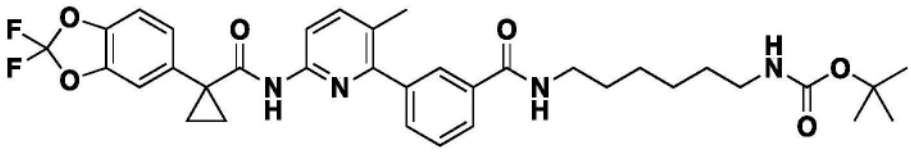
[0453] N-(5-氨基戊基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5c):将4c(240mg,0.038mmol)溶于DCM(2mL),添加TFA(2mL),并将溶液搅拌2小时。然后蒸发挥发物,将所得油再溶解于DCM中,并用饱和$NaHCO_3$水溶液处理。分离各层,然后将水层用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用Na_2SO_4干燥,并浓缩,得到呈油状物的标题化合物5c(184mg,0.34mmol,85%,两步产率),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:537.22,实际值:537.2。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.09(d,J=8.4Hz,1H),7.80(t,J=1.8Hz,1H),7.76(dd,J=7.7,1.5Hz,1H),7.69(s,1H),7.59(d,J=8.5Hz,1H),7.57-7.50(m,1H),7.47(t,J=7.6Hz,1H),7.23(dd,J=8.2,1.7Hz,1H),7.19(d,J=1.8Hz,1H),7.08(d,J=8.2Hz,1H),6.30(s,1H),3.45(q,J=6.7Hz,2H),2.74(t,J=6.8Hz,2H),2.25(s,3H),1.65-1.59(m,2H),1.57-1.47(m,2H),1.48-1.40(m,2H),1.33-1.23(m,2H),1.20-1.12(m,2H),0.91-0.85(m,2H)。

[0454] 

[0455] N-(5-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)戊基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物201):将3(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯)(70mg,0.20mmol)溶于DCM(1.0mL),并添加TFA(0.8mL),并将溶液搅拌1h,直到通过TLC监测到起始材料被消耗。蒸发挥发物,添加DCM并再次蒸发。将残余物溶于DMF(1.5mL),并添加DIEA(150μL,0.86mmol),然后添加中间体5c(N-(5-氨基戊基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺)(54mg,

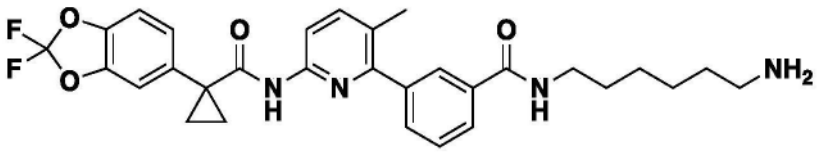
0.1mmol)。然后添加HATU(152mg,0.4mmol),并将混合物搅拌1h。添加水,将所得悬浮液用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用1M HCl洗涤两次,用饱和$NaHCO_3$洗涤两次,用5%LiCl洗涤两次,用盐水洗涤,并用Na_2SO_4干燥,然后浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(0-4%MeOH/DCM)纯化,获得化合物202(35mg,0.043mmol,43%),其为在1:1水:乙腈(2mL)中冻干后的粉末。HRMS[M+H]$^+$m/z计算值:811.3262,实际值:811.3267。1H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δ8.11(d,J=8.4Hz,1H),7.85(t,J=1.8Hz,1H),7.81(dt,J=7.8,1.5Hz,1H),7.71(s,1H),7.61(d,J=8.5Hz,1H),7.55(dt,J=7.7,1.4Hz,1H),7.49(t,J=7.6Hz,1H),7.25(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.21(d,J=1.8Hz,1H),7.10(d,J=8.2Hz,1H),6.53(s,1H),6.41(dd,J=16.7,1.8Hz,2H),6.22(d,J=3.3Hz,1H),6.03(d,J=3.3Hz,1H),5.82(dd,J=10.4,1.8Hz,2H),4.54-4.32(m,2H),4.07-3.79(m,4H),3.45(q,J=6.6Hz,2H),3.24(q,J=6.6Hz,2H),2.91(t,J=7.3Hz,2H),2.46(t,J=7.3Hz,2H),2.27(s,3H),1.77(q,J=3.9Hz,2H),1.65-1.59(m,2H),1.52(p,J=7.0Hz,2H),1.40-1.32(m,2H),1.18(q,J=3.9Hz,2H)。13C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ171.7,167.4,165.0,155.5,148.9,144.8,144.1,143.6,141.0,140.2,134.9,134.8,131.8,128.4,127.5,127.0,126.6,126.6,126.3,112.9,112.4,110.2,107.4,100.9,39.7,39.1,31.2,29.0,24.2,23.7,19.2,17.2。

[0456] 化合物203的合成

[0457] 

4d

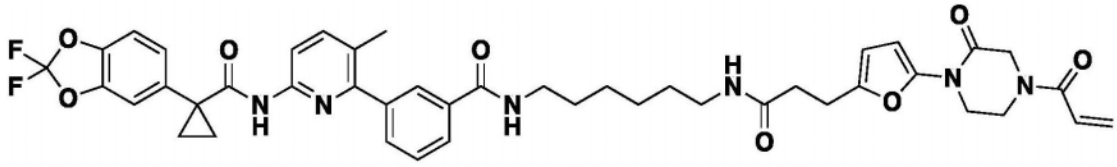
[0458] (6-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)己基)氨基甲酸叔丁酯(4d):使鲁马卡托(100mg,0.22mmol)和(6-氨基己基)氨基甲酸叔丁酯根据通用程序A反应,并通过硅胶色谱法(0-60% EtOAc/Hex)纯化,获得呈油状物的中间体4d(114mg,0.18mmol,80%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:651.3,实际值:651.2。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.14(d,J=8.4Hz,1H),7.86(s,1H),7.82(d,J=7.7Hz,1H),7.72(s,1H),7.63(d,J=8.5Hz,1H),7.57(dt,J=7.6,1.5Hz,1H),7.51(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.23(d,J=1.7Hz,1H),7.12(d,J=8.1Hz,1H),6.37(s,1H),4.58(s,1H),3.48(q,J=6.7Hz,2H),3.17(q,J=6.7Hz,2H),2.29(s,3H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.69-1.64(m,1H),1.58-1.49(m,1H),1.46(s,9H),1.45-1.38(m,6H),1.20(q,J=3.9Hz,2H)。

[0459] 

5d

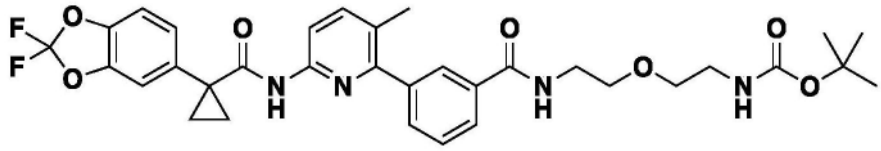
[0460] N-(6-氨基己基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺)(5d):根据通用程序B将4d(114mg,0.18mmol)去保护,得到呈油状物的胺5d(99mg,0.18mmol,定量)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:551.2,实际

值:551.2。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.10(d,J=8.4Hz,1H),7.78(s,1H),7.74(dt,J=7.5,1.6Hz,1H),7.69(s,1H),7.59(d,J=8.4Hz,1H),7.53(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.47(t,J=7.6Hz,1H),7.22(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.18(d,J=1.6Hz,1H),7.07(d,J=8.2Hz,1H),6.17(s,1H),3.44(td,J=7.2,5.8Hz,2H),2.68(t,J=6.8Hz,2H),2.24(s,3H),1.99(s,1H),1.81(s,1H),1.74(q,J=3.9Hz,2H),1.67-1.55(m,3H),1.51-1.33(m,5H),1.16(q,J=3.9Hz,2H)。

[0461] 

[0462] N-(6-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)己基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物203):将3(30mg,0.086mmol)去保护,并根据通用程序C与5d(16mg,0.029mmol)偶联,得到呈澄清无色油状物的化合物203(17.4mg,0.021mmol,73%)。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:825.3345,实际值:825.3425。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.12(d,J=8.4Hz,1H),7.89-7.79(m,2H),7.73(s,1H),7.62(d,J=8.5Hz,1H),7.56(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.51(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.22(d,J=1.7Hz,1H),7.11(d,J=8.2Hz,1H),6.54(d,J=31.0Hz,2H),6.41(dd,J=16.8,1.9Hz,1H),6.25(d,J=3.3Hz,1H),6.07(d,J=3.3Hz,1H),5.98(d,J=39.7Hz,1H),5.83(dd,J=10.3,2.0Hz,1H),4.42(d,J=21.6Hz,2H),4.05-3.81(m,4H),3.74(p,J=6.7Hz,2H),3.45(q,J=6.7Hz,2H),3.22(dq,J=13.2,6.9Hz,3H),2.94(q,J=6.4,5.5Hz,2H),2.52(t,J=7.4Hz,2H),2.28(s,3H),1.78(q,J=3.9Hz,2H),1.61(p,J=6.9Hz,2H),1.42-1.30(m,3H),1.20(q,J=3.9Hz,2H)。13C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ171.8,167.3,155.5,149.7,148.9,144.7,144.1,143.6,141.0,140.2,134.9,134.9,133.4,131.7,131.7,130.0,128.5,127.5,127.0,126.6,126.6,126.4,112.9,112.4,110.2,107.3,100.8,55.6,43.6,39.6,39.1,34.8,31.2,29.4,29.3,26.0,25.9,24.2,19.1,18.6,17.2,12.5。

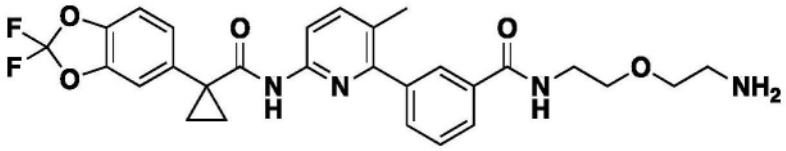
[0463] 化合物204的合成

[0464] 

4e

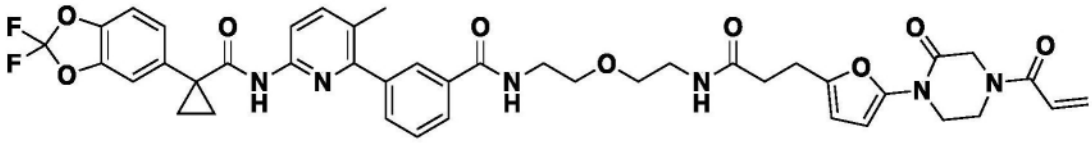
[0465] (2-(2-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(4e):使鲁马卡托(100mg,0.22mmol)和(2-(2-氨基乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(57mg,0.28mmol)根据通用程序A反应,并通过硅胶色谱法(0-60% EtOAc/Hex)纯化,获得呈澄清无色油状物的4e(122mg,0.19mmol,87%)。LC/MS[M+H]+m/z计算值:639.3,实际值:639.2。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.14(d,J=8.4Hz,1H),7.88(t,J=1.8Hz,1H),7.81(dt,J=7.5,1.6Hz,1H),7.72(s,1H),7.63(d,J=8.5Hz,1H),7.59(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.52(t,J=7.6Hz,1H),7.27

(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.23(d,J＝1.7Hz,1H),7.12(d,J＝8.2Hz,1H),6.60(s,1H),4.87(s,1H),3.74-3.62(m,4H),3.58(t,J＝5.2Hz,2H),3.41-3.31(m,2H),2.29(s,3H),1.79(q,J＝3.9Hz,2H),1.46(s,9H),1.20(q,J＝3.9Hz,2H)。

[0466] 

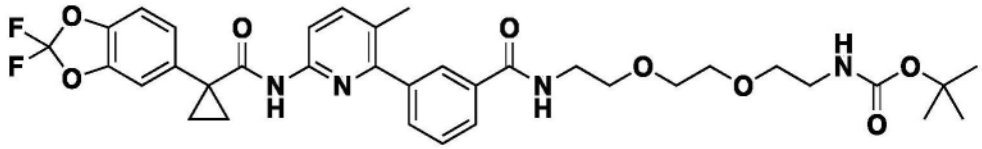
5e

[0467] N-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5e):根据通用程序B将4e(122mg,0.19mmol)去保护,得到呈油状物的胺5e(102mg,0.19mmol,定量)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:539.2实际值:639.2。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.14(d,J＝8.4Hz,1H),7.88(t,J＝1.7Hz,1H),7.85(s,1H),7.77(s,1H),7.63(d,J＝8.5Hz,1H),7.57(dt,J＝7.7,1.5Hz,1H),7.51(t,J＝7.6Hz,1H),7.27(dd,J＝8.1,1.8Hz,1H),7.23(d,J＝1.7Hz,1H),7.12(d,J＝8.2Hz,1H),6.91(s,0H),3.70(tdd,J＝7.9,4.0,1.2Hz,4H),3.55(t,J＝5.2Hz,2H),2.91(t,J＝5.2Hz,2H),2.29(s,3H),1.79(q,J＝3.9Hz,2H),1.20(q,J＝3.9Hz,2H)。

[0468] 

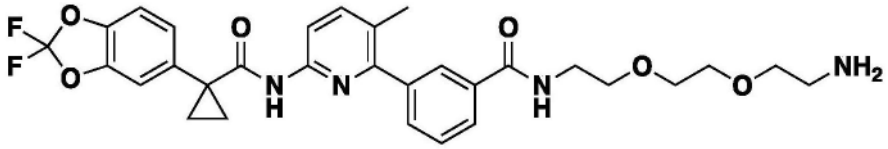
[0469] N-(2-(2-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)乙氧基)乙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物204)。将3(30mg,0.086mmol)去保护,并根据通用程序C与中间体5e(23mg,0.043mmol)偶联,得到呈泡沫的化合物204(10.9mg,0.0134mmol,31％产率)。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:813.31,实际值:813.3055。^{1}H NMR(600MHz,氯仿-d)δ8.10(d,J＝8.4Hz,1H),7.88(t,J＝1.8Hz,1H),7.82(dt,J＝7.7,1.5Hz,1H),7.72(s,1H),7.60(d,J＝8.5Hz,1H),7.55(dt,J＝7.6,1.4Hz,1H),7.48(t,J＝7.7Hz,1H),7.25(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.21(d,J＝1.7Hz,1H),7.09(d,J＝8.2Hz,1H),6.86(s,1H),6.39(dd,J＝16.7,1.8Hz,1H),6.20(d,J＝3.3Hz,1H),6.02(d,J＝3.2Hz,1H),5.81(dd,J＝10.4,1.8Hz,1H),3.82(s,2H),3.73(hept,J＝6.6Hz,2H),3.63(d,J＝4.1Hz,4H),3.53(t,J＝5.1Hz,2H),3.41(q,J＝5.3Hz,2H),3.19(q,J＝7.4Hz,2H),2.89(t,J＝7.5Hz,2H),2.47(t,J＝7.3Hz,2H),2.26(s,3H),1.48(t,J＝7.4Hz,3H),1.18(q,J＝3.9Hz,2H),0.12-0.06(m,1H)。^{13}C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ171.77,167.53,165.03,155.44,149.75,148.91,144.71,144.11,143.59,140.95,140.22,134.94,134.55,131.91,131.68,128.46,127.72,126.98,126.64,126.36,112.96,112.39,110.21,107.27,100.91,69.63,69.50,55.72,53.43,43.65,39.83,39.18,34.69,31.20,24.08,19.14,17.18,12.52。

[0470] 化合物205的合成

[0471] 

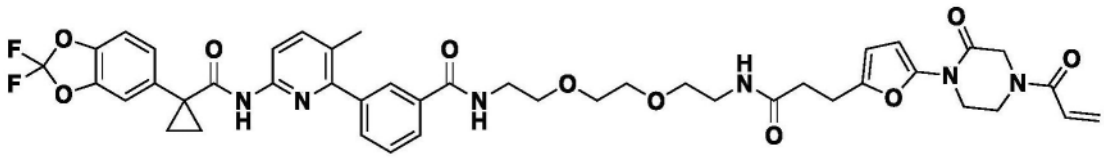
4f

[0472] (2-(2-(2-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(4f):使鲁马卡托(100mg,0.22mmol)和(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(70mg,0.28mmol)根据通用程序A反应,并通过硅胶色谱法(0-80% EtOAc/Hex)纯化,获得呈油状物的4f(127mg,0.19mmol,85%)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:683.3,实际值:683.3。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.14(d,J=8.4Hz,1H),7.88(s,1H),7.80(d,J=7.5Hz,1H),7.77-7.72(m,1H),7.63(d,J=8.4Hz,1H),7.57(d,J=7.5Hz,1H),7.52(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.23(d,J=1.7Hz,1H),7.11(d,J=8.2Hz,1H),6.74(s,1H),5.02(s,1H),3.75-3.61(m,8H),3.56(t,J=5.4Hz,2H),3.31(d,J=5.8Hz,2H),2.28(s,3H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.45(s,9H),1.20(q,J=3.9Hz,2H)。

[0473] 

5f

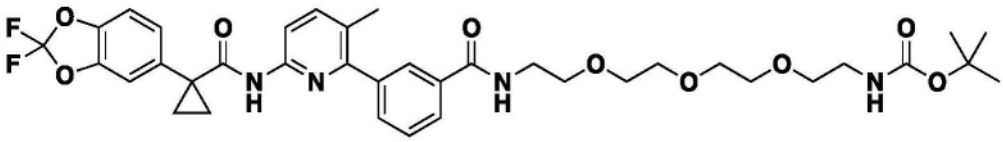
[0474] N-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5f):根据通用程序B将4f(127mg,0.19mmol)去保护,得到呈油状物的胺5f(111mg,0.19mmol,定量)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:583.2,实际值:583.3。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.13(d,J=8.4Hz,1H),7.89(t,J=1.7Hz,1H),7.83(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.78(s,1H),7.63(d,J=8.5Hz,1H),7.56(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.51(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.2,1.7Hz,1H),7.23(d,J=1.7Hz,1H),7.12(d,J=8.2Hz,1H),7.08(s,1H),3.73-3.62(m,9H),3.51(t,J=5.2Hz,2H),2.82(t,J=5.1Hz,2H),2.28(s,3H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.20(q,J=3.9Hz,2H)。

[0475] 

[0476] N-(2-(2-(2-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物205)。将中间体3(30mg,0.086mmol)去保护,并根据通用程序C与中间体5f(25mg,0.043mmol)偶联,得到呈油状物的化合物205(11.6mg,0.0134mmol,31%产率)。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:857.33,实际值:857.3319。1H NMR(600MHz,氯仿-d)δ8.11(d,J=8.4Hz,1H),7.86(tt,J=1.8,1.2Hz,1H),7.79(ddd,J=7.7,1.8,1.2Hz,1H),7.72(s,1H),7.62-7.58(m,1H),7.55(ddd,J=7.6,1.7,1.2Hz,1H),7.48

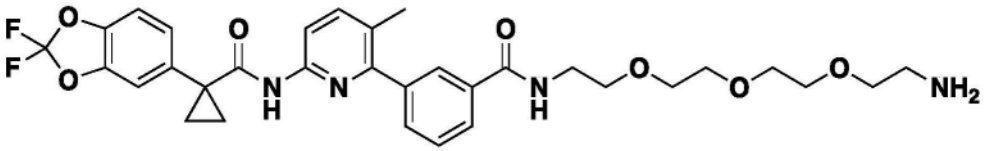
(td,J＝7.7,0.6Hz,1H),7.25(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.21(d,J＝1.7Hz,1H),7.09(d,J＝8.2Hz,1H),6.83(d,J＝5.8Hz,1H),6.41(dd,J＝16.7,1.8Hz,1H),6.24(d,J＝3.2Hz,1H),6.18(s,1H),6.05(dd,J＝3.3,1.0Hz,1H),5.82(dd,J＝10.5,1.8Hz,1H),5.32(s,1H),4.40(d,J＝39.8Hz,2H),3.94(d,J＝47.9Hz,1H),3.85(s,2H),3.70-3.58(m,7H),3.50(dd,J＝5.6,4.8Hz,2H),3.39(q,J＝5.4Hz,2H),2.93(t,J＝7.5Hz,2H),2.47(t,J＝7.5Hz,2H),2.25(s,3H),2.19(s,1H),1.76(q,J＝3.8Hz,2H),1.47(d,J＝12.2Hz,1H),1.18(p,J＝3.8Hz,2H)。^{13}C NMR 151MHz,$CDCl_3$)δ171.78,171.54,167.31,164.98,155.46,148.91,144.68,144.12,143.60,140.94,140.25,134.93,134.64,131.88,131.68,128.46,127.72,126.98,126.63,126.51,126.34,113.00,112.39,110.19,107.18,100.77,70.23,70.18,69.80,55.62,53.43,43.58,39.81,39.16,34.67,31.20,30.92,23.97,19.13,17.19,12.47,1.02。

[0477] 化合物206的合成

[0478] 

4g

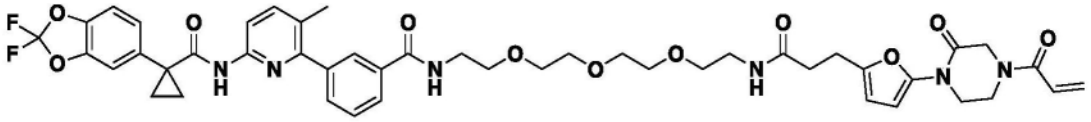
[0479] (1-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯基)-1-氧代-5,8,11-三氧杂-2-氮杂十三烷-13-基)氨基甲酸叔丁酯(4g):使鲁马卡托(100mg,0.22mmol)和(2-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)-乙基)氨基甲酸叔丁酯(82mg,0.28mmol)根据通用程序A反应,并通过硅胶色谱法(0-100％EtOAc/Hex)纯化,获得呈油状物的4g(139mg,0.19mmol,87％)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:727.3,实际值:727.2。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.14(d,J＝8.4Hz,1H),7.89(s,1H),7.82(d,J＝7.5Hz,1H),7.73(s,1H),7.63(d,J＝8.5Hz,1H),7.57(d,J＝7.5Hz,1H),7.51(t,J＝7.6Hz,1H),7.27(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.23(d,J＝1.7Hz,1H),7.12(d,J＝8.2Hz,1H),6.80(s,1H),3.73-3.66(m,9H),3.64(dd,J＝6.1,3.2Hz,2H),3.59(dd,J＝6.1,3.2Hz,2H),3.50(t,J＝5.1Hz,2H),3.30(d,J＝5.7Hz,2H),2.28(s,3H),1.79(q,J＝3.9Hz,2H),1.46(s,9H),1.20(q,J＝3.9Hz,2H)。

[0480] 

5g

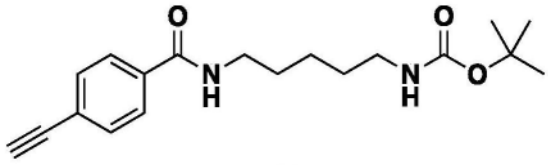
[0481] N-(2-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(5g):根据通用程序B将4g(139mg,0.19mmol)去保护,得到呈油状物的胺5g(119mg,0.19mmol,定量)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:627.3,实际值:627.3。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.13(d,J＝8.4Hz,1H),7.93(t,J＝1.8Hz,1H),7.87(dt,J＝7.6,1.6Hz,1H),7.76(s,1H),7.62(d,J＝8.5Hz,1H),7.60(s,1H),7.55(dt,J＝7.7,1.5Hz,1H),7.50(t,J＝7.6Hz,1H),7.27(dd,J＝8.2,1.7Hz,1H),7.23(d,J＝1.7Hz,1H),7.12(d,J＝8.2Hz,1H),3.73-3.63(m,9H),3.61(dt,J＝

6.0,1.8Hz,4H),3.48-3.43(m,2H),2.82-2.75(m,2H),2.29(s,3H),1.79(q,J=3.9Hz,2H),1.20(q,J=3.9Hz,2H)。

[0482] 

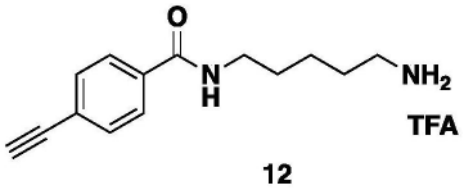
[0483] N-(15-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-13-氧代-3,6,9-三氧杂-12-氮杂十五烷基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物206)。将3(30mg,0.086mmol)去保护,并根据通用程序C与中间体5g(27mg,0.043mmol)偶联,得到呈油状物的化合物206(13.7mg,0.0152mmol,35%产率)。HRMS(ESI):[M+H]$^+$m/z计算值:901.36,实际值:901.3584。^{1}H NMR 1H NMR(600MHz,氯仿-d)δ8.10(d,J=8.5Hz,1H),7.87(t,J=1.8Hz,1H),7.80(dt,J=7.8,1.5Hz,1H),7.73(s,1H),7.60(d,J=8.5Hz,1H),7.54(dt,J=7.7,1.4Hz,1H),7.48(t,J=7.7Hz,1H),7.25(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.21(d,J=1.7Hz,1H),7.09(d,J=8.2Hz,1H),6.93(d,J=6.0Hz,1H),6.41(dd,J=16.7,1.8Hz,1H),6.25(d,J=3.2Hz,1H),6.05(d,J=3.3Hz,1H),5.82(dd,J=10.4,1.8Hz,1H),4.41(d,J=35.7Hz,2H),3.95(d,J=50.4Hz,3H),3.85(s,2H),3.70-3.62(m,8H),3.62-3.57(m,2H),3.57-3.52(m,2H),3.47(dd,J=5.6,4.6Hz,2H),3.39(q,J=5.3Hz,2H),2.93(t,J=7.6Hz,2H),2.47(t,J=7.6Hz,2H),2.25(s,3H),2.19(s,1H),1.76(q,J=3.9Hz,2H),1.18(q,J=3.9Hz,2H)。^{13}C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ171.78,171.50,167.25,164.97,155.52,148.90,144.64,144.13,143.60,140.92,140.21,134.93,134.65,133.37,131.81,131.68,129.98,128.40,127.78,126.98,126.62,126.59,126.35,112.96,112.38,110.20,107.12,100.70,70.43,70.38,70.18,70.07,69.85,69.82,53.43,39.81,39.19,34.59,31.20,30.92,23.93,19.13,17.18。

[0484] 炔烃-接头-化合物100的合成

[0485] 

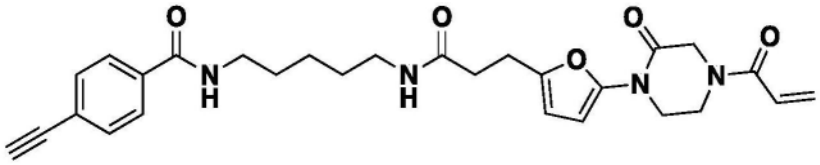
11

[0486] N-(5-氨基戊基)-4-乙炔基苯甲酰胺(11):将4-乙炔基苯甲酸(27mg,0.19mmol)、N-Boc-1,5-二氨基戊烷(47mg,0.23mmol)、HOBt(26mg,0.19mmol)、和DIEA(165mL,0.95mmol)溶于DCM(1.5mL),并添加EDCI-HCl(73mg,0.38mmol)。室温搅拌混合物16h后,添加水,将混合物分配,并将水相用DCM萃取。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用Na_2SO_4干燥,浓缩,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0-50% EtOAc/Hex)纯化,获得呈固体的Boc保护的胺11(27mg,0.082mmol,43%)。LC/MS[M+H]+m/z计算值:331.19,实际值:331.1。1H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ7.78(d,J=8.3Hz,2H),7.59(d,J=8.7Hz,2H),6.32(s,1H),4.63(s,1H),3.50(td,J=7.0,5.7Hz,2H),3.23(s,1H),3.18(q,J=6.5Hz,2H),1.70(d,J=7.5Hz,2H),1.62-1.52(m,2H),1.46(s,11H)。

[0487] 

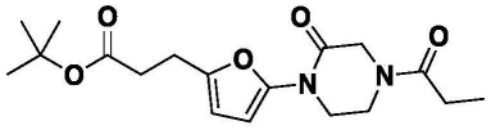
12

[0488] N-(5-氨基戊基)-4-乙炔基苯甲酰胺(12):将(5-(4-乙炔基苯甲酰胺基)戊基)-氨基甲酸叔丁酯11(27mg,0.082mmol)溶于DCM(1mL)并添加TFA(0.5mL)。在室温搅拌2h后,将混合物在DCM中稀释,并重复蒸发以去除挥发物,得到呈TFA盐和油状物的胺(32mg,0.096mmol,117%),其无需进一步纯化即可使用。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:231.14,实际值:231.1。1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ8.55(t,J=5.7Hz,1H),7.84(d,J=8.2Hz,2H),7.63(s,2H),7.57(d,J=8.1Hz,2H),4.39(s,1H),3.26(q,J=6.6Hz,2H),2.83-2.74(m,2H),1.62-1.48(m,4H),1.40-1.32(m,2H)。

[0489] 

[0490] N-(5-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)戊基)-4-乙炔基苯甲酰胺(化合物100):将中间体1(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯)(20mg,0.057mmol)溶于DCM(0.5mL)并用TFA(0.25mL)处理。将混合物在室温搅拌45分钟,直到起始材料被消耗,然后用DCM稀释,蒸发去除挥发物。然后将羧酸溶于DMF,并添加12(N-(5-氨基戊基)-4-乙炔基苯甲酰胺TFA;22mg,0.062mmol)、DIEA(50mL,0.29mmol)和HATU(43mg,0.11mmol)。在室温搅拌混合物1h后,添加水。将所得悬浮液用DCM萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用Na_2SO_4干燥,浓缩,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0-4% MeOH/DCM)纯化,获得呈油状物的化合物100(7.6mg,0.016mmol,27%)。HRMS[M+H]$^+$m/z计算值:380.1586,实际值:380.1581。1H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ7.82(d,J=8.3Hz,2H),7.58(d,J=8.3Hz,2H),6.77-6.50(m,2H),6.43(dd,J=16.7,2.1Hz,1H),6.24(d,J=3.2Hz,1H),6.06(d,J=3.3Hz,1H),5.93(s,1H),5.86(dd,J=10.1,2.1Hz,1H),4.44(d,J=17.4Hz,2H),4.01(s,2H),3.91-3.84(m,2H),3.46(q,J=6.6Hz,2H),3.32-3.19(m,3H),2.93(t,J=7.2Hz,2H),2.50(t,J=7.3Hz,2H),1.72-1.61(m,2H),1.60-1.46(m,2H),1.44-1.35(m,2H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ171.0,165.7,164.6,150.1,135.2,132.1,128.8,127.9,124.7,106.9,100.5,83.4,83.1,38.9,33.8,29.3,29.2,24.3,24.0。

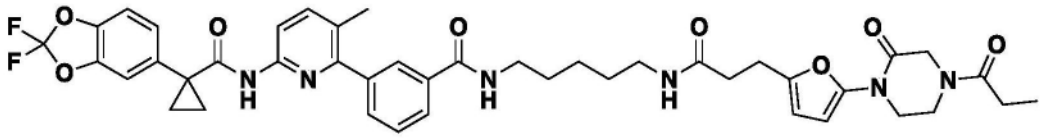
[0491] 化合物226的合成

[0492] 

10

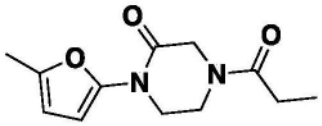
[0493] 3-(5-(2-氧代-4-丙酰基哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯(10):将中间体2((E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯)(85mg,0.20mmol)溶于EtOH(5mL),并添加Pd/C(10mg,10%wt.)。将气氛换成氢气(气球),并将混合物剧烈搅拌过夜。16h后,将悬浮液用DCM稀释,并通过硅藻土过滤以去除Pd/C,然后

浓缩。将粗残余物再溶解于DCM(2mL),并添加TEA(83μL,0.60mmol)。然后将溶液冷却至0℃,添加丙酰氯(25μL,0.31mmol),并将混合物在0℃搅拌30min。添加水,并将混合物用DCM萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法纯化,得到呈固体的中间体10(48mg,0.14mmol,两步产率69%)。1H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δ6.28(d,J=3.2Hz,1H),6.04(d,J=3.2Hz,1H),4.40(s,1H),4.29(s,1H),3.91(dt,J=30.8,5.3Hz,2H),3.85-3.78(m,2H),2.88(t,J=7.6Hz,2H),2.54(t,J=7.5Hz,2H),2.43-2.34(m,2H),1.44(s,9H),1.19(q,J=6.9Hz,3H)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:351.2,实际值:351.2。

[0494] 

[0495] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)-N-(5-(3-(5-(2-氧代-4-丙酰基哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)戊基)苯甲酰胺(化合物226):使中间体10(15mg,0.043mmol)和中间体5c(15mg,0.029mmol)根据通用程序C反应,得到呈油状物的化合物226(18mg,0.022mmol,76%)。1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.10(d,J=8.4Hz,1H),7.82(s,1H),7.79(d,J=7.6Hz,1H),7.72(s,1H),7.59(d,J=8.5Hz,1H),7.52(d,J=7.7Hz,1H),7.46(t,J=7.6Hz,1H),7.22(dd,J=8.1,1.8Hz,1H),7.19(d,J=1.7Hz,1H),7.07(d,J=8.1Hz,1H),6.51-6.39(m,1H),6.22-6.15(m,1H),6.02-5.97(m,1H),5.88-5.76(m,1H),4.31(d,J=50.6Hz,2H),3.96-3.71(m,4H),3.42(q,J=6.6Hz,2H),3.21(q,J=6.5Hz,2H),2.92-2.82(m,2H),2.44(t,J=7.4Hz,2H),2.41-2.29(m,2H),2.24(s,3H),1.74(q,J=3.9Hz,2H),1.64-1.56(m,2H),1.53-1.43(m,2H),1.38-1.26(m,2H),1.21-1.09(m,5H)。13C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ206.9,172.2,171.8,167.3,155.4,149.8,148.9,144.9,144.1,143.6,141.0,140.1,134.9,134.8,131.7,131.7,128.4,127.5,127.0,126.6,113.0,112.4,110.2,107.3,100.9,53.4,49.3,47.2,42.4,39.7,39.1,38.7,34.9,31.2,29.0,26.5,24.2,23.8,19.1,17.2,9.0。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:813.3345,实际值:813.3422。

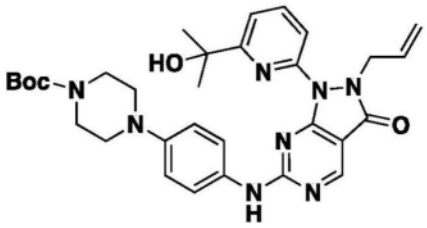
[0496] 化合物101的合成

[0497] 

[0498] 1-(5-甲基呋喃-2-基)-4-丙酰基哌嗪-2-酮:将1-(5-甲基呋喃-2-基)哌嗪-2-酮(30mg,0.17mmol)溶于DCM(2mL)。将溶液冷却至0℃,并添加TEA(69μL,0.50mmol)和丙酰氯(21μL,0.25mmol)。在0℃搅拌30min后,添加水,并将反应用DCM萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(0-100% EtOAc/Hex)纯化,得到呈固体的1-(5-甲基呋喃-2-基)-4-丙酰基哌嗪-2-酮(17.3mg,0.073mmol,43%)。1H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δ6.25(d,J=3.2Hz,1H),6.00(d,J=2.2Hz,1H),4.41(s,1H),4.29(s,1H),3.97-3.86(m,2H),3.82(t,J=5.5Hz,2H),2.45-2.34(m,2H),2.27(s,3H),1.23-1.16(m,3H)。13C NMR(151MHz,CDCl3)δ172.2,163.4,147.5,144.4,107.2,101.0,49.3,46.9,38.8,26.5,13.4,9.0.13C NMR(151MHz,$CDCl_3$)δ172.2,163.4,147.5,

144.4,107.2,101.0,49.3,46.9,38.8,26.5,13.4,9.0。HRMS(ESI):[M+H]$^+$m/z计算值:259.1160,实际值:259.1053。

[0499] 化合物220的合成

[0500] 

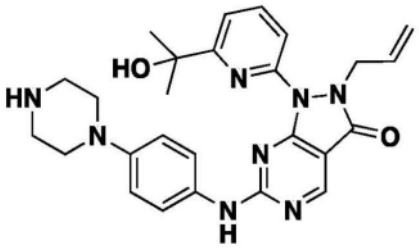
中间体 7

[0501] 4-(4-((2-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-基)氨基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(中间体7)。将可商购中间体62-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-6-(甲硫基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(250mg,0.7mmol)溶于7mL甲苯并冷却至0℃。在冰上将间氯过氧基苯甲酸(190mg,0.77mmol)添加到反应混合物中,并将反应混合物升温至室温,并搅拌1小时。然后缓慢添加N,N-二异丙基乙胺(365mL,2.1mmol)和1-哌嗪-甲酸、4-(4-氨基苯基)-,1,1-二甲基乙基酯(232mg,0.84mmol),并将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物在EtOAc中萃取,用盐水洗涤3次,并在二氧化硅上干燥。通过快速柱色谱法(DCM/己烷5:95)纯化得到中间体7(0.445mmol,64%产率)。

[0502] ^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.99(s,1H),7.95(t,J=7.9Hz,1H),7.80(dd,J=8.1,0.8Hz,1H),7.44(dd,J=7.7,0.8Hz,1H),5.83-5.65(m,1H),5.13-5.04(m,1H),4.97(dq,J=17.1,1.4Hz,1H),4.85(dt,J=6.2,1.4Hz,2H),3.80(s,1H),2.63(s,3H),1.63(s,6H)。

[0503] LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:

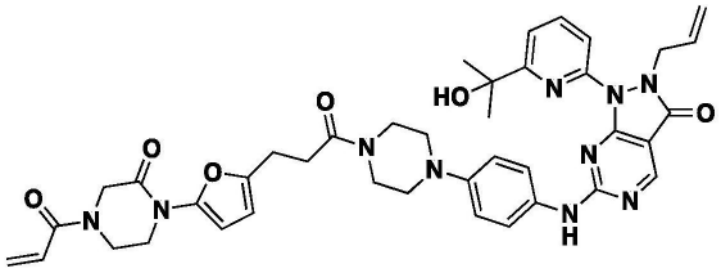
[0504]

[0505] 

中间体 8

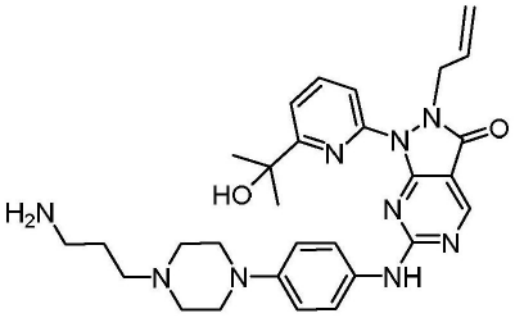
[0506] 2-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-6-((4-(哌嗪-1-基)苯基)氨基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(中间体8)。将中间体7(261mg,0.445mmol)溶于4mL的DCM,并冷却至0℃。在冰上滴加1mL三氟乙酸。将反应混合物在室温搅拌1小时,然后在DCM中萃取,用盐水洗涤3次,并在二氧化硅上干燥。通过快速柱色谱法(DCM/己烷5:95)纯化得到中间体8(0.398mmol,89%产率)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.84(s,1H),7.86(t,J=7.9Hz,1H),7.75(d,J=8.1Hz,1H),7.48(d,J=8.5Hz,2H),7.34(d,J=7.6Hz,1H),6.93(d,J=9.0Hz,2H),5.78-5.59(m,1H),5.04(d,J=10.2Hz,1H),4.94(d,J=17.0Hz,1H),4.74(d,J=6.2Hz,2H),3.94(s,1H),3.60(t,J=5.1Hz,4H),3.11(t,J=5.1Hz,4H),2.05(s,

1H),1.59(s,6H),1.49(s,9H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值

[0507] 

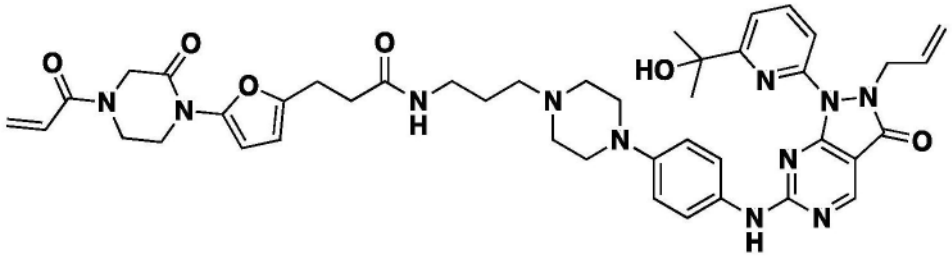
[0508] 6-((4-(4-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-2-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(化合物220)。将LEB-03-139(0.0449mmol)溶于3mL的DCM,并将反应混合物在冰上冷却。滴加1mL三氟乙酸,并将溶液升温至室温并搅拌1小时。将去保护的胺盐用DCM洗涤两次,并在真空下干燥。去保护后,立即将粗产物溶于0.5mL DMF,并向混合物中添加去保护的中间体3(.0898mmol),然后添加DIPEA(0.449mmol)和HATU(0.0898mmol)。将反应搅拌30分钟,然后添加水。将混合物用EtOAc萃取三次,并将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。通过快速柱色谱法(MeOH:DCM 8:92)纯化得到呈固体的化合物220(12.9mg,0.0169mmol,38%产率)。^{1}H NMR(600MHz,氯仿-d)δ8.76(s,1H),7.80(t,J=7.9Hz,1H),7.66(d,J=8.0Hz,1H),7.43(d,J=8.4Hz,2H),7.29(d,J=7.6Hz,1H),7.19(s,1H),6.87-6.82(m,2H),6.45(s,1H),6.34(dd,J=16.7,1.8Hz,1H),6.20(d,J=3.2Hz,1H),6.01(d,J=3.2Hz,1H),5.74(t,J=11.1,10.6Hz,1H),5.67-5.59(m,1H),5.23(s,1H),4.97(dd,J=9.8,0.8Hz,1H),4.87(dd,J=17.4,0.8Hz,1H),4.67(d,J=6.2Hz,2H),4.38(s,1H),4.31(s,1H),3.73(t,J=5.2Hz,2H),3.55(t,J=5.1Hz,2H),3.06(t,J=5.2Hz,4H),2.92(t,J=7.8Hz,2H),2.62(d,J=8.4Hz,2H),1.59(s,4H),1.52(s,6H)。^{13}C NMR(151MHz,氯仿-d)δ169.96,165.90,165.00,162.18,161.36,161.26,156.36,150.16,147.68,147.51,144.67,138.85,131.56,131.29,126.30,119.07,117.20,116.21,116.12,107.23,101.12,72.46,50.15,49.85,49.49,47.67,45.40,41.64,31.55,30.56,23.71。HRMS(ESI):[M+H]$^+$m/z计算值:761.35,实际值:761.3522。

[0509] 化合物221的合成

[0510] 

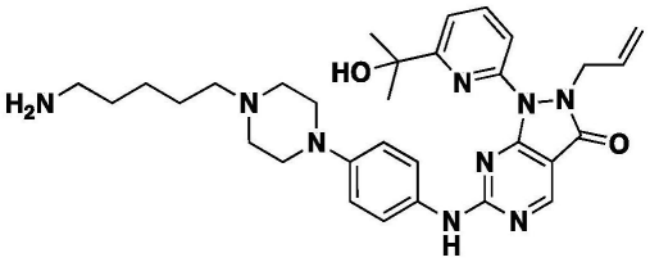
[0511] 2-烯丙基-6-((4-(4-(3-氨基丙基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(中间体12)。将中间体8(40mg,0.0823mmol)溶于0.5mL的DMF。将(3-溴丙基)氨基甲酸叔丁酯(24mg,1.2eq,0.0987mmol)和碳酸钾(34mg,3.0eq,0.247mmol)添加到混合物中,并将反应升温至50℃并搅拌过夜。添加水,将混合物用EtOAc萃取三次,将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。

通过快速柱色谱法(EtOAc:己烷50:50)纯化得到boc保护的中间体。将其立即溶于3mL的DCM,并将反应混合物在冰上冷却。滴加1mL三氟乙酸,并将溶液升温至室温并搅拌1小时。将去保护的胺TFA盐用DCM洗涤两次,并在真空下干燥,得到呈油状物的中间体12(33mg,0.0497mmol,两步产率60%)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ8.80(s,1H),7.92(t,J=7.9Hz,1H),7.63(d,J=8.0Hz,1H),7.54(d,J=8.4Hz,3H),6.90(d,J=8.9Hz,2H),5.75-5.54(m,1H),5.05(d,J=10.2Hz,1H),4.89(d,J=17.1Hz,1H),4.75(d,J=6.2Hz,2H),3.66(s,1H),3.43(s,9H),3.28(q,J=9.4,8.5Hz,2H),3.19(s,1H),3.06(t,J=7.1Hz,2H),2.23(d,J=8.2Hz,3H),1.59(s,6H)。LC/MS:[M+H]$^{+}$m/z计算值:544.3,实际值:544.3。

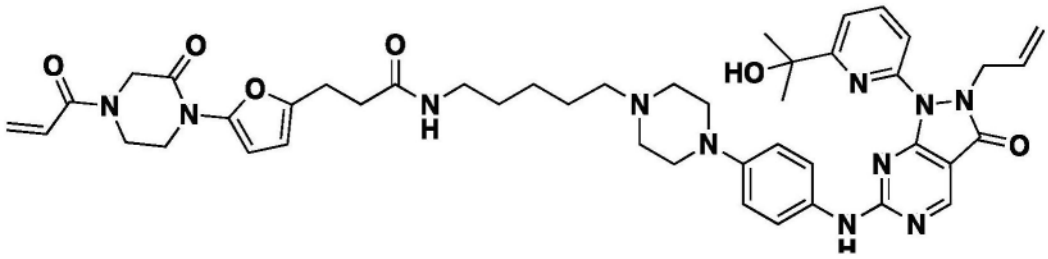
[0512] 

[0513] 3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-N-(3-(4-(4-((2-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-基)氨基)苯基)哌嗪-1-基)丙基)丙烯酰胺(化合物221)。使中间体3(19mg,0.0558mmol)和中间体12(0.0497mmol)根据通用程序C反应。水解后,将去保护的3和中间体12溶于DMF(0.5mL),然后溶于DIPEA(43mL,0.249mmol)和HATU(23mg,0.0596mmol)。将反应搅拌30分钟。添加水,并将混合物用4:1$CHCl_3$:IPA萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用硫酸钠干燥并浓缩。通过prep TLC(10% MeOH的DCM溶液)纯化得到呈固体的化合物221(8.1mg,0.0099mmol,20%产率)。^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d6)δ10.07(s,1H),8.75(s,1H),7.97(s,1H),7.83(t,J=5.6Hz,1H),7.68(d,J=8.1Hz,1H),7.54(d,J=7.7Hz,1H),7.51(s,2H),6.85(d,J=8.6Hz,2H),6.80-6.72(m,1H),6.16-6.08(m,2H),6.04(d,J=3.2Hz,1H),5.71-5.66(m,1H),5.64-5.55(m,1H),5.24(s,1H),4.92(d,J=10.2Hz,1H),4.76(d,J=17.0Hz,1H),4.61(d,J=6.0Hz,2H),4.27(d,J=93.6Hz,2H),3.95-3.63(m,4H),3.02(q,J=6.4Hz,6H),2.73(t,J=7.5Hz,2H),2.31(t,J=7.5Hz,2H),2.24(t,J=7.2Hz,2H),1.55-1.47(m,2H),1.39(s,2H),1.17(s,6H),0.80-0.74(m,2H)。^{13}C NMR(151MHz,DMSO)δ171.0,168.0,164.6,161.6,156.5,150.1,139.3,132.7,131.3,128.8,118.7,116.8,115.9,106.9,100.5,72.8,55.9,53.2,49.2,47.6,47.1,46.9,42.5,37.4,34.7,33.8,31.4,30.9,29.5,26.9,25.3,24.0,22.6,22.5,14.4。HRMS(ESI):[M+H]$^{+}$m/z计算值:818.41,实际值:818.4101。

[0514] 化合物222的合成

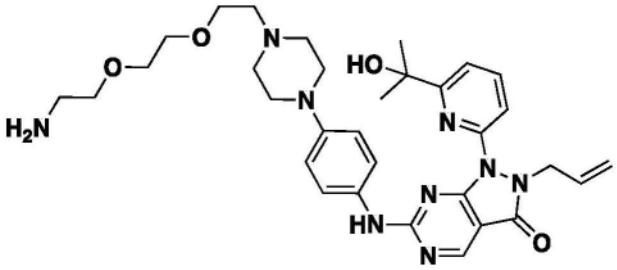
[0515] 

[0516] 2-烯丙基-6-((4-(4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(中间体13)。将中间体8(40mg,0.0823mmol)溶于0.5mL的DMF。将(5-溴戊基)氨基甲酸叔丁酯(26mg,1.2eq,0.0987mmol)和碳酸钾(34mg,3.0eq,0.247mmol)添加到混合物中,并将反应升温至50℃并搅拌过夜。添加水,将混合物用EtOAc萃取三次,将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。通过快速柱色谱法(EtOAc:已烷50:50)纯化得到boc保护的中间体。将其立即溶于3mL的DCM,并将反应混合物在冰上冷却。滴加1mL三氟乙酸,并将溶液升温至室温并搅拌1小时。将去保护的胺TFA盐用DCM洗涤两次,并在真空下干燥,得到呈油状物的中间体13(21mg,0.0307mmol,两步产率37%)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ8.80(s,1H),8.12(s,1H),7.94(t,J=7.9Hz,1H),7.64(d,J=8.0Hz,1H),7.56(d,J=8.2Hz,3H),6.92(d,J=8.8Hz,2H),5.67(dd,J=16.8,10.4Hz,1H),5.07(d,J=10.2Hz,1H),4.90(d,J=17.1Hz,1H),4.76(d,J=6.2Hz,2H),3.69(s,1H),3.55-3.47(m,8H),3.22(s,1H),3.19-2.89(m,4H),1.91-1.66(m,4H),1.61(s,6H),1.51(s,2H),1.27(s,1H)。LC/MS:[M+H]$^{+}$m/z计算值:572.3,实际值:572.3。

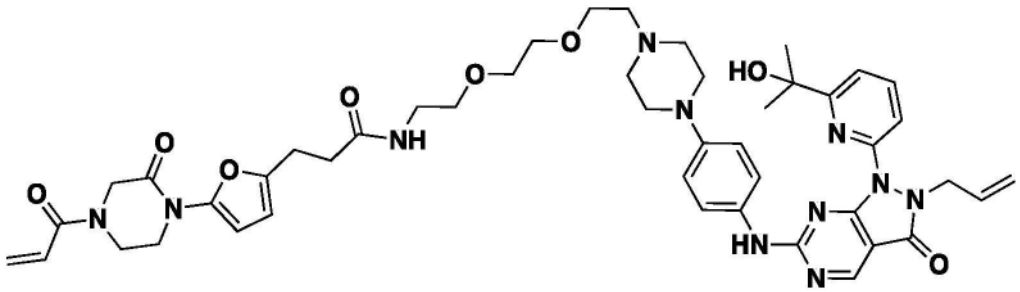
[0517] 

[0518] 3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-N-(5-(4-(4-((2-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-基)氨基)苯基)哌嗪-1-基)戊基)丙酰胺(化合物222)。使中间体3(19mg,0.0558mmol)和中间体13(21mg,0.0307mmol)根据通用程序C偶联。水解后,将去保护的3和中间体13溶于DMF(0.5mL),然后溶于DIPEA(27mL,0.153mmol)和HATU(14mg,0.0368mmol)。添加水,并将混合物用4:1$CHCl_3$:IPA萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用硫酸钠干燥并浓缩。通过prep TLC(8% MeOH的DCM溶液)纯化得到呈固体的化合物222(10.1mg,0.0119mmol,39%产率)。^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d6)δ10.15(s,1H),8.83(s,1H),8.05(s,1H),7.86(t,J=5.6Hz,1H),7.78-7.72(m,1H),7.61(d,J=7.7Hz,2H),7.58(s,2H),6.92(d,J=8.7Hz,2H),6.88-6.76(m,1H),6.24-6.19(m,1H),6.10(d,J=3.2Hz,1H),5.76(q,J=9.8,8.3Hz,1H),5.72-5.61(m,1H),5.36-5.26(m,1H),5.00(dq,J=10.3,1.3Hz,1H),4.84(dq,J=17.2,1.5Hz,1H),4.69(d,J=6.0Hz,2H),4.43(s,1H),4.27(s,1H),3.95(d,J=5.8Hz,1H),3.86(s,1H),3.82-3.73(m,2H),3.13-3.08(m,4H),3.08-3.01(m,2H),2.80(t,J=7.5Hz,2H),2.38(t,J=7.5Hz,2H),2.30(t,J=7.4Hz,2H),1.47(s,6H),1.45-1.37(m,2H),1.26-1.21(m,6H),0.89-0.81(m,2H)。^{13}C NMR(151MHz,DMSO)δ170.97,168.04,161.64,156.46,150.07,139.28,132.67,128.77,118.72,115.93,106.92,100.44,72.78,58.33,53.28,49.17,47.57,47.06,46.88,42.46,38.88,33.80,30.92,29.54,29.48,29.16,26.48,24.81,24.00,22.56,14.42。HRMS(ESI):[M+H]$^{+}$m/z计算值:846.44,实际值:846.4395。

[0519] 化合物223的合成

[0520] 

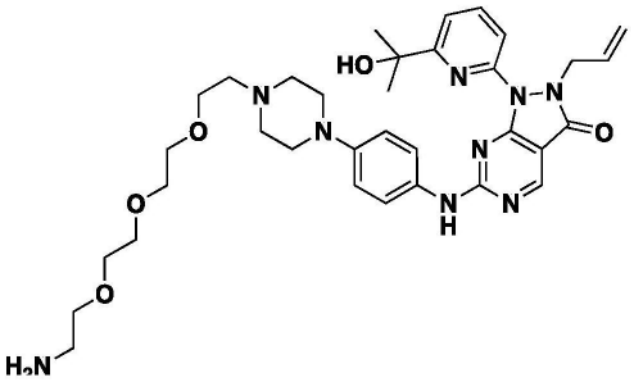
[0521] 2-烯丙基-6-((4-(4-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(中间体14)。将中间体8(40mg,0.0823mmol)溶于0.5mL的DMF。将(2-(2-(溴甲氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(31mg,1.2eq,0.0987mmol)和碳酸钾(34mg,3.0eq,0.247mmol)添加到混合物中,并将反应升温至50℃并搅拌过夜。添加水,将混合物用EtOAc萃取三次,将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。通过快速柱色谱法(EtOAc:己烷50:50)纯化得到boc保护的中间体。将其立即溶于3mL的DCM,并将反应混合物在冰上冷却。滴加1mL三氟乙酸,并将溶液升温至室温并搅拌1小时。将去保护的胺TFA盐用DCM洗涤两次,并在真空下干燥,得到中间体14(28mg,0.0389mmol,47%产率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ10.99(s,1H),8.74(s,1H),8.25(s,1H),7.97(t,J=7.9Hz,1H),7.60(t,J=8.9Hz,2H),7.50(d,J=8.5Hz,2H),6.87(d,J=8.7Hz,2H),5.66(ddd,J=16.5,10.3,5.6Hz,1H),5.07(d,J=10.2Hz,1H),4.90(d,J=17.1Hz,1H),4.75(d,J=6.3Hz,4H),3.87(d,J=4.6Hz,4H),3.76-3.69(m,4H),3.65(s,4H),3.39-3.10(m,8H),1.61(s,6H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:618.3,实际值:618.3。

[0522] 

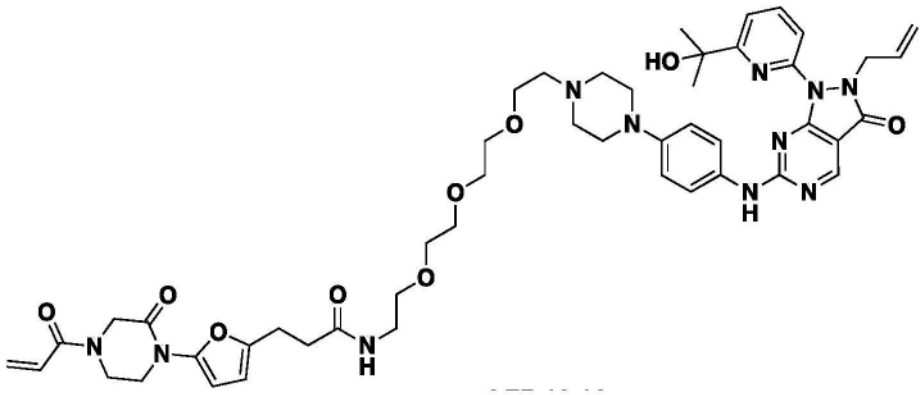
[0523] 3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-N-(2-(2-(2-(4-(4-((2-烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-基)氨基)苯基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙氧基)乙基)丙酰胺(化合物223)。使中间体3(19mg,0.0558mmol)和中间体14(28mg,0.0389mmol)根据通用程序C偶联。水解后,将去保护的3和中间体14溶于DMF(0.5mL),然后溶于DIPEA(34mL,0.195mmol)和HATU(18mg,0.0466mmol)。将反应搅拌30分钟。添加水,并将混合物用4:1$CHCl_3$:IPA萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用硫酸钠干燥并浓缩。通过prep TLC(8%MeOH的DCM溶液)纯化得到呈固体的化合物223(8.3mg,0.0093mmol,17%产率)。^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d6)δ8.83(s,1H),8.05(s,1H),7.97(t,J=5.8Hz,1H),7.76(s,1H),7.61(d,J=7.8Hz,1H),7.58(s,3H),6.92(d,J=8.5Hz,2H),6.81(d,J=12.8Hz,1H),6.23-6.15(m,2H),6.10(d,J=3.2Hz,1H),5.76(d,J=7.0Hz,2H),5.67(ddt,J=16.5,10.8,6.0Hz,1H),5.31(s,1H),5.04-4.97(m,1H),4.87-4.80(m,1H),4.69(s,2H),4.42(s,1H),4.26(s,1H),3.94(s,1H),3.85(s,1H),3.77(d,J=

24.8Hz,2H),3.56(t,J=5.8Hz,2H),3.54-3.49(m,6H),3.42(t,J=5.9Hz,2H),3.22(q,J=5.8Hz,2H),3.09(d,J=5.8Hz,4H),2.79(t,J=7.6Hz,2H),2.58(t,J=4.8Hz,4H),2.44-2.36(m,4H),1.47(s,6H),0.86(d,J=7.4Hz,1H)。^{13}C NMR(151MHz,DMSO)δ171.31,168.04,161.64,156.46,150.02,139.28,132.68,128.76,118.72,115.93,106.93,100.44,72.78,70.12,70.04,69.58,68.89,57.72,53.63,49.14,47.07,46.88,42.46,39.07,33.65,30.92,29.49,23.89,14.42。HRMS(ESI):[M+H]$^+$m/z计算值:892.45,实际值:892.4454。

[0524] 化合物224的合成

[0525] 

[0526] 2-烯丙基-6-((4-(4-(2-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)苯基)氨基)-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-1,2-二氢-3H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-酮(中间体15)。将中间体8(40mg,0.0823mmol)溶于0.5mL的DMF。将(2-(2-(2-(溴甲氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(35mg,1.2eq,0.0987mmol)和碳酸钾(34mg,3.0eq,0.247mmol)添加到混合物中,并将反应升温至50℃并搅拌过夜。添加水,将混合物用EtOAc萃取三次,将合并的有机萃取物用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。通过快速柱色谱法(EtOAc:己烷50:50)纯化得到boc保护的中间体。将其立即溶于3mL的DCM,并将反应混合物在冰上冷却。滴加1mL三氟乙酸,并将溶液升温至室温并搅拌1小时。将去保护的胺TFA盐用DCM洗涤两次,并在真空下干燥,得到呈油状物的中间体15(22mg,0.0279mmol,34%产率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ11.44(s,1H),8.71(s,1H),8.10(s,4H),8.00(t,J=7.9Hz,1H),7.65(d,J=8.0Hz,1H),7.57(t,J=7.4Hz,3H),6.91(d,J=8.6Hz,2H),5.69(ddt,J=16.5,10.1,6.2Hz,1H),5.11(d,J=10.1Hz,1H),4.92(d,J=17.1Hz,1H),4.78(d,J=6.3Hz,2H),3.98-3.77(m,5H),3.77-3.63(m,9H),3.33(d,J=59.7Hz,8H),1.64(s,6H),1.29(s,1H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:662.3,实际值:662.4

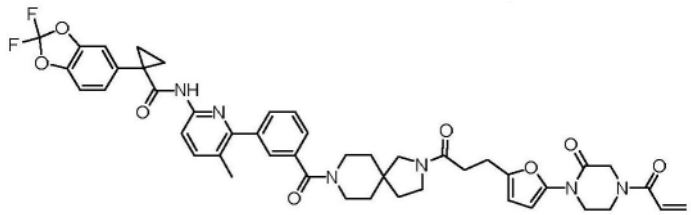
[0527] 

[0528] 3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(4-((2-

烯丙基-1-(6-(2-羟基丙烷-2-基)吡啶-2-基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-基)氨基)苯基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)丙酰胺(化合物224)。使中间体3(19mg,0.0558mmol)和中间体15(22mg,0.0279mmol)根据通用程序C偶联。水解后,将去保护的3和中间体14溶于DMF(0.5mL),然后溶于DIPEA(49mL,0.279mmol)和HATU(21mg,0.0558mmol)。将反应搅拌30分钟。添加水,并将混合物用4:1$CHCl_3$:IPA萃取三次。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,并用硫酸钠干燥并浓缩。通过prep TLC(8%MeOH的DCM溶液)纯化得到呈固体的化合物224(10.0mg,0.0107mmol,19%产率)。^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d6)δ10.14(s,1H),8.83(s,1H),8.05(s,1H),7.97(t,J=5.6Hz,1H),7.76(d,J=8.1Hz,1H),7.61(d,J=7.4Hz,1H),6.92(d,J=8.8Hz,2H),6.87-6.75(m,1H),6.21(d,J=3.2Hz,1H),6.11-6.06(m,1H),5.76(s,2H),5.67(ddt,J=16.3,10.2,6.0Hz,1H),5.32(s,1H),5.00(dq,J=10.2,1.4Hz,1H),4.84(dq,J=17.1,1.5Hz,1H),4.69(d,J=6.0Hz,2H),4.26(s,1H),3.95(s,1H),3.77(d,J=24.9Hz,2H),3.59-3.48(m,9H),3.41(t,J=5.9Hz,2H),3.21(q,J=5.8Hz,2H),3.09(d,J=5.3Hz,4H),2.83-2.76(m,2H),2.57(t,J=5.0Hz,4H),2.51(p,J=1.9Hz,9H),1.47(s,6H)。^{13}C NMR(151MHz,DMSO-d_6)δ171.30,164.62,156.47,150.02,147.70,139.28,132.68,128.76,118.72,116.75,115.93,106.92,100.44,72.78,70.26,70.23,70.17,70.08,69.59,68.87,57.72,55.38,53.62,49.15,47.54,47.07,46.87,42.45,39.05,33.64,30.92,23.88。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:936.47,实际值:936.4723

[0529] 另外的双功能化合物根据本文所述的程序制备。这些化合物的表征如下。

[0530] N-(6-(3-(2-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)-2,8二氮杂螺[4.5]-癸烷-8-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物207)

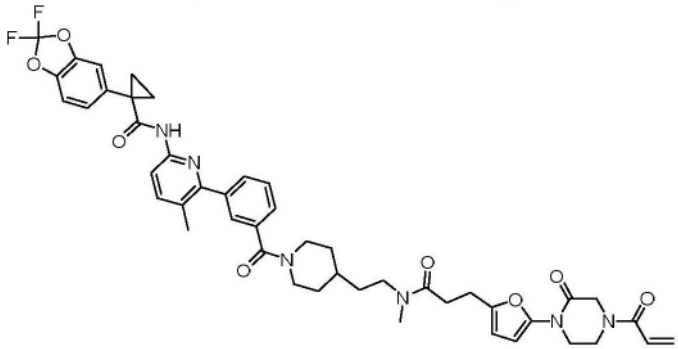
[0531] 

[0532] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.11(d,J=8.4Hz,1H),7.83(s,1H),7.61(d,J=8.5Hz,1H),7.49-7.43(m,3H),7.42-7.38(m,1H),7.25-7.20(m,1H),7.19(t,J=1.7Hz,1H),7.08(dd,J=8.2,3.9Hz,1H),6.52(s,1H),6.44-6.36(m,1H),6.25(dd,J=3.2,2.2Hz,1H),6.05(t,J=2.5Hz,1H),5.82(d,J=1.5Hz,1H),4.49-4.36(m,2H),4.06-3.76(m,5H),3.62-3.17(m,7H),2.96(t,J=7.6Hz,2H),2.57(dd,J=8.7,6.4Hz,2H),2.26(s,3H),2.11(d,J=15.1Hz,2H),1.91-1.78(m,2H),1.75(q,J=3.8Hz,2H),1.54-1.39(m,2H),1.17(q,J=4.1Hz,2H)

[0533] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.83,170.42,170.19,169.97,169.92,164.98,154.97,150.26,148.76,144.60,144.12,143.62,141.43,139.60,135.93,135.85,134.85,131.69,130.31,130.23,128.45,127.68,127.12,126.82,126.68,126.29,113.10,112.42,110.20,107.11,101.12,56.64,54.66,44.71,44.04,41.63,39.62,36.60,33.97,33.08,32.74,31.23,29.72,23.40,19.18,17.27。19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.52

[0534] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C46H47F2N6O8(M+H)+849.3423;实际值:849.3419

[0535] N-(6-(3-(4-(2-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-N-甲基丙酰胺基)-乙基)-哌啶-1-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物208)

[0536] 

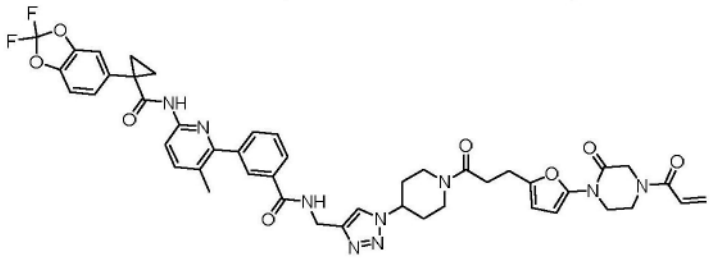
[0537] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(s,1H),7.82-7.52(m,2H),7.50-7.43(m,3H),7.40(s,1H),7.23(dt,J=8.3,2.2Hz,1H),7.19(d,J=1.6Hz,1H),7.08(dd,J=8.2,5.6Hz,1H),6.51(d,J=14.1Hz,1H),6.45-6.33(m,1H),6.26(d,J=3.2Hz,1H),6.05(d,J=3.3Hz,1H),5.84-5.76(m,1H),4.68(s,1H),4.50-4.33(m,2H),4.05-3.69(m,5H),3.54-3.18(m,2H),3.05-2.86(m,6H),2.76(d,J=17.3Hz,1H),2.64-2.55(m,2H),2.27(s,3H),1.89-1.73(m,3H),1.54-1.44(m,3H),1.35-1.28(m,1H),1.23-1.04(m,4H)。

[0538] 13C:(101MHz,CDCl3)δ171.10,170.9,164.97,150.26,144.52,144.15,143.67,134.21,131.70,130.05,128.40,127.69,126.69,126.31,112.46,110.20,107.09,100.97,47.46,45.37,35.07,34.92,33.91,33.67,33.54,31.86,31.32,29.72,23.78,23.55,19.15,17.27。

[0539] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.50,-49.52

[0540] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C46H49F2N6O8(M+H)+851.3580;实际值:851.3572

[0541] N-((1-(1-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)哌啶-4-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物209)

[0542] 

[0543] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.18(br s,1H),8.01-7.59(m,5H),7.58-7.44(m,3H),7.23(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.18(d,J=1.7Hz,1H),7.08(d,J=8.2Hz,1H),6.50(d,J=11.6Hz,1H),6.39(dd,J=16.7,1.9Hz,1H),6.25(d,J=3.2Hz,1H),6.07(d,J=3.2Hz,1H),5.80(dd,J=10.3,1.9Hz,1H),4.78-4.67(m,3H),4.63(tt,J=11.3,4.1Hz,1H),4.47-4.33(m,2H),4.07-3.79(m,5H),3.22(ddd,J=14.2,11.9,2.8Hz,1H),2.97(td,J=7.6,2.8Hz,2H),2.90-2.78(m,1H),2.68(q,J=7.4Hz,2H),2.41-2.13(m,5H),2.01-1.84(m,2H),1.77

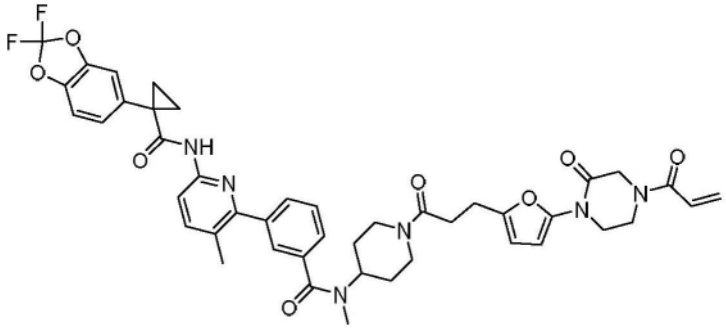
(q,J＝4.0Hz,2H),1.21(s,2H)

[0544] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ169.91,167.08,164.98,150.02,144.71,144.20,143.75,134.23,131.97,131.69,129.94,129.15,128.68,126.71,126.33,120.54,112.46,110.24,107.36,101.06,57.82,49.45,46.82,44.13,40.51,35.57,32.74,32.09,31.98,31.45,23.78,19.02,17.43。

[0545] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.46

[0546] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C46H46F2N9O8(M+H)+890.3437;实际值:890.3433。

[0547] N-(1-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)-N-甲基苯甲酰胺(化合物210)

[0548] 

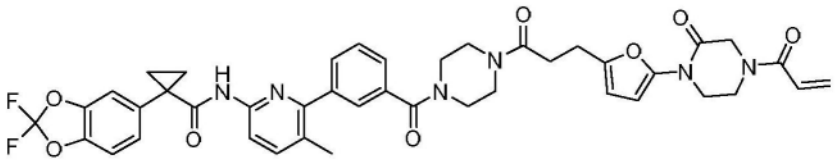
[0549] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.10(s,1H),7.76-7.55(m,1H),7.51-7.43(m,3H),7.39(d,J＝6.9Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.7Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.08(d,J＝8.2Hz,1H),6.50(s,1H),6.41(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.27(d,J＝3.2Hz,1H),6.07(d,J＝3.2Hz,1H),5.82(dd,J＝10.2,2.0Hz,1H),4.77(s,2H),4.50-4.32(m,2H),4.09-3.71(m,6H),3.17(s,1H),2.96(t,J＝7.7Hz,2H),2.93-2.75(m,3H),2.66(s,2H),2.27(s,3H),1.81-1.72(m,3H),1.59(s,2H),1.37-1.28(m,1H),1.18(s,2H)

[0550] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ169.70,164.97,150.17,144.62,144.16,143.65,131.69,130.14,128.39,126.68,126.30,112.46,110.21,107.16,100.94,69.02,49.37,44.78,39.08,31.50,29.72,23.72,19.21,17.26。

[0551] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.56

[0552] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C44H45F2N6O8(M+H)+823.3267;实际值:823.3247

[0553] N-(6-(3-(4-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)哌嗪-1-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物213)

[0554] 

[0555] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.08(d,J＝8.4Hz,1H),7.65(s,1H),7.59(d,J＝8.4Hz,1H),7.54-7.45(m,3H),7.40(dt,J＝7.4,1.6Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.7Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.10(d,J＝8.2Hz,1H),6.52(s,1H),6.41(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.26(d,J＝3.3Hz,1H),6.07(d,J＝3.3Hz,1H),5.82(dd,J＝10.2,2.0Hz,1H),4.48-4.36(m,2H),

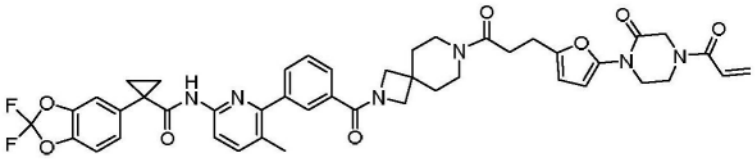
4.05-3.83(m,4H),3.80-3.37(m,8H),2.97(dd,J＝8.8,6.4Hz,2H),2.65(d,J＝9.4Hz,2H),2.26(s,3H),1.74(q,J＝3.9Hz,2H),1.16(q,J＝3.9Hz,2H)

[0556] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.75,170.24,170.14,164.97,155.06,149.93,148.92,144.72,144.13,143.62,141.11,140.28,135.04,134.94,134.23,131.68,130.70,129.99,129.14,128.49,128.00,126.94,126.84,126.62,126.29,112.94,112.44,110.26,107.31,101.08,49.46,46.83,39.06,31.56,31.19,23.60,19.28,17.23。

[0557] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.54

[0558] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C42H41F2N6O8(M+H)+795.2954,实际值:795.2943

[0559] N-(6-(3-(7-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)-2,7-二氮杂螺[3.5]-壬烷-2-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物214)

[0560] 

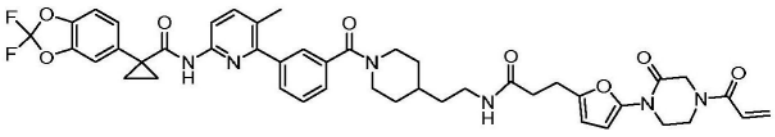
[0561] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.08(d,J＝8.4Hz,1H),7.80-7.67(m,2H),7.64-7.58(m,2H),7.52(dt,J＝7.7,1.5Hz,1H),7.46(t,J＝7.6Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.18(d,J＝1.7Hz,1H),7.07(d,J＝8.2Hz,1H),6.50(d,J＝13.4Hz,1H),6.40(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.25(d,J＝3.2Hz,1H),6.05(d,J＝3.3Hz,1H),5.82(dd,J＝10.3,2.0Hz,1H),4.51-4.31(m,2H),4.06-3.80(m,8H),3.66-3.45(m,2H),3.36(t,J＝5.6Hz,2H),2.94(dd,J＝8.9,6.4Hz,2H),2.68-2.57(m,2H),2.26(s,3H),1.88-1.62(m,6H),1.17(q,J＝3.8Hz,2H)

[0562] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ170.11,169.84,164.98,150.17,148.82,144.61,144.13,143.63,134.78,134.23,133.15,131.68,131.57,129.98,129.14,128.63,128.32,127.64,127.05,126.71,126.29,113.07,112.43,110.23,107.17,101.05,62.93,58.32,49.46,46.77,42.44,39.07,38.84,35.67,34.91,34.55,31.54,31.21,29.71,23.71,19.17,17.38。

[0563] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.49

[0564] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C45H45F2N6O8(M+H)+835.3267;实际值:835.3298

[0565] N-(6-(3-(4-(2-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)乙基)哌啶-1-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物225)

[0566] 

[0567] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.10(s,1H),7.82-7.54(m,2H),7.49-7.42(m,3H),7.39(dd,J＝5.4,3.2Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.7Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.09(d,J＝8.1Hz,1H),6.52(s,1H),6.41(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.20(d,J＝3.2Hz,1H),6.05(d,J＝3.2Hz,1H),5.82(dd,J＝10.2,2.0Hz,1H),5.61(s,1H),4.67(s,1H),4.51-4.32(m,2H),

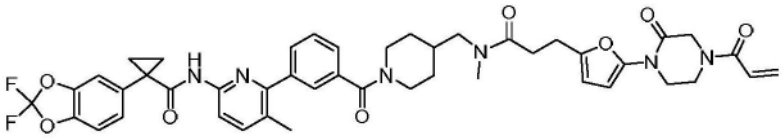
4.05-3.72(m,5H),3.25(q,J＝6.9Hz,2H),2.99-2.87(m,3H),2.73(s,1H),2.48(t,J＝7.3Hz,2H),2.26(s,3H),1.83-1.72(m,3H),1.57-1.47(m,2H),1.42(q,J＝7.1Hz,2H),1.23-1.00(m,4H)

[0568] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.45,169.80,164.99,149.89,148.76,144.92,144.14,143.64,136.32,134.87,134.24,131.69,130.07,129.17,128.37,127.68,127.09,126.69,126.26,112.93,112.46,110.21,107.37,101.10,47.99,42.42,39.06,36.98,36.12,35.02,33.69,32.67,31.74,31.26,24.26,19.18,17.25。

[0569] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.50

[0570] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C45H47F2N6O8(M+H)+837.3423,实际值:837.3448

[0571] N-(6-(3-(4-((3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)-N-甲基丙酰胺基)甲基)哌啶-1-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物215)

[0572] 

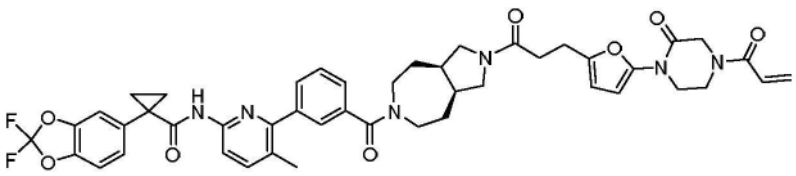
[0573] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.07(d,J＝8.4Hz,1H),7.71(s,1H),7.59(d,J＝8.5Hz,1H),7.48-7.43(m,3H),7.38(dt,J＝6.8,1.9Hz,1H),7.24(dd,J＝8.2,1.7Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.09(d,J＝8.2Hz,1H),6.52(s,1H),6.40(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.25(d,J＝3.3Hz,1H),6.05(t,J＝3.8Hz,1H),5.81(dd,J＝10.3,2.0Hz,1H),4.66(s,1H),4.48-4.32(m,2H),4.06-3.69(m,5H),3.40(s,1H),3.27-3.11(m,1H),3.00(s,3H),2.96-2.91(m,3H),2.81-2.72(m,1H),2.63(t,J＝6.5Hz,2H),2.26(s,3H),2.00-1.87(m,1H),1.79-1.72(m,3H),1.57-1.40(m,2H),1.20-1.12(m,3H)

[0574] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.85,171.66,169.94,164.98,150.27,148.80,144.57,144.11,143.60,141.22,136.21,134.90,134.23,131.68,130.07,129.14,128.44,128.35,127.67,127.07,126.71,126.30,112.88,112.45,110.22,107.11,100.95,53.44,49.46,39.09,36.61,34.92,31.88,31.20,30.53,29.58,23.79,23.57,19.24,17.27。

[0575] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.51

[0576] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C45H47F2N6O8(M+H)+837.3423;实际值:837.3439

[0577] N-(6-(3-((3aR,8aS)-2-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)十氢吡咯并[3,4-d]吖庚因-6-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物216)

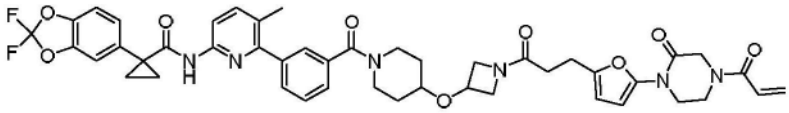
[0578] 

[0579] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.09(d,J＝8.4Hz,1H),7.66(s,1H),7.59(d,J＝8.4Hz,1H),7.48-7.42(m,3H),7.38(dt,J＝6.3,2.0Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.08(d,J＝8.2Hz,1H),6.52(s,1H),6.40(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.25(d,J＝1.8Hz,1H),6.05(d,J＝3.3Hz,1H),5.81(dd,J＝10.2,2.0Hz,1H),4.52-4.28(m,2H),

4.06-3.79(m,5H),3.74-3.45(m,4H),3.37-3.25(m,2H),3.22-3.11(m,1H),2.95(t,J＝7.6Hz,2H),2.56(t,J＝8.3Hz,3H),2.53-2.38(m,2H),2.25(s,3H),2.11-1.97(m,1H),1.85-1.72(m,5H),1.16(q,J＝3.9Hz,2H)

[0580] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.77,170.94,170.04,164.97,163.22,155.29,150.26,148.85,144.58,144.11,143.60,141.07,140.07,136.55,134.94,134.23,131.68,130.08,129.14,128.43,127.48,126.99,126.70,126.53,126.31,112.89,112.46,110.20,107.11,100.98,52.48,51.83,51.57,51.14,49.46,47.76,43.17,42.94,40.49,39.10,32.86,31.20,30.18,23.39,19.24,17.26。19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.55HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C46H47F2N6O8(M+H)+849.3423;实际值:849.3475

[0581] N-(6-(3-(4-((1-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)氮杂环丁烷-3-基)氧基)哌啶-1-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物217)

[0582] 

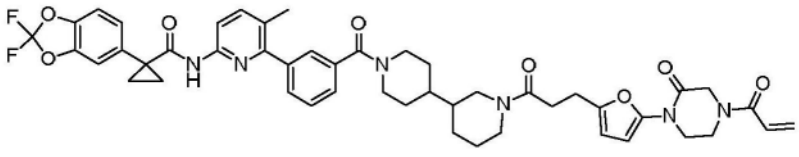
[0583] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.09(d,J＝8.4Hz,1H),7.68(s,1H),7.59(d,J＝8.4Hz,1H),7.50-7.42(m,3H),7.39(dt,J＝7.0,1.8Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.09(d,J＝8.2Hz,1H),6.52(s,1H),6.40(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.26(d,J＝3.3Hz,1H),6.05(d,J＝3.3Hz,1H),5.82(dd,J＝10.3,2.0Hz,1H),4.50-4.34(m,3H),4.27-4.16(m,2H),4.12-3.81(m,7H),3.71-3.54(m,2H),3.45(d,J＝21.9Hz,1H),3.22(s,1H),2.96-2.86(m,2H),2.39(t,J＝7.6Hz,2H),2.26(s,3H),1.88(s,1H),1.80-1.72(m,3H),1.51(s,2H),1.17(q,J＝3.9Hz,2H)

[0584] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.78,171.58,169.98,164.97,163.22,155.21,149.95,148.84,144.63,144.12,143.61,141.12,135.90,134.94,134.24,131.69,130.25,129.98,129.15,128.43,127.63,127.01,126.69,126.29,112.89,112.46,110.20,107.21,101.04,73.90,65.51,58.03,55.96,49.46,46.72,44.80,39.10,31.96,31.21,30.09,23.25,19.22,17.25。

[0585] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.52

[0586] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C46H47F2N6O9(M+H)+865.3373;实际值:865.3416

[0587] N-(6-(3-(1-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)-[3,4'-联哌啶]-1'-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物211)

[0588] 

[0589] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.09(d,J＝8.4Hz,1H),7.70(s,1H),7.61(s,1H),7.49-7.43(m,3H),7.40(t,J＝4.1Hz,1H),7.25-7.22(m,1H),7.20(d,J＝1.7Hz,1H),7.09(d,J＝7.6Hz,1H),6.52(s,1H),6.41(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.26(t,J＝3.2Hz,1H),6.05(d,J＝3.2Hz,1H),5.82(dd,J＝10.2,2.0Hz,1H),4.74(s,1H),4.53(t,J＝13.4Hz,1H),4.48-4.31

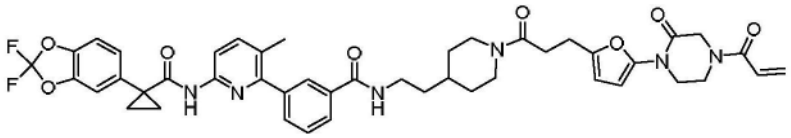
(m,2H),4.07-3.70(m,6H),3.02-2.87(m,4H),2.77-2.68(m,1H),2.63(td,J=7.2,2.1Hz,2H),2.53-2.35(m,1H),2.27(s,3H),1.94-1.80(m,2H),1.80-1.70(m,4H),1.47-1.34(m,3H),1.31-1.23(m,1H),1.22-1.10(m,4H)

[0590] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ169.67,164.98,148.74,144.52,144.14,143.64,134.81,134.21,131.69,130.06,128.41,127.65,126.71,126.30,113.01,112.45,110.22,107.05,100.95,100.86,49.41,46.25,42.69,41.71,40.51,39.08,31.56,31.25,27.87,25.79,24.97,23.72,19.20,17.29。

[0591] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.53

[0592] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C48H51F2N6O8(M+H)+877.3736;实际值:877.3794

[0593] N-(2-(1-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)哌啶-4-基)乙基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺(218)

[0594] 

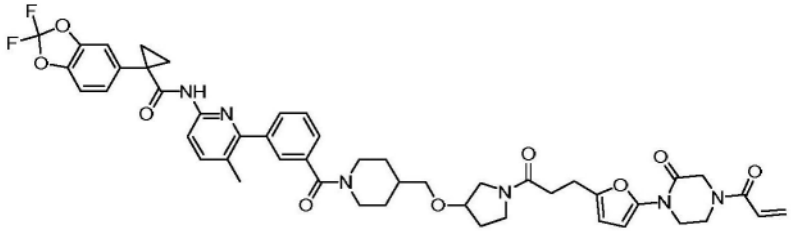
[0595] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.10(d,J=8.4Hz,1H),7.79(s,1H),7.75(d,J=7.5Hz,1H),7.68(s,1H),7.59(d,J=8.4Hz,1H),7.54(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.48(t,J=7.6Hz,1H),7.22(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.19(d,J=1.7Hz,1H),7.07(d,J=8.2Hz,1H),6.50(s,1H),6.39(dd,J=16.7,2.0Hz,1H),6.27(d,J=3.2Hz,1H),6.19(s,1H),6.05(d,J=3.2Hz,1H),5.81(dd,J=10.3,2.0Hz,1H),4.67-4.56(m,1H),4.48-4.33(m,2H),4.04-3.77(m,5H),3.49(q,J=6.6Hz,2H),3.03-2.91(m,3H),2.67-2.58(m,2H),2.54(td,J=12.9,2.8Hz,1H),2.25(s,3H),1.85-1.72(m,4H),1.61-1.52(m,3H),1.21-1.08(m,4H)

[0596] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.81,169.64,169.34,167.25,164.98,155.36,148.90,144.49,144.15,143.64,141.04,140.19,134.87,134.23,131.83,131.68,128.55,127.46,127.00,126.66,126.52,126.32,113.00,112.44,110.19,107.10,100.88,49.45,45.68,42.16,42.04,39.07,37.54,36.29,33.83,32.54,32.44,31.84,31.76,31.53,31.20,23.79,19.15,17.28。

[0597] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.52

[0598] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C45H47F2N6O8(M+H)+837.3423;实际值:837.3455

[0599] N-(6-(3-(4-(((1-(3-(5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰基)吡咯烷-3-基)氧基)甲基)哌啶-1-羰基)苯基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺(化合物212)

[0600] 

[0601] 1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.09(d,J=8.3Hz,1H),7.68(s,1H),7.59(d,J=8.4Hz,

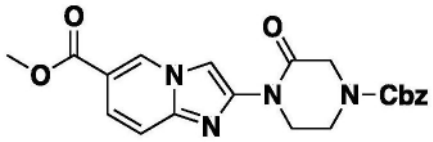
1H),7.47-7.42(m,3H),7.39(d,J＝1.8Hz,1H),7.23(dd,J＝8.2,1.8Hz,1H),7.19(d,J＝1.7Hz,1H),7.08(d,J＝8.1Hz,1H),6.52(s,1H),6.40(dd,J＝16.7,2.0Hz,1H),6.26(dd,J＝3.2,1.2Hz,1H),6.05(d,J＝3.2Hz,1H),5.81(dd,J＝10.2,2.0Hz,1H),4.72(s,1H),4.48-4.34(m,2H),4.10-3.75(m,6H),3.66-3.58(m,1H),3.54-3.39(m,3H),3.34-3.22(m,2H),3.05-2.87(m,3H),2.81-2.70(m,1H),2.60-2.50(m,2H),2.26(s,3H),2.12-1.95(m,2H),1.94-1.71(m,5H),1.21-1.04(m,4H)

[0602] 13C NMR(101MHz,CDCl3)δ171.78,170.23,170.02,169.92,164.97,150.29,148.82,144.50,144.13,143.61,141.08,136.23,134.92,134.24,131.69,130.09,128.33,127.73,127.69,127.02,126.67,126.31,112.85,112.44,110.20,107.03,100.93,78.63,73.53,73.39,52.05,50.93,44.59,43.69,42.18,39.06,36.74,36.70,33.03,32.80,31.66,31.21,29.66,23.29,19.25,17.23。

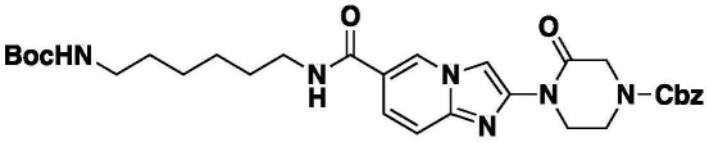
[0603] 19F:(376MHz,CDCl3)δ-49.51,-49.52

[0604] HRMS(TOF,ES+):m/z计算值:C48H51F2N6O9(M+H)+893.3686;实际值:893.3688。

[0605] 化合物231的合成

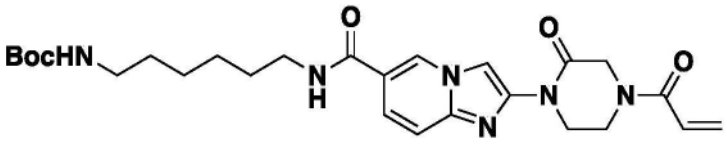
[0606] 

[0607] 2-(4-((苄氧基)羰基)-2-氧代哌嗪-1-基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-甲酸甲酯:将2-溴咪唑并[1,2-a]吡啶-6-甲酸甲酯(100mg,0.39mmol)、3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(101mg,0.43mmol)、碳酸钾(161mg,1.17mmol)、碘化铜(I)(7.5mg,0.039mmol)、和N,N'-二甲基二氨基乙烷(11mL,0.10mmol)合并并在氮气下溶于1,4-二噁烷(2mL)。通过在真空下超声处理和用氮气回填两次,使混合物脱气。然后将反应在100℃搅拌16h,并添加饱和氯化铵(1mL)和水(5mL),搅拌20分钟。添加另外的水,并将混合物用乙酸乙酯萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法(0-80% EtOAc/Hex)纯化,得到呈固体的标题化合物(62mg,0.15mmol,39%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:409.14,实际值:409.1。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.94-8.89(m,1H),8.41(s,1H),7.79(dd,J＝9.4,1.7Hz,1H),7.54(d,J＝9.4Hz,1H),7.45-7.34(m,5H),5.23(s,2H),4.43(s,2H),4.35-4.30(m,2H),4.00(s,3H),3.92(t,J＝5.5Hz,2H)。

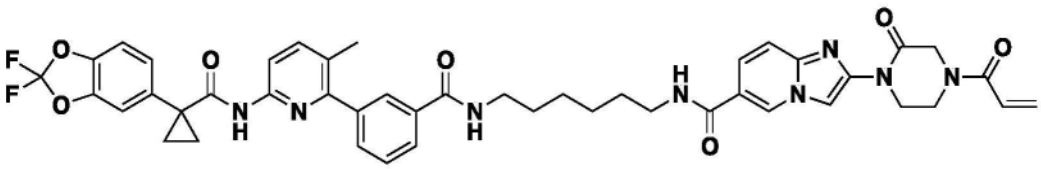
[0608] 

[0609] 4-(6-((6-((叔丁氧基羰基)氨基)己基)氨甲酰基)咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:将2-(4-((苄氧基)羰基)-2-氧代哌嗪-1-基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-甲酸甲酯(60mg,0.15mmol)溶于THF(1.5mL)和两滴MeOH。添加LiOH水溶液(1.5mL,0.75mmol,0.5M),并将反应混合物搅拌2h。将该溶液用水稀释,用HCl(1mL,1M)酸化,并用DCM萃取三次。将有机萃取物合并,用硫酸钠干燥,并浓缩得到羧酸,将其直接溶于DMF(1.5mL)。添加(6-氨基己基)氨基甲酸叔丁酯(39mg,0.18mmol)、DIEA(131mL,0.75mmol)和HATU(114mg,0.30mmol),并将反应搅拌过夜。添加水,并将混合物用EtOAc萃取三次。将有机

萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法(0-60%EtOAc/Hex)纯化,得到呈油状物的标题化合物(28mg,0.047mmol,31%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:593.30,实际值:593.3。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.82(s,1H),8.35(s,1H),7.59(d,J=9.3Hz,1H),7.49(d,J=9.3Hz,1H),7.42-7.29(m,5H),6.80(s,1H),4.59(s,1H),4.38(s,2H),4.28(s,2H),3.87(t,J=5.5Hz,2H),3.46(q,J=6.4Hz,2H),3.17(d,J=6.5Hz,2H),3.00(s,2H),1.51-1.44(m,4H),1.42(s,9H),1.39-1.31(m,4H)。

[0610] 

[0611] (6-(2-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-甲酰胺基)己基)氨基甲酸叔丁酯:4-(6-((6-((叔丁氧基羰基)氨基)己基)氨甲酰基)咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(25mg,0.047mmol)和Pd/C(6mg,10%wt.)悬浮于EtOH(4mL),将气氛换成氢气,并将混合物剧烈搅拌过夜。通过过滤(PTFE,0.45mm)去除Pd/C,并在真空下去除EtOH。然后将粗胺溶于DCM(1.5mL),并将溶液冷却至0℃。添加DIEA(40m25L,0.23mmol),然后添加丙烯酰氯(10mL,0.099mmol),并将反应在0℃搅拌20min。添加水,并将混合物用DCM萃取三次。将有机萃取物合并,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法(0-8% MeOH/DCM)纯化,得到呈固体的标题化合物(20mg,0.039mmol,83%)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:513.27,实际值:513.3。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.86(s,1H),8.36(s,1H),7.65(d,J=9.4Hz,1H),7.52(d,J=9.2Hz,1H),6.98(s,1H),6.69-6.51(m,1H),6.44(dd,J=16.8,1.9Hz,1H),5.85(dd,J=10.3,1.9Hz,1H),4.67(s,1H),4.52(d,J=16.6Hz,2H),4.35(s,2H),4.03(d,J=29.2Hz,2H),3.49(q,J=6.5Hz,2H),3.25-3.15(m,2H),1.67(p,J=6.8Hz,2H),1.58-1.35(m,15H)。

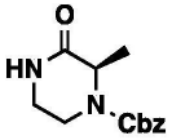
[0612] 

[0613] 2-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)-N-(6-(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙-2-烯-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺基)己基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-甲酰胺(NJH-2-153):将(6-(2-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-甲酰胺基)己基)氨基甲酸叔丁酯(15mg,0.029mmol)溶于DCM(1mL)并用TFA(0.5mL)处理,并搅拌30min。蒸发挥发物,将粗品用DCM洗涤,并蒸发两次。将粗胺和鲁马卡托(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸,15mg,0.032mmol)溶于DMF(0.5mL),并添加DIEA(25mL,0.15mmol),然后添加HATU(22mg,0.058mmol)。将溶液搅拌20分钟,然后添加水,并将混合物用EtOAc萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法(0-7%MeOH/DCM)纯化,得到呈固体的标题化合物(12.7mg,0.015mmol,52%)。HRMS(ESI)[M+H]$^+$m/z计算值:847.3301,实际值:847.3370。H1 NMR(600MHz,CDCl3)δ8.84(s,1H),8.31(s,1H),8.07(d,J=8.4Hz,1H),7.79(d,J=1.8Hz,1H),7.75(dt,J=7.8,1.5Hz,1H),7.66(s,1H),7.60(d,J=9.2Hz,1H),7.56(d,J=8.5Hz,1H),7.53(dt,J=7.7,1.4Hz,1H),7.49-7.43(m,

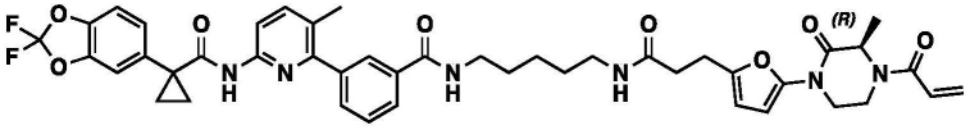
2H),7.20(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.18(d,J=1.7Hz,1H),7.05(d,J=8.2Hz,1H),6.87(s,1H),6.56(s,1H),6.41(dd,J=16.8,1.7Hz,1H),6.34(s,1H),5.81(d,J=10.7Hz,1H),4.47(d,J=27.0Hz,2H),4.31(s,2H),3.98(d,J=49.3Hz,3H),3.47(dq,J=23.0,6.5Hz,4H),2.21(s,3H),1.73(q,J=3.9Hz,2H),1.66-1.60(m,2H),1.53-1.38(m,5H),1.15(q,J=3.9Hz,2H)。

[0614] 13C NMR(151MHz,CDCl3)δ171.7,167.6,164.8,155.3,148.9,144.1,143.6,141.3,141.0,140.3,134.9,134.8,131.9,131.7,128.6,127.4,127.0,126.6,126.5,120.8,115.7,113.0,112.4,110.2,104.0,55.8,43.7,39.2,39.1,31.2,29.6,29.1,25.4,25.2,19.1,18.6,17.2,12.5。

[0615] 化合物230的合成

[0616] 

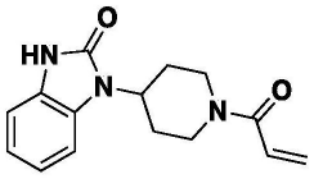
[0617] (R)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:将453mg(3.28mmol)的碳酸钾溶于3mL的THF并搅拌5分钟。向反应混合物中添加1mL水,然后滴加310μL(2.17mmol)氯甲酸苄酯。添加125mg(1.10mmol)的(R)-3-甲基哌嗪-2-酮,并将反应混合物搅拌过夜。然后向反应中添加水,并将反应混合物用乙酸乙酯萃取三次。将有机层合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(0%至80% EtOAc:己烷)纯化,得到160mg呈固体的标题化合物(0.64mmol,59%产率)。LC/MS[M+H]$^+$m/z计算值:249.12,实际值:249.1。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.47-7.34(m,5H),6.16(s,1H),5.21(s,2H),4.83-4.63(m,1H),4.38-4.12(m,1H),3.61-3.42(m,1H),3.31(d,J=12.6Hz,2H),1.63(s,2H)。

[0618] 

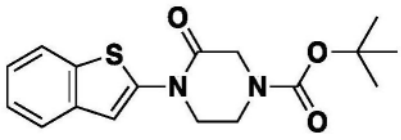
[0619] (R)-N-(5-(3-(5-(4-丙烯酰基-3-甲基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酰胺基)戊基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺:将160mg(0.64mmol)的(R)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯、176mg(0.64mmol)的(E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯、268mg(1.94mmol)的碳酸钾、18μL(0.16mmol)的N,N'-二甲基乙二胺和13mg(0.068mmol)的碘化铜溶于3mL二噁烷,脱气三次,加热至100℃并搅拌过夜。第二天,向反应中添加水,并将反应混合物用乙酸乙酯萃取三次。将有机层合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩,得到粗中间体(R)-4-(5-(4,4-二甲基-3-氧戊-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯。将该中间体与30mg的Pd/C(10%wt.)添加到5mL的EtOH中,并将气氛替换为氢气。将反应剧烈搅拌过夜。第二天,将反应通过硅藻土过滤以去除Pd/C,浓缩以去除EtOH,得到粗中间体(R)-1-(5-(4,4-二甲基-3-氧戊基)呋喃-2-基)-3-甲基哌嗪-2-酮。然后将该粗中间体立即溶于500μL DCM,并添加500μL的TFA,并将溶液搅拌1h。在真空下蒸发挥发物,并添加DCM(1mL)并蒸发,得到羧酸中间体(R)-3-(5-(3-甲基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸。将该中间体溶于500μL DMF,然后添加100μL DIEA和70mg(0.13mmol)N-(4-氨基丁基)-3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷-1-甲酰胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酰胺,然后添加

100mg HATU。允许反应混合物在室温搅拌1h。添加水,并将混合物用EtOAc萃取三次。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(0%至4% MeOH的DCM溶液)纯化,得到11.1mg呈固体的LEB-03-162(0.013mmol,三步产率2%)。HRMS(ESI)[M+H]$^+$m/z计算值:824.3345,实际值:825.3417。1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.12(d,J=8.4Hz,1H),8.05(s,1H),7.90-7.79(m,2H),7.76(s,1H),7.63(d,J=8.5Hz,1H),7.56(dt,J=7.7,1.5Hz,1H),7.50(t,J=7.6Hz,1H),7.27(dd,J=8.2,1.8Hz,1H),7.23(d,J=1.8Hz,1H),7.14-7.08(m,1H),6.54(s,2H),6.46(s,1H),6.14(dd,J=78.1,3.3Hz,2H),5.91(s,1H),5.83(d,J=10.1Hz,1H),4.72(s,1H),3.91-3.77(m,2H),3.46(p,J=6.2Hz,2H),3.25(q,J=6.6Hz,2H),2.99(s,3H),2.94-2.90(m,4H),2.48(t,J=7.3Hz,2H),2.28(s,3H),1.78(q,J=3.9Hz,2H),1.56-1.49(m,2H),1.49-1.44(m,2H),1.37(q,J=8.0Hz,1H),1.20(q,J=3.9Hz,2H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ171.69,171.00,166.14,162.78,155.91,150.13,149.51,143.31,142.59,141.14,140.02,136.74,134.87,131.74,128.44,128.15,127.98,127.21,127.02,126.79,113.56,112.69,110.59,106.88,100.60,54.08,42.32,38.88,36.25,33.78,31.81,31.24,31.16,29.29,29.23,24.32,23.97,19.18,18.56,17.21,16.16,12.95。

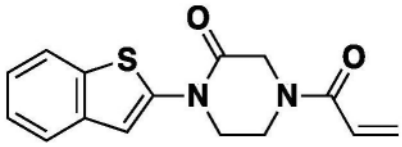
[0620] 实例4:示例性DUB募集因子的合成

[0621] 

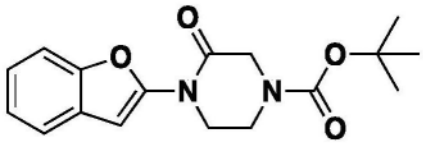
[0622] 1-(1-丙烯酰哌啶-4-基)-1,3-二氢-2H-苯并[d]咪唑-2-酮:将1-(哌啶-4-基)-1,3-二氢-2H-苯并[d]咪唑-2-酮(50mg,0.23mmol)通过通用程序H酰化,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0至20% MeOH/DCM)纯化,得到呈油状物的标题化合物(11.8mg,0.043mmol,19%)。1H NMR(400MHz,DMSO)δ10.87(s,1H),7.29-7.17(m,1H),7.05-6.95(m,3H),6.88(ddd,J=16.1,10.5,3.3Hz,1H),6.16(d,J=2.4Hz,1H),5.70(dd,J=10.4,2.4Hz,1H),4.61(d,J=13.1Hz,1H),4.44(tt,J=12.0,3.9Hz,1H),4.21(d,J=13.8Hz,1H),3.21(t,J=13.3Hz,1H),2.76(t,J=12.9Hz,1H),2.34-2.07(m,2H),1.75(d,J=12.4Hz,2H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ164.8,154.2,129.7,129.0,129.0,127.7,121.1,120.9,109.3,109.0,50.3,45.1,41.6,29.9,29.0。HRMS(ESI):[M+H]$^+$m/z计算值:272.14,实际值:272.1394。

[0623] 

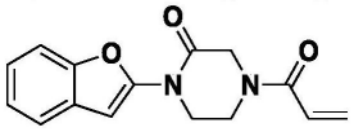
[0624] 4-(苯并[b]噻吩-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯:通过通用程序D将2-溴苯并[b]噻吩(100mg,0.47mmol)与3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(93.5mg,0.47mmol)偶联,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0至100% EtOAc/己烷)纯化,得到固体(22.3mg,0.116mmol,14%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.81(d,J=7.8Hz,1H),7.72(d,J=7.7Hz,1H),7.30(s,2H),6.92(s,1H),4.40(s,2H),4.01(t,J=5.4Hz,2H),3.92(t,J=5.4Hz,2H),1.54(s,9H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:333.1,实际值:333.1

[0625] 

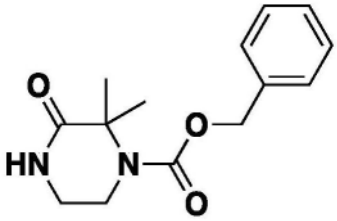
[0626] 4-丙烯酰基-1-(苯并[b]噻吩-2-基)哌嗪-2-酮:将4-(苯并[b]噻吩-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(EZ-1-035)(18mg,0.05mmol)分别通过通用程序F和H去保护并酰化。将粗残余物通过硅胶色谱法(0至100% EtOAc/Hex)纯化,得到呈固体的标题化合物(6.6mg,0.023mmol,46%)。1H NMR(400MHz,DMSO)δ7.86(d,J=7.9Hz,1H),7.74(t,J=7.2Hz,1H),7.45-7.32(m,1H),7.28(q,J=6.8Hz,1H),7.11(s,1H),6.98-6.77(m,1H),6.21(d,J=16.7Hz,1H),5.83-5.74(m,1H),4.50(d,J=68.5Hz,2H),4.18-3.91(m,4H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ164.7,142.0,136.7,136.2,128.9,128.0,124.9,123.9,122.8,122.1,108.0,49.2,48.4,47.6,46.8。HRMS(ESI):[M+Na]$^+$m/z计算值:309.0674,实际值:309.0667。

[0627] 

[0628] 4-(苯并呋喃-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯:通过通用程序D将2-溴苯并呋喃(200mg,1.02mmol)与3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(204.24mg,1.02mmol)偶联,并通过硅胶色谱法(0至50% EtOAc/己烷)纯化,得到固体(44.3mg,0.14mmol,14%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.65-7.52(m,1H),7.48-7.39(m,1H),7.26(dd,J=6.0,3.3Hz,2H),6.96(d,J=1.2Hz,1H),4.35(s,2H),4.19-4.05(m,2H),3.86(d,J=5.6Hz,2H),1.53(d,J=1.6Hz,9H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:316.1,实际值:316.2

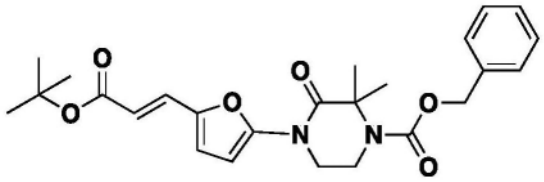
[0629] 

[0630] 4-丙烯酰基-1-(苯并呋喃-2-基)哌嗪-2-酮:将4-(苯并呋喃-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(EZ-1-044)(44.3mg,0.14mmol)通过通用程序F和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0至50% EtOAc/己烷)纯化,得到呈固体的标题化合物(9.3mg,0.034mmol,25%)。1H NMR(300MHz,CDCl3)δ7.63-7.51(m,1H),7.43(dt,J=7.1,3.8Hz,1H),7.29(td,J=6.3,2.8Hz,2H),6.98(d,J=1.0Hz,1H),6.57(d,J=9.8Hz,1H),6.47(dd,J=16.7,2.2Hz,1H),5.88(dd,J=10.1,2.2Hz,1H),4.52(s,2H),4.24-3.92(m,4H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ165.0,150.1,149.5,129.0,128.8,128.1,123.9,123.9,121.2,111.1,94.6,49.5,47.1,46.6,42.4。HRMS(ESI):[M+H]$^+$m/z计算值:271.1004,实际值:271.1078。

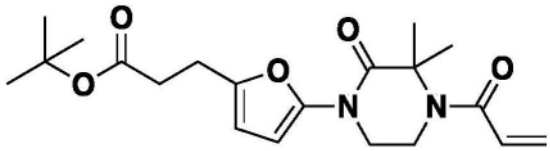
[0631] 

[0632] 2,2-二甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:通过通用程序E用氯甲酸苄酯保护3,3-二

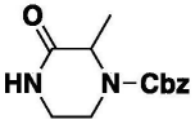
甲基哌嗪-2-酮(400mg,3.12mmol),并通过硅胶色谱法(0至10%MeOH/DCM)纯化,得到粉末(492.1mg,1.88mmol,60%)。1H NMR(300MHz,CDCl3)δ7.41(s,5H),6.02(s,1H),5.19(s,2H),3.87-3.74(m,2H),3.49-3.35(m,2H),1.75(s,6H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:263.1,实际值:263.1。

[0633] 

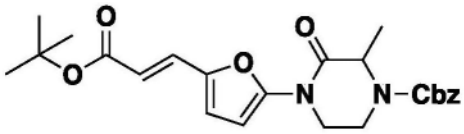
[0634] (E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2,2-二甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:将(E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯(中间体2)(104mg,0.38mmol)和2,2-二甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(EZ-1-050)(100mg,0.38mmol)通过通用程序D偶联,并通过硅胶色谱法(0至50% EtOAc/己烷)纯化,得到静置后固化的油状物(133.7mg,0.29mmol,77%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.43(d,J=5.1Hz,6H),6.66(q,J=3.6Hz,2H),6.12(d,J=15.6Hz,1H),5.22(s,2H),4.04-3.98(m,2H),3.91(d,J=5.2Hz,2H),1.80(s,6H),1.56(d,J=4.0Hz,9H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:455.2,实际值:455.2

[0635] 

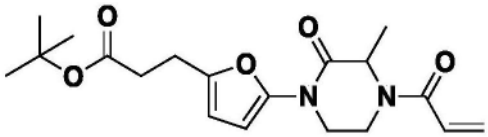
[0636] 3-(5-(4-丙烯酰基-3,3-二甲基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯:将(E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2,2-二甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(30mg,0.066mmol)通过通用程序G和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0-70% EtOAc/己烷)纯化,得到呈油状物的标题化合物(7.2mg,0.019mmol,29%,两步产率)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ6.51(ddd,J=16.8,10.6,2.3Hz,1H),6.29(t,J=2.9Hz,1H),6.23(dt,J=16.8,2.1Hz,1H),6.03(d,J=3.2Hz,1H),5.70(dt,J=10.5,2.1Hz,1H),3.88(dd,J=6.4,3.4Hz,2H),3.78(dd,J=6.1,3.6Hz,2H),2.87(t,J=7.6Hz,2H),2.54(td,J=7.9,2.3Hz,2H),1.83(d,J=2.3Hz,6H),1.44(d,J=2.3Hz,9H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ171.6,171.1,166.3,149.1,146.2,131.5,127.2,107.2,99.7,80.4,63.6,47.5,42.7,28.2,23.8,23.5。HRMS(ESI):[M+Na]$^+$m/z计算值:399.1896,实际值:399.1883。

[0637] 

[0638] 2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:通过通用程序E用氯甲酸苄酯保护3-甲基哌嗪-2-酮(400mg,3.5mmol),并通过硅胶色谱法(0至10%MeOH/DCM)纯化,得到固体(123.9mg,0.5mmol,14%)。1H NMR(300MHz,CDCl3)δ7.36(s,5H),5.96(s,1H),5.16(s,2H),4.69(s,1H),4.18(s,1H),3.47(d,J=12.1Hz,1H),3.27(d,J=12.2Hz,2H),1.46(d,J=7.1Hz,3H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:249.1,实际值:249.1。

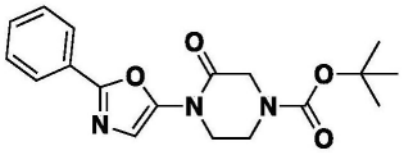
[0639] 

[0640] (E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:将2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(EZ-1-049)(60mg,0.24mmol)和(E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯(66mg,0.24mmol)通过通用程序D偶联,并通过硅胶色谱法(0至50% EtOAc/己烷)纯化,得到固体(69.3mg,0.16mmol,66%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.42(s,5H),7.32-7.24(m,1H),6.70-6.62(m,2H),6.12(d,J=15.4Hz,1H),5.23(d,J=2.5Hz,2H),4.89(s,1H),4.35(s,1H),4.00(d,J=13.9Hz,2H),3.50(s,1H),1.72-1.49(m,12H)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:441.2,实际值:441.2。

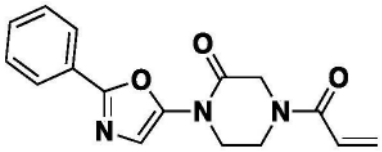
[0641] 

[0642] 3-(5-(4-丙烯酰基-3-甲基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯:

[0643] 将(E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(52.3mg,0.12mmol)通过通用程序G和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0-100% EtOAc/己烷)纯化,得到呈油状物的标题化合物(17.9mg,0.05mmol,42%,两步产率)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ6.66-6.51(m,1H),6.46(d,J=16.7Hz,1H),6.32(d,J=3.2Hz,1H),6.07(dd,J=3.2,1.0Hz,1H),5.84(d,J=9.8Hz,1H),4.74(s,1H),4.23-3.23(m,4H),2.91(t,J=7.6Hz,2H),2.57(dd,J=8.2,6.9Hz,3H),1.63(s,3H),1.47(s,9H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ171.6,167.6,164.2,149.5,145.9,128.7,128.2,107.2,100.7,80.4,60.2,54.5,52.0,48.2,33.4,28.2,23.5,17.0。HRMS(ESI):$[M+Na]^+$m/z计算值:385.1739,实际值:385.1728。

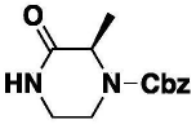
[0644] 

[0645] 3-氧代-4-(2-苯基噁唑-5-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯:通过通用程序D将5-溴-2-苯基噁唑(50mg,0.22mmol)与3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(44.7mg,0.22mmol)偶联,并通过硅胶色谱法(0至60% EtOAc/己烷)纯化,得到固体(40.4mg,0.117mmol,54%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.05-7.98(m,2H),7.49(dd,J=5.7,1.8Hz,3H),7.38(s,1H),4.36(s,2H),4.04(t,J=5.4Hz,2H),3.89(t,J=5.3Hz,2H),1.55(s,9H)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:344.2,实际值:344.1。

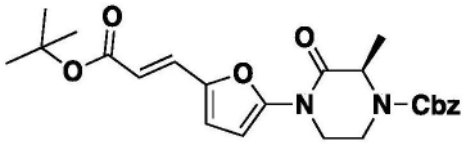
[0646] 

[0647] 4-丙烯酰基-1-(2-苯基噁唑-5-基)哌嗪-2-酮:将3-氧代-4-(2-苯基噁唑-5-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(40.4mg,0.117mmol)通过通用程序F和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0至80% EtOAc/己烷)纯化,得到呈固体的标题化合物(34.6mg,0.116mmol,45%,两

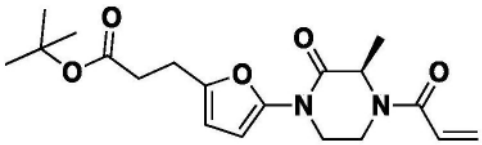
步)。1H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ8.01(dd,J=6.8,3.0Hz,2H),7.54-7.46(m,3H),7.39(s,1H),6.59(s,1H),6.54-6.42(m,1H),5.90(d,J=11.6Hz,1H),4.53(s,2H),4.10(s,4H).13C NMR(151MHz,DMSO)δ164.6,155.1,146.6,130.8,129.6,128.9,128.3,128.1,127.1,125.9,116.2,49.4,47.2,46.9。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:298.1113,实际值:298.1187。

[0648] 

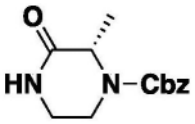
[0649] (R)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苯酯:通过通用程序E用氯甲酸苄酯(186mL,0.876mmol)保护(R)-3-甲基哌嗪-2-酮(100mg,0.88mmol),并通过硅胶色谱法(0至100%EtOAc/己烷)纯化,得到固体(47.2mg,0.25mmol,22%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ6.15(s,1H),5.21(s,2H),4.73(s,1H),4.24(s,1H),3.51(d,J=12.5Hz,1H),3.31(d,J=12.6Hz,2H),1.50(d,J=7.0Hz,3H)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:248.1,实际值:248.1

[0650] 

[0651] (R,E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:将(R)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苯酯(44.6mg,0.18mmol)和(E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯(49.1mg,0.18mmol)通过通用程序D偶联,并通过硅胶色谱法(0至35% EtOAc/己烷)纯化,得到油状物(56.7mg,0.13mmol,72%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.42(d,J=5.3Hz,5H),7.30(s,1H),6.74-6.62(m,2H),6.12(d,J=15.6Hz,1H),5.23(d,J=2.3Hz,2H),4.89(s,1H),4.34(s,1H),4.02(s,2H),3.49(s,1H),1.61(s,3H),1.56(d,J=5.5Hz,9H)。LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:441.2,实际值:441.2。

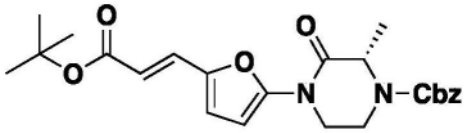
[0652] 

[0653] (R)-3-(5-(4-丙烯酰基-3-甲基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯:将(R,E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(31.2mg,0.07mmol)通过通用程序F和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0至100%EtOAc/己烷)纯化,得到呈固体的标题化合物(18.9mg,0.052mmol,68%,两步产率)。1H NMR(300MHz,CDCl3)δ6.65-6.40(m,2H),6.33(d,J=3.4Hz,1H),6.08(d,J=3.3Hz,1H),5.90-5.81(m,1H),4.76(s,1H),3.93-3.34(m,4H),2.92(t,J=7.5Hz,2H),2.58(dd,J=8.3,6.8Hz,2H),2.22(s,3H),1.48(s,9H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ171.6,167.6,164.2,149.4,145.9,128.7,128.2,107.2,100.6,80.4,52.0,48.2,47.2,33.4,28.2,23.5。HRMS(ESI):$[M+Na]^+$m/z计算值:385.1739,实际值:385.1730。

[0654] 

[0655] (S)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:通过通用程序E用氯甲酸苄酯(149.4mg,0.88mmol)保护(S)-3-甲基哌嗪-2-酮(100mg,0.88mmol),并通过硅胶色谱法(0至100%

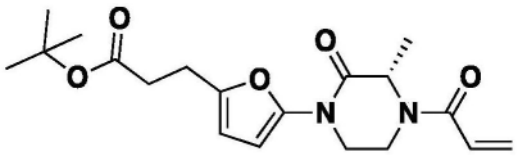
EtOAc/己烷)纯化,得到白色固体(89.4mg,0.36mmol,41%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.40(d,J=4.6Hz,5H),6.13(s,1H),5.21(s,2H),4.72(s,1H),4.24(s,1H),3.53(s,1H),3.31(d,J=12.5Hz,2H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:248.1,实际值:248.1。

[0656] 

[0657] (S,E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯:将(S)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(EZ-1-063)(41.6mg,0.17mmol)和(E)-3-(5-溴呋喃-2-基)丙烯酸叔丁酯(EZ-1-048)(46.8mg,0.17mmol)通过通用程序D偶联,并通过硅胶色谱法(0至50% EtOAc/己烷)纯化,得到澄清黄色油状物(41.3mg,0.09mmol,56%)。

[0658] 1H NMR(300MHz,CDCl3)δ7.45-7.37(m,5H),7.31(d,J=1.3Hz,1H),6.72-6.61(m,2H),6.12(d,J=15.6Hz,1H),5.23(d,J=1.3Hz,2H),4.90(s,1H),4.34(s,1H),4.05-3.92(m,2H),3.49(s,1H),1.62(s,3H),1.56(d,J=3.1Hz,9H)。

[0659] LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:441.2,实际值:441.2。

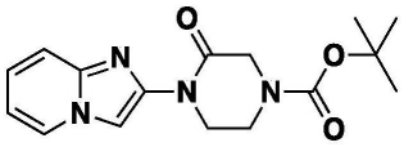
[0660] 

[0661] (S)-3-(5-(4-丙烯酰基-3-甲基-2-氧代哌嗪-1-基)呋喃-2-基)丙酸叔丁酯:将(S,E)-4-(5-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)呋喃-2-基)-2-甲基-3-氧代哌嗪-1-甲酸苄酯(35.4mg,0.08mmol)通过通用程序F和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0至100% EtOAc/己烷)纯化,得到呈澄清无色油状物的标题化合物(16.9mg,0.047mmol,58%,两步产率)。

[0662] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ6.63-6.41(m,2H),6.32(d,J=3.4Hz,1H),6.07(d,J=3.5Hz,1H),5.85(d,J=10.3Hz,1H),4.77(s,2H),3.88(s,2H),3.34(s,1H),2.91(t,J=7.5Hz,2H),2.58(dt,J=8.8,5.2Hz,2H),1.74(s,3H),1.48(d,J=4.0Hz,9H)。

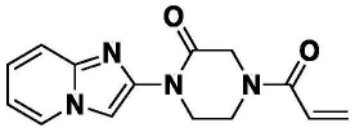
[0663] 13C NMR(151MHz,DMSO)δ171.6,164.2,149.5,145.9,128.7,128.1,107.2,100.7,80.4,54.4,52.0,48.2,33.4,28.2,23.5。

[0664] HRMS(ESI):[M+Na]$^+$m/z计算值:385.1739,实际值:385.1726。

[0665] 

[0666] 4-(咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯:通过通用程序D将2-溴咪唑并[1,2-a]吡啶(50mg,0.25mmol)与3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(50.8mg,0.25mmol)偶联,并通过硅胶色谱法(0至80% EtOAc/己烷)纯化,得到澄清无色油状物(35.7mg,0.11mmol,45%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.33(s,1H),8.15(d,J=6.7Hz,1H),7.54(d,J=9.1Hz,1H),7.22(ddd,J=8.7,6.9,1.4Hz,1H),6.85(td,J=6.8,1.3Hz,1H),4.34(s,2H),4.31(t,J=5.5Hz,2H),3.83(t,J=5.4Hz,2H),1.53(s,9H)。LC/MS:[M+H]$^+$m/z计算值:

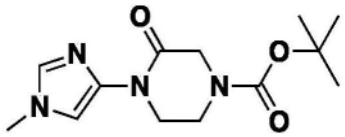
317.2,实际值:317.2。

[0667] 

[0668] 4-丙烯酰基-1-(咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)哌嗪-2-酮:将4-(咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(23.4mg,0.074mmol)通过通用程序F和H去保护并酰化,并通过硅胶色谱法(0至100% EtOAc/己烷)纯化,得到呈灰白色固体的标题化合物(3.8mg,0.014mmol,19%,两步产率)。

[0669] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ8.32(s,1H),8.15(d,J=6.9Hz,1H),7.55(d,J=9.0Hz,1H),7.24(t,J=7.9Hz,1H),6.87(t,J=6.8Hz,1H),6.62(s,1H),6.46(d,J=16.7Hz,1H),5.86(d,J=10.5Hz,1H),4.53(d,J=23.7Hz,2H),4.38(s,2H),4.04(d,J=33.0Hz,2H)。

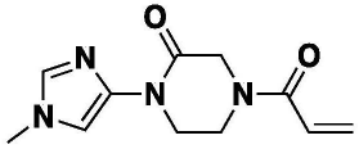
[0670] HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:271.1117,实际值:271.1190。

[0671] 

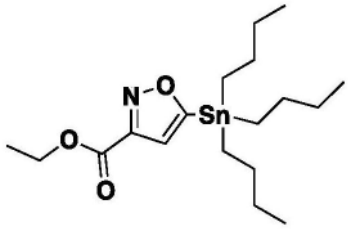
[0672] 4-(1-甲基-1H-咪唑-4-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯:通过通用程序D将4-溴-1-甲基-1H-咪唑(155mL,1.55mmol)与3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(311mg,1.55mmol)偶联,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0-100% EtOAc/Hex)纯化,得到固体(412mg,1.47mmol,95%)。

[0673] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.58-7.50(m,1H),7.39-7.26(m,1H),4.27(d,J=9.5Hz,2H),4.18-4.06(m,3H),3.80-3.61(m,4H),1.51(d,J=4.1Hz,9H)。

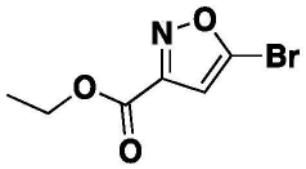
[0674] LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:281.2,实际值:281.2。

[0675] 

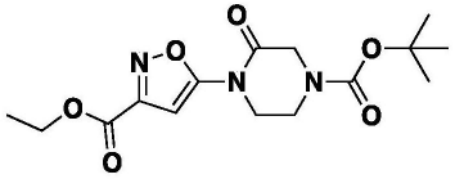
[0676] 4-丙烯酰基-1-(1-甲基-1H-咪唑-4-基)哌嗪-2-酮:将4-(1-甲基-1H-咪唑-4-基)-3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(100mg,0.36mmol)通过通用程序F和H去保护并酰化,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0至10% MeOH/DCM)纯化,得到呈固体的标题化合物(27.7mg,0.12mmol,33%)。1H NMR(300MHz,CDCl3)δ7.54(s,1H),7.27(s,1H),6.58(s,1H),6.44(dd,J=16.7,2.0Hz,1H),5.88-5.81(m,1H),4.46(d,J=16.0Hz,2H),4.18(s,2H),3.99(d,J=23.0Hz,2H),3.73(s,3H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ163.4,162.9,138.9,133.9,128.6,128.5,128.2,46.9,44.9,42.6,33.7。HRMS(ESI):$[M+H]^+$m/z计算值:235.1117,实际值:235.1190。

[0677] 

[0678] 5-(三丁基甲锡烷基)异噁唑-3-甲酸乙酯:向乙基-2-氯-2(羟基亚氨基乙酸酯)(481mg,3.17mmol)溶于无水DCM(15mL)中的溶液中添加碳酸钾(482.5mg,3.5mmol)和三丁基(乙炔基)锡烷(872mL,3.17mmol),并在室温搅拌过夜。然后将反应用水淬灭,用DCM萃取,并用无水硫酸钠干燥。将有机层通过硅胶柱色谱法(0至10% EtOAc/己烷)纯化,得到呈油状物的产物(753mg,1.75mmol,55%)。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ6.84(s,1H),4.48(q,J=7.1Hz,2H),1.70-1.10(m,27H),0.94(s,3H)。

[0679] 

[0680] 5-溴异噁唑-3-甲酸乙酯将Br_2(134mL,2.62mmol)添加到5-(三丁基甲锡烷基)异噁唑-3-甲酸乙酯(753mg,1.74mmol)和碳酸钠(203mg,1.91mmol)溶于DCM(10mL)中的溶液中,并在室温搅拌过夜。然后将反应混合物用饱和硫代硫酸钠(8mL)淬灭,然后用DCM萃取并用盐水洗涤。将有机层用无水硫酸钠干燥,并通过硅胶柱色谱法(0至15% EtOAc/己烷)纯化,得到澄清无色油状物(241.8mg,1.1mmol,63%),静置后结晶。1H NMR(400MHz,CDCl3)δ6.76(s,1H),4.49(q,J=7.1Hz,2H),1.47(dt,J=9.6,6.9Hz,3H)。

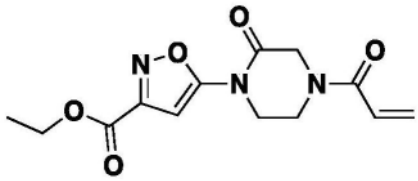
[0681] 

[0682] 5-(4-(叔丁氧基羰基)-2-氧代哌嗪-1-基)异噁唑-3-甲酸乙酯

[0683] 将无水二噁烷(3mL)添加到用N_2冲洗的小瓶中,该小瓶含有5-溴异噁唑-3-甲酸乙酯(EZ-1-091)(94.6mg,0.43mmol)、3-氧代哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.43mmol,86.1mg)、碳酸铯(280.2mg,0.86mmol)、Xantphos(19mg,0.032mmol)、$Pd(dba)_3$(10mg,0.011mmol),并将悬浮液脱气。将反应混合物在90℃搅拌过夜。将产物用EtOAc萃取,用盐水洗涤,并通过硅胶柱色谱法(0至75% EtOAc/己烷)纯化,得到澄清黄色油状物(14mg,0.04mmol,9.6%)。

[0684] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ4.48(q,J=7.1Hz,2H),4.38(s,2H),4.13(q,J=5.5Hz,2H),3.91-3.84(m,2H),1.54(d,J=2.8Hz,9H),1.46(t,J=7.1Hz,3H)。

[0685] LC/MS:$[M+H]^+$m/z计算值:340.1,实际值:340。

[0686] 

[0687] 5-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)异噁唑-3-甲酸乙酯:

[0688] 将5-(4-(叔丁氧基羰基)-2-氧代哌嗪-1-基)异噁唑-3-甲酸乙酯(EZ-1-097)(14mg,0.04mmol)分别通过通用程序F和H去保护并酰化,并将粗残余物通过硅胶色谱法(0至100% EtOAc/己烷)纯化,得到呈澄清无色油状物的标题化合物(5.0mg,0.017mmol,42%)。

[0689] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.01(s,1H),6.57(s,1H),6.47(dd,J=16.8,2.0Hz,1H),

5.90(dd,J＝10.1,2.0Hz,1H),4.56(s,2H),4.48(q,J＝7.1Hz,2H),4.18(d,J＝5.3Hz,2H),4.07(s,2H),1.46(t,J＝7.1Hz,3H)。13C NMR(151MHz,DMSO)δ173.4,144.1,143.7,135.1,121.6,119.5,118.2,117.4,64.5,44.7,27.3,16.5,9.9。HRMS(ESI):$[M+Na]^+$m/z计算值:316.0909,实际值:316.0907。

[0690] 实例5:DUB募集因子-去泛素化酶相互作用的Bio-NMR分析

[0691] 所有的NMR谱都记录在Bruker 600MHz光谱仪上,该光谱仪配有具有z-梯度的5mm QCI-F低温探针,并且在所有实验中温度保持恒定在298K。为了探测化合物和E2连接酶与OTUB1的结合,使用装有160μL的50μM{U}-^{2}H,^{1}H/^{13}C-甲基-Ile/Leu/Val/Ala(ILVA),{U}-^{15}N标记的OTUB1、25mM d-Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、5% D_2O(用于封闭)、100μM DSS(内标)、75μM DUB募集因子(化合物100)(溶于100%d_6-DMSO;用于化合物结合物研究)和/或100μM E2 D2/Ub-E2 D2(用于连接酶结合研究)的3mm NMR管进行^{1}H-1D和^{13}C-SOFAST-HMQC实验。为了使化合物与OTUB1完全结合,选择了约40小时的孵育时间。记录具有足够体积的纯d_6-DMSO和/或E2缓冲液的参考光谱,以补偿溶剂诱导的影响,40小时后重复实验,以确保任何谱变化与蛋白质氧化无关。

[0692] 实例6:三元复合物形成的天然质谱法分析

[0693] 在配有纳米电喷雾电离源(Advion TriVersa NanoMate)的Thermo QE UHMR上进行天然质谱法实验。首先将重组OTUB1缓冲液交换到pH 6.7的150mM乙酸铵、100μM $MgCl_2$和100μM ATP中。然后将4μM OTUB1与DMSO、DUB募集因子化合物100(100μM)或DUBTAc化合物200(100μM)在室温预孵育24小时。24小时后,将4μM CFTR(在相同的缓冲液中)添加到OTUB1溶液中,使用DMSO或50μM化合物使每种蛋白质的最终浓度为2μM。然后在质谱仪上分析之前,将溶液孵育30分钟。将质谱以正离子模式记录,质量范围为1000-8000m/z。然后对每个谱进行去卷积,并对相关峰进行积分,以确定形成的三元复合物%。所有实验一式三份进行。

[0694] 实例7:人支气管上皮细胞的跨上皮电导测定

[0695] 将来自携带DF508-CFTR突变的囊性纤维化(CF)患者的人支气管上皮细胞(HBEC)在37℃和5% CO_2、在具有SingleQuots补充物和生长因子(龙沙集团(Lonza),#CC-3170)的支气管上皮细胞生长基础培养基(BEGM)中培养。将细胞在细胞培养烧瓶(康宁公司(Corning),#430641U)中保持一周,每两到三天更换培养基。将细胞用杜氏磷酸盐缓冲盐水(赛默飞世尔科技公司,#14040141)洗涤,用0.05%胰蛋白酶-EDTA(赛默飞世尔科技公司,#25300120)胰蛋白酶化5至10分钟,之后添加胰蛋白酶中和溶液(TNS,赛默飞世尔科技公司,#R002100)。将细胞以300x g沉淀5分钟,并在具有杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle medium,DMEM,赛默飞世尔科技公司,#11965092)的BEGM中重悬,并以每板一百万个细胞的密度铺在24孔transwell板(康宁公司,#3526)上。将细胞在含有DMEM的BEGM中浸没生长一周,每两到三天更换培养基,此时将细胞带到气液界面(ALI),并再生长两周,然后备用。

[0696] 在实验前24小时,用DMSO媒介物、10μM鲁马卡托或10μM DUBTAC处理细胞。然后将细胞浸没在pH 7.4的含20mM HEPES(赛默飞世尔科技公司,#15630080)的Ham's F12缓冲液(赛默飞世尔科技公司,#21700075)中,并安装到测定系统中。使用24通道跨上皮电流钳放大器(TECC-24,EP Design,比利时贝尔特姆(Bertem,Belgium))记录跨上皮电阻。以大约六

分钟的间隔进行电阻测量。取四个值来确定基线电阻,并在以下每次添加后取另外四个测量值:10μM阿米洛利(Amiloride)(密理博西格玛公司,#A7410)在顶部添加,20μM佛司可林(Forskolin)(密理博西格玛公司,#F6886)在顶部添加,和0.5μM依伐卡托(在顶部和基底外侧均添加)。然后添加CFTR抑制剂172(密理博西格玛公司,#219672),进行最后六次测量。根据电阻测量值计算跨上皮电导(G)(G=1/R)。氯离子穿过上皮单层的转运是由CFTR介导的,因此功能性CFTR的激活或抑制引起跨上皮电导的变化。这样,ΔG可用于测量功能性CFTR表达和通过化合物添加对CFTR的功能性挽救。

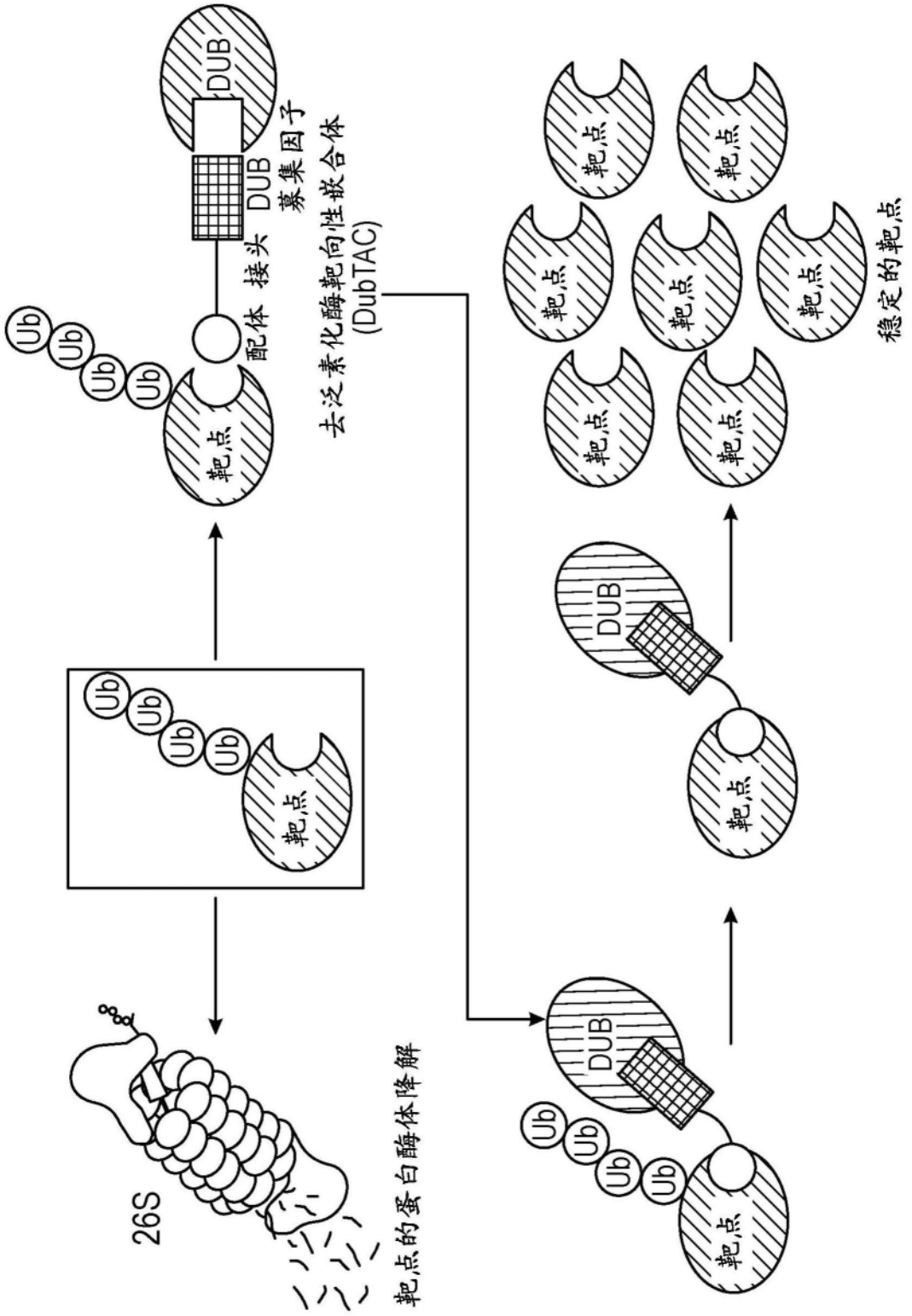

DUB
募集因子
DUB
接头
配体
Ub
Ub
Ub
Ub
靶点
去泛素化酶靶向性嵌合体
(DubTAC)
靶点
靶点
靶点
靶点
靶点
靶点
稳定的靶点
DUB
靶点
Ub
Ub
Ub
Ub
靶点
DUB
Ub
Ub
Ub
Ub
靶点
26S
靶点的蛋白酶体降解

图1

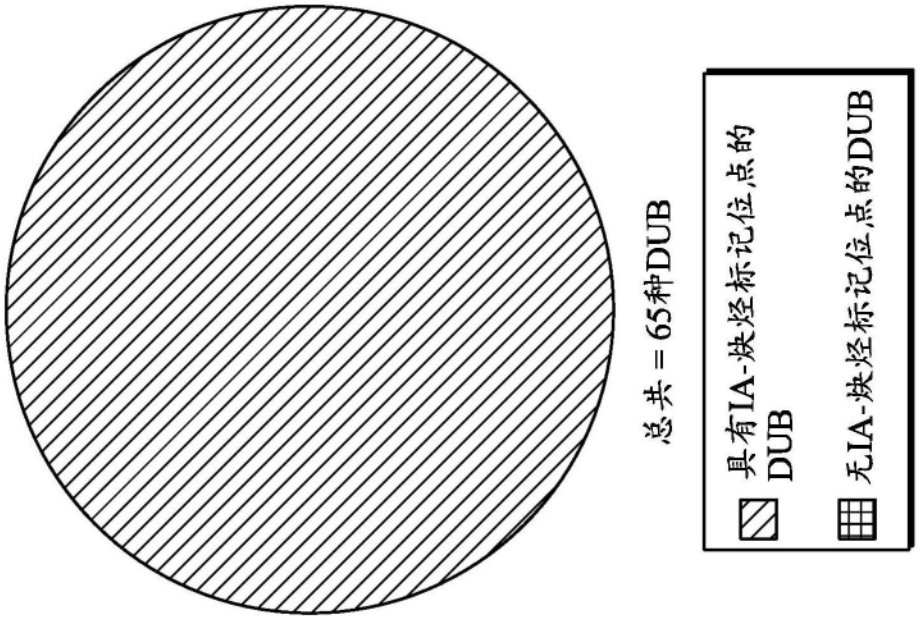

总共 = 65种DUB
具有IA-炔烃标记位点的DUB
无IA-炔烃标记位点的DUB

图2A

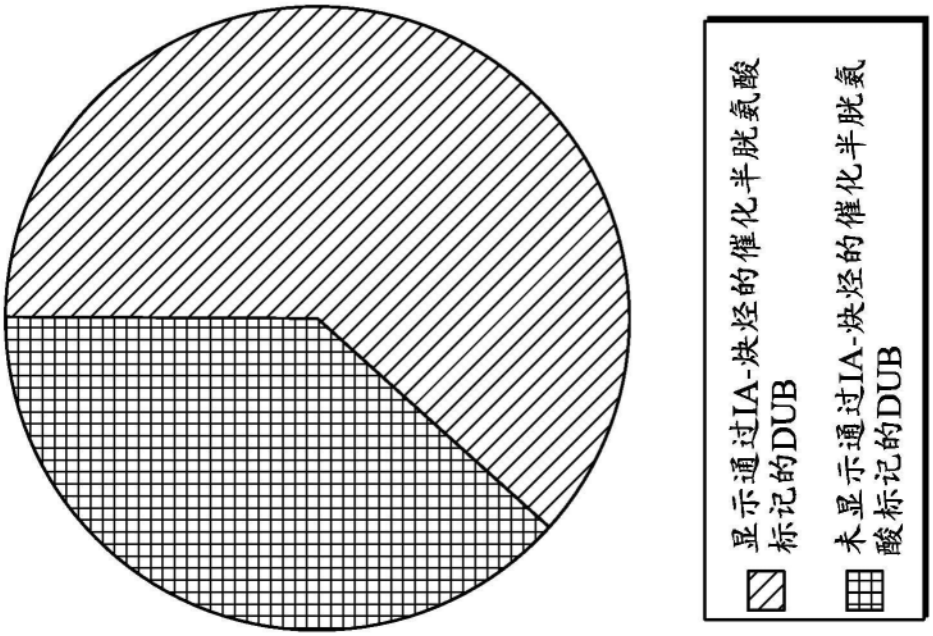

显示通过IA-炔烃的催化半胱氨酸标记的DUB
未显示通过IA-炔烃的催化半胱氨酸标记的DUB

图2B

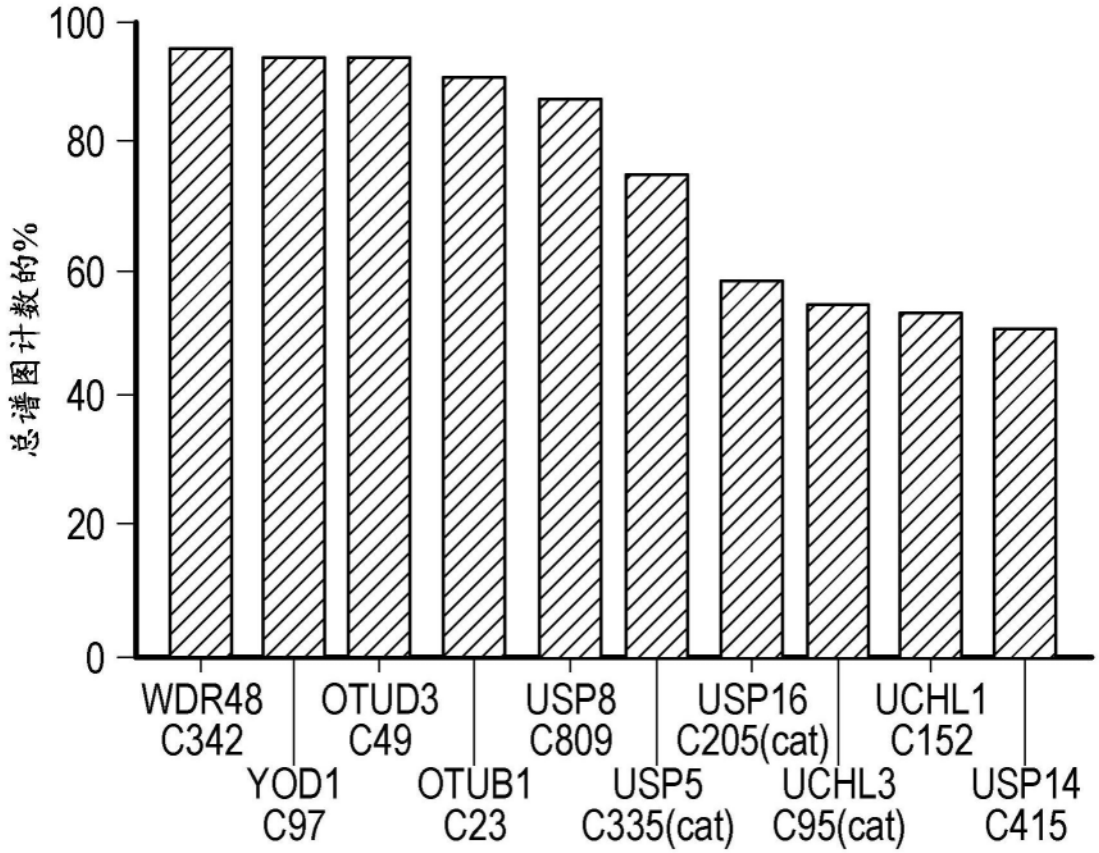

总谱图计数的%
100
80
60
40
20
0
WDR48 C342
YOD1 C97
OTUD3 C49
OTUB1 C23
USP8 C809
USP5 C335(cat)
USP16 C205(cat)
UCHL3 C95(cat)
UCHL1 C152
USP14 C415

图3A

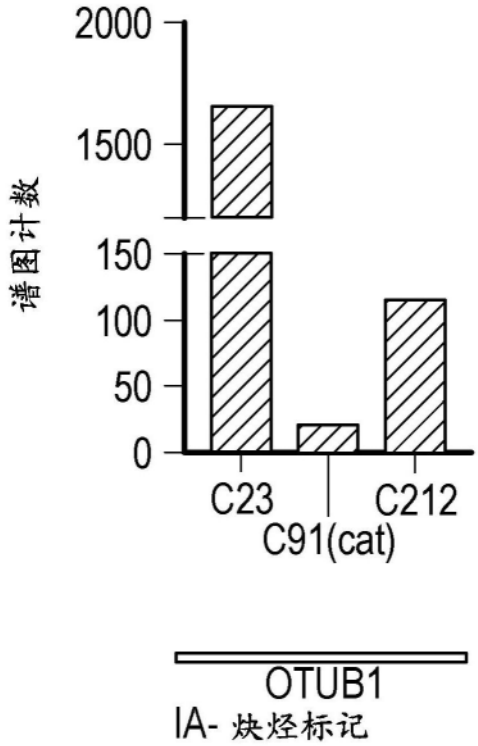

2000
1500
150
100
50
0
谱图计数
C23
C212
C91(cat)
OTUB1
IA- 炔烃标记

图3B

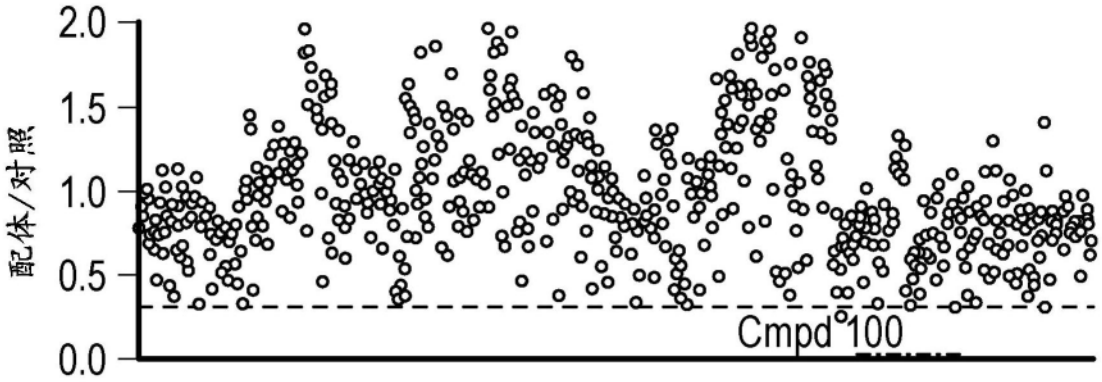

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
配体/对照
Cmpd 100

图4

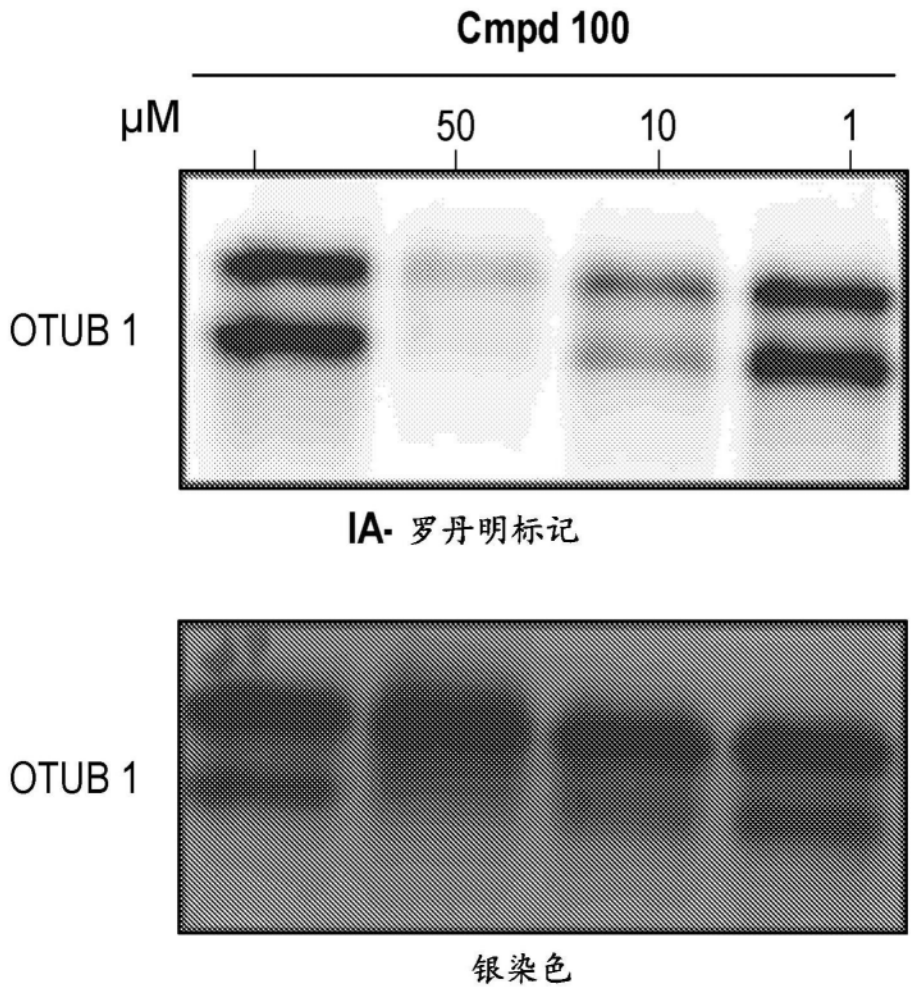


图5

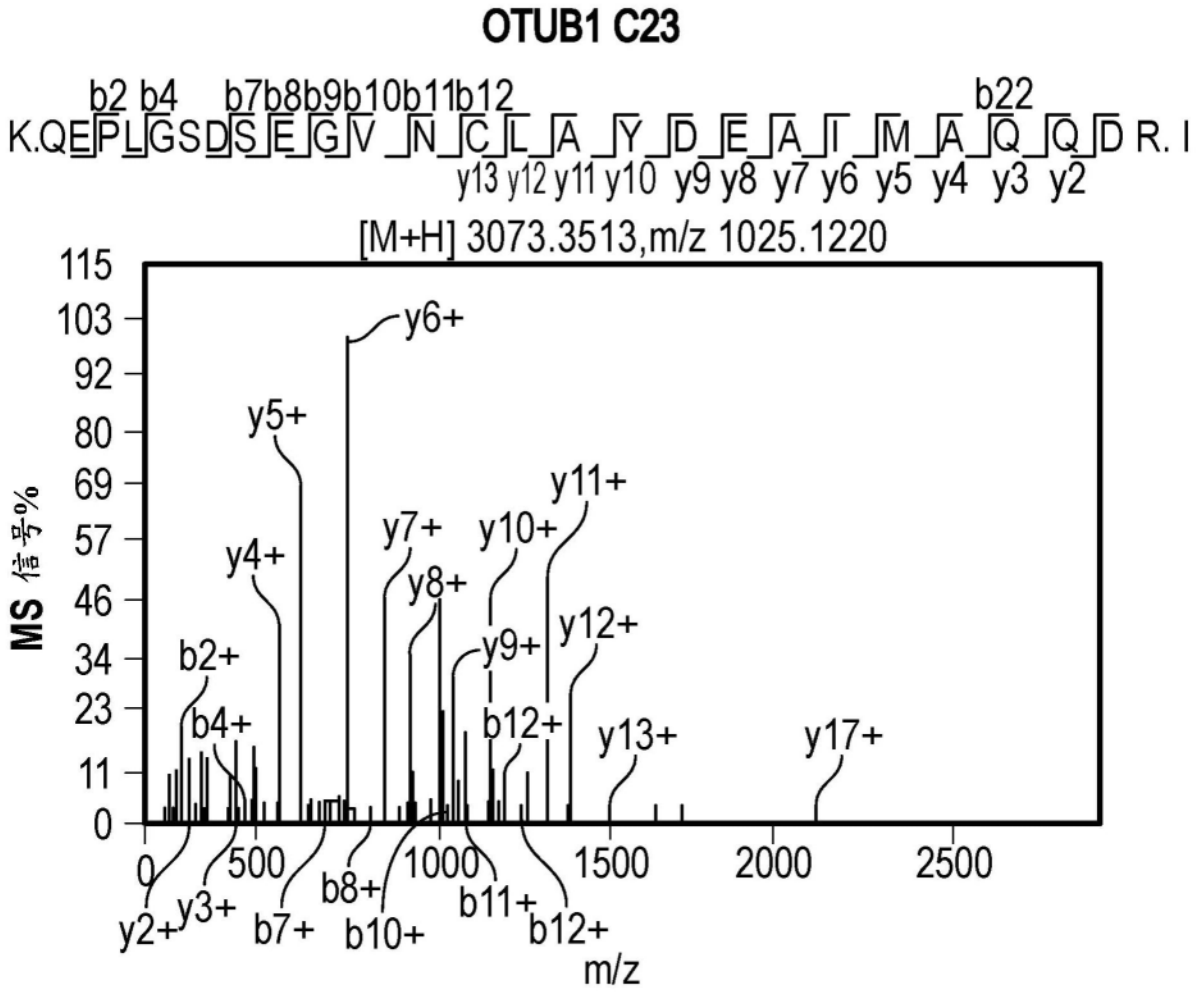

OTUB1 C23
b2 b4 b7b8b9b10b11b12 b22
K.QEPLGSDSEGV_N_C_L_A_Y_D_E_A_I_M_A_Q_Q_D R. I
y13 y12 y11 y10 y9 y8 y7 y6 y5 y4 y3 y2
[M+H] 3073.3513,m/z 1025.1220
MS 信号%
115
103
92
80
69
57
46
34
23
11
0
y6+
y5+
y11+
y7+
y10+
y4+
y8+
y12+
y9+
b2+
b4+
b12+
y13+
y17+
0
500
1000
1500
2000
2500
y2+
y3+
b7+
b8+
b10+
b11+
b12+
m/z

图6

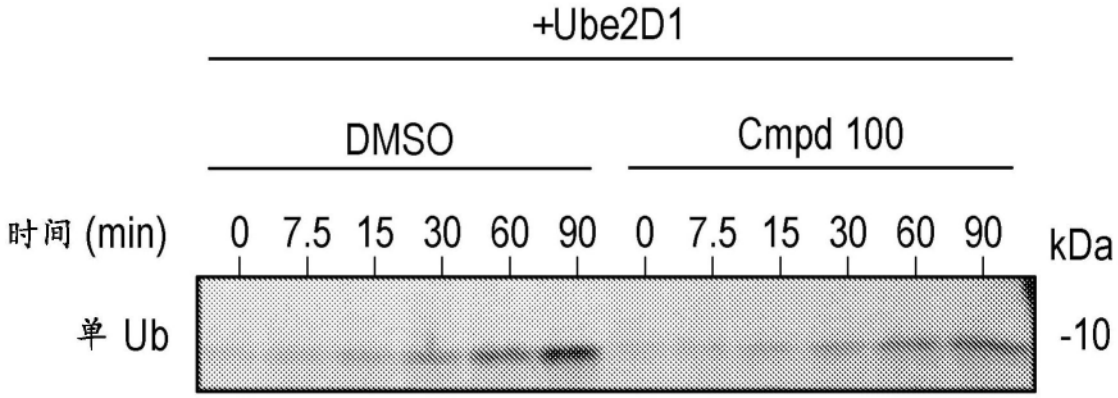

+Ube2D1
DMSO
Cmpd 100
时间 (min)
0 7.5 15 30 60 90 0 7.5 15 30 60 90
kDa
单 Ub
-10

图7

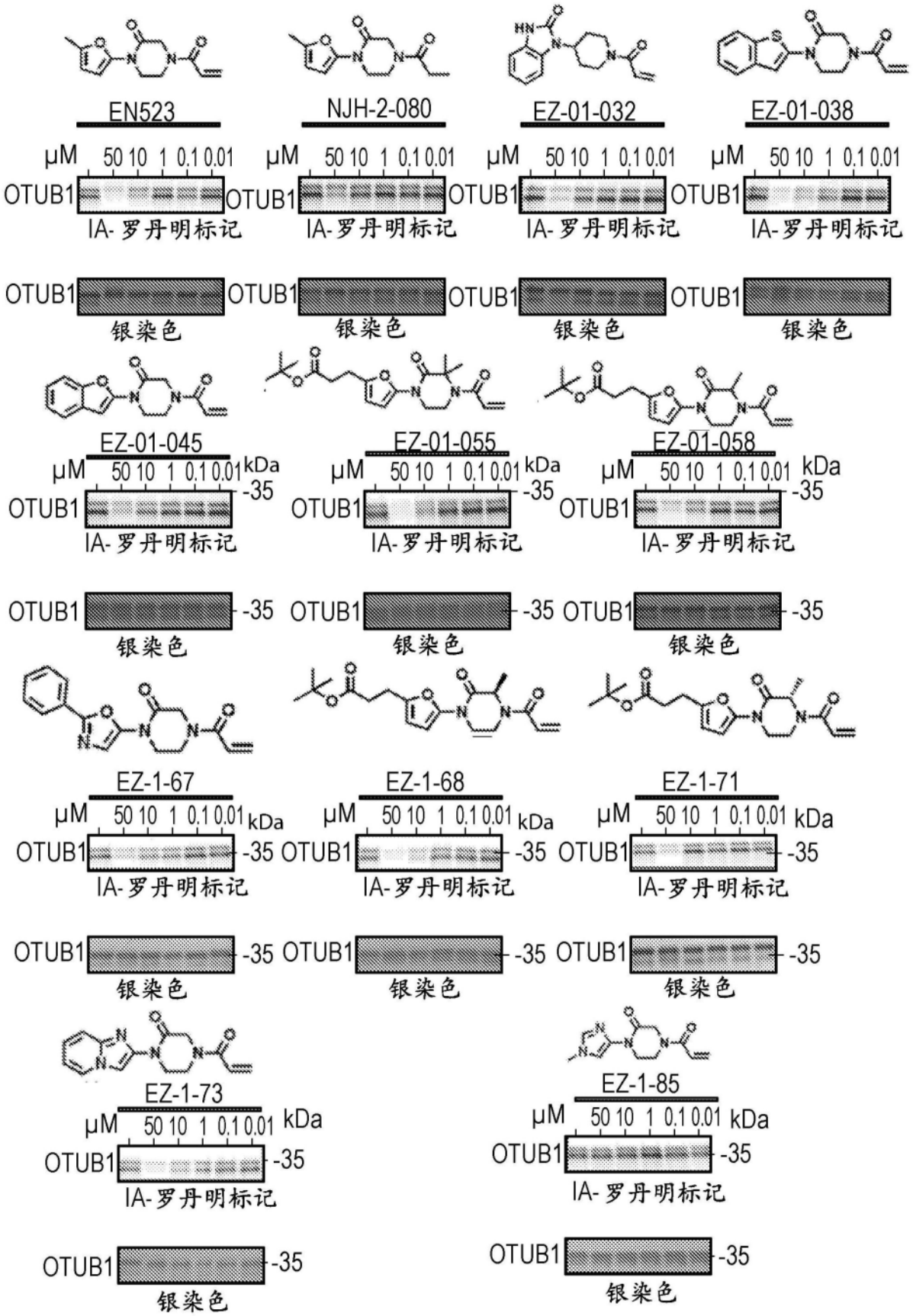

EN523
NJH-2-080
EZ-01-032
EZ-01-038
μM 50 10 1 0.1 0.01
OTUB1
IA-罗丹明标记
银染色
EZ-01-045
EZ-01-055
EZ-01-058
kDa
-35
EZ-1-67
EZ-1-68
EZ-1-71
EZ-1-73
EZ-1-85

图8

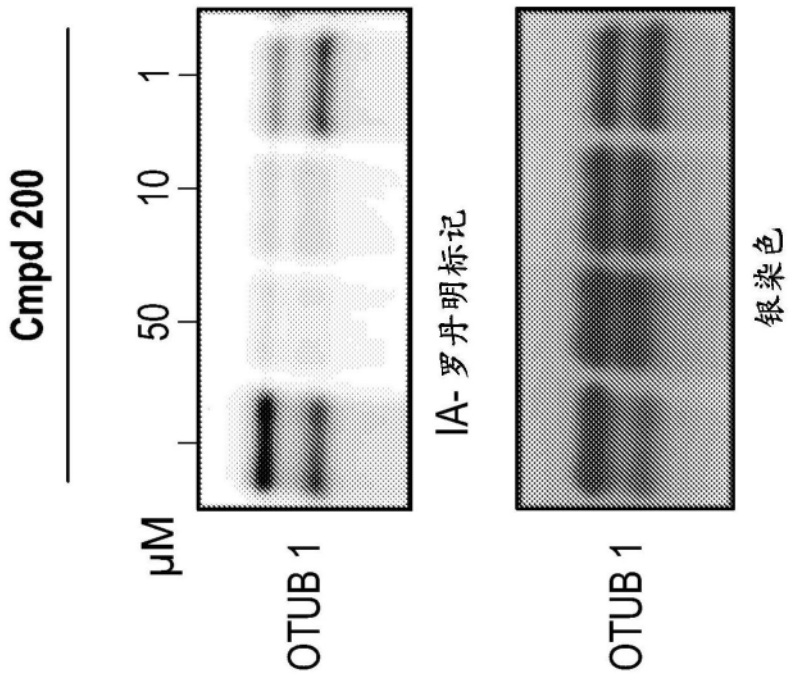

Cmpd 200
μM
50
10
1
OTUB 1
IA- 罗丹明标记
OTUB 1
银染色

图9A

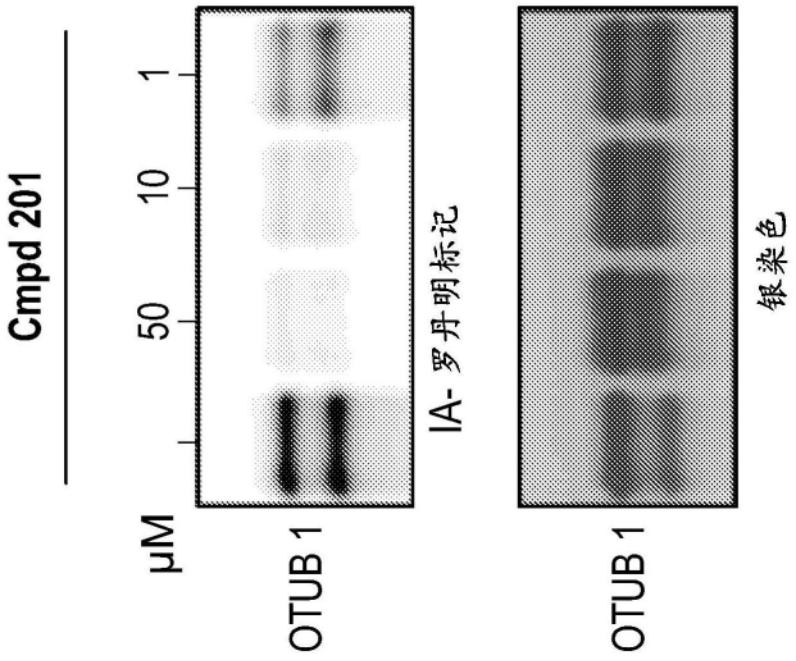

Cmpd 201
μM
50
10
1
OTUB 1
IA- 罗丹明标记
OTUB 1
银染色

图9B

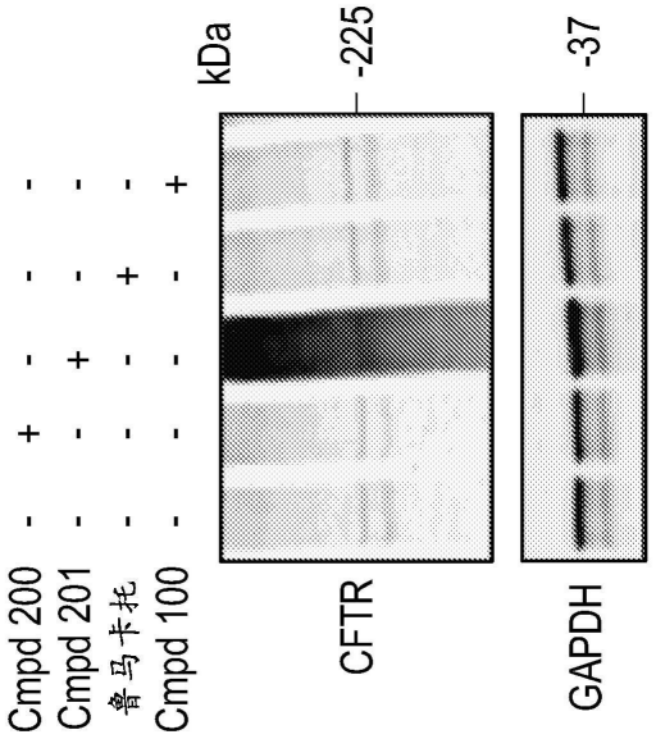

kDa
-225
-37
Cmpd 200
Cmpd 201
鲁马卡托
Cmpd 100
CFTR
GAPDH

图10A

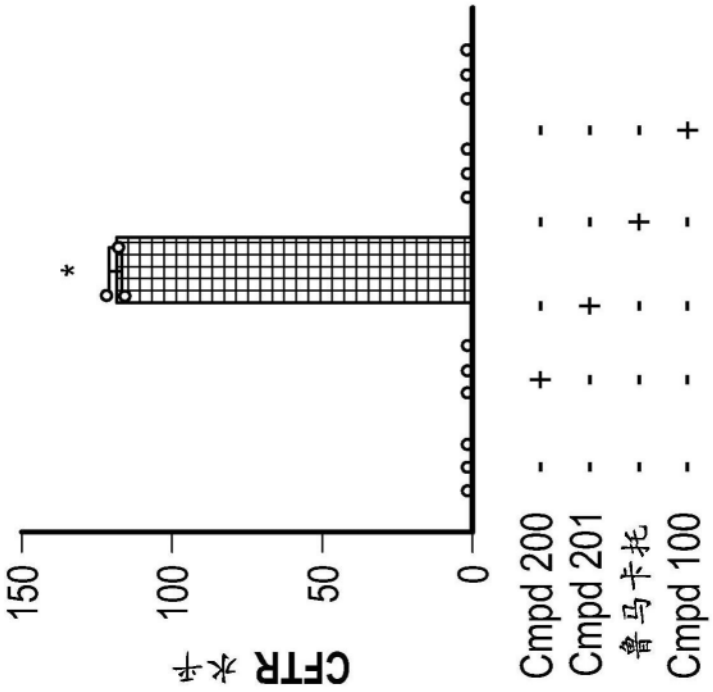

150
100
50
0
CFTR 水平
*
Cmpd 200
Cmpd 201
鲁马卡托
Cmpd 100

图10B

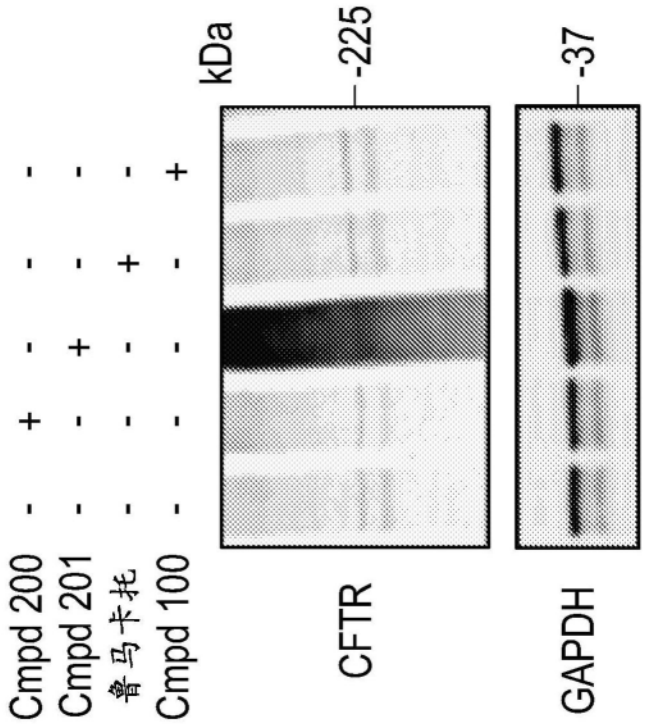

kDa
-225
-37
Cmpd 200
Cmpd 201
鲁马卡托
Cmpd 100
CFTR
GAPDH

图11A

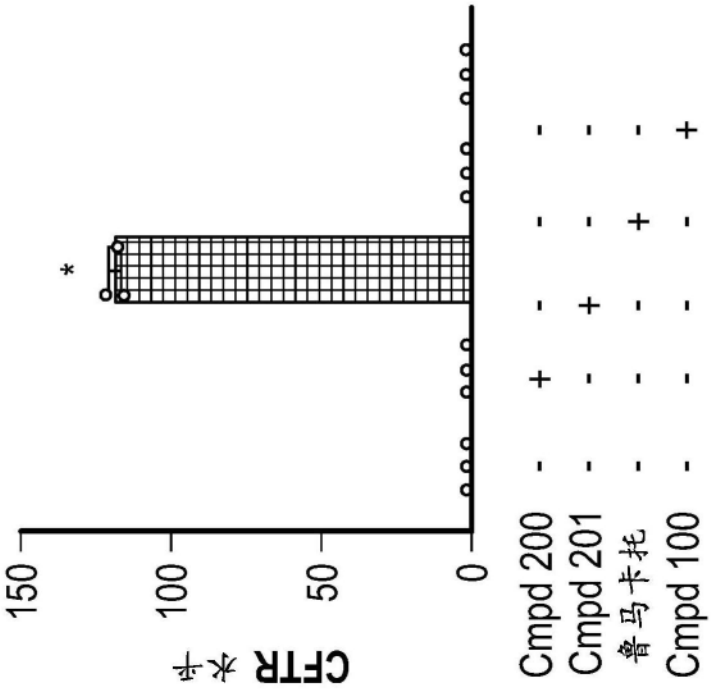

150
100
50
0
CFTR 水平
*
Cmpd 200
Cmpd 201
鲁马卡托
Cmpd 100

图11B

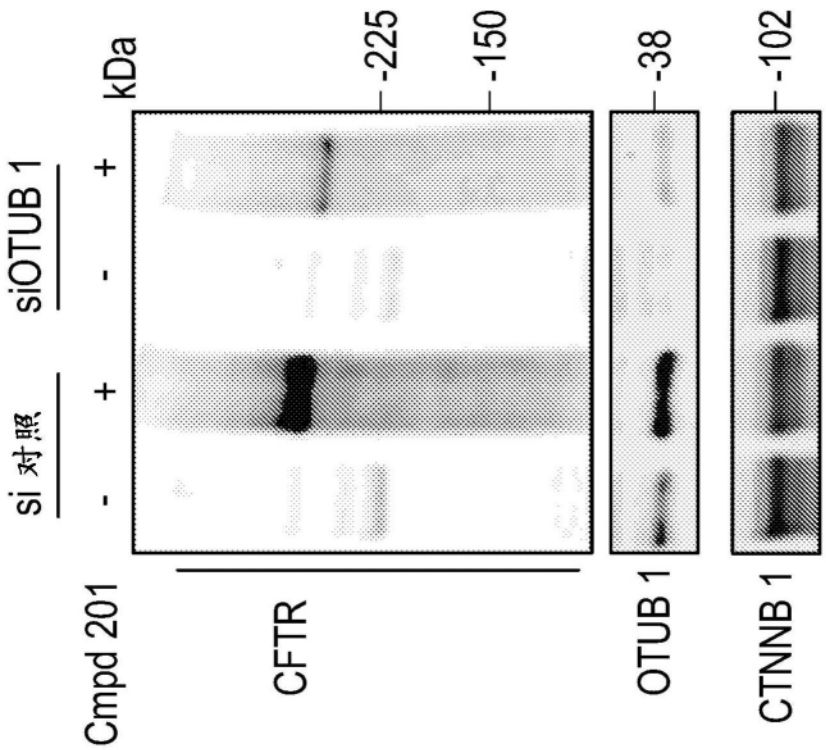

kDa
-225
-150
-38
-102
siOTUB 1
si 对照
Cmpd 201
CFTR
OTUB 1
CTNNB 1

图12A

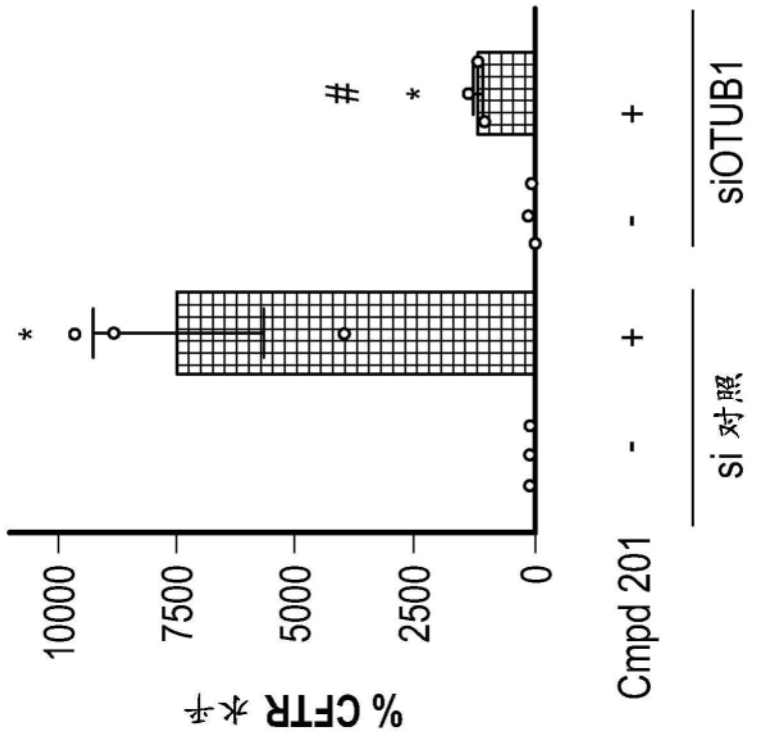

% CFTR
10000
7500
5000
2500
0
Cmpd 201
si 对照
siOTUB1

图12B

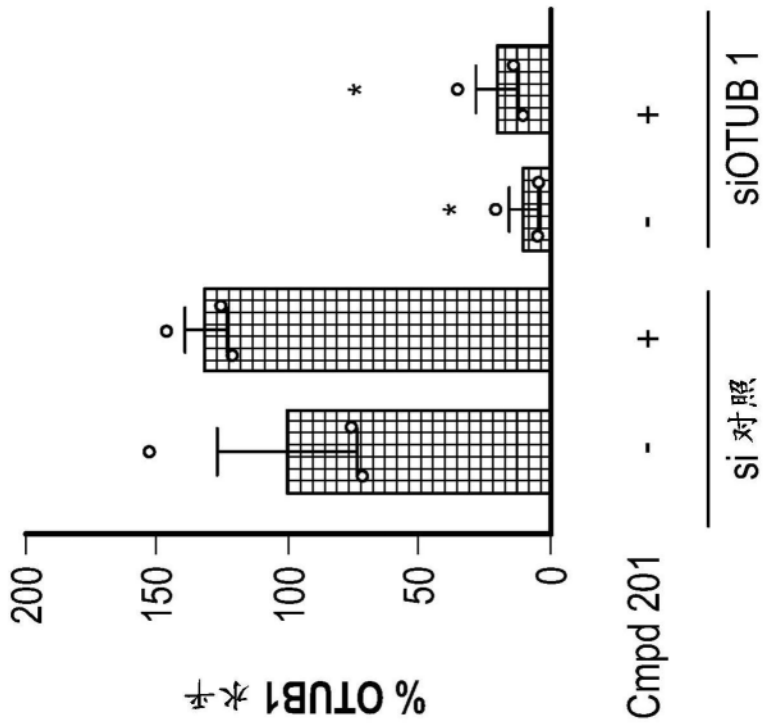

% OTUB1 水平
200
150
100
50
0
Cmpd 201
-
+
+
si 对照
-
-
+
siOTUB 1
*
*

图12C

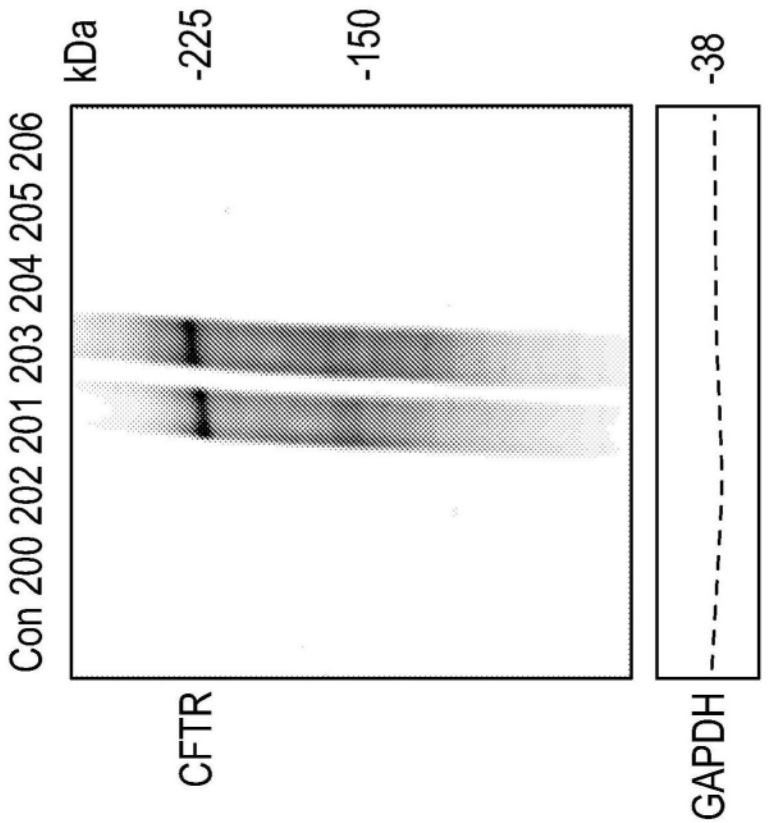

kDa
-225
-150
-38
Con 200 202 201 203 204 205 206
CFTR
GAPDH

图13

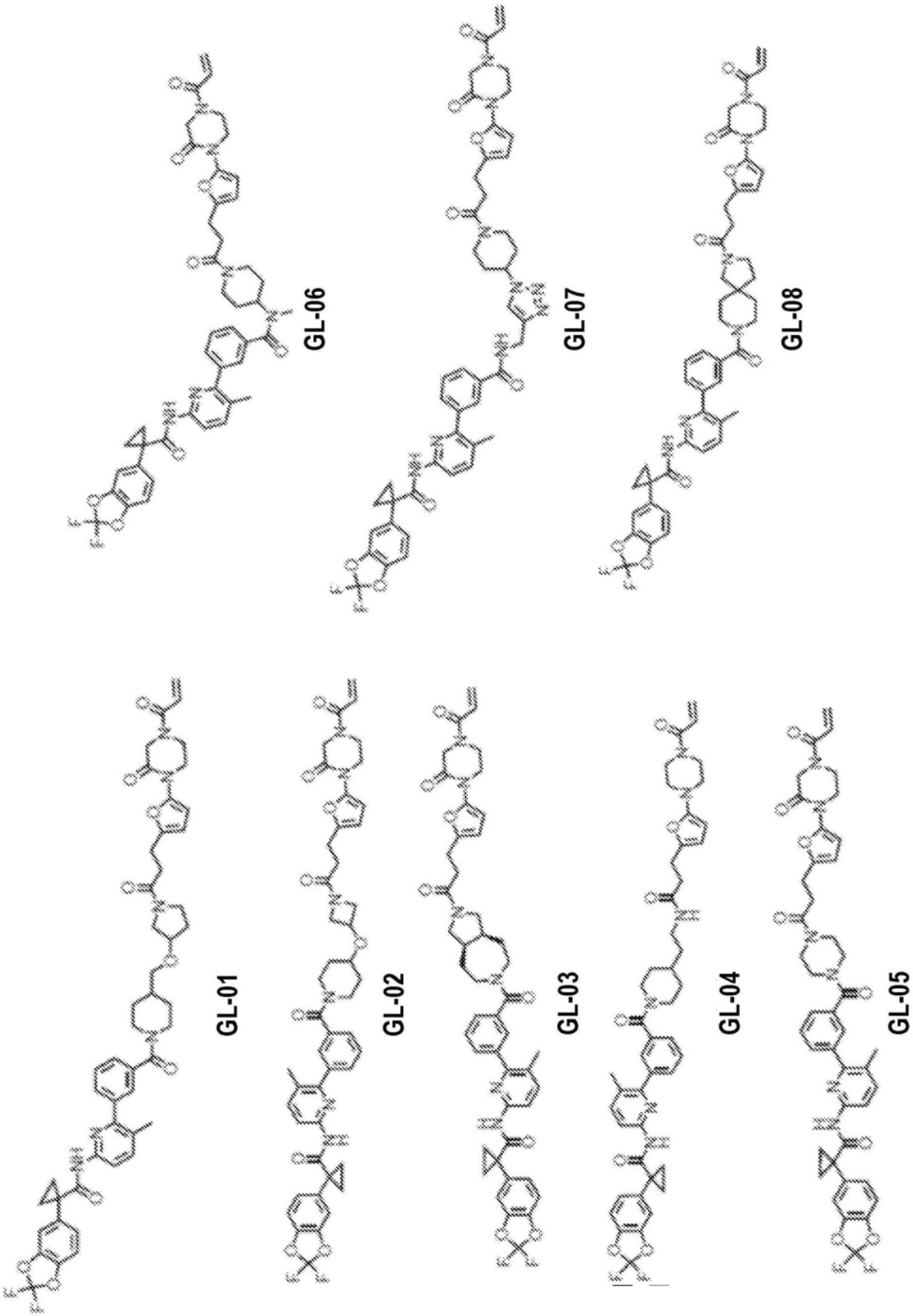


图14A

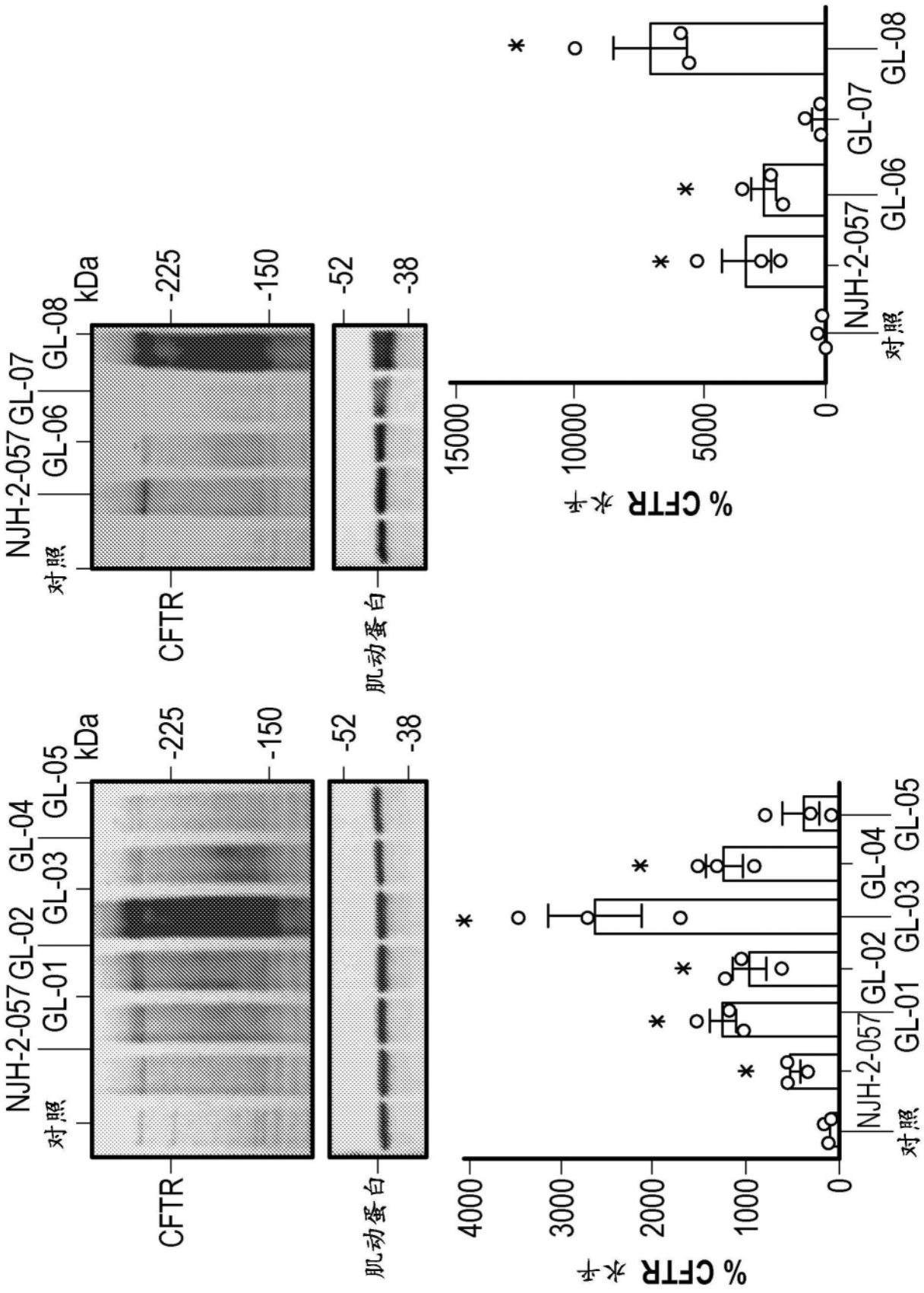

kDa
-225
-150
-52
-38
CFTR
肌动蛋白
对照
NJH-2-057
GL-01
GL-02
GL-03
GL-04
GL-05
GL-06
GL-07
GL-08
% CFTR 水平
0
1000
2000
3000
4000
5000
10000
15000

图14B

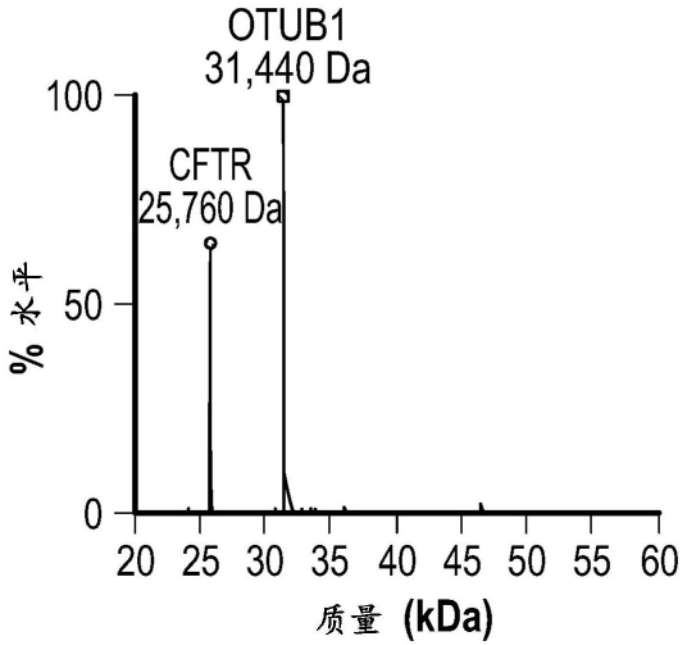

OTUB1
31,440 Da
CFTR
25,760 Da
100
50
0
% 水平
20 25 30 35 40 45 50 55 60
质量 (kDa)

图15A

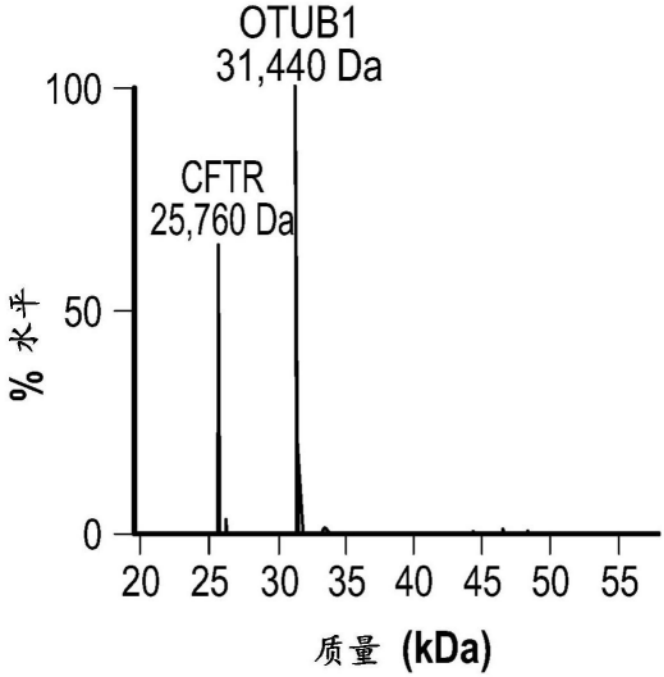

OTUB1
31,440 Da
CFTR
25,760 Da
100
50
0
% 水平
20 25 30 35 40 45 50 55
质量 (kDa)

图15B

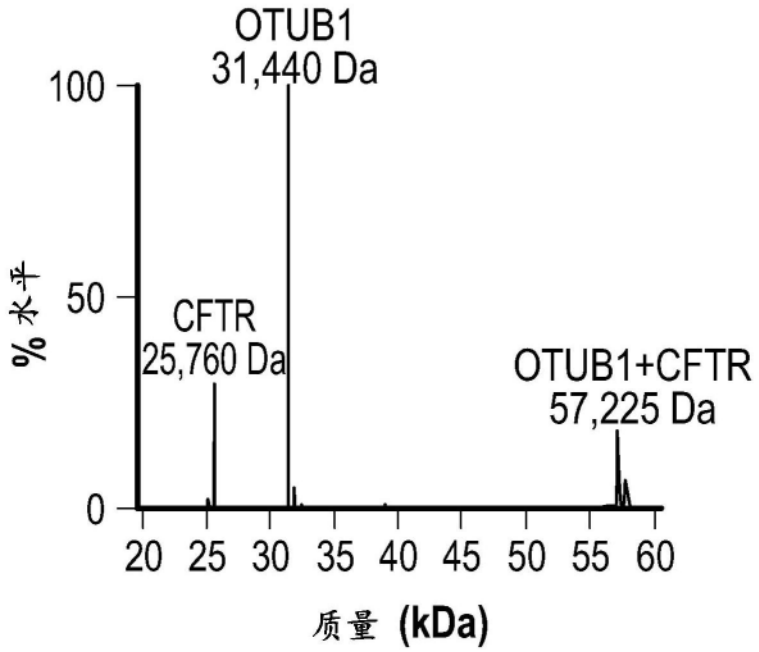

OTUB1
31,440 Da
100
50
0
% 水平
CFTR
25,760 Da
OTUB1+CFTR
57,225 Da
20 25 30 35 40 45 50 55 60
质量 (kDa)

图15C

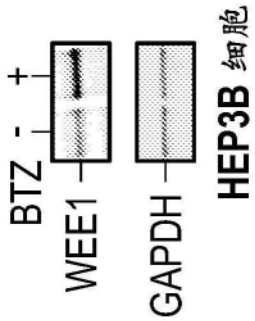

BTZ - +
WEE1
GAPDH
HEP3B 细胞

图16A

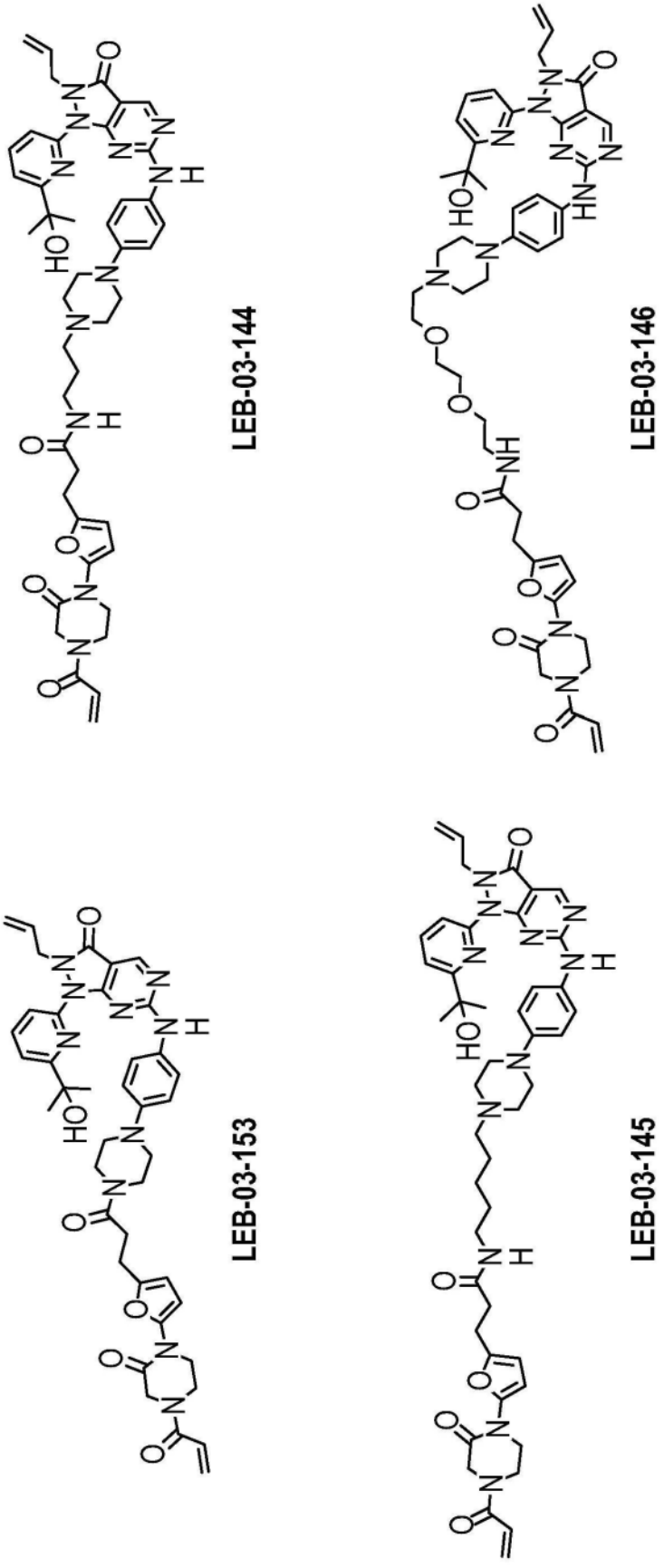


图16B

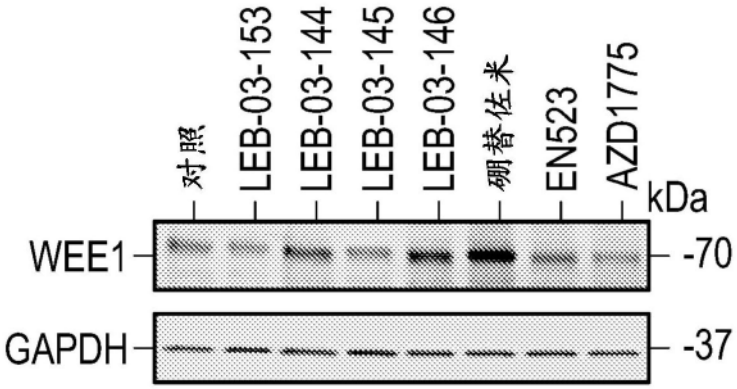

对照
LEB-03-153
LEB-03-144
LEB-03-145
LEB-03-146
硼替佐米
EN523
AZD1775
kDa
WEE1
-70
GAPDH
-37

图16C

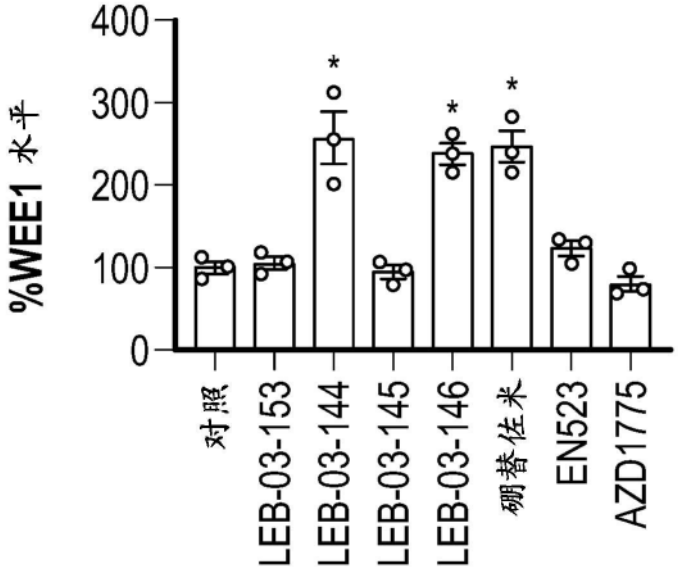

%WEE1 水平
400
300
200
100
0
*
*
*
对照
LEB-03-153
LEB-03-144
LEB-03-145
LEB-03-146
硼替佐米
EN523
AZD1775

图16D

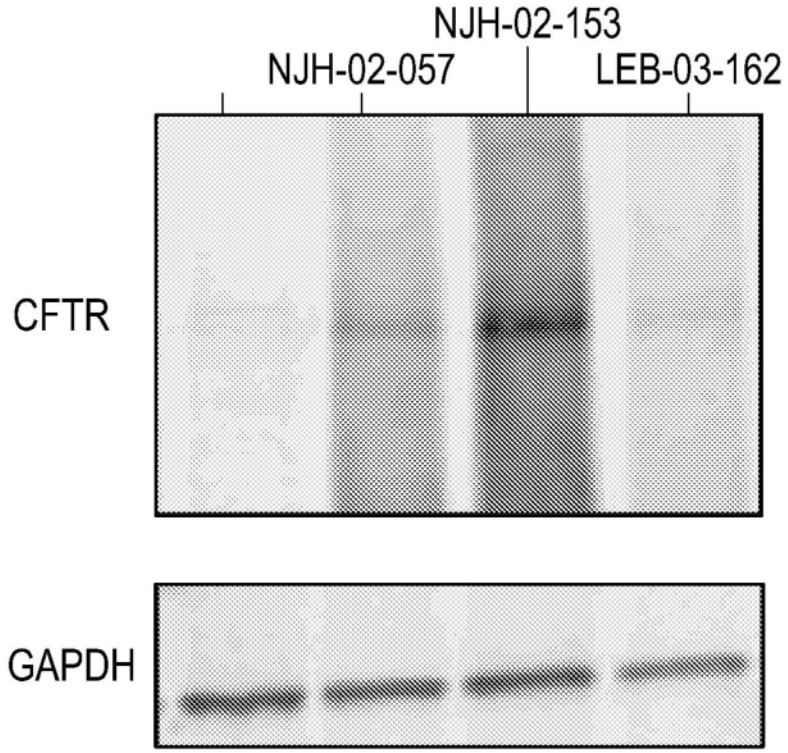

NJH-02-153
NJH-02-057
LEB-03-162
CFTR
GAPDH

图17

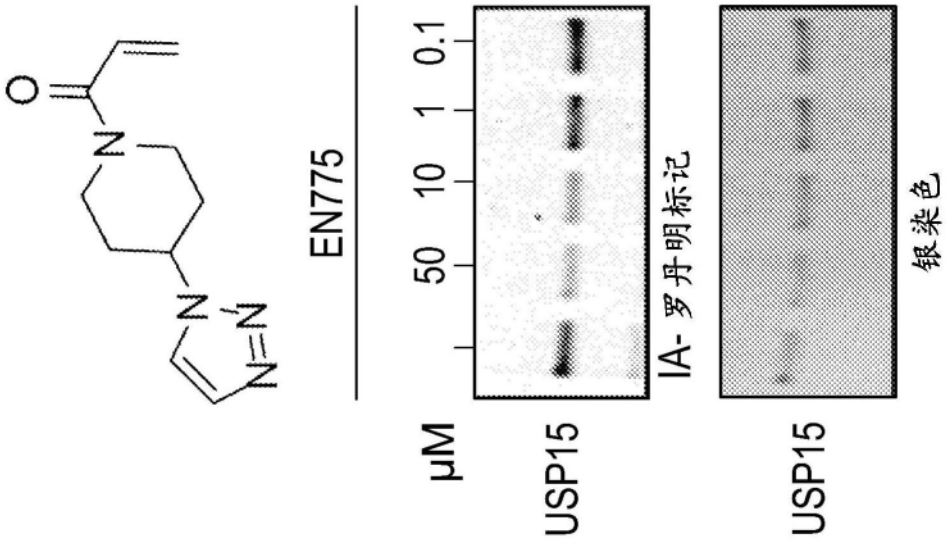

O
N
N
N=N
EN775
50
10
1
0.1
μM
USP15
IA-罗丹明标记
USP15
银染色

图18A

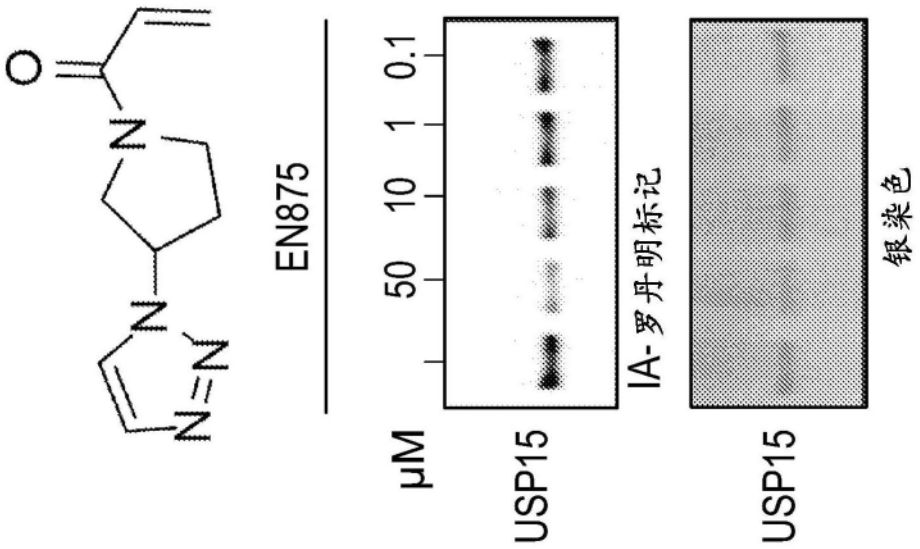

O
N
N
N
N
EN875
0.1
1
10
50
μM
USP15
IA-罗丹明标记
USP15
银染色

图18B

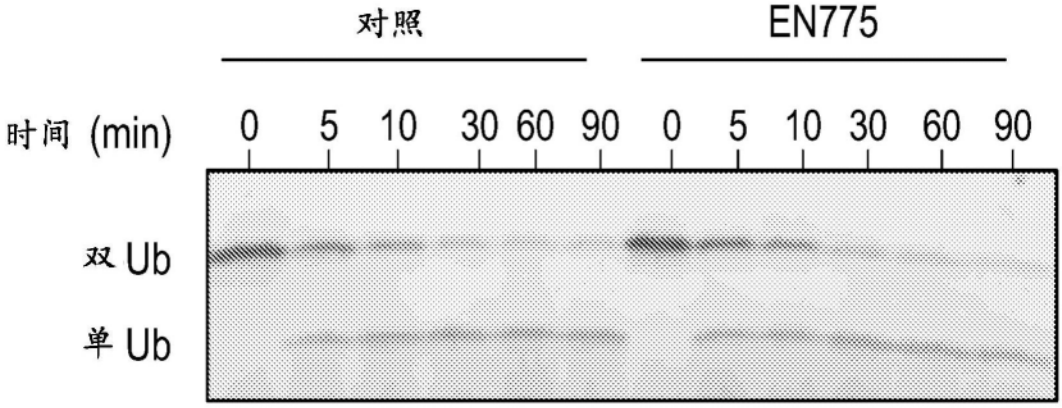

对照
EN775
时间 (min)
0 5 10 30 60 90 0 5 10 30 60 90
双 Ub
单 Ub

图18C

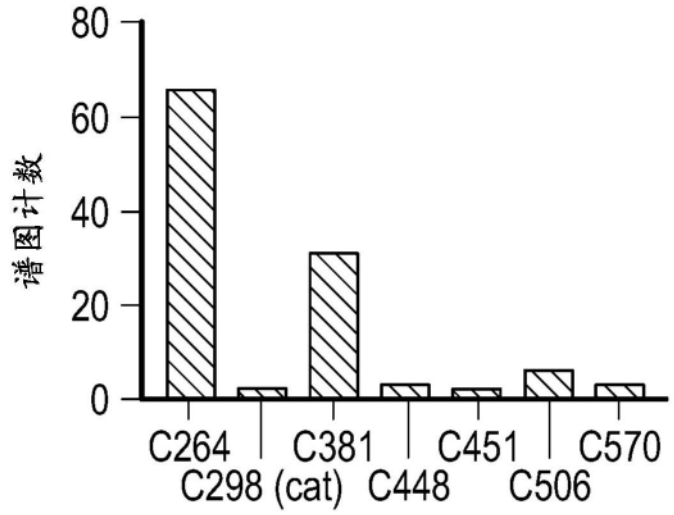

80
60
40
20
0
谱图计数
C264
C298 (cat)
C381
C448
C451
C506
C570

图18D

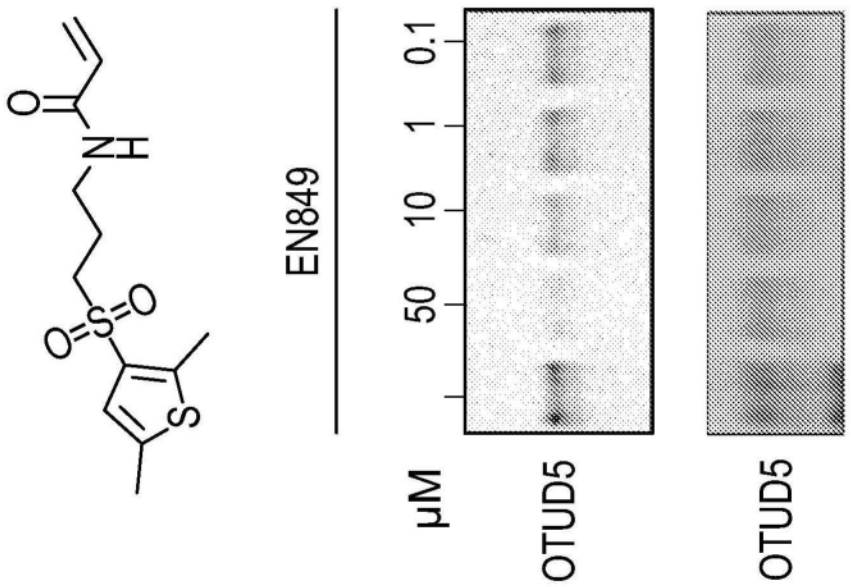

O
N
H
O
S
O
S
EN849
0.1
1
10
50
μM
OTUD5
OTUD5

图19A

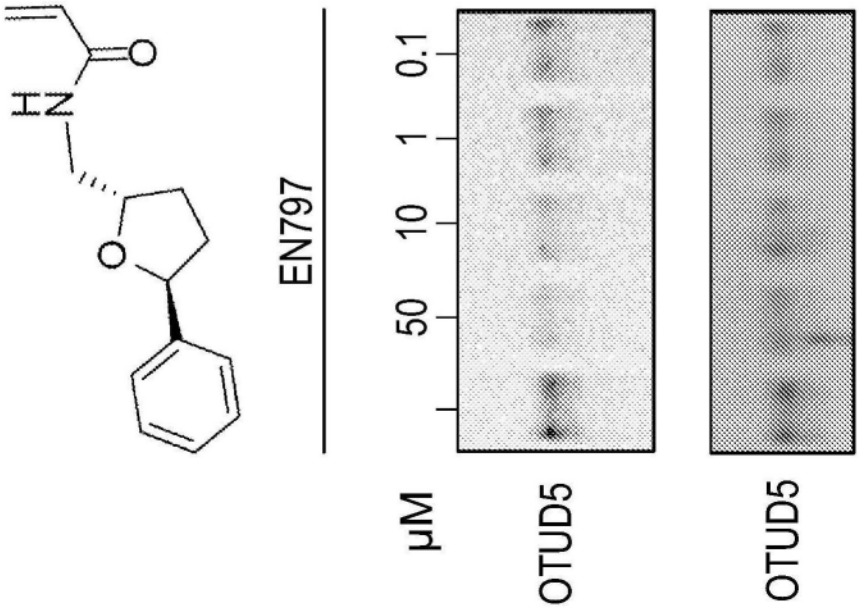


图19B