



(21) 申请号 201980079494.8
(22) 申请日 2019.10.09
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113164495 A

(43) 申请公布日 2021.07.23
(30) 优先权数据
62/743,337 2018.10.09 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/055461 2019.10.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/076996 EN 2020.04.16

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 诺瓦蒂什股份公司

(72) 发明人 J·斯普拉德林 C·C·沃德
D·K·野村 M·席尔勒
J·A·塔拉里科 J·麦肯纳
T·J·马伊莫内 胡曦睿

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
专利代理师 张晓威

(51) Int.Cl.
A61K 31/5517 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 495/14 (2006.01)
(56) 对比文件
US 2018228907 A1,2018.08.16
HÄKLI M ET AL.Transcriptional
coregulator SNURF (RNF4)possesses
ubiquitin E3 ligase activity.《 FEBS
LETTERS,ELSEVIER,AMSTERDAM,NL》.2004,第560
卷摘要.

LIN BOREN ET AL,.Negative regulation
of the RLH signaling by the E3 ubiquitin
ligase RNF114.《CYTOKINE 》.2017,第99 卷摘
要.

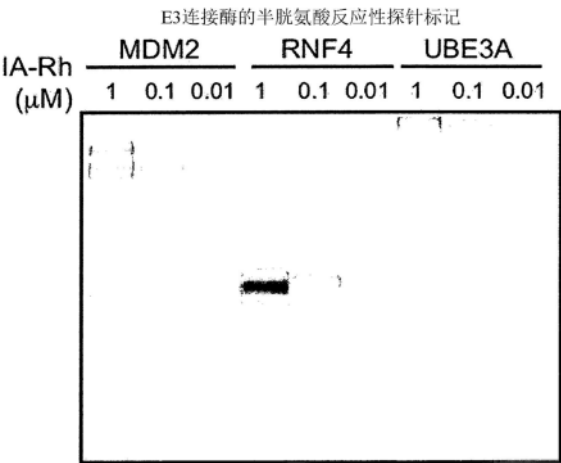
BING ZHOU ET AL.Discovery of a Small-
Molecule Degradar ofBromodomain and
Extra-Terminal (BET)Proteins with
Picomolar Cellular Potencies and Capable
of Achieving Tumor Regression.《JOURNAL OF
MEDICINAL CHEMISTRY 》.2017,第61卷摘要、结
果与讨论比分、fig1-9.

审查员 汤艳星

权利要求书12页 说明书258页
序列表10页 附图61页

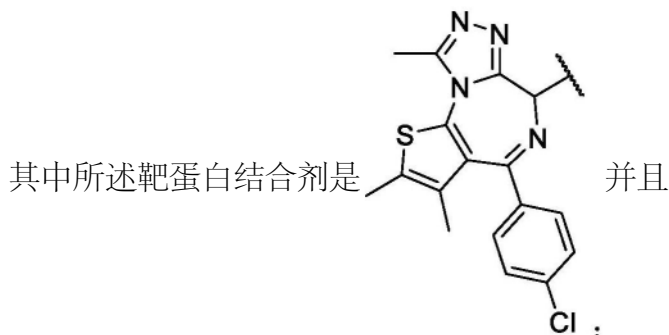
(54) 发明名称
E3连接酶的共价靶向

(57) 摘要
本文尤其公开了用于靶向E3连接酶的组合
物和方法。在一个方面是一种靶蛋白降解剂,其
包含1) 靶蛋白结合剂和2) E3泛素连接酶结合剂,
其中所述E3泛素连接酶是人RNF4或人RNF114。在
一个方面,提供了一种药物组合物,其包含如本
文所述的化合物,包含实施例,以及药学上可接
受的赋形剂。

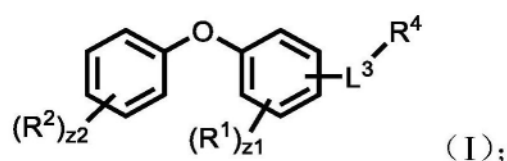


1. 一种靶蛋白降解剂,其包括1) 靶蛋白结合剂和2) E3泛素连接酶结合剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4或人RNF114;

其中所述靶蛋白结合剂和E3泛素连接酶结合剂通过结合剂接头共价键合;



其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



其中

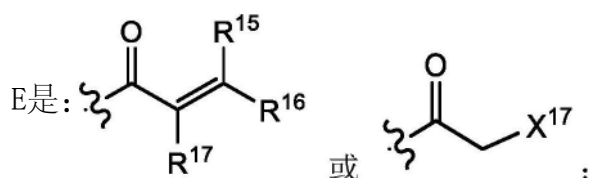
R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基或与结合剂接头相连的键;

L^3 为 $-N(R^3)-$ 或 $-N(H)-$;

R^3 为经取代或未经取代的烷基;

R^4 为E;



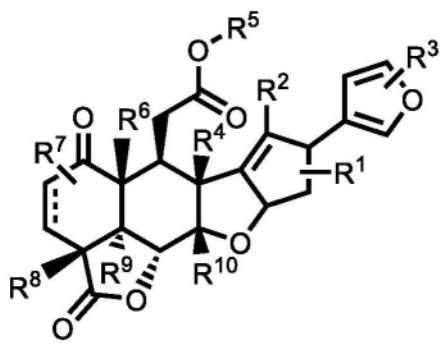
R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地是氢或未经取代的烷基; X^{17} 是卤素;

z_1 为0到4的整数;

z_2 为0到5的整数;

或者

其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立地为氢或未经取代的烷基；

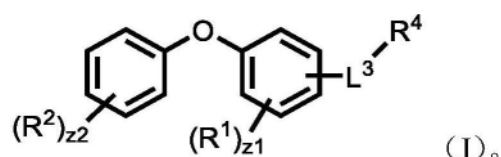
R^3 为与结合剂接头相连的键；并且

||为单键或双键。

2. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其中所述E3泛素连接酶结合剂能够与E3泛素连接酶的半胱氨酸形成共价键。

3. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

4. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



5. 根据权利要求4所述的靶蛋白降解剂，

其中

R^3 为经 R^{31} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基；

R^{31} 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、经 R^{32} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、或经 R^{32} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基；并且

R^{32} 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基或未经取代的2元到8元杂烷基。

6. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂，其中 R^2 独立地为卤素、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的 C_1 - C_3 烷基、未经取代的2元到3元杂烷基或与结合剂接头相连的键。

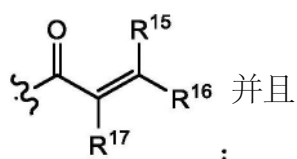
7. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂，其中 z_2 为1并且 R^2 为与结合剂接头相连的键。

8. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂，其中 R^1 独立地为卤素。

9. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂，其中 z_1 为0。

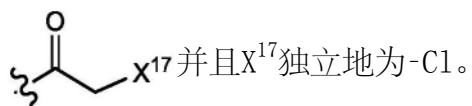
10. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂，其中 L^3 为 $-N(R^3)-$ ； R^3 为经 R^{31} -取代的甲基；并且 R^{31} 独立地为未经取代的苯基。

11. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂，其中E为

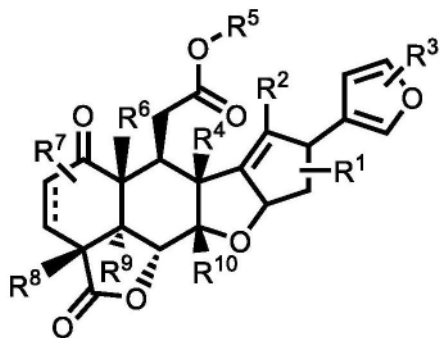


R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 为氢。

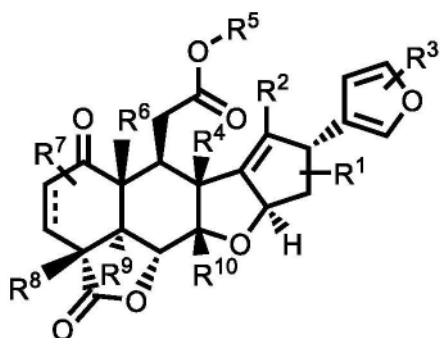
12. 根据权利要求5所述的靶蛋白降解剂, 其中E为



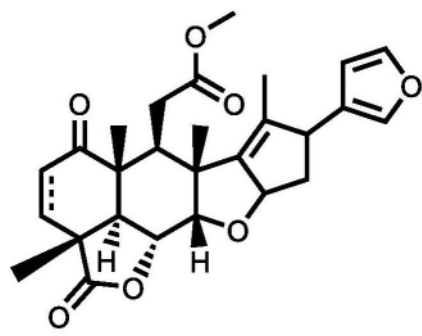
13. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



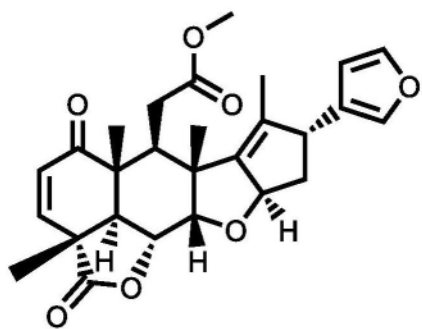
14. 根据权利要求13所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



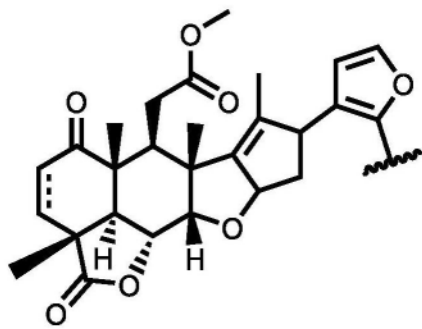
15. 根据权利要求13所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



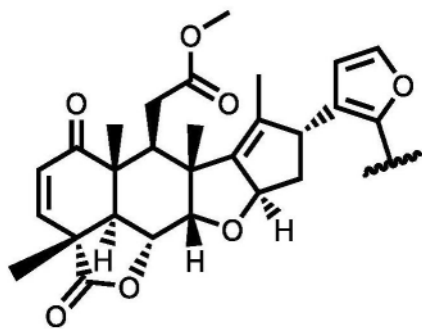
16. 根据权利要求13所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



17. 根据权利要求13所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:



18. 根据权利要求13所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:



19. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂,其中所述结合剂接头为 L^{11} - L^{12} - L^{13} - L^{14} ;
 L^{11} 直接连接到所述E3泛素连接酶结合剂;

L^{11} 为-N(R^{61})-、-C(O)-、-C(O)N(R^{61})-、-N(R^{61})C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)₂-、-S(O)-、-O-、-S-、-NHC(O)NH-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头;并且

L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、-N(R^{61})-、-C(O)-、-C(O)N(R^{61})-、-N(R^{61})C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)₂-、-S(O)-、-O-、-S-、-NHC(O)NH-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

20. 根据权利要求19所述的靶蛋白降解剂,其中

L^{11} 为-N(R^{61})-、-C(O)-、-C(O)N(R^{61})-、-N(R^{61})C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)₂-、-S(O)-、-O-、-S-、-NHC(O)NH-、经 R^{61} -取代或未经取代的

C_1 - C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂环基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头；

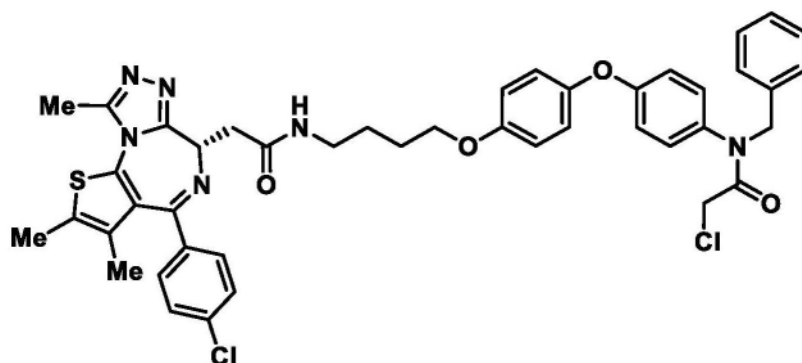
L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1 - C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂环基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头；

R^{61} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

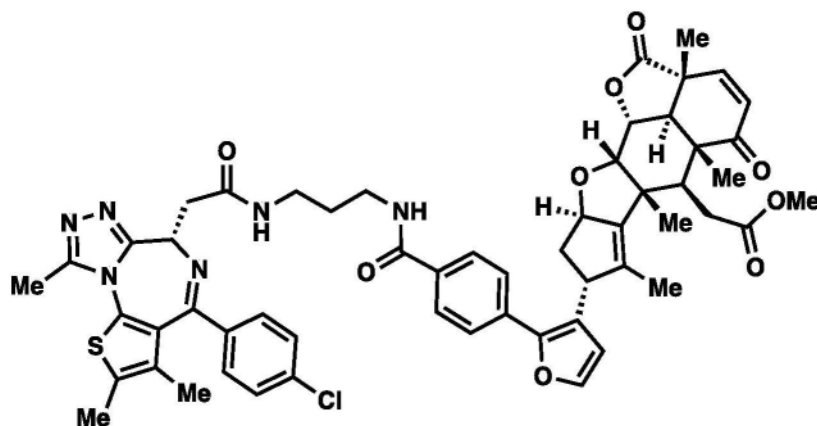
21. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其中所述靶蛋白结合剂能够结合与疾病相关的靶蛋白。

22. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其中所述靶蛋白结合剂结合BRD4。

23. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其具有下式：



24. 根据权利要求1所述的靶蛋白降解剂，其具有下式：



25. 一种药物组合物，其包括根据权利要求1到24中任一项所述的靶蛋白降解剂和药学上可接受的赋形剂。

26. 根据权利要求1到24中任一项所述的靶蛋白降解剂或其药学上可接受的盐在制备用于降低细胞蛋白水平的药物中的用途。

27. 根据权利要求26所述的用途,其进一步包括以下步骤:

- A) 使与靶蛋白降解剂接触的细胞蛋白泛素化,并由此形成泛素化的细胞蛋白;
- B) 使泛素化的细胞蛋白与蛋白酶体接触,并由此形成泛素化的细胞蛋白-蛋白酶体复合物;以及
- C) 通过蛋白酶体对细胞蛋白进行蛋白水解。

28. 根据权利要求26所述的用途,其中所述E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价结合E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

30. 根据权利要求28所述的用途,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C132。

32. 根据权利要求30所述的用途,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C135。

33. 根据权利要求28所述的用途,其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述半胱氨酸残基是人RNF114的C8。

35. 根据权利要求26所述的用途,其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸,所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

36. 根据权利要求35所述的用途,其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

37. 根据权利要求1到22中任一项所述的靶蛋白降解剂或其药学上可接受的盐在制备用于在有需要的受试者中治疗癌症的药物中的用途。

38. 根据权利要求1到24中任一项所述的靶蛋白降解剂或其药学上可接受的盐在制备用于降低细胞蛋白水平的药物中的用途,包括使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物。

39. 根据权利要求38所述的用途,其中所述E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价结合E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

42. 根据权利要求41所述的用途,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C132。

43. 根据权利要求41所述的用途,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C135。

44. 根据权利要求39所述的用途,其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

45. 根据权利要求44所述的用途,其中所述半胱氨酸残基是人RNF114的C8。

46. 根据权利要求38所述的用途,其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸,所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

47. 根据权利要求46所述的用途,其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

48. 根据权利要求38所述的用途,其中在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合

剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成所述靶蛋白降解剂。

49. 根据权利要求48所述的用途,其中在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出所述E3泛素连接酶结合剂。

50. 根据权利要求49所述的用途,其中通过包括以下步骤的方法来鉴定所述E3泛素连接酶结合剂:

i) 使E3泛素连接酶蛋白与候选E3泛素连接酶结合剂的混合物接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

ii) 将来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的候选E3泛素连接酶结合剂鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

51. 根据权利要求50所述的用途,其中所述候选E3泛素连接酶结合剂包括共价半胱氨酸修饰剂部分,并且候选E3泛素连接酶结合剂通过检测E3泛素连接酶结合剂与E3泛素连接酶蛋白的共价结合以形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物而被鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

52. 根据权利要求51所述的用途,其中E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。

53. 根据权利要求38所述的用途,其中在合成之前,鉴定所述靶蛋白结合剂。

54. 根据权利要求53所述的用途,其中通过包括以下步骤的方法来鉴定所述靶蛋白结合剂:

i) 使细胞蛋白与候选靶蛋白结合剂的混合物接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;以及

ii) 鉴定形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的靶蛋白结合剂。

55. 根据权利要求54所述的用途,其中通过检测细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物,将形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的候选靶蛋白结合剂鉴定为靶蛋白结合剂。

56. 根据权利要求55所述的用途,其中细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。

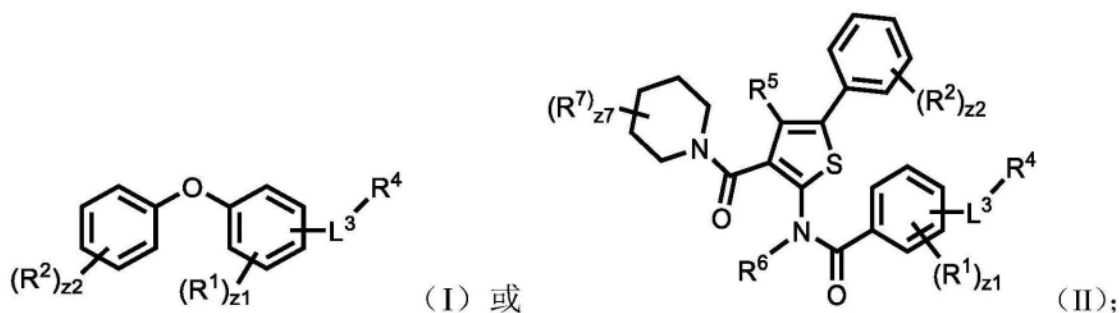
57. 根据权利要求38所述的用途,其中在合成之前,修饰E3泛素连接酶结合剂以去除共价半胱氨酸修饰剂部分。

58. 一种制备E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包括:

A) 使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

B) 使所述E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物;

其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



其中

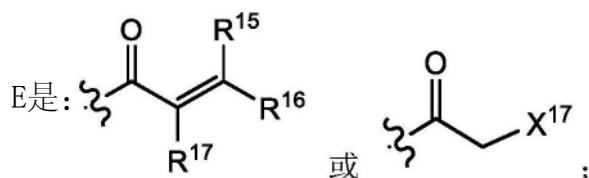
R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基；

R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基；

L^3 为 $-N(R^3)-$ 或 $-N(H)-$ ；

R^3 为经取代或未经取代的烷基；

R^4 为E；



R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地是氢或未经取代的烷基； X^{17} 是卤素；

R^5 和 R^6 独立地为氢或未经取代的烷基；

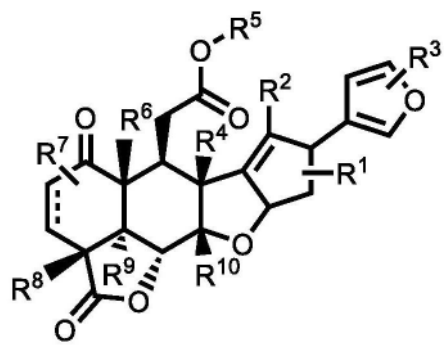
R^7 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基；

z_1 为0到4的整数；

z_2 为0到5的整数；且

z_7 为0到10的整数；或者

其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立地为氢或未经取代的烷基；并且

||为单键或双键。

59. 根据权利要求58所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂共价键合E3泛素连接酶的半胱氨酸。

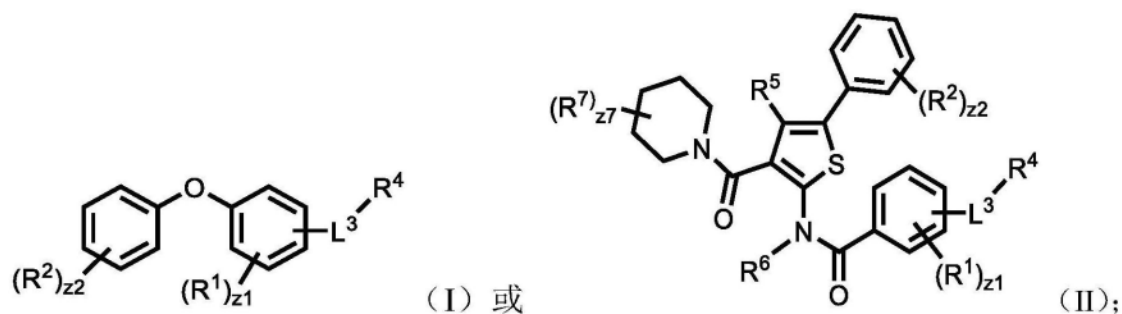
60. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

61. 一种制备细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物的方法, 所述方法包括:

A) 使所述细胞蛋白与E3泛素连接酶结合剂接触, 并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物; 以及

B) 使所述细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述E3泛素连接酶接触, 并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物;

其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



其中

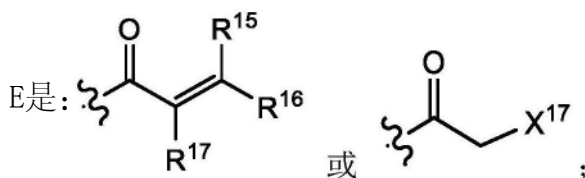
R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

L^3 为 $-N(R^3)-$ 或 $-N(H)-$;

R^3 为经取代或未经取代的烷基;

R^4 为E;



R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地是氢或未经取代的烷基; X^{17} 是卤素;

R^5 和 R^6 独立地为氢或未经取代的烷基;

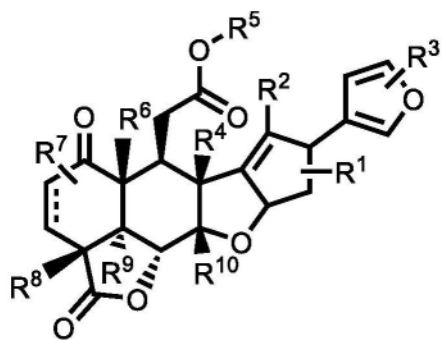
R^7 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

z_1 为0到4的整数;

z_2 为0到5的整数; 且

z_7 为0到10的整数; 或者

其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



;

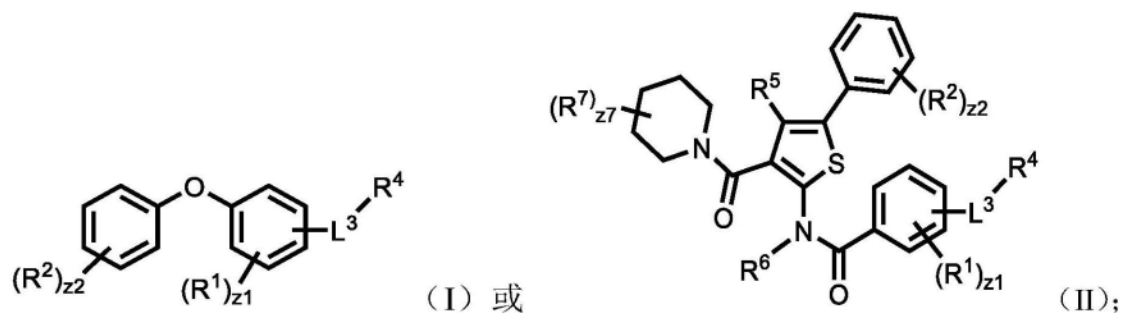
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立地为氢或未经取代的烷基;并且

||为单键或双键。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价键合E3泛素连接酶的半胱氨酸。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

64. 一种抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成的方法,所述方法包括使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成;其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



其中

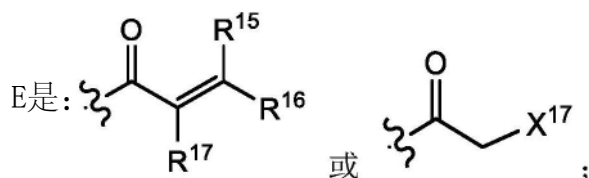
R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-NO_2$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

L^3 为 $-N(R^3)-$ 或 $-N(H)-$;

R^3 为经取代或未经取代的烷基;

R^4 为E;



R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地是氢或未经取代的烷基; X^{17} 是卤素;

R^5 和 R^6 独立地为氢或未经取代的烷基;

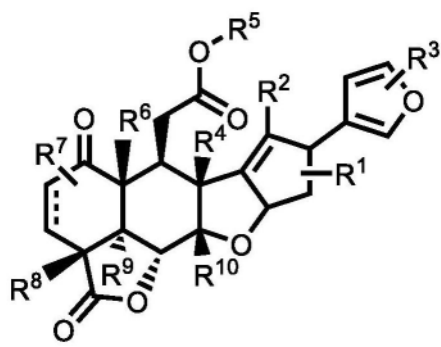
R^7 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、未经取代的烷基或未经取代的杂烷基;

z_1 为0到4的整数；

z_2 为0到5的整数；且

z_7 为0到10的整数；或者

其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立地为氢或未经取代的烷基；并且

||为单键或双键。

65. 根据权利要求64所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂共价键合E3泛素连接酶的半胱氨酸。

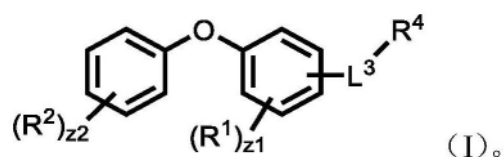
66. 根据权利要求64所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂在E3泛素连接酶的氨基酸处接触E3泛素连接酶，所述E3泛素连接酶能够在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下接触细胞蛋白以形成细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物。

67. 根据权利要求64所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

68. 根据权利要求65所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是RNF4，并且半胱氨酸是人RNF4的C132。

69. 根据权利要求65所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是RNF4，并且半胱氨酸是人RNF4的C135。

70. 根据权利要求58到69中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



71. 根据权利要求70所述的方法，其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸，所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

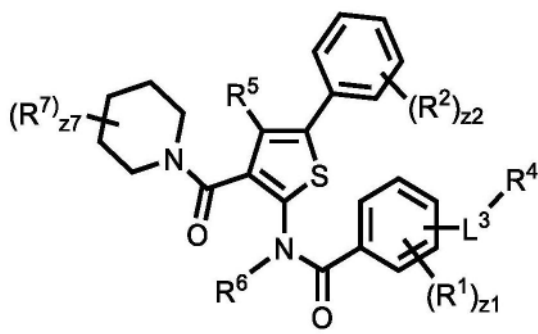
72. 根据权利要求71所述的方法，其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

73. 根据权利要求58到66中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

74. 根据权利要求65到66中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF114，并且半胱氨酸是人RNF114的C8。

75. 根据权利要求73所述的方法，其中所述细胞蛋白是p21。

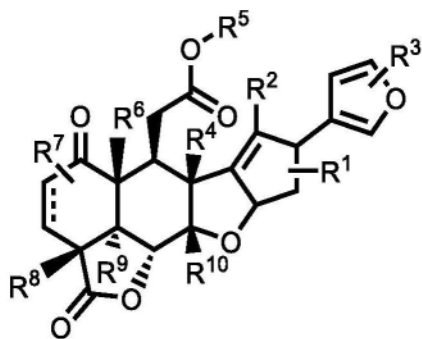
76. 根据权利要求73所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



77. 根据权利要求76所述的方法, 其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸, 所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

79. 根据权利要求73所述的方法, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



80. 根据权利要求79所述的方法, 其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸, 所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

81. 根据权利要求80所述的方法, 其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

E3连接酶的共价靶向

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年10月9日提交的美国临时申请第62/743,337号的权益,所述美国临时申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0003] 对“序列表”、表格或作为ASCII文件提交的计算机程序列表附录的引用

[0004] 写入创建于2019年10月4日、字节数为18,670、机器格式为IBM-PC、采用MS Windows操作系统的文件052103-517001W0_Sequence_Listing_ST25.txt中的序列表通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 靶蛋白降解已成为用于治疗疾病的有力策略。此方法采用双功能降解剂,所述双功能降解剂由与E3连接酶募集剂连接的蛋白质靶向性配体组成,所述募集剂将E3连接酶带到特定的蛋白质底物上,从而以蛋白酶体依赖性方式泛素化并降解这些底物。然而,这种方法面临的一个挑战是目前针对靶蛋白降解应用而存在的E3连接酶募集剂相对较少。本文尤其描述了本领域中的这些和其它问题的解决方案。

发明内容

[0006] 在一个方面是一种靶蛋白降解剂,其包含1)靶蛋白结合剂和2)E3泛素连接酶结合剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4或人RNF114。

[0007] 在一个方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所述的化合物,包含实施例,以及药学上可接受的赋形剂。

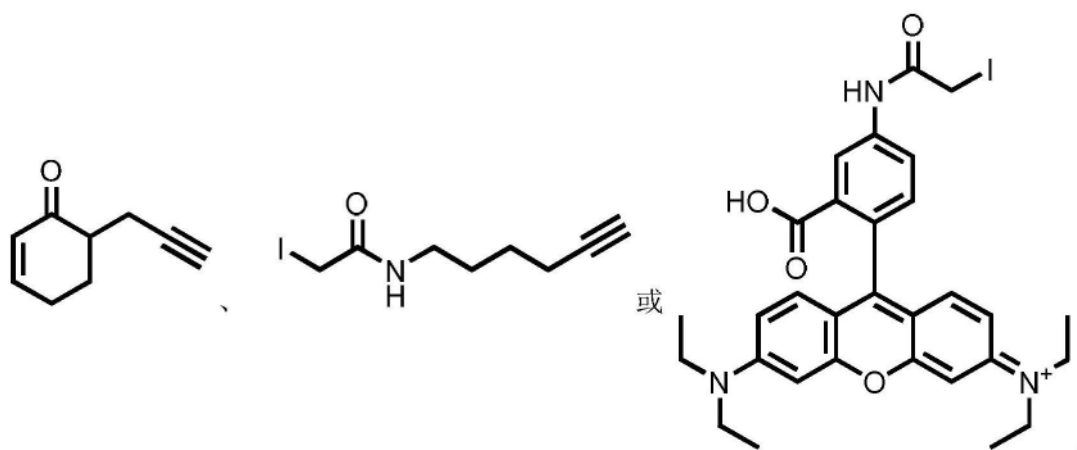
[0008] 在一个方面,提供了一种降低(例如,相对于对照降低)细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触。在实施例中,所述靶蛋白降解剂是本文所述的化合物。

[0009] 在一个方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包含使与癌症相关的细胞蛋白与靶蛋白降解剂(例如,本文所述的化合物)接触。

[0010] 在一个方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的靶蛋白降解剂,包含实施例。

[0011] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i)单价E3泛素连接酶结合剂;(ii)单价靶蛋白结合剂;以及(iii)与所述单价E3泛素连接酶结合剂和所述靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。

[0012] 在一个方面,提供了一种鉴定被靶蛋白结合剂接触的细胞蛋白的方法,所述方法包含:(A)使细胞蛋白质组或细胞的第一样品与所述靶蛋白结合剂接触,从而形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;(B)使步骤A的细胞蛋白质组或细胞的所得第一样品和尚未与所述靶蛋白结合剂接触的所述细胞蛋白质组或细胞的第二样品与具有下式的化合物接触:



(C) 使步骤B的所得第一样品与第一可检测剂接触,并使步骤B的所得第二样品与第二可检测剂接触;(D) 测量结合至选定蛋白质的所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平;以及(E) 通过测量所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平之间的差异来鉴定细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物中的所述细胞蛋白,所述第一可检测剂和所述第二可检测剂各自结合至能够形成所述细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的所述细胞蛋白。

[0013] 在一个方面是一种制备E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包含:(A) 使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及(B) 使所述E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物。

[0014] 在一个方面,提供了一种制备细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包含:(A) 使所述细胞蛋白与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及(B) 使所述细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物。

[0015] 在一个方面,提供了一种抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成的方法,所述方法包含使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成。

附图说明

[0016] 图1A-1E. 使用基于凝胶的ABPP对RNF4进行共价配体筛选。(图1A) E3连接酶MDM2、RNF4和UBE3A的基于凝胶的ABPP标记。在室温下,将纯蛋白用IA-若丹明标记30分钟,然后进行SDS/PAGE并通过凝胶内荧光显像。(图1B) 针对纯RNF4的IA-若丹明标记的共价配体(50μM)的基于凝胶的ABPP筛选示意图,寻找抑制探针标记从而导致荧光损失的化合物。(图1C-1D) 针对RNF4的IA-若丹明标记的半胱氨酸反应性共价配体的基于凝胶的ABPP筛选。将共价配体与纯RNF4蛋白一起预孵育30分钟,然后进行IA-若丹明标记(250nM),持续1小时。对蛋白质进行SDS/PAGE,并通过凝胶内荧光显像。突出显示了来自这种筛选的潜在命中(hit)。(图1E) 如(图1C-1D)中所述进行的可再现RNF4筛选命中的结构和基于凝胶的ABPP确认。凝胶也被银染。

[0017] 图2A-2C. TRH 1-23与RNF4中的锌-配位半胱氨酸发生非功能性反应。(图2A) RNF4上的TRH 1-23共价加合物的LC-MS/MS分析。将RNF4与TRH 1-23 (50 μ M) 一起在室温下孵育30分钟。用胰蛋白酶消化RNF4, 并通过LC-MS/MS分析胰蛋白酶消化物, 并搜索经TRH 1-23修饰的加合物。示出了经TRH 1-23修饰的C132和C135RNF4胰蛋白酶肽的MS/MS谱图。肽序列中突出显示的是经修饰的半胱氨酸。肽序列对应于SEQ ID NO:1的残基118-147。(图2B) TRH 1-23与RNF4的C132或C135的反应性的示意图。(图2C) TRH 1-23不抑制RNF4自体泛素化测定。将RNF4与TRH 1-23 (100 μ M) 一起预孵育, 然后在37 $^{\circ}$ C下添加UBA1、E2酶和ATP, 持续40分钟。将反应淬灭并进行SDS/PAGE和针对RNF4的蛋白质印迹分析 (Western blotting)。(图2C) 所示的凝胶是n=3的代表性凝胶。

[0018] 图3A-3C. 使用基于凝胶的ABPP优化RNF4共价配体。(图3A-3B) 使用基于凝胶的ABPP对TRH 1-23的类似物进行了针对RNF4的IA-若丹明标记的测试。(图3C) 使用基于凝胶的ABPP对CCW16进行了针对RNF4的IA-若丹明标记的测试。对于(图3A-3C), 将共价配体与纯RNF4蛋白一起预孵育30分钟, 然后进行IA-若丹明标记, 持续1小时。对蛋白质进行SDS/PAGE, 并通过凝胶内荧光显像。在(图3C)中, 通过光密度法对凝胶进行定量, 以计算IC50值。(图3C) 所示的凝胶是n=3的代表性凝胶。

[0019] 图4A-4F. 基于RNF4募集剂的BRD4降解剂。(图4A) CCW 28-3 (与BRD4抑制剂JQ1连接的基于RNF4募集剂的降解剂) 的结构。(图4B) CCW 28-3的针对纯人RNF4的基于凝胶的ABPP分析。将CCW 28-3与纯RNF4蛋白一起预孵育30分钟, 然后进行IA-若丹明标记, 持续1小时。对蛋白质进行SDS/PAGE, 并通过凝胶内荧光显像。通过光密度法对凝胶进行定量, 以计算IC50值。(图4C) 在231MFP乳腺癌细胞中的CCW 28-3处理引起BRD4降解。将231MFP乳腺癌细胞用媒剂DMSO或CCW 28-3处理3小时。对蛋白质进行SDS/PAGE和针对BRD4和GAPDH上样对照的蛋白质印迹分析。(图4D, 4E) 在231MFP乳腺癌细胞中的CCW 28-3处理引起依赖于蛋白酶体、E1抑制剂和BRD4抑制剂的BRD4降解。将媒剂DMSO或蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (BTZ) (10 μ M)、E1抑制剂TAK-243 (10 μ M) 或BRD4抑制剂JQ1 (10 μ M) 预孵育30分钟, 然后再用MZ1 (1 μ M) 或CCW 28-3 (1 μ M) 处理3小时。对蛋白质进行SDS/PAGE和针对BRD4和肌动蛋白上样对照的蛋白质印迹分析。(图4F) 将RNF4野生型和敲除的HeLa细胞用CCW 28-3 (10 μ M) 处理5小时, 并对其进行SDS/PAGE和针对BRD4、RNF4和GAPDH的蛋白质印迹分析。通过光密度法定量(图4B-4F) 中的印迹。(图4B-4F) 中的数据来自n=3的代表性凝胶。条形图是平均值 $\pm$ sem, n=3-5个/组。显著性表示为: 与用媒剂处理的对照相比, *p<0.05; 以及与(B, D-E) 中用CCW 28-3处理的组和(图4F) 中用CCW 28-3处理的野生型细胞相比, #p<0.05。

[0020] 图5. 针对RNF4的另外的命中以及通过基于凝胶的ABPP进行对RNF4命中的蛋白质组范围内的选择性的一般性评估。DKM 2-76和TRH 1-74的基于凝胶的ABPP分析, 针对RNF4的IA-若丹明标记。将共价配体与纯RNF4蛋白一起预孵育30分钟, 然后进行IA-若丹明标记 (250nM), 持续1小时。对蛋白质进行SDS/PAGE, 并通过凝胶内荧光显像。RNF4命中YP 1-44和TRH 1-23的基于凝胶的ABPP筛查, 针对231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中的IA-若丹明标记。将YP 1-44和TRH 1-23与蛋白质组一起预孵育30分钟, 然后进行IA-若丹明标记 (250nM), 持续1小时。对蛋白质进行SDS/PAGE, 并通过凝胶内荧光显像。

[0021] 图6. 原位231MFP乳腺癌细胞中的CCW 28-3的isoTOP-ABPP分析。将231MFP细胞用DMSO媒剂或CCW 28-3 (10 μ M) 原位处理1小时, 然后用IA-炔烃 (100 μ M) 对蛋白质组进行体外

标记,持续1小时。通过CuAAC附加同位素轻(对于DMSO处理)或重(对于化合物处理)TEV蛋白酶-可裂解生物素-叠氮化物标签,以进行isoTOP-ABPP分析。数据针对三个生物学重复。

[0022] 图7. 在RNF4野生型和敲除的HeLa细胞中以较低的浓度对CCW 28-3进行了测试。将RNF4野生型和敲除的HeLa细胞用DMSO溶剂或CCW 28-3 (5或1 μ M) 处理5小时对其进行SDS/PAGE和针对BRD4和GAPDH的蛋白质印迹分析。通过光密度法定量印迹。数据来自n=3的代表性凝胶。条形图是平均值 $\pm$ sem, n=3个/组。显著性表示为:与用溶剂处理的对照相比,* $p<0.05$;以及用CCW 28-3处理的野生型细胞相比,# $p<0.05$ 。

[0023] 图8A-8C. 印苦楝内酯(Nimbolide)会削弱乳腺癌细胞的增殖或存活。(图8A) 印苦楝内酯的结构。印苦楝内酯具有可能与半胱氨酸反应的环状烯酮。(图8B-8C) 231MFP和HCC38乳腺癌细胞在含血清的培养基中的增殖和无血清的细胞存活。将细胞用DMSO溶剂或印苦楝内酯处理,并在48小时后通过Hoechst染色评估细胞活力。(图8B-8C) 中所示的数据是平均值 $\pm$ sem, n=6个/组。显著性表示为与用溶剂处理的对照相比,* $p<0.05$ 。

[0024] 图9A-9E. 231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中的印苦楝内酯的isoTOP-ABPP分析显示,RNF114为靶标。(图9A) isoTOP-ABPP示意图,其中将231MFP乳腺癌细胞蛋白质组或细胞用DMSO或印苦楝内酯(10 μ M, 体外30分钟或原位1.5小时) 预处理,然后用IA-炔烃(100 μ M, 1小时) 对蛋白质组进行体外标记,然后通过铜催化的叠氮化物-炔烃环加成反应(CuAAC) 附加同位素轻(对于DMSO处理) 或重(对于印苦楝内酯处理) TEV蛋白酶-可裂解生物素-叠氮化物标签。随后将对照蛋白质组和处理过的蛋白质组以1:1的比率合并,使探针标记的蛋白质富集抗生物素蛋白,用胰蛋白酶消化,并通过TEV蛋白酶洗脱经探针修饰的胰蛋白酶肽,通过LC-MS/MS进行分析,并定量轻到重的经探针修饰的肽比率。(图9B) 如(图9A中) 中所述在体外分析231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中的印苦楝内酯(10 μ M) 的isoTOP-ABPP分析。显示轻/重比 >5 的三个靶标包含PTOV1的C308、RNF114的C8和PFKP的C123。(图9C) 如(图9A) 中所述原位分析231MFP乳腺癌细胞中的印苦楝内酯(10 μ M) 的isoTOP-ABPP分析。(图9D) 使用短发夹RNA寡核苷酸在231MFP细胞中稳定地敲低RNF114。与shControl细胞相比,通过qPCR证实了shRNF114细胞中的RNF114敲低。在接种细胞48小时后,通过Hoechst染色评估细胞增殖。(图9E) 231MFP shControl和shRNF114对印苦楝内酯的敏感性。将231MFP shControl和shRNF114细胞用DMSO溶剂或印苦楝内酯处理,并在48小时后通过Hoechst染色评估细胞增殖。针对各自的shControl或shRNF114对照组,对使用印苦楝内酯的增殖百分比进行了归一化。(图9D-9E) 中所示的数据是平均 $\pm$ sem。(图9B-9E) 中所示的数据来自n=6个/组。(图9D, 9E) 中的显著性表示为与shControl组相比,* $p<0.05$ 。

[0025] 图10A-10E. 印苦楝内酯与RNF114的C8共价反应。(图10A) 如通过PONDR所评估的,印苦楝内酯靶向RNF114内的内在无序区域。(图10B) 用于合成炔烃官能化的印苦楝内酯探针的途径。(图10C) 231MFP乳腺癌细胞蛋白质组的印苦楝内酯探针标记。将231MFP蛋白质组与DMSO或印苦楝内酯(10 μ M, 30分钟) 一起预孵育,然后用印苦楝内酯-炔烃探针进行标记(1 μ M, 1小时),然后通过CuAAC附加若丹明-叠氮化物,进行SDS/PAGE,并进行凝胶内荧光分析。与印苦楝内酯竞争的谱带对应于PTOV1和RNF114的分子量。(图10D) 用印苦楝内酯探针标记的纯人RNF114蛋白的基于凝胶的ABPP分析。在上面两个小图中,将纯RNF114蛋白与DMSO溶剂或印苦楝内酯(100 μ M, 30分钟) 一起预孵育,然后用PBS中的印苦楝内酯探针(10 μ M, 1小时) 进行标记。在下面的两个小图中,在含有1mg/ml BSA的PBS中,用印苦楝内酯探针(10 μ M,

1小时)标记纯野生型和C8A突变型RNF114蛋白。对于这两个实验,均显示了核糖核苷酸-炔标记和RNF114的银染。(图10E)用印苦楝内酯(100 μ M,1小时)标记纯RNF114蛋白,并进行胰蛋白酶消化和LC-MS/MS分析。示出了RNF114的C8上的经印苦楝内酯修饰的加合物。肽序列对应于SEQ ID NO:2的残基7-26。(图10C-10D)中所示的数据来自n=3个/组。

[0026] 图11A-11D.印苦楝内酯通过破坏底物识别来抑制RNF114活性。(图11A)在添加或不添加p21的情况下使用纯GST-Ube1、GST-UBE2D1和RNF114蛋白、Flag-泛素和ATP进行的RNF114泛素化测定,以及针对Flag-泛素(左)或p21(右)的印迹分析。将DMSO或印苦楝内酯(100 μ M)与RNF114一起预孵育,然后添加E1和E2酶、Flag-泛素和ATP,以启动反应。(图11B)使用野生型或C8A突变型RNF114的DMSO或印苦楝内酯(100 μ M)处理的RNF114自体泛素化测定。(图11C)在纯RNF114和p21蛋白的体外孵育中,通过印苦楝内酯(100 μ M)抑制Flag-RNF114的下拉和p21的富集。D)将231MFP细胞用印苦楝内酯(100 μ M)处理。示出了DMSO对照或经印苦楝内酯处理的细胞中的p21水平。(图11A-11D)中所示的凝胶来自n=3个/组的代表性图像。(图11C)中所示的数据是平均 $\pm$ sem。(图11C)中所示的数据来自n=3个/组。(图11C)中的显著性表示为与(图11C)中的p21/RNF114组相比,或针对(图11D)中的每个时间点的经媒剂处理的对照组,*p<0.05。

[0027] 图12A-12G.印苦楝内酯可用于募集RNF114,用于BRD4的靶蛋白降解。(图12A)用于合成XH1和XH2的途径,所述XH1和XH2是基于印苦楝内酯的降解剂,由作为RNF114募集剂的印苦楝内酯、接头和BRD4抑制剂JQ1组成。(图12B,12C)在用XH1(图12B)或XH2(图12C)处理剂(100nM)处理12小时之前30分钟和期间,用DMSO媒剂或蛋白酶体抑制剂硼替佐米(BTZ)(1 μ M)预处理的231MFP乳腺癌细胞中的BRD4水平。(图12D)用MZ1对比XH2处理12小时的231MFP乳腺癌细胞中的BRD4水平。(图12E-12G)在用XH2处理(100nM)12小时之前或期间用DMSO媒剂或E3连接酶抑制剂TAK-243(10 μ M)(E)、JQ1(1 μ M)(F)或依米丁(75 μ M)(图12G)预处理30分钟的231MFP乳腺癌细胞中的BRD4水平。通过SDS/PAGE和蛋白质印迹分析对长和短的BRD4同工型和GAPDH上样对照进行显像,并通过光密度法进行定量(图12B-12G)。(B-G)中所示的凝胶来自n=3个/组的代表性图像。(B,C,E-G)中所示的数据是平均 $\pm$ sem。(图12B,12C,12E-12G)中的显著性表示为:与媒剂处理的对照组相比,*p<0.05;以及与XH2处理的组相比,#p<0.05。

[0028] 图13A-13F.化学蛋白质组学启用的共价配体筛选,其用于鉴定针对RNF114的更易于合成处理的共价配体。(图13A)针对纯RNF114蛋白的IA-炔烃(10 μ M)或JNS27(50 μ M)标记的印苦楝内酯竞争的基于凝胶的ABPP分析。IA-炔烃和JNS27探针的结构以红色突出显示了反应性部分。还示出了针对野生型和C8A突变型RNF114蛋白的JNS27标记的印苦楝内酯(50 μ M)竞争的基于凝胶的ABPP分析。在这些实验中,将DMSO或印苦楝内酯预先孵育30分钟,然后进行探针标记,持续1小时。(图13B)在筛选针对RNF114的JNS27标记的半胱氨酸反应性共价配体的库时,EN62是热门命中一。示出了EN62的结构,其中丙烯酰胺反应性部分以红色突出显示。还示出了针对纯RNF114的JNS27标记的EN62的基于凝胶的ABPP分析。(图13C)使用野生型或C8A突变型RNF114的DMSO或EN62(50 μ M)处理的RNF114自体泛素化测定。(图13D)231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中的EN62的体外IsoTOP-ABPP分析。将DMSO或EN62(50 μ M)与231MFP蛋白质组一起预孵育30分钟,然后进行IA-炔烃标记(100 μ M),持续1小时,然后进行isoTOP-ABPP方法。(图13E)用Hoechst染色评估48小时后针对EN62的231MFP细胞存活。(图

13F) 231MFP肿瘤异种移植物在经媒剂(18:1:1盐水:PEG40:乙醇)或EN62(腹膜内注射50mg/kg,每天一次,皮下注射231MFP细胞后17天开始)处理的C.B-17雌性SCID小鼠中的生长。(图13A-13C)中所示的凝胶来自n=3个/组的代表性图像。(图13D,13F)中所示的数据是平均值 $\pm$ sem,n=3-8个/组。(图13E-13F)中的显著性表示为与用媒剂处理的对照相比,* $p<0.05$ 。

[0029] 图14.231MFP乳腺癌细胞中的PTOV1和PFKP敲低。用shRNA寡核苷酸稳定敲低PTOV1和PFKP,并通过qPCR确认表达。231MFP shControl细胞使用了靶向shRNA寡核苷酸的GFP。通过Hoechst染色在48小时后评估了231MFP shControl、shPFKP和shPTOV1细胞的增殖。所示数据是平均值 $\pm$ sem,n=6个/组。显著性表示为与shControl细胞相比,* $p<0.05$ 。

[0030] 图15.用印苦楝内酯治疗的231MFP乳腺癌细胞中p53的水平。通过蛋白质印迹分析和GAPDH水平作为上样对照,评估了用DMSO媒剂或印苦楝内酯(100 μ M)处理的231MFP乳腺癌细胞中的p53的水平。凝胶代表n=3个/组。通过光密度法定量印迹,并将其相对于上样对照归一化。条形图所示的数据是平均 $\pm$ sem。

[0031] 图16A-16C.针对RNF114的半胱氨酸反应性配体的基于凝胶的ABPP筛选。针对纯人RNF114蛋白的JNS27标记筛选了半胱氨酸反应性共价配体。将共价配体(50 μ M)与RNF114一起预孵育30分钟,然后用JNS27进行标记,持续1小时。然后通过CuAAC将若丹明-叠氮化物附加到经探针标记的蛋白质上。通过SDS/PAGE离蛋白质,并通过凝胶内荧光显像。在下面的剂量反应研究中对那些显示出抑制探针标记作用的蛋白质进行了重新测试,以鉴定可重复抑制RNF114的JNS27标记的命中。

[0032] 图17A-17C.印苦楝内酯会削弱乳腺癌细胞的增殖或存活。(图17A-17B) 231MFP乳腺癌细胞在含血清的培养基中的增殖(图17A)和无血清的细胞存活(图17B)。图17A-17B中所示的数据是平均值 $\pm$ sem,n=6个生物学独立样品/组。(图17C)在用DMSO媒剂或印苦楝内酯处理231MFP细胞24或48小时后,通过流式细胞术评估的碘化丙锭和膜联蛋白-V-阳性(PI+/膜联蛋白-V+)细胞的百分比。示出了来自n=3个生物学独立样品/组的代表性FACS数据。图18D中示出了被定义为FITC+/PI+细胞的晚期凋亡细胞百分比的定量。使用不成对的两尾学生t检验计算统计显著性。显著性表示为与经媒剂处理的对照相比,在图17A中,分别对于100和10 μ M,* $p=7.75\times10^{-14}$ 和 1.14×10^{-13} ;在图17B中,分别对于100和10 μ M,* $p=3.88\times10^{-8}$ 和 1.53×10^{-7} 。

[0033] 图18A-18E.印苦楝内酯会削弱乳腺癌细胞的增殖和存活并诱导凋亡。(图18A-18B) HCC38乳腺癌细胞在含血清的培养基中的增殖(图18A)和无血清的细胞存活(图18B)。将细胞用DMSO媒剂或印苦楝内酯处理,并在48小时后评估细胞活力。(图18C)示出了用于流式细胞术数据的门控策略。使用了两个门控步骤--第一步是通过前向散射和侧向散射进行门控。第二个门基于通过细胞死亡染料(PI/膜联蛋白)分离成象限。(图18D-18E)在用DMSO媒剂或印苦楝内酯处理231MFP(图18D)和HCC38(图18E)细胞24或48小时后,通过流式细胞术评估的碘化丙锭和膜联蛋白-V-阳性(PI+/膜联蛋白-V+)细胞的百分比。来自图18D中的231MFP细胞的代表性FACS数据示于图17C中,而来自HCC38细胞的数据示于(图18E)的左侧小图上。图18D-18E中的条形图是被定义为PI+/膜联蛋白-V+细胞的晚期凋亡细胞的百分比。图18A-18B和图18D-18E中所示的数据是平均值 $\pm$ sem,在图18A-18B中,n=6个生物学独立样品/组,而在图18D-18E中,n=3个生物学独立样品/组。使用不成对的两尾学生t检验计算统计显著性。显著性分别表示为与经媒剂处理的对照相比,在图18A中,分别对于100和10

μM , $*p=1.64\times 10^{-13}$ 和 2.05×10^{-13} ;在图18B中,分别对于100和10 μM , $*p=2.09\times 10^{-11}$ 和 7.07×10^{-12} ;在图18D中,对于24小时数据,分别对于10和100 μM , $*p=9.05\times 10^{-5}$ 和 1.87×10^{-5} ;在图18E中,对于48小时数据,分别对于1、10和100 μM , $*p=0.00139$ 、 0.000142 和 7.97×10^{-9} ;在图18E中,对于24小时数据,分别对于1、10和100 μM , $*p=0.00424$ 、 0.0182 和 2.22×10^{-11} ;以及在图18E中,对于48小时数据,分别对于1、10和100 μM , $*p=6.68\times 10^{-6}$ 、 4.70×10^{-7} 和 9.00×10^{-11} 。

[0034] 图19A-19D. 231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中的印苦楝内酯的isoTOP-ABPP分析显示,RNF114为靶标。(图19A)如图19A中所述原位分析231MFP乳腺癌细胞中的印苦楝内酯(10 μM)的isoTOP-ABPP分析。左图示出了轻同位素探针与重同位素探针修饰的肽的比率,其中比率最高的主要靶标是RNF114的C8。右图示出了带有RNF114的C8的经探针修饰的肽的代表性MS1轻峰与重峰。(图19B)与siControl231MFP细胞相比,通过RNF114的蛋白质印迹分析证实了靶向RNF114的短干扰RNA(siRNA)的RNF114敲低。GAPDH表达被示出为上样对照。所示的凝胶是来自n=3个生物学重复/组的代表性凝胶。(图19C)在siControl和siRNF114细胞中24小时后的231MFP细胞增殖。(图19D)印苦楝内酯对231MFP siControl和siRNF114 231MFP乳腺癌细胞的效果印苦楝内酯对231MFP siControl和siRNF114 231MFP乳腺癌细胞的效果。将细胞用DMSO媒剂或印苦楝内酯处理24小时,然后评估增殖。将siControl或siRNF114组的数据相对于每组中相应的DMSO媒剂对照归一化。示出了单独的生物学独立样品数据,并且线表示平均值。图19C中所示的数据是平均 $\pm$ sem。图19A-19B中所示的数据来自n=3个生物学独立样品/组,而在图18D-18E中,数据来自n=5个生物学独立样品/组。使用不成对的两尾学生t检验计算图18D-18E中的统计显著性。图18D中的显著性表示为与siControl细胞相比, $*p=4.52\times 10^{-5}$ 。图18E中的显著性表示为与siControl组中相应的印苦楝内酯治疗浓度相比,分别对于10、6和3 μM , $*p=1.90\times 10^{-5}$ 、 2.72×10^{-4} 和0.00101。

[0035] 图20A-20D. 阐明RNF114在印苦楝内酯介导的效果中的作用。(图20A)与siControl 231MFP细胞相比,通过RNF114的蛋白质印迹分析证实了3种靶向RNF114的独立siRNA的RNF114敲低。GAPDH表达被示出为上样对照。(图20B)通过Hoechst染色评估的在siControl和siRNF114细胞中24小时后的231MFP细胞增殖。(图20C)印苦楝内酯对231MFP siControl和siRNF114 231MFP乳腺癌细胞的效果。将细胞用DMSO媒剂或印苦楝内酯处理24小时,然后通过Hoechst染色评估增殖。将siControl或siRNF114组中的每组的数据相对于每组中相应的DMSO媒剂对照归一化。示出了单独的生物学独立样品数据,并且线表示平均值。(图20D)针对重组人RNF114蛋白的IA-若丹明标记的印苦楝内酯、JNS27和碘乙酰胺竞争的基于凝胶的ABPP分析。将RNF114蛋白用DMSO媒剂或印苦楝内酯、JNS27和碘乙酰胺预处理30分钟,然后用IA-若丹明(100nM)对RNF114进行标记,持续30分钟。通过SDS/PAGE和凝胶内荧光评估RNF114 IA-若丹明标记。所示的数据来自n=1个生物学重复。所示的数据来自n=3个生物学独立样品/组。图20A和图20D中所示的数据是来自n=3个生物学独立样品/组的代表性凝胶。图20B中所示的数据是平均值 $\pm$ sem,对于图20B,n=5个生物学独立样品/组。在图20B、图20C中,使用不成对的两尾学生t检验计算统计显著性。在图20B中,显著性表示为与siControl细胞相比,对于siRNF114-1、siRNF114-2和siRNF114-3, $*p=4.52\times 10^{-5}$ 、0.0429和0.00230。图20C中的显著性表示为与siControl细胞中相应浓度的印苦楝内酯处理相比,对于siRNF114-1,分别对于10、6和3 μM , $*p=1.90\times 10^{-5}$ 、0.000272、0.00101;对于siRNF114-2,

分别对于10、6和3 μ M, *p=0.000626、0.00139、3.66x10⁻⁵; 以及对于siRNF114-3, 分别对于10、6和3 μ M, *p=0.00134、9.15x10⁻⁵、0.00769。图20F中的显著性表示为与用媒剂处理的对照相比, *p=0.0188。

[0036] 图21A-21G. 印苦楝内酯与RNF114的C8共价反应。(图21A) 如通过PONDR所评估的, 印苦楝内酯靶向RNF114内的内在无序区域。(图21B) 用于合成炔烃官能化的印苦楝内酯探针的途径。(图21C) 用印苦楝内酯探针标记的纯人RNF114蛋白的基于凝胶的ABPP分析。在上面两个小图中, 将纯RNF114蛋白与DMSO媒剂或印苦楝内酯(100 μ M, 30分钟)一起预孵育, 然后用PBS中的印苦楝内酯探针(10 μ M, 1小时)进行标记。在下面的两个小图中, 在含有1mg/ml BSA的PBS中, 用印苦楝内酯探针(10 μ M, 1小时)标记纯野生型和C8A突变型RNF114蛋白。(图21D) 针对纯RNF114蛋白的IA-炔烃(10 μ M)或JNS27(50 μ M)标记的印苦楝内酯竞争的基于凝胶的ABPP分析。IA-炔烃和JNS27探针的结构以红色突出显示了反应性部分。还示出了针对野生型和C8A突变型RNF114蛋白的JNS27标记的印苦楝内酯(50 μ M)竞争的基于凝胶的ABPP分析。在这些实验中, 将DMSO或印苦楝内酯预先孵育30分钟, 然后进行探针标记, 持续1小时。(图21E) 231MFP细胞中Flag-RNF114的印苦楝内酯-炔烃标记。将稳定表达Flag标记的RNF114的231MFP细胞用DMSO媒剂或印苦楝内酯-炔烃处理2小时。随后从收获的细胞裂解物中富集RNF114, 然后通过CuAAC将若丹明-叠氮化物附加到经探针标记的蛋白质上, 然后通过SDS/PAGE和凝胶内荧光对印苦楝内酯-炔烃标记进行显像。(图21F) 231MFP细胞中内源RNF114的印苦楝内酯-炔烃标记。将231MFP细胞用DMSO媒剂或印苦楝内酯-炔烃(50 μ M)处理1.5小时。通过CuAAC将生物素-叠氮化物附加到经探针标记的蛋白质上, 然后使这些蛋白质富集抗生物素蛋白。通过SDS/PAGE和针对RNF114的蛋白质印迹分析来分析所得的下拉蛋白。图21C-21F中所示的凝胶是来自n=3个生物学独立样品/组的代表性凝胶。

[0037] 图22A-22I. 印苦楝内酯通过破坏底物识别来抑制RNF114活性。(图22A-22B) 在添加或不添加p21的情况下使用纯GST-Ube1、GST-UBE2D1和RNF114蛋白、Flag-泛素和ATP进行的RNF114泛素化测定, 以及针对Flag-泛素(图22A)或p21(图22B)的印迹分析。(图22C) 使用野生型或C8A突变型RNF114的DMSO或印苦楝内酯(100 μ M)处理的RNF114自体泛素化测定。(图22D) 在纯RNF114和p21蛋白的体外孵育中, 通过印苦楝内酯(100 μ M)抑制Flag-RNF114的下拉和p21的富集。(图22E) 将231MFP细胞用印苦楝内酯(100 μ M)处理。示出了DMSO对照或经印苦楝内酯处理的细胞中的p21水平。(图22F) 231MFP乳腺癌细胞的基于串联质量标签(TMT)的定量蛋白质组谱图, 所述乳腺癌细胞用DMSO媒剂或印苦楝内酯(100nM)处理12小时。以红色显示的是水平显著升高>2倍的蛋白质。(图22F)中所示的数据针对在n=3个生物学独立样品/组中用2个或更多个独特肽定量的6397种蛋白质。(图22G) 在添加p21(CDKN1A)、PEG10或CTGF的情况下使用纯GST-Ube1、GST-UBE2D1和RNF114蛋白、Flag-泛素和ATP进行的RNF114泛素化测定, 以及针对Flag-泛素的印迹分析。将DMSO或印苦楝内酯(100 μ M)与RNF114一起预孵育, 然后添加E1和E2酶、Flag-泛素和ATP, 以启动反应。(图22H) 通过蛋白质印迹分析评估的siControl和siCDKN1A/siCDKN1C 231MFP细胞中p21(CDKN1A)和p57(CDKN1C)的表达, 以肌动蛋白作为上样对照。(图22I) 用DMSO媒剂或印苦楝内酯(6 μ M)处理24小时的siControl或siCDKN1A/siCDKN1C细胞中的231MFP细胞增殖。图22A-22E和图22G中所示的数据是来自n=3个生物学独立样品/组的代表性图像。图22A-22D中所示的印迹的定量在图23A-23D中。所有三个生物学独立样品/组均示于图22H中。图22I中所示的数据是平

均值 $\pm$ sem, $n=5$ 个生物学独立样品/组。在图22E和图22I中,使用不成对的两尾学生t检验计算统计显著性。显著性表示为与图22E中的每个时间点上的经媒剂治疗的对照组相比,分别对于1小时、2小时、4小时和8小时, $*p=0.00799$ 、 0.0295 、 0.00962 和 0.0135 ;在图22I中,分别与经媒剂处理的siControl和siCDKN1A/siCDKN1C组相比, $p=5.65\times 10^{-8}$ 和 0.0173 。在图22I中,显著性表示为与用印苦楝内酯处理的siControl细胞相比, $\#p=6.70\times 10^{-5}$ 。

[0038] 图23A-23I. 印苦楝内酯可用于募集RNF114,用于BRD4的靶蛋白降解。(图23A)用于合成XH2的途径,所述XH2是基于印苦楝内酯的降解剂,其由作为RNF114募集剂的印苦楝内酯、接头和BRD4抑制剂JQ1组成。(图23B) XH2的针对RNF114的基于凝胶的ABPP分析。将RNF114与DMSO媒剂或XH2一起预孵育30分钟,然后进行JNS27标记($50\mu\text{M}$),持续1小时,然后通过CuAAC附加若丹明-叠氮化物,进行SDS/PAGE,并进行凝胶内荧光分析。(图23C-23D)用XH2(图23C)对比MZ1(图23D)处理12小时的231MFP乳腺癌细胞中的BRD4表达。(图23E-23F) BRD4在231MFP乳腺癌细胞中的表达。在用MZ1($1\mu\text{M}$)或XH2(100nM)处理剂(100nM)处理12小时之前或期间,将细胞用DMSO媒剂或蛋白酶体抑制剂硼替佐米(BTZ)($1\mu\text{M}$)(图23E)或E1泛素活化酶抑制剂TAK-243($10\mu\text{M}$)(图23F)预处理30分钟。(图24G) RNF114野生型(WT)和敲除(KO) HAP1细胞中的RNF114和上样对照GAPDH的表达。(图23H)用DMSO媒剂、MZ1($1\mu\text{M}$)或XH2(100nM)处理12小时的RNF114野生型(WT)或敲除(KO) HAP1细胞中的RNF114和BRD4表达。(图23I) 231MFP乳腺癌细胞的基于串联质量标签(TMT)的定量蛋白质组谱图,所述乳腺癌细胞用DMSO媒剂或XH2(100nM)处理12小时。通过SDS/PAGE和蛋白质印迹分析对图23C-23H中的长和短的BRD4同工型进行显像,通过光密度法进行定量,并相对于GAPDH上样对照进行归一化。图23B-23H中所示的凝胶是来自 $n=3$ 个生物学独立样品/组的代表性图像,并且图23C-23F和图23H中的印迹的定量示出于图25C-25F和图25I中。图23I中所示的数据针对在一式三份的处理中用2个或更多个独特肽定量的5797种蛋白质。方法部分介绍了图23I中的统计显著性。

具体实施方式

[0039] I. 定义

[0040] 本文所使用的缩写具有化学领域和生物学领域内的常规含义。本文所述的化学结构和化学式是根据化学领域中已知的化学价的标准规则构建的。

[0041] 当通过从左到右书写的常规化学式说明取代基时,所述取代基同等地涵盖由从右到左书写结构所产生的化学上相同的取代基,例如, $-\text{CH}_2\text{O}-$ 等同于 $-\text{OCH}_2-$ 。

[0042] 除非另外说明,否则术语“烷基”本身或作为另一取代基的一部分,意指直链(即,无支链的)或支链碳链(或碳)或其组合,其可以是完全饱和、单不饱和的和或多不饱和的,并且可以包含单价、二价和多价基团。烷基可以包含指定数量的碳(例如, C_1-C_{10} 意指一个碳到十个碳)。烷基是未环化的链。不饱和烷基是具有一个或多个双键或三键的烷基。烷氧基是通过氧接头($-\text{O}-$)与分子的其余部分连接的烷基。烷基部分可以是烯基部分。烷基部分可以是炔基部分。烷基部分可以是完全饱和的。烯基可以包含多于一个双键和/或除一个或多个双键外的一个或多个三键。炔基可以包含多于一个三键和/或除一个或多个三键外的一个或多个双键。除非另外说明,否则术语“亚烷基”本身或作为另一取代基的一部分,意指衍生自烷基的二价基团。除非另外说明,否则术语“亚烯基”本身或作为另一取代基的一部分,意

指衍生自烯烃的二价基团。

[0043] 除非另外说明,否则术语“杂烷基”本身或与另一术语组合意指包含至少一个碳原子和至少一个杂原子(例如,O、N、P、Si和S)的稳定直链或支链或其组合,并且其中氮原子和硫原子可以任选地被氧化,并且氮杂原子可以任选地被季铵化。一个或多个杂原子(例如,O、N、S、Si或P)可以放置在杂烷基的任何内部位置处或位于烷基与分子的其余部分连接的位置处。杂烷基是未环化的链。杂烷基部分可以包含一个杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包含两个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包含三个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包含四个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包含五个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包含至多8个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。除非另外说明,否则术语“杂烯基”本身或与另一术语组合意指包含至少一个双键的杂烷基。杂烯基可以任选地包含多于一个双键和/或除一个或多个双键外的一个或多个三键。除非另外说明,否则术语“杂炔基”本身或与另一术语组合意指包含至少一个三键的杂烷基。杂炔基可以任选地包含多于一个三键和/或除一个或多个三键外的一个或多个双键。

[0044] 类似地,除非另外说明,否则术语“亚杂烷基”本身或作为另一取代基的一部分,意指衍生自杂烷基的二价基团。对于亚杂烷基,杂原子还可以占据链末端(例如,亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等)中的任一个或两个。仍进一步地,对于亚烷基和亚杂烷基连接基团,连接基团的式书写的方向并不暗示连接基团的朝向。例如,式-C(O)₂R'-表示-C(O)₂R'-和-R'C(O)₂-两者。应理解,当在叙述如-NR'R''等特定杂烷基之后叙述“杂烷基”时,术语杂烷基和-NR'R''不是冗余的或相互排斥的。相反,叙述特定杂烷基以增加清晰度。因此,术语“杂烷基”在本文中不应被解释为排除如-NR'R''等特定杂烷基。

[0045] 除非另外说明,否则术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或与其它术语组合分别意指“烷基”和“杂烷基”的环状形式。环烷基和杂环烷基不是芳香族的。另外,对于杂环烷基,杂原子可以占据杂环与分子的其余部分连接的位置。“亚环烷基”和“亚杂环烷基”,单独或作为另一取代基的一部分,意指分别衍生自环烷基和杂环烷基的二价基团。

[0046] 在实施例中,术语“环烷基”意指单环、双环或多环环烷基环系统。在实施例中,单环系统是含有3个到8个碳原子的环烷基,其中此类基团可以是饱和的或不饱和的,但不是芳香族的。在实施例中,环烷基是完全饱和的。在实施例中,桥接的单环含有单环环烷基环,其中单环的两个非相邻碳原子通过一个碳原子与三个另外的碳原子之间的亚烷基桥连接(即,形式为(CH₂)_w的桥接基团,其中w为1、2或3)。在实施例中,桥接的或稠合的双环环烷基通过单环环烷基环内含有的任何碳原子与母体分子部分连接。在实施例中,多环环烷基通过基础环内含有的任何碳原子与母体分子部分连接。

[0047] 在实施例中,环烷基为环烯基。术语“环烯基”根据其普通一般含义使用。在实施例中,环烯基是单环、双环或多环环烯基环系统。在实施例中,单环环烯基环系统是含有3个到8个碳原子的环烷基,其中此类基团是不饱和的(即,含有至少一个环形碳碳双键),但不是芳香族的。在实施例中,双环环烯基环是桥接的单环或稠合的双环。在实施例中,桥接的单环含有单环环烯基环,其中单环的两个非相邻碳原子通过一个碳原子与三个另外的碳原子之间的亚烷基桥连接(即,形式为(CH₂)_w的桥接基团,其中w为1、2或3)。在实施例中,桥接的或稠合的双环环烯基通过单环环烯基环内含有的任何碳原子与母体分子部分连接。在实施

例中,多环环烯基通过基础环内含有的任何碳原子与母体分子部分连接。

[0048] 在实施例中,杂环烷基是杂环基。如本文所使用的,术语“杂环基”意指单环、双环或多环杂环。杂环基单环杂环是含有独立地选自O、N和S组成的组的至少一个杂原子的3元、4元、5元、6元或7元环,其中环是饱和的或不饱和的,但不是芳香族的。3元或4元环含有选自O、N和S组成的组的1个杂原子。5元环可以含有零个或一个双键以及选自O、N和S组成的组的一个、两个或三个杂原子。6元或7元环含有零个、一个或两个双键以及选自O、N和S组成的组的一个、两个或三个杂原子。杂环基单环杂环通过杂环基单环杂环内含有的任何碳原子或任何氮原子连接至母体分子部分。杂环基双环杂环通过双环系统的单环杂环部分内含有的任何碳原子或任何氮原子连接至母体分子部分。多环杂环基通过基础环内含有的任何碳原子或氮原子连接至母体分子部分。

[0049] 除非另外说明,否则术语“卤基”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分,意指氟、氯、溴或碘原子。另外,如“卤代烷基”等术语旨在包含单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“卤代(C₁-C₄)烷基”包含但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

[0050] 除非另外说明,否则术语“酰基”意指-C(O)R,其中R是经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。

[0051] 除非另外说明,否则术语“芳基”意指多元不饱和的芳香族烃取代基,其可以是单环或稠合在一起(即,稠环芳基)或共价连接的多个环(优选地,1个到3个环)。稠环芳基是指稠合在一起的多个环,其中稠环中的至少一个环是芳基环。术语“杂芳基”是指含有至少一个杂原子(如N、O或S)的芳基(或环),其中氮原子和硫原子任选地被氧化,并且一个或多个氮原子任选地被季铵化。因此,术语“杂芳基”包含稠环杂芳基(即,稠合在一起的多个环,其中稠环中的至少一个环是杂芳环)。杂芳基可以通过碳原子或杂原子与分子的其余部分连接。“亚芳基”和“亚杂芳基”,单独或作为另一取代基的一部分,意指分别衍生自芳基和杂芳基的二价基团。杂芳基取代基可以是与环杂原子氮键合的-O-。

[0052] 螺环是其中相邻环通过单个原子连接的两个或更多个环。螺环内的单个环可以相同或不同。螺环中的单个环可以是经取代的或未经取代的,并且可以具有与螺环集合中的其它单个环不同的取代基。螺环内的单个环的可能取代基是当不是螺环的一部分时的同一环的可能取代基(例如,环烷基环或杂环烷基环的取代基)。当提及螺环系统时,杂环螺环意指其中至少一个环是杂环并且其中每个环可以是不同的环的螺环。当提及螺环系统时,经取代的螺环意指至少一个环是经取代的并且每个取代基可以任选地是不同的。

[0053] 符号“”表示化学部分与分子或化学式的其余部分连接的点。

[0054] 如本文所使用的,术语“氧代”意指与碳原子双键合的氧。

[0055] 以上术语中的每一个术语(例如,“烷基”、“杂烷基”、“环烷基”、“杂环烷基”、“芳基”和“杂芳基”)包含所指示的基团的经取代和未经取代的形式。下文提供了针对每种类型的基团的优选取代基。

[0056] 烷基和杂烷基(包含通常被称作亚烷基、烯基、亚杂烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基)的取代基可以是选自但不限于以下的多种基团中的一个或多个: -OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-

$\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''')=\text{NR}''''$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{ONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{NR}'''\text{R}''''$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}'\text{SO}_2\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})-\text{OR}''$ 、 $-\text{NR}'\text{OR}''$ ，数量在零到 $(2m'+1)$ 范围内，其中 m' 是此类基团中的碳原子的总数。 R 、 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选地独立地指代氢、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基(例如，被1-3个卤素取代的芳基)、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基或芳烷基。当本文所述的化合物包含多于一个R基团时，例如，如当存在多于一个这些基团时独立地选择各 R' 基团、 R'' 基团、 R''' 基团和 R'''' 基团那样，独立地选择R基团中的每一个。当 R' 和 R'' 与同一氮原子连接时，二者可以与所述氮原子组合以形成4元、5元、6元或7元环。根据以上对取代基的讨论，本领域技术人员将理解术语“烷基”旨在包含含有与除氢基团以外的基团结合的碳原子的基团，如卤代烷基(例如， $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$)和酰基(例如， $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 等)。

[0057] 类似于针对烷基所描述的取代基，芳基和杂芳基的取代基是变化的，并且选自例如以下： $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{卤素}$ 、 $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''')=\text{NR}''''$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{ONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{NR}'''\text{R}''''$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{R}'$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{Ph})_2$ 、氟代(C_1-C_4)烷氧基和氟代(C_1-C_4)烷基、 $-\text{NR}'\text{SO}_2\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})-\text{OR}''$ 、 $-\text{NR}'\text{OR}''$ ，数量在零到芳环系统上的开放价总数的范围内；并且其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 优选地独立地选自氢、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基和经取代或未经取代的杂芳基。当本文所述的化合物包含多于一个R基团时，例如，如当存在多于一个这些基团时独立地选择各 R' 基团、 R'' 基团、 R''' 基团和 R'''' 基团那样，独立地选择R基团中的每一个。

[0058] 环(例如，环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基)的取代基可以被描绘为环上的而非环的特定原子上的取代基(通常被称为浮动取代基)。在此情况下，取代基可以与环原子中的任何环原子(遵循化学价规则)连接，并且在稠环或螺环的情况下，被描绘为与稠环或螺环的一个成员缔合的取代基(单环上的浮动取代基)可以是稠环或螺环中的任一个上的取代基(多个环上的浮动取代基)。当取代基与环而非特定原子连接(浮动取代基)并且取代基的下标是大于1的整数时，多个取代基可以位于同一原子、同一环、不同原子、不同稠环、不同螺环上，并且每个取代基可以任选地不同。在环与分子的其余部分的连接点不限于单个原子(浮动取代基)的情况下，连接点可以是环的任何原子，并且在稠环或螺环的情况下，可以是稠环或螺环中的任一个的任何原子(在遵循化学价规则的情况下)。在环、稠环或螺环含有一个或多个环杂原子并且所述环、稠环或螺环被示出为具有又一个浮动取代基(包含但不限于与分子的其余部分的连接点)的情况下，浮动取代基可以与杂原子键合。在环杂原子被示出为与具有浮动取代基的结构或式中的一个或多个氢键合(例如，具有与环原子相连的两个键和与氢相连的第三个键的环氮)的情况下，当杂原子与浮动取代基键合时，取代基将被理解为在遵循化学价规则的同时替换氢。

[0059] 两个或多个取代基可以被任选地连接形成芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基。这种

所谓的环形成取代基通常(尽管不是必须的)连接到环状基础结构上。在一个实施例中,环形成取代基与基础结构的邻近成员连接。例如,与环状基础结构的邻近成员连接的两个环形成取代基产生稠环结构。在另一实施例中,环形成取代基与基础结构的单个成员连接。例如,与环状基础结构的单个成员连接的两个环形成取代基产生螺环结构。在又另一实施例中,环形成取代基与基础结构的非邻近成员连接。

[0060] 如本文所使用的,术语“杂原子”或“环杂原子”旨在包含氧(O)、氮(N)、硫(S)、磷(P)和硅(Si)。

[0061] 如本文所使用的,“取代基”意指选自以下部分的基团:

[0062] (A) 氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈烷基、C₁-C₆烷基或C₁-C₄烷基)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈环烷基、C₃-C₆环烷基或C₅-C₆环烷基)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀芳基、C₁₀芳基、或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基),以及

[0063] (B) 被选自以下的至少一个取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:

[0064] (i) 氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈烷基、C₁-C₆烷基或C₁-C₄烷基)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈环烷基、C₃-C₆环烷基或C₅-C₆环烷基)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀芳基、C₁₀芳基、或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基),以及

[0065] (ii) 被选自以下的至少一个取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:

[0066] (a) 氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈烷基、C₁-C₆烷基或C₁-C₄烷基)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈环烷基、C₃-C₆环烷基或C₅-C₆环烷基)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀芳基、C₁₀芳基、或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基),以及

[0067] (b) 被选自以下的至少一个取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基：氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、未经取代的烷基（例如， C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基）、未经取代的杂烷基（例如，2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基）、未经取代的环烷基（例如， C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 C_5 - C_6 环烷基）、未经取代的杂环烷基（例如，3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基）、未经取代的芳基（例如， C_6 - C_{10} 芳基、 C_{10} 芳基、或苯基）或未经取代的杂芳基（例如，5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基）。

[0068] 在实施例中，如本文所使用的，“取代基”意指选自以下部分的基团：

[0069] (A) 氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、未经取代的烷基（例如， C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基）、未经取代的杂烷基（例如，2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基）、未经取代的环烷基（例如， C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 C_5 - C_6 环烷基）、未经取代的杂环烷基（例如，3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基）、未经取代的芳基（例如， C_6 - C_{10} 芳基、 C_{10} 芳基、或苯基）或未经取代的杂芳基（例如，5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基），以及

[0070] (B) 烷基（例如， C_1 - C_{20} 、 C_1 - C_{12} 、 C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2 ）、杂烷基（例如，2元到20元、2元到12元、2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元）、环烷基（例如， C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6 ）、杂环烷基（例如，3元到10元、3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元）、芳基（例如， C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 或苯基）或杂芳基（例如，5元到12元、5元到10元、5元到9元或5元到6元），其被选自以下的至少一个取代基取代：

[0071] (i) 氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、未经取代的烷基（例如， C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基）、未经取代的杂烷基（例如，2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基）、未经取代的环烷基（例如， C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 C_5 - C_6 环烷基）、未经取代的杂环烷基（例如，3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基）、未经取代的芳基（例如， C_6 - C_{10} 芳基、 C_{10} 芳基、或苯基）或未经取代的杂芳基（例如，5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基），以及

[0072] (ii) 烷基（例如， C_1 - C_{20} 、 C_1 - C_{12} 、 C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2 ）、杂烷基（例如，2元到20元、2元到12元、2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元）、环烷基（例如， C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6 ）、杂环烷基（例如，3元到10元、3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元）、芳基（例如， C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 或苯基）或杂芳基（例如，5元到12元、5元到10元、5元到9元或5元到6元），其被选自以下的至少一个取代基取代：

[0073] (a) 氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基)、未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 C_5 - C_6 环烷基)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基)、未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 芳基、 C_{10} 芳基、或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基),以及

[0074] (b) 烷基(例如, C_1 - C_{20} 、 C_1 - C_{12} 、 C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、杂烷基(例如,2元到20元、2元到12元、2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、环烷基(例如, C_3 - C_{10} 、 C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、杂环烷基(例如,3元到10元、3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、芳基(例如, C_6 - C_{12} 、 C_6 - C_{10} 或苯基)或杂芳基(例如,5元到12元、5元到10元、5元到9元或5元到6元),其被选自以下的至少一个取代基取代:氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元杂烷基、2元到6元杂烷基或2元到4元杂烷基)、未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 C_5 - C_6 环烷基)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元杂环烷基、3元到6元杂环烷基或5元到6元杂环烷基)、未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 芳基、 C_{10} 芳基、或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元杂芳基、5元到9元杂芳基或5元到6元杂芳基)。

[0075] 如本文所使用的,“大小受限的取代基(size-limited substituent/size-limited substituent group)”意指选自上文针对“取代基”所描述的所有取代基的基团,其中每个经取代或未经取代的烷基是经取代或未经取代的 C_1 - C_{20} 烷基,每个经取代或未经取代的杂烷基是经取代或未经取代的2元到20元杂烷基,每个经取代或未经取代的环烷基是经取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基,每个经取代或未经取代的杂环烷基是经取代或未经取代的3元到8元杂环烷基,每个经取代或未经取代的芳基是经取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基,并且每个经取代或未经取代的杂芳基是经取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0076] 如本文所用的,“低级取代基(lower substituent/lower substituent group)”意指选自上文针对“取代基”所描述的所有取代基的基团,其中每个经取代或未经取代的烷基是经取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基,每个经取代或未经取代的杂烷基是经取代或未经取代的2元到8元杂烷基,每个经取代或未经取代的环烷基是经取代或未经取代的 C_3 - C_7 环烷基,每个经取代或未经取代的杂环烷基是经取代或未经取代的3元到7元杂环烷基,每个经取代或未经取代的芳基是经取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基,并且每个经取代或未经取代的杂芳基是经取代或未经取代的5元到9元杂芳基。

[0077] 在本文化合物的其它实施例中,每个经取代或未经取代的烷基是经取代或未经取代的 C_1 - C_{20} 烷基,每个经取代或未经取代的杂烷基是经取代或未经取代的2元到20元杂烷

基,每个经取代或未经取代的环烷基是经取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基,每个经取代或未经取代的杂环烷基是经取代或未经取代的3元到8元杂环烷基,每个经取代或未经取代的芳基是经取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基,和/或每个经取代或未经取代的杂芳基是经取代或未经取代的5元到10元杂芳基。在本文化合物的一些实施例中,每个经取代或未经取代的亚烷基是经取代或未经取代的 C_1 - C_{20} 亚烷基,每个经取代或未经取代的亚杂烷基是经取代或未经取代的2元到20元亚杂烷基,每个经取代或未经取代的亚环烷基是经取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基,每个经取代或未经取代的亚杂环烷基是经取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基,每个经取代或未经取代的亚芳基是经取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基,和/或每个经取代或未经取代的亚杂芳基是经取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基。

[0078] 在一些实施例中,每个经取代或未经取代的烷基是经取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基,每个经取代或未经取代的杂烷基是经取代或未经取代的2元到8元杂烷基,每个经取代或未经取代的环烷基是经取代或未经取代的 C_3 - C_7 环烷基,每个经取代或未经取代的杂环烷基是经取代或未经取代的3元到7元杂环烷基,每个经取代或未经取代的芳基是经取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基,和/或每个经取代或未经取代的杂芳基是经取代或未经取代的5元到9元杂芳基。在一些实施例中,每个经取代或未经取代的亚烷基是经取代或未经取代的 C_1 - C_8 亚烷基,每个经取代或未经取代的亚杂烷基是经取代或未经取代的2元到8元亚杂烷基,每个经取代或未经取代的亚环烷基是经取代或未经取代的 C_3 - C_7 亚环烷基,每个经取代或未经取代的亚杂环烷基是经取代或未经取代的3元到7元亚杂环烷基,每个经取代或未经取代的亚芳基是经取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基,和/或每个经取代或未经取代的亚杂芳基是经取代或未经取代的5元到9元亚杂芳基。在一些实施例中,化合物是以下实例章节、附图或表格中所述的化学物种。

[0079] 在实施例中,经取代或未经取代的部分(例如,经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基和/或经取代或未经取代的亚杂芳基)是未经取代的(例如,分别为未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基、未经取代的杂芳基、未经取代的亚烷基、未经取代的亚杂烷基、未经取代的亚环烷基、未经取代的亚杂环烷基、未经取代的亚芳基和/或未经取代的亚杂烷基)。在实施例中,经取代或未经取代的部分(例如,经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基和/或经取代或未经取代的亚杂芳基)是经取代的(例如,分别为经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基、经取代的杂芳基、经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂烷基)。

[0080] 在实施例中,经取代的部分(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基、经取代的杂芳基、经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基

基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基取代,其中如果经取代的部分被多个取代基取代,则每个取代基可以任选地不同。在实施例中,如果取代的部分被多个取代基取代,则每个取代基不同。

[0081] 在实施例中,经取代的部分(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基、经取代的杂芳基、经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个大小受限的取代基取代,其中如果经取代的部分被多个大小受限的取代基取代,则每个大小受限的取代基可以任选地不同。在实施例中,如果经取代的部分被多个大小受限的取代基取代,则每个大小受限的取代基不同。

[0082] 在实施例中,经取代的部分(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基、经取代的杂芳基、经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个低级取代基取代,其中如果经取代的部分被多个低级取代基取代,则每个低级取代基可以任选地不同。在实施例中,如果经取代的部分被多个低级取代基取代,则每个低级取代基不同。

[0083] 在实施例中,经取代的部分(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基、经取代的杂芳基、经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的部分被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,如果经取代的部分被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基不同。

[0084] 本公开的某些化合物具有不对称碳原子(光学或手性中心)或双键;根据绝对立体化学,可以定义为氨基酸的(R)-或(S)-或(D)-或(L)-的对映异构体、外消旋物、非对映异构体、互变异构体、几何异构体、立体等距形式以及单独的异构体均涵盖在本公开的范围内。本公开的化合物不包含本领域中已知的太不稳定而无法进行合成和/或分离的化合物。本公开旨在包含呈外消旋形式和光学纯形式的化合物。光学活性(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂来制备,或使用常规技术来解析。当本文所述的化合物含有烯烃键或几何不对称的其它中心时,并且除非另外指明,否则意图是这些化合物包含E几何异构体和Z几何异构体两者。

[0085] 如本文所使用的,术语“异构体”是指具有相同数量和种类的原子,并且因此具有相同分子量但在原子的结构布置或配置方面不同的化合物。

[0086] 如本文所使用的,术语“互变异构体”是指平衡存在并且容易由一种异构形式转化为另一种异构形式的两种或更多种结构异构体之一。对于本领域的技术人员将显而易见的是,本公开的某些化合物可以以互变异构形式存在,所述化合物的所有此类互变异构形式均处于本公开的范围内。

[0087] 除非另外说明,否则本文描绘的结构还旨在包含所述结构的所有立体化学形式;即,每个不对称中心的R配置和S配置。因此,本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映

异构体混合物和非对映异构体混合物均处于本公开的范围。除非另外说明,否则本文所述的结构还旨在包含仅在一或多个同位素富集的原子是否存在方面不同的化合物。例如,具有除了由氘或氚替换氢或由 ^{13}C -或 ^{14}C -富集的碳替换碳之外的本发明结构的化合物处于本公开的范围。本公开的化合物还可以在构成这种化合物的一个或多个原子上含有非天然比例的原子同位素。例如,化合物可以用如例如氚(^3H)、碘-125(^{125}I)或碳-14(^{14}C)等放射性同位素进行放射性标记。本公开的化合物的所有同位素变化(不论是放射性的还是非放射性的)均涵盖在本公开的范围。

[0088] 应注意,在整个申请中,替代方案书写在Markush基团中,例如含有多于一个可能氨基酸的每个氨基酸位置中。特别设想了,Markush基团的每个成员应单独考虑,从而包括另一实施例,并且Markush基团不应被理解为单一单位。

[0089] 如本文所使用的,术语“生物缀合物反应性部分”和“生物缀合物反应性基团”是指由于生物缀合物反应性基团的原子或分子之间的缔合而能够形成生物缀合物(例如,共价接头)的部分或基团。缔合可以是直接的或间接的。例如,本文提供的第一生物缀合物反应性基团(例如, $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、N-羟基琥珀酰亚胺或-马来酰亚胺)与第二生物缀合物反应性基团(例如,巯基、含硫氨基酸、胺、含有氨基酸的胺侧链或羧酸盐)之间的缀合可以例如通过共价键或接头(例如第二接头的第一接头)直接进行,或例如通过非共价键(例如静电相互作用(例如离子键、氢键、卤素键)、范德华(van der Waals)相互作用(例如,偶极-偶极、偶极诱导的偶极、伦敦分散)、环堆积(π 效应)、疏水相互作用等)间接进行。在实施例中,生物缀合物或生物缀合物接头是使用生物缀合物化学(即两个生物缀合物反应性基团的缔合)形成的,所述生物缀合物化学包含但不限于亲核取代(例如,胺和醇与酰基卤、活性酯的反应)、亲电取代(例如,烯胺反应)以及碳-碳和碳-杂原子多重键的加成(例如,迈克尔(Michael)反应、狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)加成)。这些和其它有用的反应在以下中文文献进行了讨论:例如, March,《高级有机化学(ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY)》,第3版,约翰威利父子公司(John Wiley&Sons),纽约(New York),1985;Hermanson,《生物缀合物技术(BIOCONJUGATE TECHNIQUES)》,学术出版社(Academic Press),圣地亚哥(San Diego),1996;和Feeney等人,《蛋白质的修饰(MODIFICATION OF PROTEINS)》;化学进展系列,第一卷,198,美国化学学会(American Chemical Society),华盛顿特区(Washington,D.C.),1982。在实施例中,第一生物缀合物反应性基团(例如,马来酰亚胺部分)共价连接到第二生物缀合物反应性基团(例如巯基)。在实施例中,第一生物缀合物反应性基团(例如,卤代乙酰基部分)共价连接到第二生物缀合物反应性基团(例如巯基)。在实施例中,第一生物缀合物反应性基团(例如,吡啶基部分)共价连接到第二生物缀合物反应性基团(例如巯基)。在实施例中,第一生物缀合物反应性基团(例如,N-羟基琥珀酰亚胺部分)共价连接到第二生物缀合物反应性基团(例如巯基)。在实施例中,第一生物缀合物反应性基团(例如,马来酰亚胺部分)共价连接到第二生物缀合物反应性基团(例如巯基)。在实施例中,第一生物缀合物反应性基团(例如,-磺基-N-羟基琥珀酰亚胺部分)共价连接到第二生物缀合物反应性基团(例如氨基)。

[0090] 用于本文的生物缀合物化学的有用的生物缀合物反应性部分包含,例如:(a)羧基及其各种衍生物,包含但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酸性卤化物、酰基咪唑、硫代酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳香族酯;(b)可以转化为酯、醚、醛等的

羟基。(c) 卤代烷基, 其中卤化物可以之后用亲核基团 (如例如胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、碳负离子或醇盐离子) 置换, 从而导致新的基团共价连接在卤素原子的位点处; (d) 亲二烯基, 所述亲二烯基能够参与狄尔斯-阿尔德反应, 如例如马来酰亚胺基或马来酰亚胺基团; (e) 醛基或酮基, 所述醛基或酮基使得可以通过羰基衍生物 (如例如亚胺、脎、半卡巴脎或脎) 的形成或通过如格氏 (Grignard) 加成或烷基锂加成等机制进行随后的衍生化; (f) 磺酰卤基, 所述磺酰卤基用于随后与胺反应, 例如以形成磺酰胺; (g) 硫醇基, 所述硫醇基可以转化为二硫化物, 与酰基卤反应, 或与如金等金属键合, 或与马来酰亚胺反应; (h) 胺基或巯基 (例如, 存在于半胱氨酸中), 所述胺基或巯基可以被例如酰化、烷基化或氧化; (i) 烯烃, 所述烯烃可以经历例如环加成、酰化、迈克尔加成等; (j) 环氧化物, 所述环氧化物可以与例如胺和羟基化合物反应; (k) 亚磷酰胺和可用于核酸合成的其它标准官能团; (l) 金属氧化硅键合; (m) 与反应性磷基 (例如膦) 的金属键合, 以形成例如磷酸二酯键; (n) 使用铜催化的环加成点击化学将叠氮化物连接到炔烃; (o) 生物素缀合物可以与抗生物素蛋白或抗生物素链菌素 (streptavidin) 反应, 以形成抗生物素蛋白-生物素复合物或抗生物素链菌素-生物素复合物。可以选择生物缀合物反应性基团, 使得其不参与或不干扰本文所描述的缀合物的化学稳定性。可替代地, 可以通过保护基团的存在来保护反应性官能团不参与交联反应。在实施例 1 中, 生物缀合物包括衍生自如马来酰亚胺等不饱和键与巯基的分子实体。

[0091] “类似物 (Analog 或 analogue)” 是根据其在化学和生物学内的普通一般含义使用的, 并且是指例如在一个原子被不同元素的原子替换中, 或在特定官能团存在的情况下, 或一个官能团被另一个官能团替换中, 或参考化合物的一个或多个手性中心的绝对立体化学中, 与另一化合物 (即, 所谓的“参考”化合物) 在结构上类似但在组成上不同的化合物。因此, 类似物是与参考化合物在功能和外观上类似或相当, 但在结构或来源上不类似或不相当的化合物。

[0092] 如本文所使用的, 术语“一个 (a/an)” 是指一个或多个。另外, 如本文所使用的, 短语“被 [n]... 取代” 意指指定基团可以被所指名的取代基中的任何或全部取代基中的一个或多个取代。例如, 当如烷基或杂芳基等基团“被未经取代的 C_1-C_{20} 烷基或未经取代的 2 元到 20 元杂烷基取代” 时, 所述基团可以含有一个或多个未经取代的 C_1-C_{20} 烷基, 和/或一个或多个未经取代的 2 元到 20 元杂烷基。此外, 在部分被 R 取代基取代的情况下, 所述基团可以被称为“R 取代的”。在部分被 R 取代的情况下, 所述部分被至少一个 R 取代基取代, 并且每个 R 取代基任选地不同。当在化学属 (如式 (I)) 的描述中存在特定 R 基团时, 可以使用罗马字母符号来区分所述特定 R 基团的每种外观。例如, 在存在多个 R^{13} 取代基的情况下, 每个 R^{13} 取代基可以被区分为 R^{13A} 、 R^{13B} 、 R^{13C} 、 R^{13D} 等, 其中 R^{13A} 、 R^{13B} 、 R^{13C} 、 R^{13D} 等中的每一个均在 R^{13} 的定义范围内定义并且任选地不同。

[0093] “可检测剂” 或“可检测部分” 是通过适当手段 (如光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学、磁共振成像或其它物理手段) 可检测的物质、化合物、元素、分子或组合物。例如, 有用的可检测剂包含 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 ^{99m}Tc 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 $^{154-158}Gd$ 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、

Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、Lu、³²P、荧光团(例如荧光染料)、电子致密试剂、酶(例如, ELISA中常用的酶)、生物素、地高辛(digoxigenin)、顺磁性分子、顺磁性纳米颗粒、超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒、USPIO纳米颗粒聚集体、超顺磁性氧化铁(“SPIO”)纳米颗粒、SPIO纳米颗粒聚集体、单晶体氧化铁纳米颗粒、单晶体氧化铁、纳米颗粒造影剂、含有钆螯合物(“Gd-螯合物”)分子的脂质体或其它递送媒剂、钆、放射性同位素、放射性核素(例如碳-11、氮-13、氧-15、氟-18、铷-82)、氟脱氧葡萄糖(例如氟-18标记的)、任何发射 γ 射线的放射性核素、发射正电子的放射性核素、放射性标记的葡萄糖、放射性标记的水、放射性标记的氨、生物胶体、微泡(例如包含微泡壳,包含白蛋白、半乳糖、脂质和/或聚合物;微泡气芯,包含空气、一种或多种重气体、全氟化碳、氮气、八氟丙烷、全氟烷脂质微球,全氟醚等)、碘化造影剂(例如碘海醇、碘克沙醇、碘佛醇、碘帕醇、碘昔兰、碘普罗胺、泛影酸盐、甲泛影酸、碘克酸)、硫酸钡、二氧化钍、金、金纳米颗粒、金纳米颗粒聚集体、荧光团、双光子荧光团或半抗原和蛋白质或其它实体,所述其它实体可例如通过将放射性标记掺入与靶肽特异性反应的肽或抗体中而检测到。可检测部分是单价可检测剂或能够与另一种组合物形成键的可检测剂。

[0094] 可以用作根据本公开的实施例的成像和/或标记剂的放射性物质(例如,放射性同位素)包含但不限于¹⁸F、³²P、³³P、⁴⁵Ti、⁴⁷Sc、⁵²Fe、⁵⁹Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷⁷As、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Sr、⁸⁹Zr、⁹⁴Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、⁹⁹Mo、¹⁰⁵Pd、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Er、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹At、²¹¹Pb、²¹²Bi、²¹²Pb、²¹³Bi、²²³Ra和²²⁵Ac。可以用作根据本公开的实施例的另外的成像剂的顺磁性离子包含但不限于过渡离子和镧系金属(例如原子序数为21-29、42、43、44或57-71的金属)。这些金属包含Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb和Lu的离子。

[0095] 对本公开的化合物的描述受本领域技术人员已知的化学键合原理的限制。因此,在基团可以被多个取代基中的一个或多个取代的情况下,选择此类取代以便符合化学键合原理并且得到并非固有地不稳定和/或如本领域普通技术人员已知的将可能在环境条件下(如水性、中性和几种已知的生理条件下)不稳定的化合物。例如,杂环烷基或杂芳基,按照本领域技术人员已知的化学键合原理,通过环杂原子与分子的其余部分连接,从而避免固有地不稳定的化合物。

[0096] 本领域普通技术人员将理解,当化合物或化合物属(例如,本文所述的属)的变量(例如,部分或接头)通过具有所有填充的化合价的独立化合物的名称或分子式描述时,变量的一个或多个未填充化合价将由使用该变量的上下文决定。例如,当本文所述的化合物的变量通过单键连接(例如,键合)至化合物的其余部分时,该变量应被理解为表示独立化合物的单价形式(即,由于未填充的化合价而能够形成单键)(例如,在一个实施例中,如果变量被命名为“甲烷”,但是已知该变量通过单键连接至化合物的其余部分,则本领域普通技术人员将理解,该变量实际上是甲烷的单价形式,即甲基或-CH₃)。同样,对于接头变量(例如,如本文所述的L¹、L²或L³),本领域普通技术人员将理解,该变量是独立化合物的二价形式(例如,在一个实施例中,如果变量被指定为“PEG”或“聚乙二醇”但该变量通过两个单独的键连接至化合物的其余部分,则本领域普通技术人员将理解,该变量是PEG的二价形式(即,能够通过两个未填充的化合价形成两个键),而不是独立化合物PEG)。

[0097] 术语“药学上可接受的盐”旨在包含根据在本文所述化合物上发现的特定取代基用相对无毒的酸或碱制备的活性化合物的盐。当本公开的化合物含有相对酸性的官能团时,可以通过使中性形式的此类化合物与足够量的期望的碱(纯净的或于合适的惰性溶剂中)接触来获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐的实例包含钠盐、钾盐、钙盐、铵盐、有机胺盐或镁盐或类似盐。当本公开的化合物含有相对碱性的官能团时,酸加成盐可以通过使中性形式的此类化合物与足够量的所希望的酸纯净地或于适合的惰性溶剂中接触来获得。药学上可接受的酸加成盐的实例包含衍生自以下无机酸的酸加成盐:如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、一氢碳酸、磷酸、一氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、一氢硫酸、氢碘酸或亚磷酸等;以及衍生自以下相对无毒的有机酸的盐:如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、乳酸、杏仁酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、草酸、甲磺酸等。还包含如精氨酸盐等氨基酸的盐,以及如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等有机酸的盐(参见,例如,Berge等人,“药用盐 (Pharmaceutical Salts)”,《药物科学杂志 (Journal of Pharmaceutical Science)》,1977,66,1-19)。本公开的某些特定化合物含有允许这些化合物转化为碱加成盐或酸加成盐的碱性官能团和酸性官能团两者。因此,本公开的化合物可以以盐(如具有药学上可接受的酸)的形式存在。本公开包含此类盐。此类盐的非限制性实例包含盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、丙酸盐、酒石酸盐(例如,(+)-酒石酸盐、(-)-酒石酸盐或其混合物,包含外消旋混合物)、琥珀酸盐、苯甲酸盐和如谷氨酸等氨基酸的盐以及季铵盐(例如甲基碘、乙基碘等)。这些盐可以通过本领域的技术人员已知的方法制备。化合物的中性形式优选地通过使盐与碱或酸接触并且以常规方式分离母体化合物而再生。化合物的母体形式可以在某些物理性质上不同于各种盐形式,如在极性溶剂中的溶解度。

[0098] 除盐形式外,本公开还提供了前药形式的化合物。本文所述的化合物的前药是易于在生理条件下经历化学变化从而提供本公开的化合物的那些化合物。本文所述的化合物的前药可以在施用后在体内转化。另外,可以在离体环境中(如例如当与合适的酶或化学试剂接触时)通过化学或生化方法将前药转化为本公开的化合物。

[0099] 本公开的某些化合物可以非溶剂化形式以及溶剂化形式(包含水合形式)存在。一般来讲,溶剂化形式等同于非溶剂化形式,并且被涵盖在本公开的范围内。本公开的某些化合物可以以多种结晶或无定形形式存在。一般来讲,所有物理形式对于由本公开所设想的用途是等效的,并且旨在处于本公开的范围内。

[0100] “药学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的载剂”是指有助于向受试者施用活性剂并且有助于受试者吸收的物质,并且所述物质可以包含在本公开的组合物中而不会对患者引起显著不良的毒理学作用。药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包含水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸化林格氏(Ringer's)液、普通蔗糖、普通葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、调味剂、盐溶液(如林格氏溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物(如乳糖、直链淀粉或淀粉)、脂肪酸酯、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和颜料等。此类制剂可以进行灭菌,并且如果需要的话,可以与助剂(如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色物质和/或芳香物质等)混合,所述助剂不与本公开的化合物有害地反应。本领域的技术人员将认识到,其它药用赋形剂在本公开中是有用的。

[0101] 术语“制剂”旨在包含活性化合物与提供胶囊的载剂形式的包封材料的调配物,在

所述胶囊中,具有或不具有其它载剂的活性组分被载剂包围,所述活性组分由此与所述载剂缔合。类似地,包含了扁囊剂和锭剂。片剂、粉剂、胶囊、丸剂、扁囊剂以及锭剂可以用作适用于口服施用的固体剂型。

[0102] 如本文所使用的,术语“约”意指包含指定值的值的范围,本领域普通技术人员会认为所述值合理地类似于指定值。在实施例中,约意指使用本领域通常可接受的测量结果在标准偏差内。在实施例中,约意指范围扩展到指定值的 $\pm 10\%$ 。在实施例中,约包含指定值。

[0103] “接触”根据其普通一般含义使用,并且是指使至少两个不同的物种(例如,包含生物分子或细胞的化学化合物)变得足够接近以进行反应、相互作用或物理触摸的过程。然而,应理解;所得反应产物可以由所添加的试剂之间的反应直接产生,或由来自所添加的试剂中的一种或多种试剂的可以在反应混合物中产生的中间体产生。术语“接触”可以包含允许两个物种反应、相互作用或物理触摸,其中所述两个物种可以是如本文所述的化合物和蛋白质或酶。在一些实施例中,接触包含允许本文所述的化合物与信号传导路径中涉及的蛋白质或酶相互作用。

[0104] 如本文所定义的,关于蛋白质-抑制剂相互作用的术语“活化(activation/activate/activating)”、“活化剂(activator)”等意指,相对于在不存在活化剂的情况下的蛋白质的活性或功能,正面地影响(例如增加)蛋白质的活性或功能。在实施例中,活化意指相对于在不存在活化剂的情况下的蛋白质的浓度或水平,正面地影响(例如增加)蛋白质的浓度或水平。术语可以参考活化(activation或activating)、敏化或上调信号转导或酶促活性或疾病中降低的蛋白质的量。因此,活化可以至少部分地包含部分或完全增加刺激、增加或启动活化、敏化或上调信号转导或酶活性或与疾病有关的蛋白质(例如,相对于非患病对照在疾病中降低的蛋白质)的量。活化可以至少部分地包含部分或完全增加刺激、增加或启动活化、敏化或上调信号转导或酶活性或蛋白质的量

[0105] 术语“激动剂”、“活化剂”、“上调剂”等是指能够可检测地增加给定基因或蛋白质的表达或活性的物质。与不存在激动剂的情况下的对照相比,激动剂可以使表达或活性增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些情况下,与不存在激动剂的情况下的表达或活性相比,表达或活性高1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更高。

[0106] 如本文所定义的,关于蛋白质-抑制剂相互作用的术语“抑制(inhibition/inhibit/inhibiting等)”意指,相对于在不存在抑制剂的情况下的蛋白质的活性或功能,负面地影响(例如降低)蛋白质的活性或功能。在实施例中,抑制意指相对于在不存在抑制剂的情况下的蛋白质的浓度或水平,负面地影响(例如降低)蛋白质的浓度或水平。在实施例中,抑制是指疾病或疾病的症状减少。在实施例中,抑制是指特定蛋白质靶标的活性降低。因此,抑制至少部分地包含部分或完全阻断刺激、降低、预防或延迟活化、脱敏或下调信号转导或酶活性或蛋白质的量。在实施例中,抑制是指由直接相互作用(例如,抑制剂与靶蛋白结合)造成的靶蛋白的活性降低。在实施例中,抑制是指由间接相互作用引起的靶蛋白的活性降低(例如,抑制剂与活化靶蛋白的蛋白质结合,从而防止靶蛋白活化)。

[0107] 可互换地,术语“抑制剂(inhibitor)”、“阻遏物(repressor)”或“拮抗剂(antagonist)”或“下调剂(downregulator)”是指能够可检测地降低给定基因或蛋白质的表达或活性的物质。与不存在拮抗剂的情况下的对照相比,拮抗剂可以使表达或活性降低

10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些情况下,与不存在拮抗剂的情况下的表达或活性相比,表达或活性低1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更低。

[0108] 术语“RNF4”和“环指蛋白4”是指E3连接酶蛋白(包含同系物、同工型及其功能片段)。所述术语包含维持RNF4活性(例如,与野生型RNF4相比,至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%活性内)的任何重组形式或天然存在形式的RNF4变体。在实施例中,由RNF4基因编码的RNF4蛋白具有在Entrez 6047、UniProt P78317、RefSeq(蛋白)NP_002929、RefSeq(蛋白)NP_001171939或RefSeq(蛋白)NP_001171938中列出或对应于其的氨基酸序列。在实施例中,氨基酸序列或核酸序列是在提交本申请时已知的序列。在实施例中,RNF4是人RNF4,如引起人类癌症的RNF4。在实施例中,RNF4具有以下序列:

[0109] MSTRKRRGGAINSRQAQKRTREATSTPEISLEAEPIELVETAGDEIVDLTCESELPVVVD
LTHNDSVVIVDERRRPRRNARRLPQDHADSCVSSDDEELSRDRDVYVTTHTPRNARDEG
ATGLRPSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFCSCQLRDSLKNANTCPTCRKKI
NHKRYHPYI (SEQ ID NO: 1)。

[0110] 术语“RNF114”和“环指蛋白114”以及“ZNF228”和“ZNF313”是指E3连接酶蛋白(包含同系物、同工型及其功能片段)。所述术语包含维持RNF114活性(例如,与野生型RNF114相比,至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%活性内)的任何重组形式或天然存在形式的RNF4变体。在实施例中,由RNF4基因编码的RNF114蛋白具有在Entrez 55905、UniProtQ9Y508或RefSeq(蛋白)NP_061153中列出或对应于其的氨基酸序列。在实施例中,氨基酸序列或核酸序列是在提交本申请时已知的序列。在实施例中,RNF114是人RNF114,如引起人类癌症的RNF114。在实施例中,RNF114具有以下序列:

[0111] MAAQQRDCGGAAQLAGPAAEADPLGRFTCPVCLEVYEKPVQVPCGHVFCSSACLQECLKPK
KPVCGVCRSALAPGVRAVELERQIESTETSCHGCRKNFFLSKIRSHVATCSKYQNYIMEG
VKATIKDASLQPRNVPNRYTFPCPYCPEKNFDQEGLEHCKLFHSTDTKSVVCPICASMP
WGDPNYRSANFREHIQRRHRFSYDTFVDYDVDEEDMMNQVLQRSIIDQ (SEQ ID NO: 2)。

[0112] 术语“BRD4”和“含溴结构域的蛋白质4”是指在有丝分裂过程中与染色体缔合的蛋白质,其在跨细胞分裂和转录调控的表观遗传记忆传递中起关键作用。在实施例中,由BRD4基因编码的BRD4蛋白具有在Entrez23476、UniProt060885、RefSeq(蛋白)NP_001317313.1、RefSeq(蛋白)NP_055114.1或RefSeq(蛋白)NP_490597.1中列出或对应于其的氨基酸序列。在实施例中,氨基酸序列或核酸序列是在提交本申请时已知的序列。在实施例中,BRD4具有以下序列:

MSAESGPGTRLRNLPVMDGLETSQMSTTQAQAQPQANAASTNPPPPETSNNPKPKRQT
 NQLQYLLRVVLKTLWKHQFAWPFQQPVDAVKLNLPDYKIIKTPMDMGTIKKRLNNYYW
 NAQECIQDFNTMFTNICYIYNKPGDDIVLMAEAEKLFQKINELPTEETEIMIVQAKGRG
 RGRKETGTAKPGVSTVPNTTQASTPPQTQTPQNPVQATPHFPFAVTPDLIVQTPVMT
 VVPPQLQTPPPVPPQPPPPAPAPQPVQSHPIIAATPQPVKTKKGVKRKADTTTPTTI
 DPIHEPPSLPPEPKTTKLGRRESSRPVKPPKKDVPDSQQHPAPEKSSKVSEQLKCCSGI
 LKEMFAKKHAAAYAWPFYKPVDEALGLHDYCDIHKHPMDMSTIKSKLEAREYRDAQEFGA
 DVRLMFSNCKYKNPPDHEVVAMARKLQDVFMRFKMPDEPEEPVVAVSSPAVPPPTKV
 [0113] APPSSSDSSSDSSSDSDSSTDDSEEERAQRLAELQEQLKAVHEQLAALSQPQQNKPKKKE
 KDKKEKKKEKHKRKEEVEENKSKAKEPPPKTKKNNSSNSNVSKKEPAPMKSKPPPTYE
 SEEEDKCKPMSYEEKRQLSLDINKLPGEKLGRVVHIIQSREPSLKNSNPDEIEIDFETLK
 PSTLRELERYVTSLRKKRKPQAEKVDVIAGSSKMKGFSSSESSSSSSSDSEDSETE
 MAPKSKKKGHPGREQKHHHHHHHQQMQQAPAPVPQQPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP
 PPPSMPQQAAPAMKSSPPFIATQVPVLEPQLPGSVFDPIGHFTQPIHLHPQELPPLP
 QPPEHSTPHLNLQHAVVSPALHNALPQQPSRPSNRAAALPPKPARPPAVSPALTQTPLL
 PQPPMAQPPQVLEDEEPPAPPLTSMQMQLYLQQLQKVQPPTPLLPSVKVQSQPPPLPP
 PPHPSVQQQLQQQPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP
 HPPPGQQPPPPQPAKPQQVIQHHSRHHKSDPYSTGHLREAPSPLMIHSPQMSQFQSLT
 HQSPPQQNVQPKQELRAASVVQPQLVVVKEEKIHSPIRSEPFSPSLRPEPPKHPESI
 [0114] KAPVHLPQRPEMKPVDVGRPVIRPEQNAPPPGAPDKDKQKQEPKTPVAPKDLKIKNMG
 SWASLVQKHPTTSSSTAKSSSDSFEQFRRAAREKEEREKALKAQAEHAEKEKERLRQERM
 RSREDEDALEQARRAHEEARRRQEQQQQQRQEQQQQQQQQAAAVAAAATPQAQSSQPQS
 MLDQQRELARKREQERRRREAMAATIDMNFQSDLLSIFEENLF (SEQ ID NO: 3)。

[0115] 术语“表达”包含涉及多肽产生的任何步骤,包含但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰以及分泌。可以使用用于检测蛋白质的常规技术(例如,ELISA、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫荧光、免疫组织化学等)来检测表达。

[0116] 术语“调节剂(modulator)”是指相对于不存在调节剂的情况,增加或降低靶分子的水平或靶分子的功能或分子靶标的物理状态的组合物。术语“调节(modulate)”根据其普通一般含义使用,并且是指改变或更改一个或多个性质的动作。“调节(Modulation)”是指改变或更改一个或多个性质的过程。

[0117] 在与疾病相关的物质或物质的活性或功能的上下文中,术语“相关”或“与...相关”意指所述疾病(全部或部分)由所述物质或物质的活动或功能引起,或所述疾病的症状(全部或部分)由所述物质或物质的活动或功能引起。

[0118] 如本文所使用的,术语“异常”是指与正常不同。当用于描述酶促活性或蛋白质功能时,异常是指大于或小于正常对照或正常非患病对照样品的平均值的活性或功能。异常活性可以指代引起疾病的活性的量,其中使异常活性返回到正常或非疾病相关联的量(例如,通过施用化合物或使用如本文所描述的方法)会导致疾病或一种或多种疾病症状减少。

[0119] 如本文所使用的,术语“信号传导路径”是指细胞与任选的细胞外组分(例如蛋白质、核酸、小分子、离子、脂质)之间的一系列相互作用,所述相互作用将一个组分中的变化传递给一个或多个其它组分,进而可以将变化传递给另外的组分,所述变化任选地被传播到其它信号传导路径组分。

[0120] 在本公开中,“包括(comprise/comprising)”、“含有(containing)”和“具有(having)”等可以具有美国专利法赋予其的含义并且可以意指“包含(include/including)”等。“基本上由...组成(consisting essentially of或consists essentially)”同样具有美国专利法中赋予的含义并且该术语是开放性的,从而允许超出所叙述的存在,只要所叙述的基本或新颖特征不被超出所叙述的存在改变,但是排除现有

技术实施例。

[0121] 术语“疾病”或“病状”是指能够用本文所提供的化合物或方法治疗的患者或受试者所处的状态或健康状况。所述疾病可以是癌症。所述疾病可以是自身免疫性疾病。所述疾病可以是炎性疾病。所述疾病可以是感染性疾病。在一些另外的情况下，“癌症”是指人类癌症和癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病等，包含实体和淋巴瘤、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、神经胶质瘤、食道癌和肝癌(包含肝肿瘤(hepatocarcinoma))、淋巴瘤(包含B急性淋巴母细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's Lymphoma)(例如，伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、小细胞淋巴瘤和大细胞淋巴瘤)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma))、白血病(包含AML、ALL和CML)或多发性骨髓瘤。

[0122] 如本文所使用的，术语“癌症”是指在哺乳动物(例如，人)中发现的所有类型的癌症、肿瘤或恶性肿瘤，包含白血病、淋巴瘤、癌和肉瘤。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的示例性癌症包含脑癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、前列腺癌、结直肠癌、胰腺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、宫颈癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、头部癌症、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)和非霍奇金氏淋巴瘤。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的示例性癌症包含甲状腺癌、内分泌系统癌、脑癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肝癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、直肠癌、胃癌和子宫癌。另外的实例包含甲状腺癌、胆管癌、胰腺癌、皮肤恶性黑色素瘤、结肠腺癌、直肠腺癌、胃腺癌、食管癌、头颈部鳞状细胞癌、浸润性乳腺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、原发性脑肿瘤、恶性胰腺岛瘤、恶性类癌、尿膀胱癌、癌变前皮肤损伤、睾丸癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、食管癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、内分泌或外分泌胰腺肿瘤、甲状腺髓样癌(medullary thyroid cancer)、甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma)、黑色素瘤、结直肠癌、乳头状甲状腺癌、肝细胞癌或前列腺癌。

[0123] 术语“白血病”是指血液形成器官的渐进性、恶性疾病，并且总体上其特征在于白细胞及其前体在血液和骨髓中的失调增殖和发展。白血病通常在临床上基于以下各项进行分类：(1)疾病的持续时间和特征-急性的或慢性的；(2)所涉及的细胞的类型；髓样(骨髓性的)、淋巴样(淋巴性的)或单核细胞的；以及(3)异常细胞在血液中的数量的增加或非增加-白血病性或非白血病性(亚白血病性)。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的示例性白血病包含例如急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、成人T细胞白血病、非白血病性白血病(a leukemic leukemia)、白血病性白血病(a leukocytic leukemia)、嗜碱细胞性白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎性白血病、嗜酸性粒细胞白血病、格罗氏白血病(Gross' leukemia)、毛细胞白血病、成血细胞性白血病(hemoblastic leukemia)、成血细胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴球性白血病(lymphogenous leukemia)、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、微成髓细胞性白血病

(micromyeloblastic leukemia)、单核细胞性白血病、成髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓样粒细胞性白血病、髓单核细胞白血病、内格利氏白血病(Naegeli leukemia)、浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞性白血病、早幼粒细胞白血病、里德尔氏细胞白血病(Rieder cell leukemia)、希林氏白血病(Schilling's leukemia)、干细胞白血病、亚白血病性白血病和未分化细胞白血病。

[0124] 如本文所使用的,术语“淋巴瘤”是指影响造血和淋巴组织的一组癌症。其开始于淋巴细胞(主要在淋巴结、脾脏、胸腺和骨髓中发现的血细胞)。淋巴瘤的两种主要类型是非霍奇金氏淋巴瘤和霍奇金氏病。霍奇金氏病占有所有诊断出的淋巴瘤的大约15%。这是与里德-斯泰伯格氏(Reed-Sternberg)恶性B淋巴细胞相关的癌症。非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)可以基于癌症的生长速率和所涉及的细胞类型进行分类。存在侵略性(高等级)和惰性(低等级)类型的NHL。基于所涉及的细胞类型,存在B细胞和T细胞NHL。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的示例性B细胞淋巴瘤包含但不限于小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴结外(MALT)淋巴瘤、结节性(单核细胞样B细胞)淋巴瘤、脾脏淋巴瘤、弥漫性大细胞B淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤或前体B淋巴母细胞淋巴瘤。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的示例性T细胞淋巴瘤包含但不限于皮肤T细胞淋巴瘤(cunateous T-cell lymphoma)、外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、蕈样真菌病和前体T淋巴母细胞淋巴瘤。

[0125] 术语“肉瘤”通常是指由类似于胚胎结缔组织的物质组成的肿瘤,并且通常由包埋在纤维状或均质物质中的紧密堆积的细胞构成。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的肉瘤包含软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、阿贝西肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肉瘤、脂肪肉瘤、腺泡状软部分肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄样肉瘤、绿色癌肉瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、威尔姆斯氏瘤肉瘤(Wilms'tumor sarcoma)、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金肉瘤、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤、B细胞的免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞的免疫母细胞肉瘤、詹森氏肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、库普弗细胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤、白血病性肉瘤(leukosarcoma)、恶性间皮瘤肉瘤、骨膜外肉瘤、网状细胞肉瘤、劳斯氏肉瘤(Rous sarcoma)、浆液性囊肿肉瘤(serocystic sarcoma)、滑膜肉瘤或毛细血管扩张性肉瘤(telangiectaltic sarcoma)。

[0126] 术语“黑色素瘤”应理解为源自皮肤和其它器官的黑色素细胞系统的肿瘤。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的黑色素瘤包含例如肢端雀斑样痣黑色素瘤、无黑色素性黑色素瘤、良性幼年黑色素瘤、克劳德曼黑色素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑色素瘤、哈丁-帕西黑色素瘤(Harding-Passey melanoma)、少年黑色素瘤、恶性雀斑样痣、恶性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、甲下黑色素瘤或浅表扩散性黑色素瘤。

[0127] 术语“癌”是指由上皮细胞组成的恶性新生长,倾向于浸润周围组织并引起转移。可以用本文所提供的化合物或方法治疗的示例性癌包含例如甲状腺髓样癌、家族性甲状腺髓样癌、腺泡癌、腺泡状癌、腺样囊性癌(adenocystic carcinoma)、腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma)、腺癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底样细胞瘤、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑状癌、胆管

细胞癌、绒毛膜癌、胶样癌、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、管癌、硬癌、胚胎癌、髓样癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、外植癌、溃疡性癌 (carcinoma ex ulcere)、纤维癌、胶样癌 (gelatiniform carcinoma)、胶状癌、巨大细胞癌、巨细胞癌、腺癌、粒层细胞癌、毛母质癌 (hair-matrix carcinoma)、血样癌 (hematoid carcinoma)、肝细胞癌、贺氏细胞腺癌 (Hurthle cell carcinoma)、玻质状癌 (hyaline carcinoma)、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克龙派切尔氏癌 (Krompecher's carcinoma)、库尔奇茨基细胞癌 (Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌、豆状癌 (lenticular carcinoma)、豆状癌 (carcinoma lenticulare)、脂瘤样癌、淋巴上皮癌、髓质癌、髓性癌、黑色素癌、软癌、粘液癌、粘液性癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液质癌、粘液样癌、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化性癌 (carcinoma ossificans)、骨样癌 (osteoid carcinoma)、乳头状癌、门静脉周癌、浸润前癌、棘细胞癌、软糊状癌 (pultaceous carcinoma)、肾脏肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德癌 (schneiderian carcinoma)、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、髓状癌 (carcinoma spongiosum)、鳞状癌、鳞状细胞癌、string癌 (string carcinoma)、血管扩张性癌 (carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌 (carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌、结节性皮癌 (carcinoma tuberosum)、结节性皮癌 (tuberous carcinoma)、疣状癌或绒毛状癌。

[0128] 如本文所使用的,术语“转移”、“转移性”和“转移性癌症”可互换使用,并且指代增殖性疾病或病症 (例如,癌症) 从一个器官向另一个不相邻的器官或身体部分的扩散。“转移性癌症”也被称为“IV期癌症”。

[0129] 术语“治疗 (treating或treatment)”是指成功治疗或改善损伤、疾病、病理或病状的任何指标,包含任何客观或主观参数,如,消除;缓解;减轻症状或使得损伤、病理或病状对患者而言更易忍受;减缓退化或衰退的速度;或使退化的最终点较少衰退;改善患者的身体或精神健康。症状的治疗或改善可以基于客观或主观参数;包含身体检查、神经精神病学检查和/或精神病学评估的结果。术语“治疗”及其缀合可以包含预防损伤、病理、病状或疾病。在实施例中,治疗是预防。在实施例中,治疗不包含预防。如本文所使用的 (并且在本领域中被充分理解的),“治疗 (treating或treatment)”还广泛地包含用于在受试者的病状中获得有益的或期望的结果 (包含临床结果) 的任何方法。有益的或期望的临床结果可以包含但不限于:减轻或改善一种或多种症状或病状、减轻疾病程度、稳定 (即,不恶化) 疾病状态、预防疾病传播或扩散、延迟或减缓疾病进展、改善或缓解疾病状态、减少疾病复发以及缓解 (无论是部分的还是全部的,以及无论是可检测的还是不可检测的)。换句话说,如本文所使用的,“治疗”包含对疾病的任何治愈、改善或预防。治疗可以预防疾病发生;抑制疾病扩散;缓解疾病的症状 (例如,眼痛、看到光晕、红眼、极高的眼内压)、完全或部分去除疾病的根本原因、缩短疾病的持续时间或这些事物的组合。如本文所使用的,“治疗 (Treating和treatment)”包含预防性治疗。治疗方法包含向受试者施用治疗有效量的活性剂。施用步骤可以由单次施用组成,或者可以包含一系列施用。治疗期的长度取决于多种因素,如病状的严重程度、患者的年龄、活性剂的浓度、在治疗中所使用的组合物的活性或其组合。还应当理解,用于治疗或预防的药剂的有效剂量可以在特定治疗或预防方案的过程中增加或减少。通过本领域中已知的标准诊断测定,剂量的变化可以产生并且变得显而易见。在一些情

况下,可能需要慢性施用。例如,以足以治疗患者的量向受试者施用组合物,且持续足够的持续时间。在实施例中,治疗(treating或treatment)不是预防性治疗。

[0130] 术语“预防”是指减少患者的疾病症状的发生。如上所述,预防可以是完全的(没有可检测的症状)或部分的,使得观察到比不存在治疗时可能发生的症状更少的症状。

[0131] “患者”或“有需要的受试者”是指遭受或易于遭受可以通过施用如本文所提供的药物组合物进行治疗的疾病或病状的活生物体。非限制性实例包含人、其它哺乳动物、牛科动物、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、牛、鹿和其它非哺乳动物。在一些实施例中,患者是人。

[0132] “有效量”是相对于不存在化合物的情况,足以使化合物实现所陈述目的(例如实现其所施用的效果、治疗疾病、降低酶活性、增加酶活性、降低信号传导路径或降低疾病或病状的一种或多种症状)的量。“有效量”的实例是足以促成治疗、预防或减少疾病的一种或多种症状的量,所述量也可以被称为“治疗有效量”。一种或多种症状(和此短语的语法等同物)的“减少”意指降低一种或多种症状的严重程度或频率,或消除一种或多种症状。药物的“预防有效量”是当施用于受试者时,将具有预期的预防效果的药物的量,例如预防或延迟损伤、疾病、病理或病状的发作(或复发)或降低损伤、疾病、病理或病状或其症状发作(或复发)的可能性。完全预防效果不一定通过施用一次剂量发生,并且可以在仅施用一系列剂量之后发生。因此,预防有效量可以以一次或多次施用的形式施用。如本文所使用的,“活性降低量”是指相对于不存在拮抗剂的情况,降低酶的活性所需的拮抗剂的量。如本文所使用的,“功能破坏量”是指相对于不存在拮抗剂的情况,破坏酶或蛋白质的功能所需的拮抗剂的量。精确量将取决于治疗的目的,并且将可由本领域的技术人员使用已知的技术确定(参见例如,Lieberman,《医药剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)》(第1-3卷,1992);Lloyd,《医药学混配的艺术、科学和技术(The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)》(1999);Pickar,《剂量计算(Dosage Calculations)》(1999);以及《雷明顿:医药科学和实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第20版,2003,Gennaro编辑,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams&Wilkins))。

[0133] 对于本文所描述的任何化合物,治疗有效量可以最初根据细胞培养测定确定。目标浓度将是能够实现本文所述方法的一种或多种活性化合物的浓度,如使用本文所描述或本领域已知的方法所测量的。如本领域所熟知的,用于人的治疗有效量也可以根据动物模型确定。例如,可以调配针对人的剂量以实现已发现对动物有效的浓度。人体内的剂量可以通过监测化合物有效性以及如上文所描述的上调或下调剂量来调整。基于以上所描述的方法和其它方法调整剂量以实现在人类中的最大功效完全处于普通技术人员的能力内。

[0134] 如本文所使用的,术语“治疗有效量”是指如上文所描述的足以改善病症的治疗剂的量。例如,对于给定参数,治疗有效量将显示增加或降低至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%。治疗功效也可以表示为“倍数”增加或减少。例如,治疗有效量可以相对于对照具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多的效果。

[0135] 剂量可以根据患者的需要和所采用的化合物而变化。在本公开的上下文中,向患者施用的剂量应足以随时间推移而在患者体内产生有益治疗反应。剂量的大小也将通过任何不良副作用的存在、性质和程度确定。针对特定情况来确定适当的剂量是在执业者的技能之内的。通常,治疗开始于比化合物的最优剂量小的较小剂量。其后,剂量以小增量增加直到达到在这些情况下的最优效果。可以单独调整给药的量和间隔,以提供所施用化合物

的对所治疗的特定临床适应症有效的水平。这将提供与个体疾病状态的严重程度相称的治疗方案。

[0136] 如本文所使用的,术语“施用”意指向受试者口服施用、以栓剂形式施用、局部接触、静脉内、肠胃外、腹膜内、肌肉内、病灶内、鞘内、鼻内或皮下施用,或植入缓慢释放装置(例如,微型渗透泵)。通过任何途径进行施用,包含肠胃外和经粘膜(例如,颊、舌下、腭、牙龈、鼻、阴道、直肠或经皮)。肠胃外施用包含例如静脉内、肌肉内、动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内施用。其它递送模式包含但不限于使用脂质体调配物、静脉内输注、经皮贴剂等。在实施例中,施用不包含施用除了所叙述的活性剂之外的任何活性剂。

[0137] “共施用物”,其意指,在施用一种或多种另外的疗法的同时、恰好之前或恰好之后,施用本文所描述的组合物。本文提供的化合物可以单独施用或可以共施用于患者。共给药旨在包含化合物(多于一种化合物)单独或以组合形式同时或依序给药。因此,制剂还可以在需要时与其它活性物质组合(例如以减少代谢性降解)。本公开的组合物可以经皮、通过局部途径递送,或被调配成施用棒、溶液、悬浮液、乳液、凝胶、乳膏、软膏、糊剂、果胶、涂剂、粉剂和气雾剂。

[0138] 如本文所使用的“细胞”是指执行足以保持或复制其基因组DNA的代谢功能或其它功能的细胞。细胞可以通过本领域众所周知的方法来鉴定,包含例如完整膜的存在、特定染料染色、产生子代的能力或在配子的情况下与第二配子组合以产生活的后代的能力。“干细胞”是特征在于通过有丝分裂进行自我更新的能力和分化成组织或器官的潜力的细胞。在哺乳动物干细胞之中,可以区分胚胎干细胞(ES细胞)和体干细胞(例如,HSC)。胚胎干细胞存留在胚泡中并产生胚胎组织,而体干细胞存留在成体组织中以用于组织再生和修复的目的。

[0139] “对照”或“对照实验”根据其普通一般含义使用,并且是指其中如在平行实验中一样对实验的受试者或试剂进行处理的实验,不同之处在于省略了实验的程序、试剂或变量。在一些实例中,对照在评估实验效果中被用作比较的标准。在一些实施例中,对照是在不存在如本文(包含实施例和实例)所述的化合物的情况下,蛋白质的活性的度量。

[0140] “抗癌剂(Anti-cancer agent和anticancer agent)”按照其普通一般含义使用,并且是指具有抗肿瘤性质的组合物、化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂、肽、蛋白质、核酸或具有抗肿瘤性质或抑制细胞生长或增殖的能力的分子。在一些实施例中,抗癌剂是化学治疗剂。在一些实施例中,抗癌剂是本文鉴定的在治疗癌症的方法中具有效用的药剂。在一些实施例中,抗癌剂是由FDA或除美国以外国家的类似监管机构批准的用于治疗癌症的药剂。抗癌剂的实例包含但不限于抗雄激素(例如,康士得(Casodex)、氟他胺(Flutamide)、MDV3100或ARN-509)、MEK(例如,MEK1、MEK2或MEK1和MEK2)抑制剂(例如,XL518、CI-1040、PD035901、司美替尼(selumetinib)/AZD6244、GSK1120212/曲美替尼(trametinib)、GDC-0973、ARRY-162、ARRY-300、AZD8330、PD0325901、U0126、PD98059、TAK-733、PD318088、AS703026、BAY 869766)、烷基化剂(例如,环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、白消安(busulfan)、美法仑(melphalan)、甲氮芥(mechlorethamine)、乌拉莫司汀(uramustine)、噻替哌(thiotepa)、亚硝基脲、氮芥(例如,氯乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑)、亚乙基亚胺和甲基三聚氰胺(例如,六甲基三聚氰胺、噻替哌)、烷基磺酸盐(例如,白消安)、亚硝基脲(例如,卡莫司汀(carmustine)、洛美司汀(lomustine)、司莫司

汀(semustine)、链佐星(streptozocin)、三氮烯(氮烯咪胺(decarbazine))、抗代谢物(例如,5-硫唑嘌呤、亚叶酸、卡培他滨(capecitabine)、氟达拉滨(fludarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、培美曲塞(pemetrexed)、雷替曲塞(raltitrexed)、叶酸类似物(例如,甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如,氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷)、嘌呤类似物(例如,巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin)等)、植物生物碱(例如,长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、长春地辛(vindesine)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)等)、拓扑异构酶抑制剂(例如,伊立替康(irinotecan)、拓扑替康(topotecan)、安吡啶(amsacrine)、依托泊苷(etoposide)(VP16)、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、替尼泊苷(teniposide)等)、抗肿瘤抗生素(例如,多柔比星(doxorubicin)、阿霉素(adriamycin)、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)、放线菌素(actinomycin)、博来霉素(bleomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、普卡霉素(plicamycin)等)、铂基化合物(例如,顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaloplatin)、卡铂(carboplatin))、蒽醌(例如,米托蒽醌)、经取代的尿素(例如,羟基脲)、甲基胍衍生物(例如,丙卡巴肼(procarbazine))、肾上腺皮质激素抑制剂(例如,米托坦(mitotane)、氨鲁米特(aminogluthetimide))、表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)(例如,依托泊苷)、抗生素(例如,柔红霉素、多柔比星、博来霉素)、酶(例如,L-天冬酰胺酶)、促分裂原活化蛋白激酶信号传导的抑制剂(例如U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY43-9006、渥曼青霉素(wortmannin)或LY294002)、mTOR抑制剂、抗体(例如,利妥昔单抗(rituxan))、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、多柔比星、长春新碱、依托泊苷、吉西他滨、伊马替尼(imatinib)(Gleevec.RTM.)、格尔德霉素(geldanamycin)、17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-AAG)、硼替佐米(bortezomib)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、阿那曲唑(anastrozole);血管生成抑制剂;抗雄激素、抗雌激素;反义寡核苷酸;细胞凋亡基因调节剂;细胞凋亡调节剂;精氨酸脱氨酶;BCR/ABL拮抗剂; β 内酰胺衍生物;bFGF抑制剂;比卡鲁胺(bicalutamide);喜树碱(camptothecin)衍生物;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);氯米芬(clomifene)类似物;阿糖胞苷达克珠单抗(cytarabine dacliximab);地塞米松(dexamethasone);雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑(etanidazole);磷酸依托泊苷;依西美坦(exemestane);法倔唑(fadrozole);非那雄胺(finasteride);氟达拉滨;氟代柔红霉素盐酸盐;钆替沙林(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;合普素凡(hepsulfam);免疫增强药肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白细胞介素;来曲唑(letrozole);白血病抑制因子;白细胞干扰素 α ;亮丙瑞林+雌性激素+黄体酮;抑那通(leuprorelin);基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;MIF抑制剂;米非司酮(mifepristone);错配的双链RNA;单克隆抗体;分枝杆菌细胞壁提取物;一氧化氮调节剂;奥沙利铂;帕诺米芬(panomifene);朋脱若唑(pentrozole);磷酸酶抑制剂;纤溶酶原活化物抑制剂;铂络合物;铂化合物;泼尼松(prednisone);蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;ras法尼斯基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;酶性核酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;溶基质素抑制剂;合成粘多糖;它莫昔芬(tamoxifen)甲碘化物;端粒酶抑制剂;促甲状

腺激素;翻译抑制剂;酪氨酸激酶抑制剂;尿激酶受体拮抗剂;类固醇(例如,地塞米松)、非那雄胺、芳香酶抑制剂、促性腺激素释放激素激动剂(GnRH)(如戈舍瑞林(goserelin)或亮丙瑞林)、肾上腺皮质类固醇(例如,泼尼松)、孕激素(例如,己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮)、雌激素(例如,己烯雌酚、炔雌醇)、抗雌激素(例如,它莫昔芬)、雄激素(例如,丙酸睾酮、氟甲睾酮)、抗雄激素(例如,氟他胺)、免疫刺激剂(例如,卡介苗(BCG)、左旋咪唑、白介素-2、 α -干扰素等)、单克隆抗体(例如,抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR和抗VEGF单克隆抗体)、免疫毒素(例如,抗CD33单克隆抗体-卡奇霉素(calicheamicin)缀合物、抗CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素缀合物等)、放射免疫疗法(例如,与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 等缀合的抗CD20单克隆抗体)、雷公藤甲素(triptolide)、高三尖杉酯碱(homoharringtonine)、更生霉素(dactinomycin)、多柔比星、表柔比星、托泊替康、伊曲康唑(itraconazole)、长春地辛、西立伐他汀(cerivastatin)、长春新碱、脱氧腺苷、舍曲林(sertraline)、匹伐他汀(pitavastatin)、伊立替康、氯法齐明(clofazimine)、5-壬基氧色胺、维罗非尼(vemurafenib)、达拉非尼(dabrafenib)、厄洛替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、EGFR抑制剂、靶向表皮生长因子受体(EGFR)的疗法或治疗剂(例如,吉非替尼(IressaTM)、厄洛替尼(TarcevaTM)、西妥昔单抗(cetuximab)(ErbixTM)、拉帕替尼(lapatinib)(TykerbTM)、帕尼单抗(panitumumab)(VectibixTM)、凡德他尼(vandetanib)(CaprelsaTM)、阿法替尼(afatinib)/BIBW2992、CI-1033/卡奈替尼(canertinib)、来那替尼(neratinib)/HKI-272、CP-724714、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、ARRY-380、AG-1478、达克替尼(dacomitinib)/PF299804、OSI-420/去甲基厄洛替尼、AZD8931、AEE788、培利替尼(pelitinib)/EKB-569、CUDC-101、WZ8040、WZ4002、WZ3146、AG-490、XL647、PD153035、BMS-599626)、索拉非尼(sorafenib)、伊马替尼、舒尼替尼(sunitinib)、达沙替尼(dasatinib)、吡咯并苯二氮卓类药物(例如,托马霉素(tomaymycin))、卡铂、CC-1065和CC-1065类似物(包含氨基-CBI)、氮芥(例如,苯丁酸氮芥和美法仑)、多拉司他汀(dolastatin)和多拉司他汀类似物(包含瑞奥西汀(auristatin):例如,单甲基溴瑞西汀E)、蒽环霉素抗生素(如多柔比星、柔红霉素等)、杜卡霉素(duocarmycin)和杜卡霉素类似物、烯二炔(如新制癌菌素(neocarzinostatin)和卡奇霉素)、来普霉素(leptomycin)衍生物、美登木素生物碱(maytansinoid)和美登木素生物碱类似物(例如,美登素(mertansine))、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、紫杉醇、长春花生物碱(如长春花碱和长春新碱)、埃博霉素(epothilone)(例如,埃博霉素B)、喜树碱及其临床类似物托泊替康和伊立替康等。

[0141] 化合物的“特异性(Specific/specifically/specificity)”等是指化合物对特定分子靶标产生特定作用(如抑制)而对细胞中其它蛋白质的作用很小或没有作用的能力。

[0142] 术语“亲电化学部分”或“亲电部分”根据其普通一般化学含义使用,并且是指亲电的化学基团(例如,单价化学基团)。

[0143] 术语“不可逆共价键”按照其在本领域中的普通一般含义使用,并且是指(例如,亲电化学部分和亲核部分)的原子或分子之间产生的缔合,其中解离的可能性低。在实施例中,不可逆共价键在正常生物学条件下不容易解离。在实施例中,不可逆共价键是通过两种物质(例如,亲电化学部分和亲核部分)之间的化学反应形成的。

[0144] 如本文所使用的,术语“能够结合”是指能够可测量地结合至靶标的部分(例如本文所述的化合物)(例如,E3泛素连接酶结合剂能够与E3泛素连接酶的半胱氨酸形成共价

键)。在实施例中,当部分能够结合靶标时,所述部分能够以小于约10 μ M、5 μ M、1 μ M、500nM、250nM、100nM、75nM、50nM、25nM、15nM、10nM、5nM、1nM或约0.1nM的Kd结合。

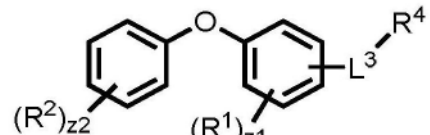
[0145] 如本文所使用的,术语“靶蛋白降解剂”是指能够在靶蛋白(例如,所关注的蛋白质)上诱导蛋白质降解的药剂(例如,化合物或组合物)。通常,靶蛋白降解剂能够将E3连接酶募集到特定的蛋白质靶标上,从而以蛋白酶体依赖性方式泛素化并降解靶标。由于对降解剂功效而言靶标的功能抑制不是必需的,因此该策略具有靶向并降解蛋白质组中存在配体的任何蛋白质的潜力(例如,靶蛋白结合剂或靶蛋白降解剂)。

[0146] 术语“靶蛋白结合剂”是指能够结合蛋白质(例如,靶蛋白)的部分。在实施例中,靶蛋白质结合剂是与蛋白质(例如,靶蛋白)形成复合物的分子或物质。在实施例中,靶蛋白质结合剂是与蛋白质(例如,靶蛋白)形成复合物的分子或物质的单价形式。

[0147] 术语“结合剂接头”是指结合靶蛋白结合剂和E3泛素连接酶结合剂的共价接头。

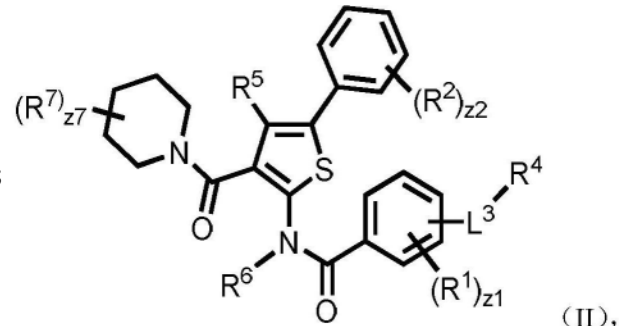
[0148] 如本文所使用的,术语“E3泛素连接酶结合剂”是指能够可测量地结合至E3泛素连接酶(E3连接酶)(例如,RNF4或RNF114)的单价药剂(例如,本文所述的单价化合物)。例如,E3泛素

连接酶结合剂是具有下式的化合物的部分或单价形式:



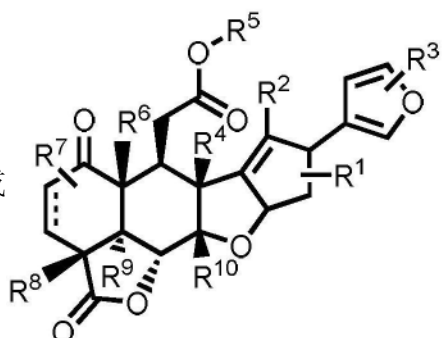
(I),

其中R²、z₂、R¹、z₁、L³和R⁴如本文所述;



(II),

z₇、R⁵、R²、z₂、L³、R⁴、R⁶、R¹和z₁如本文所述;或



(III),

R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所述。

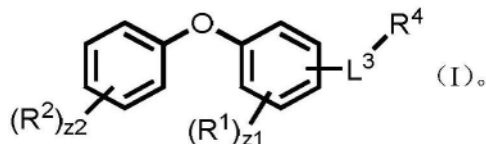
[0149] 如本文所使用的,术语“共价半胱氨酸修饰剂部分”是指能够可测量地结合至半胱氨酸氨基酸的单价亲电部分。在实施例中,共价半胱氨酸修饰剂部分通过不可逆共价键结合。在实施例中,共价半胱氨酸修饰剂部分能够以小于约10 μ M、5 μ M、1 μ M、500nM、250nM、100nM、75nM、50nM、25nM、15nM、10nM、5nM、1nM或约0.1nM的Kd结合。

[0150] II. 化合物

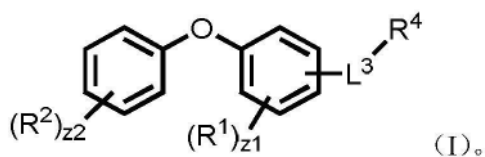
[0151] 在一个方面,提供了一种靶蛋白降解剂,其包含1) 靶蛋白结合剂和2) E3泛素连接

酶结合剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4或人RNF114。在实施例中,所述E3泛素连接酶是人RNF4。在实施例中,所述E3泛素连接酶是人RNF114。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂能够与E3泛素连接酶的半胱氨酸形成共价键。在实施例中,靶蛋白结合剂和E3泛素连接酶结合剂通过结合剂接头共价键合。

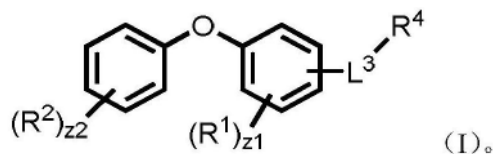
[0152] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的化合物的部分:



[0153] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



[0154] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0155] R^1 独立地为卤素、 $-CX^1_3$ 、 $-CHX^1_2$ 、 $-CH_2X^1$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{1D}$ 、 $-C(O)R^{1C}$ 、 $-C(O)-OR^{1C}$ 、 $-C(O)NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-N(O)_{m1}$ 、 $-SO_{n1}R^{1D}$ 、 $-SO_{v1}NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-NHC(O)NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-NR^{1A}SO_2R^{1D}$ 、 $-NR^{1A}C(O)R^{1C}$ 、 $-NR^{1A}C(O)OR^{1C}$ 、 $-NR^{1A}OR^{1C}$ 、 $-OCX^1_3$ 、 $-OCH_2X^1$ 、 $-OCHX^1_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^1 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。 R^2 独立地为卤素、 $-CX^2_3$ 、 $-CHX^2_2$ 、 $-CH_2X^2$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{2D}$ 、 $-C(O)R^{2C}$ 、 $-C(O)-OR^{2C}$ 、 $-C(O)NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-N(O)_{m2}$ 、 $-SO_{n2}R^{2D}$ 、 $-SO_{v2}NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-NHC(O)NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-NR^{2A}SO_2R^{2D}$ 、 $-NR^{2A}C(O)R^{2C}$ 、 $-NR^{2A}C(O)OR^{2C}$ 、 $-NR^{2A}OR^{2C}$ 、 $-OCX^2_3$ 、 $-OCH_2X^2$ 、 $-OCHX^2_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。 L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。 R^3 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CX^3_3$ 、 $-CHX^3_2$ 、 $-CH_2X^3$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{3D}$ 、 $-C(O)R^{3C}$ 、 $-C(O)-OR^{3C}$ 、 $-C(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-N(O)_{m3}$ 、 $-SO_{n3}R^{3D}$ 、 $-SO_{v3}NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NHC(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}SO_2R^{3D}$ 、 $-NR^{3A}C(O)R^{3C}$ 、 $-NR^{3A}C(O)OR^{3C}$ 、 $-NR^{3A}OR^{3C}$ 、 $-OCX^3_3$ 、 $-OCH_2X^3$ 、 $-OCHX^3_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。

基或与结合剂接头相连的键。 R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CX_3^4$ 、 $-CHX_2^4$ 、 $-CH_2X^4$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{4D}$ 、 $-C(O)R^{4C}$ 、 $-C(O)OR^{4C}$ 、 $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-N(O)_{m4}$ 、 $-SO_{n4}R^{4D}$ 、 $-SO_{v4}NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NHC(O)NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NR^{4A}SO_2R^{4D}$ 、 $-NR^{4A}C(O)R^{4C}$ 、 $-NR^{4A}C(O)OR^{4C}$ 、 $-NR^{4A}OR^{4C}$ 、 $-OCX_3^4$ 、 $-OCH_2X^4$ 、 $-OCHX_2^4$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E是亲电部分。 $z1$ 为0到4的整数。 $z2$ 为0到5的整数。每个 R^{1A} 、 R^{1B} 、 R^{1C} 、 R^{1D} 、 R^{2A} 、 R^{2B} 、 R^{2C} 、 R^{2D} 、 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{3C} 、 R^{3D} 、 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{4C} 和 R^{4D} 独立地为氢、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CHX_2$ 、 $-CH_2X$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；与同一氮原子键合的 R^{1A} 和 R^{1B} 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的杂环烷基或经取代或未经取代的杂芳基；与同一氮原子键合的 R^{2A} 和 R^{2B} 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的杂环烷基或经取代或未经取代的杂芳基；与同一氮原子键合的 R^{3A} 和 R^{3B} 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的杂环烷基或经取代或未经取代的杂芳基；与同一氮原子键合的 R^{4A} 和 R^{4B} 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的杂环烷基或经取代或未经取代的杂芳基；每个 X 、 X^1 、 X^2 、 X^3 和 X^4 独立地为 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 或 $-I$ 。 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 和 $n4$ 独立地为0到4的整数。 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $v1$ 、 $v2$ 、 $v3$ 和 $v4$ 独立地为1或2。仅一个 R^1 或一个 R^2 或一个 R^3 为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^1 为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^2 为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^3 为与结合剂接头相连的键。在实施例中，一个 R^1 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中，一个 R^2 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中，一个 R^3 独立地为与结合剂接头相连的键。一个 R^1 或一个 R^2 或一个 R^3 为与结合剂接头相连的键。

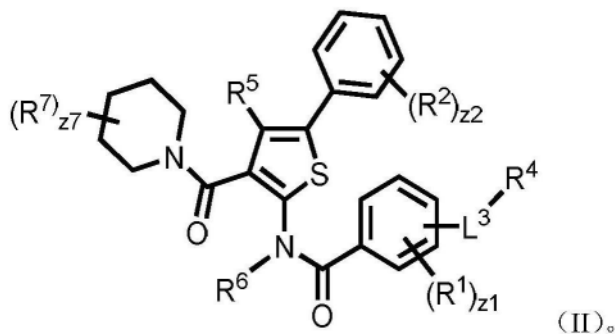
[0156] 在实施例中， R^3 独立地为氢、卤素、 $-CX_3^3$ 、 $-CHX_2^3$ 、 $-CH_2X^3$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{3D}$ 、 $-C(O)R^{3C}$ 、 $-C(O)OR^{3C}$ 、 $-C(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-N(O)_{m3}$ 、 $-SO_{n3}R^{3D}$ 、 $-SO_{v3}NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NHC(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}SO_2R^{3D}$ 、 $-NR^{3A}C(O)R^{3C}$ 、 $-NR^{3A}C(O)OR^{3C}$ 、 $-NR^{3A}OR^{3C}$ 、 $-OCX_3^3$ 、 $-OCH_2X^3$ 、 $-OCHX_2^3$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{3C} 、 R^{3D} 、 X^3 、 $n3$ 、 $m3$ 和 $v3$ 如本文所述，包含在实施例中。

[0157] 在实施例中， R^4 独立地为氢、卤素、 $-CX_3^4$ 、 $-CHX_2^4$ 、 $-CH_2X^4$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{4D}$ 、 $-C(O)R^{4C}$ 、 $-C(O)OR^{4C}$ 、 $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-N(O)_{m4}$ 、 $-SO_{n4}R^{4D}$ 、 $-SO_{v4}NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NHC(O)NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NR^{4A}SO_2R^{4D}$ 、 $-NR^{4A}C(O)R^{4C}$ 、 $-NR^{4A}C(O)OR^{4C}$ 、 $-NR^{4A}OR^{4C}$ 、 $-OCX_3^4$ 、 $-OCH_2X^4$ 、 $-OCHX_2^4$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E是亲电部分。 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{4C} 、 R^{4D} 、 X^4 、 $n4$ 、 $m4$ 和 $v4$ 如本文所述，包含在实施例中。

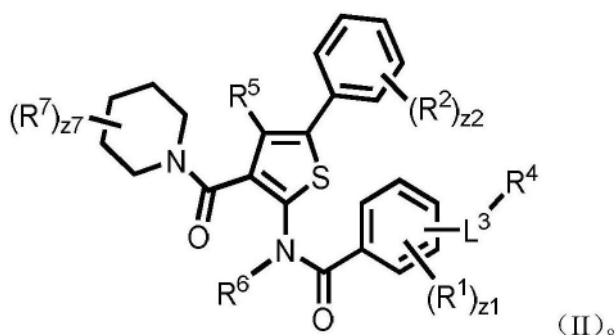
[0158] 在实施例中， R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-Cl_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取

代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^1 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。在实施例中， R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^2 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。在实施例中， L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。在实施例中， R^3 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。在实施例中， R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E为亲电部分。 z_1 为0到4的整数。 z_2 为0到5的整数。仅一个 R^1 和一个 R^2 为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^1 为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^2 为与结合剂接头相连的键。

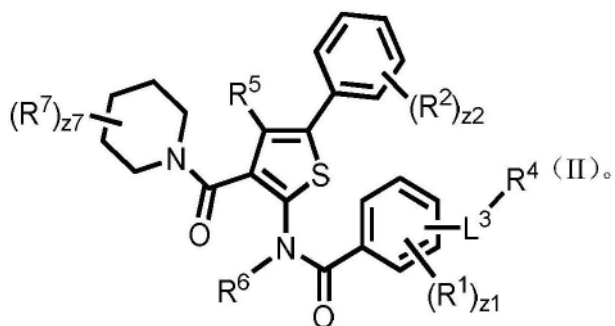
[0159] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是具有下式的化合物的部分：



[0160] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物：



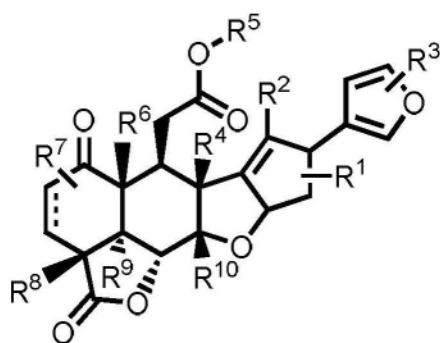
[0161] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0162] R^1 、 R^2 、 L^3 、 z_1 、 z_2 和 R^4 如本文所述。

[0163] R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。 R^7 独立地为氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^7 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。符号 z_7 为0到10的整数；在实施例中，仅一个 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 或 R^7 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^1 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^2 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^3 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^5 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^6 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中， R^7 独立地为与结合剂接头相连的键。

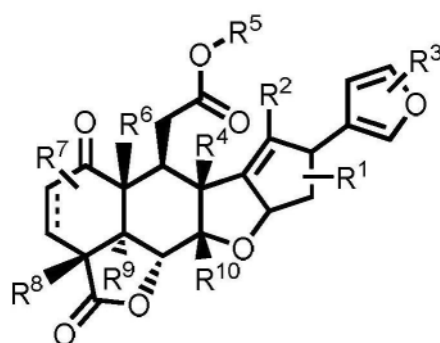
[0164] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的化合物的部分:



(III)。R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶和R⁷如本文所述。R⁸、R⁹和

R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；或与结合剂接头相连的键。仅一个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹或R¹⁰为与结合剂接头相连的键；和
||为单键或双键。

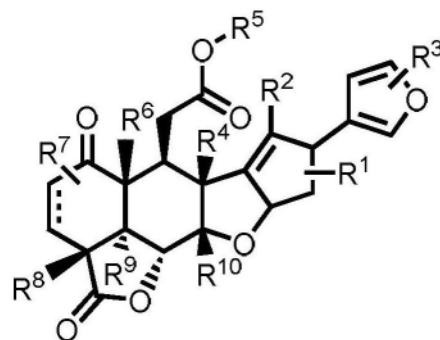
[0165] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物：



(III)。R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所

述。

[0166] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：

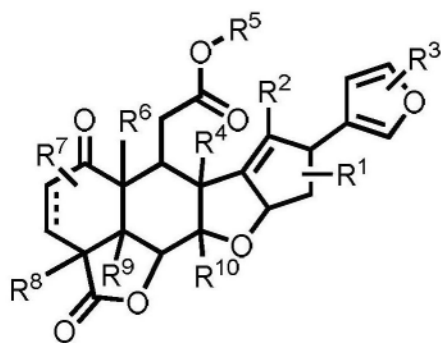


R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所

(III)。

述。

[0167] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：

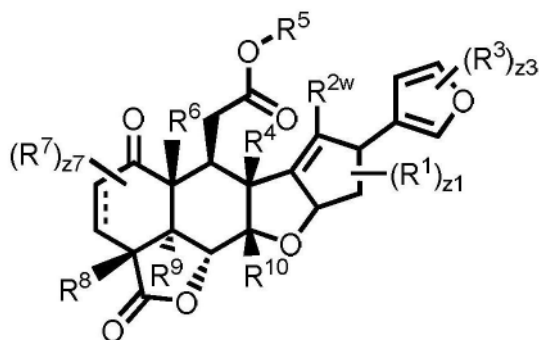


$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$ 和 R^{10} 如本文所

(IIIa)。

述。

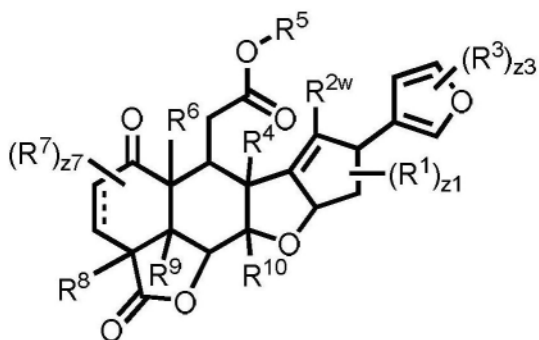
[0168] 在实施例中, E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



(III-1)。 $R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, z1$ 和

$z7$ 如本文所述。 R^{2w} 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经取代或未经取代的杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)、或与结合剂接头相连的键。符号 $z3$ 为0到3的整数。仅一个 $R^1, R^{2w}, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$ 或 R^{10} 为与结合剂接头相连的键; 和 $||$ 为单键或双键。

[0169] 在实施例中, E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



(IIIa-1)。 $R^1, R^{2w}, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$ 、

$z1, z3$ 和 $z7$ 如本文所述。

[0170] 在实施例中, R^3 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中, R^8 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中, R^9 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中, R^{10} 独立地为与结合剂接头相连的键。

[0171] 在实施例中, R^{2w} 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 R^{21} -经取代或未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、 R^{21} -经取代或未经取代的杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、 R^{21} -经取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、 R^{21} -经取代或未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、 R^{21} -经取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)、 R^{21} -经取代或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0172] 在实施例中, R^{2w} 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0173] 在实施例中, 经取代的 R^{2w} (例如, 经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代; 其中如果经取代的 R^{2w} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代; 则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中, 当 R^{2w} 被取代时, 其被至少一个取代基取代。在实施例中, 当 R^{2w} 被取代时, 其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中, 当 R^{2w} 被取代时, 其被至少一个低级取代基取代。

[0174] 在实施例中, R^{2w} 独立地为氢或经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^{2w} 独立地为氢。在实施例中, R^{2w} 独立地为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的乙基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的正丙基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R^{2w} 独立地为未经取代的叔丁基。

[0175] 在实施例中, R^3 独立地为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^3 独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^3 独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R^3 独立地为

未经取代的乙基。在实施例中, R^3 独立地为未经取代的正丙基。在实施例中, R^3 独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R^3 独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R^3 独立地为未经取代的叔丁基。

[0176] 在实施例中, z_3 为 0。在实施例中, z_3 为 1。在实施例中, z_3 为 2。在实施例中, z_3 为 3。

[0177] 在实施例中, R^7 独立地为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的乙基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的正丙基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R^7 独立地为未经取代的叔丁基。

[0178] 在实施例中, R^8 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、经取代或未经取代的杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0179] 在实施例中, R^8 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0180] 在实施例中, 经取代的 R^8 (例如, 经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基) 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代; 其中如果经取代的 R^8 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代; 则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中, 当 R^8 被取代时, 其被至少一个取代基取代。在实施例中, 当 R^8 被取代时, 其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中, 当 R^8 被取代时, 其被至少一个低级取代基取代。

[0181] 在实施例中, R^8 独立地为氢或经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^8 独立地为氢。在实施例中, R^8 独立地为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^8 独立地为

未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R⁸独立地为未经取代的甲基。在实施例中,R⁸独立地为未经取代的乙基。在实施例中,R⁸独立地为未经取代的正丙基。在实施例中,R⁸独立地为未经取代的异丙基。在实施例中,R⁸独立地为未经取代的正丁基。在实施例中,R⁸独立地为未经取代的叔丁基。

[0182] 在实施例中,R⁹独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0183] 在实施例中,R⁹独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0184] 在实施例中,经取代的R⁹(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的R⁹被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当R⁹被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当R⁹被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当R⁹被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0185] 在实施例中,R⁹独立地为氢或经取代或未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R⁹独立地为氢。在实施例中,R⁹独立地为经取代或未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的甲基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的乙基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的正丙基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的异丙基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的正丁基。在实施例中,R⁹独立地为未经取代的叔丁基。

[0186] 在实施例中,R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-

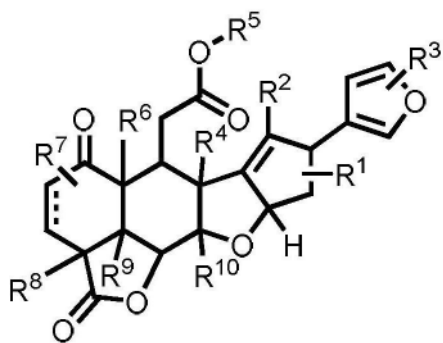
CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0187] 在实施例中,R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0188] 在实施例中,经取代的R¹⁰(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的R¹⁰被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当R¹⁰被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当R¹⁰被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当R¹⁰被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

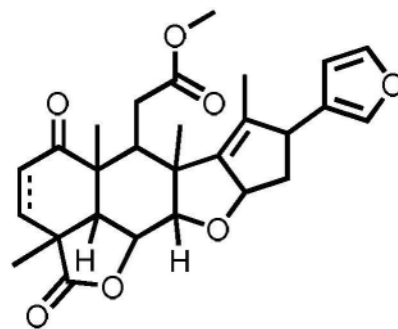
[0189] 在实施例中,R¹⁰独立地为氢或经取代或未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R¹⁰独立地为氢。在实施例中,R¹⁰独立地为经取代或未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的甲基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的乙基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的正丙基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的异丙基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的正丁基。在实施例中,R¹⁰独立地为未经取代的叔丁基。

[0190] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

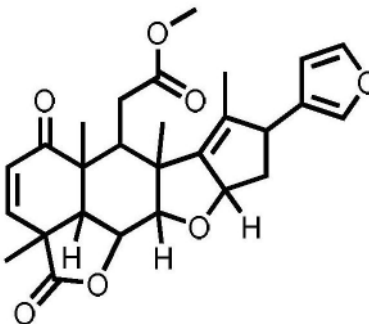


其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 如本文所

述。在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：

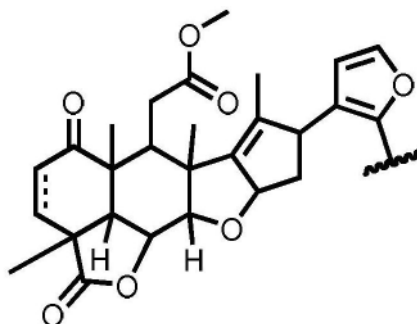


在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



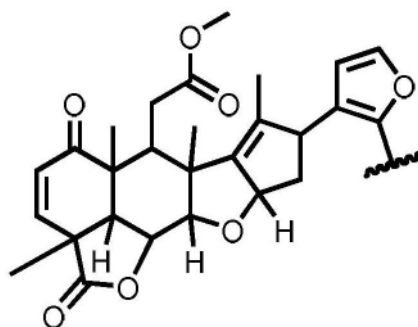
在实

施例中，E3泛素连接酶结合剂具有下式：

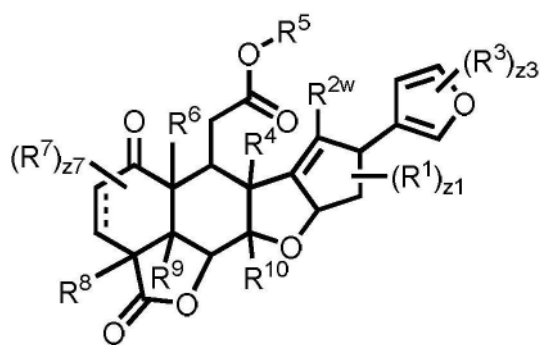


在实施例中，E3泛

素连接酶结合剂具有下式：

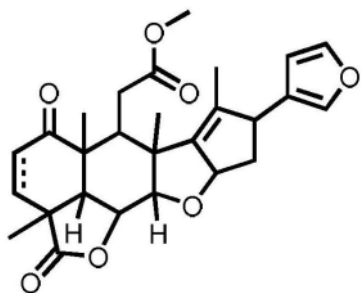


[0191] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：

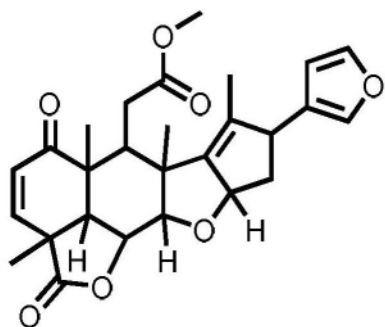


其中 R^1 、 R^{2w} 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 $z1$ 、

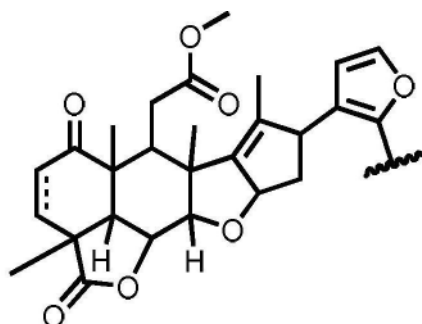
$z3$ 和 $z7$ 如本文所述。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



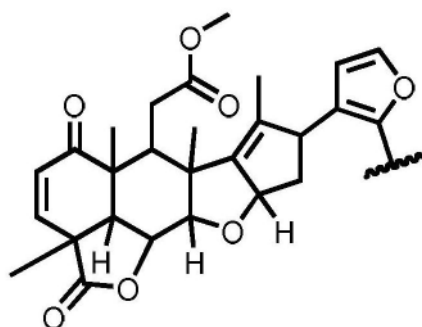
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



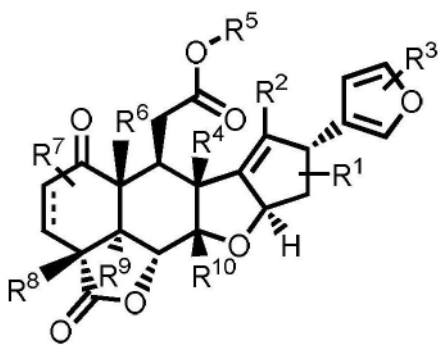
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:

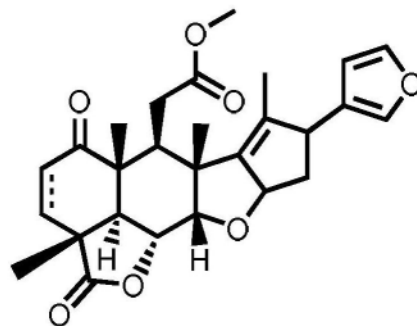


[0192] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

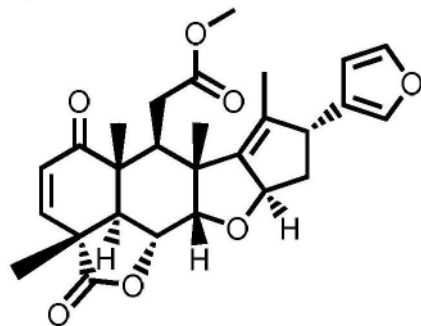


其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所

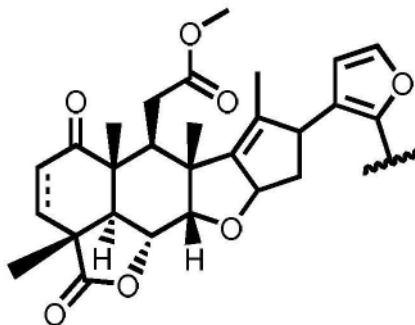
述。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

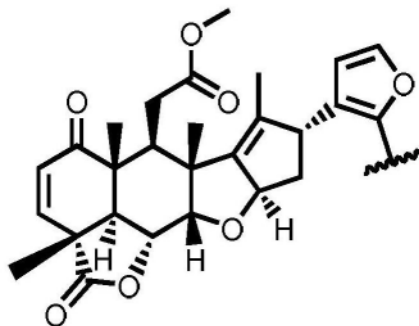


实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:

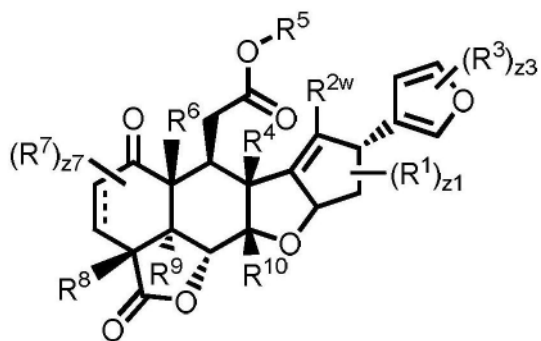


在实施例中,E3

泛素连接酶结合剂具有下式:

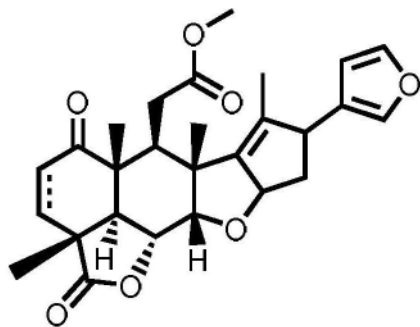


[0193] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

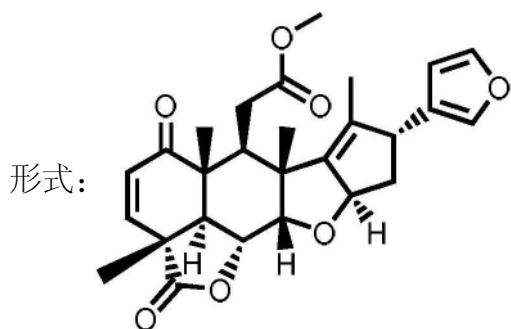


其中 R^1 、 R^{2w} 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、

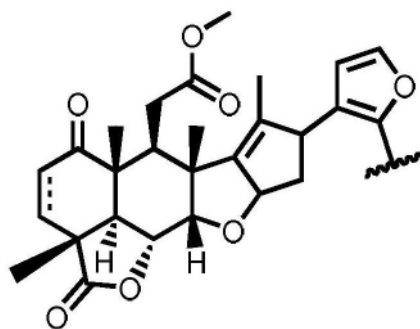
z_1 、 z_3 和 z_7 如本文所述。在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



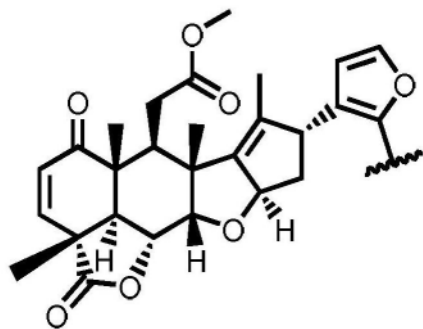
在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价



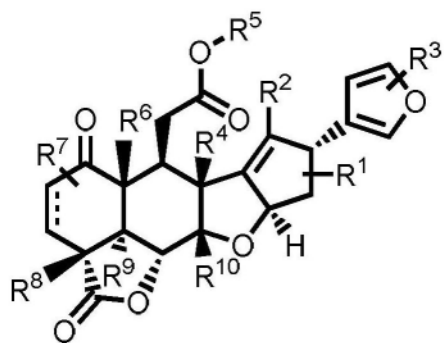
在实施例中，E3泛素连接酶结合剂具有下式：



在实施例中，E3泛素连接酶结合剂具有下式：

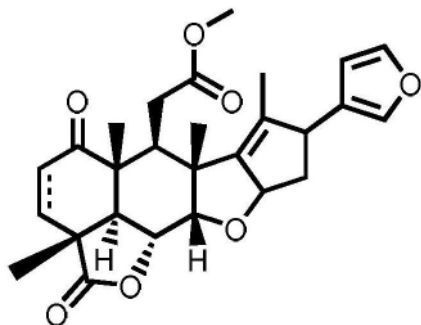


[0194] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价形式的化合物的部分：



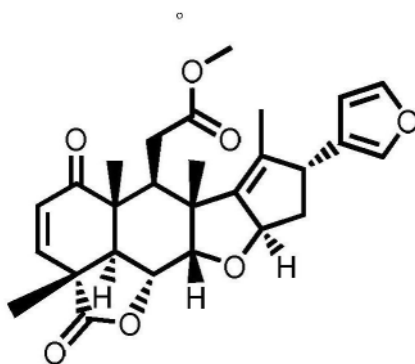
其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所述。在实施

例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价形式的化合物的部分:



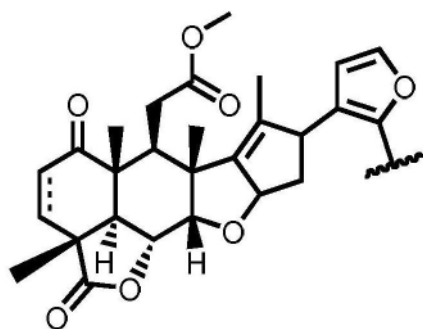
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的

单价形式的化合物的部分:



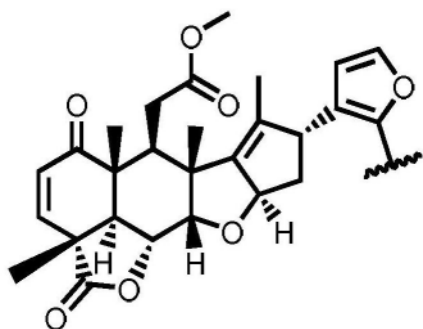
在实施例中,E3泛素连接酶结

合剂具有下式:

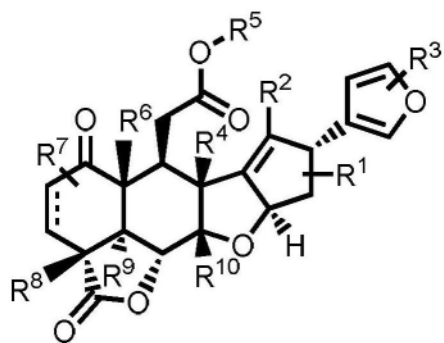


在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下

式:

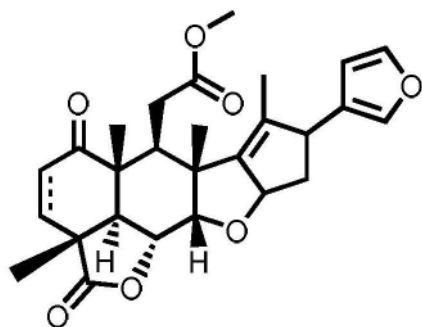


[0195] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价形式的化合物的部分:



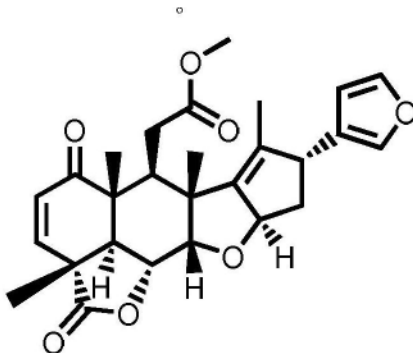
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 如本文所述。在实施

例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价形式的化合物的部分:



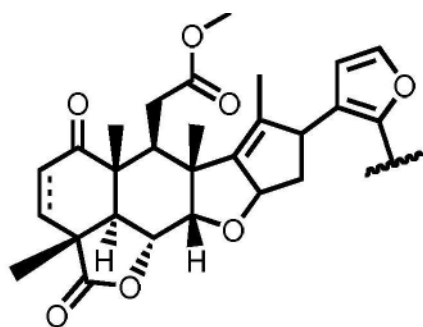
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的

单价形式的化合物的部分:



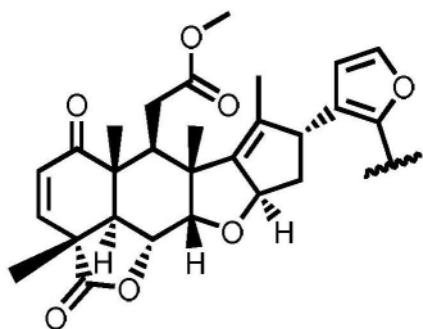
在实施例中,E3泛素连接酶结

合剂具有下式:

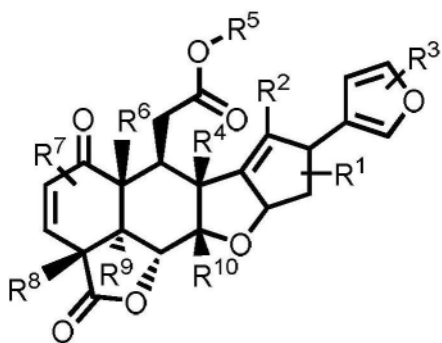


在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下

式:

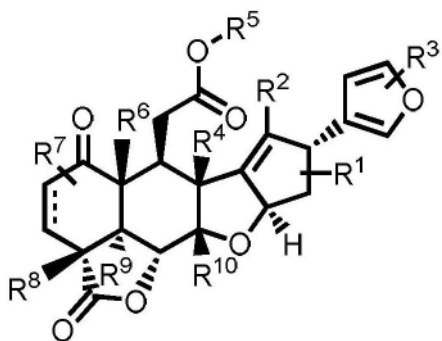


[0196] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的化合物的部分:



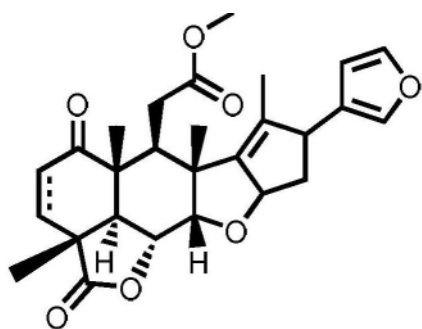
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 如本文所述。

[0197] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



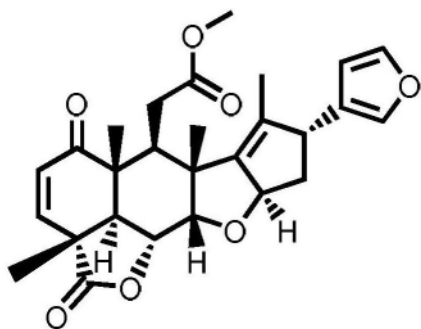
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 如本文所

述。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:

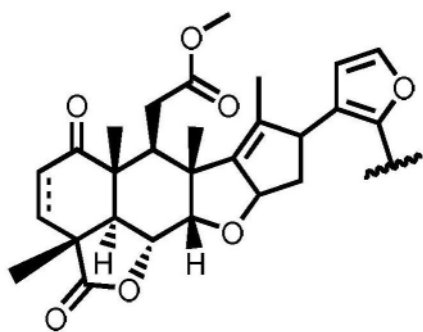


在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的

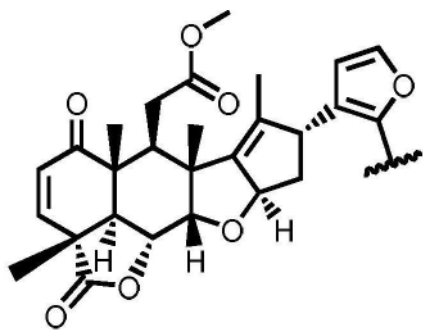
单价化合物:



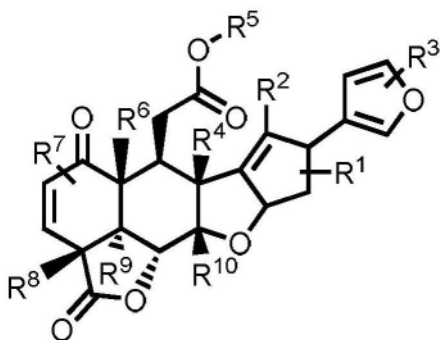
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:

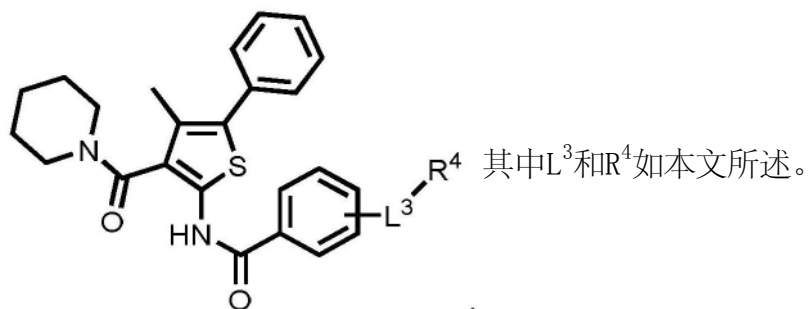


[0198] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



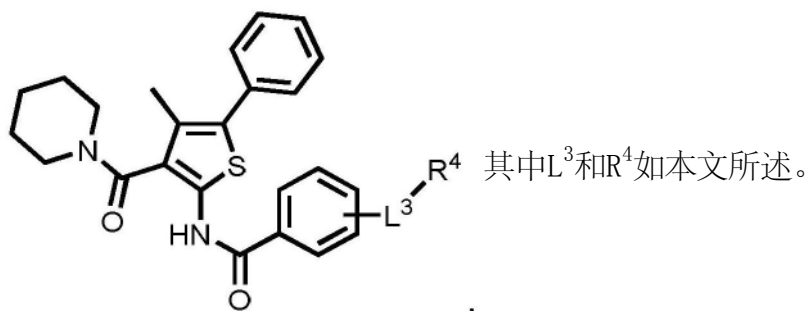
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 如本文所述。

[0199] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

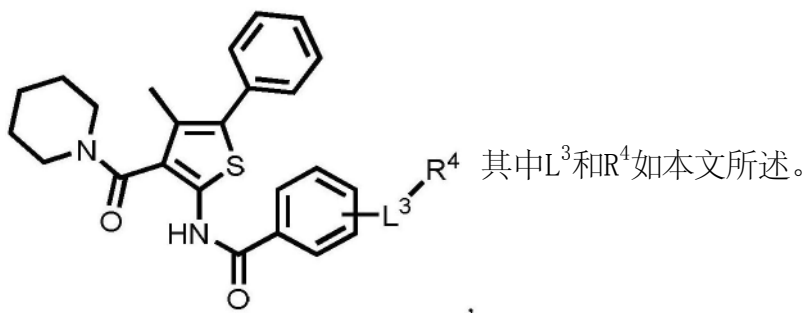


其中 L^3 和 R^4 如本文所述。

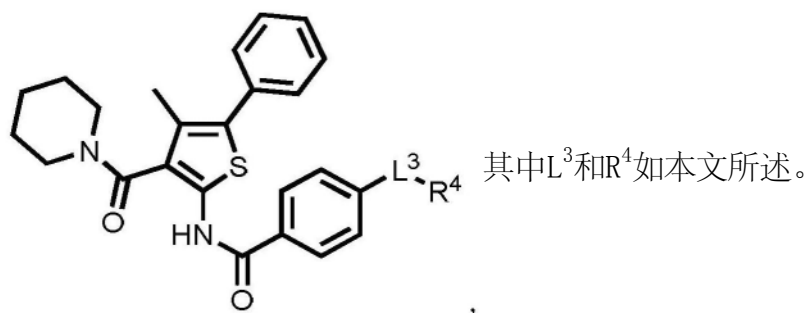
[0200] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的化合物的部分:



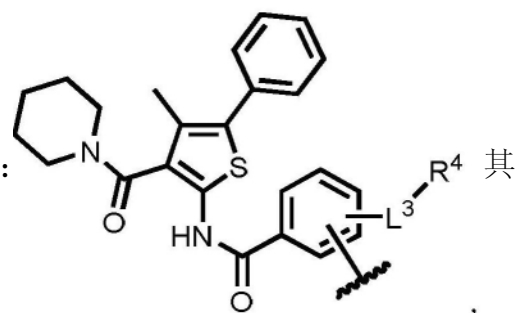
[0201] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



[0202] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

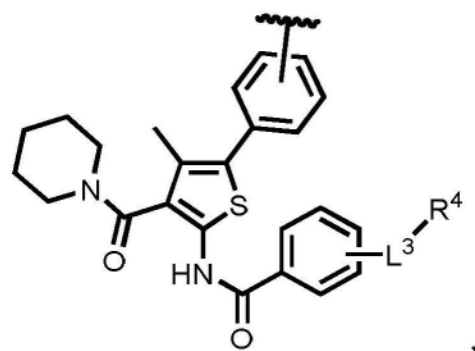


[0203] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



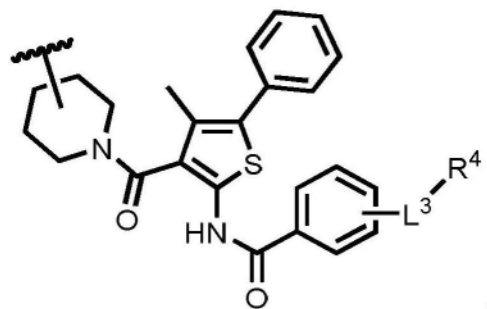
中 L^3 和 R^4 如本文所述。

[0204] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



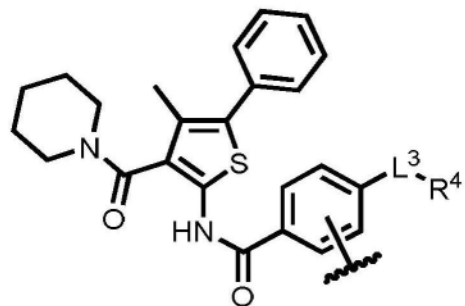
其中 L^3 和 R^4 如本文所述。

[0205] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



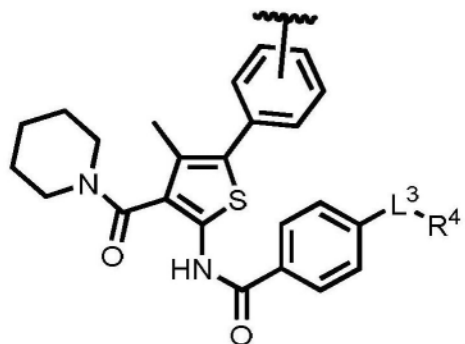
其中 L^3 和 R^4 如本文所述。

[0206] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



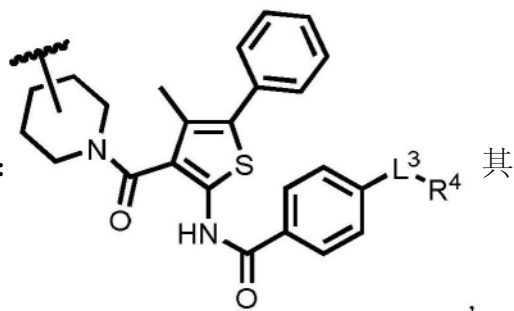
其中 L^3 和 R^4 如本文所述。

[0207] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



其中 L^3 和 R^4 如本文所述。

[0208] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



中 L^3 和 R^4 如本文所述。

[0209] 在实施例中, R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经取代或未经

取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0210] 在实施例中, R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0211] 在实施例中,经取代的 R^1 (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^1 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^1 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^1 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^1 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0212] 在实施例中, R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{11} -取代或未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经 R^{11} -取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{11} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经 R^{11} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{11} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经 R^{11} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键;两个 R^1 取代基可以任选地连接,以形成经 R^{11} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经 R^{11} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{11} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经 R^{11} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0213] 在实施例中, R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、

OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R¹¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R¹¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R¹¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R¹¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基可以任选地连接，以形成经R¹¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R¹¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0214] 在实施例中，R¹独立地为卤素。在实施例中，R¹独立地为未经取代的烷基（例如，C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂）、未经取代的杂烷基（例如，2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元）、未经取代的环烷基（例如，C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆）、未经取代的杂环烷基（例如，3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元）、未经取代的芳基（例如，C₆-C₁₀或苯基）或未经取代的杂芳基（例如，5元到10元、5元到9元或5元到6元）。

[0215] 在实施例中，R¹独立地为卤素。在实施例中，R¹为未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0216] R¹¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。

[0217] 在实施例中，R¹¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基（例如，C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂）、经取代或未经取代的杂烷基（例如，2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元）、经取代或未经取代的环烷基（例如，C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆）、经取代或未经取代的杂环烷基（例如，3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元）、经取代或未经取代的芳基（例如，C₆-C₁₀或苯基）或经取代或未经取代的杂芳基（例如，5元到10元、5元到9元或5元到6元）。

[0218] 在实施例中，R¹¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代（例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代）或未经取代的烷基、经取代（例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代）或未经取代的杂烷基、经取代（例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代）或未经取代的环烷基、经取代（例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基

或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0219] 在实施例中,经取代的 R^{11} (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^{11} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^{11} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^{11} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^{11} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0220] 在实施例中, R^{11} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{12} -取代或未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经 R^{12} -取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{12} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经 R^{12} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{12} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经 R^{12} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。在实施例中, R^{11} 为未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0221] 在实施例中, R^{11} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{12} -取代或未经取代的 C_1-C_8 烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的 C_3-C_8 环烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 芳基或经 R^{12} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基。在实施例中, R^{11} 为未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0222] R^{12} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、

C₄-C₆或C₅-C₆)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0223] 在实施例中,R¹²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0224] 在实施例中,R¹²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0225] 在实施例中,R²独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0226] 在实施例中,R²独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0227] 在实施例中,经取代的R²(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的R²被选自取代基、大小受限的取代基和低

级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^2 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^2 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^2 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0228] 在实施例中, R^2 独立地为卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、经 R^{21} -取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{21} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经 R^{21} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{21} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或经 R^{21} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元);两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经 R^{21} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经 R^{21} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{21} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或经 R^{21} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0229] 在实施例中, R^2 独立地为卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{21} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经 R^{21} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{21} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0230] 在实施例中, R^2 独立地为卤素、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_1 - C_3 烷基、未经取代的2元到3元杂烷基或与结合剂接头相连的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成未经取代的苯基。

[0231] 在实施例中, R^2 独立地为卤素、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_1 - C_3 烷基、未经取代的2元到3元杂烷基或与结合剂接头相连的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成未经取代的苯基;并且 R^{21} 独立地为 $-\text{OH}$ 。

[0232] 在实施例中, R^2 独立地为卤素。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{Cl}$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{Br}$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{I}$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{F}$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{CF}_3$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{NO}_2$ 。在实施例中, R^2 独立地为经 R^{21} -取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^2 独立地为经 R^{21} -取代的 C_1 - C_4 烷基,其中 R^{21} 独立地为 $-\text{OH}$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的乙基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的正丙

基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的叔丁基。在实施例中, R^2 独立地为未经取代的2元到4元杂烷基。在实施例中, R^2 独立地为 $-OCH_3$ 。在实施例中, R^2 独立地为 $-OCH_2CH_3$ 。在实施例中, R^2 独立地为与结合剂接头相连的键。在实施例中, 两个 R^2 取代基可以任选地连接, 以形成未经取代的苯基。

[0233] R^{21} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。

[0234] 在实施例中, R^{21} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经取代或未经取代的杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0235] 在实施例中, R^{21} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0236] 在实施例中, 经取代的 R^{21} (例如, 经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基) 被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代; 其中如果经取代的 R^{21} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代; 则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中, 当 R^{21} 被取代时, 其被至少一个取代基取代。在实施例中, 当 R^{21} 被取代时, 其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中, 当 R^{21} 被取代时, 其被至少一个低级取代

基取代。

[0237] 在实施例中, R^{21} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-Cl_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{22} -取代或未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、经 R^{22} -取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{22} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经 R^{22} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{22} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或经 R^{22} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。在实施例中, R^{21} 为未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0238] 在实施例中, R²¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R²²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R²²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R²²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R²²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R²²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R²²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0239] R^{22} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0240] 在实施例中, R^{22} 独立地为氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、未经取代的杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0241] 在实施例中, R²²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-

SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0242] 在实施例中, R²²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0243] 在实施例中, L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、经取代或未经取代的亚烷基(例如, C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的亚杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的亚环烷基(例如, C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的亚杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的亚芳基(例如, C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的亚杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0244] 在实施例中, L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂芳基。

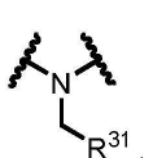
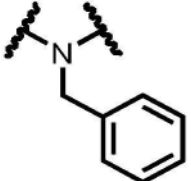
[0245] 在实施例中, 经取代的L³(例如, 经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代; 其中如果经取代的L³被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代; 则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中, 当L³被取代时, 其被至少一个取代基取代。在实施例中, 当L³被取代时, 其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中, 当L³被取代时, 其被至少一个低级取代基取代。

[0246] 在实施例中, L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经R³-取代或未经取代的亚烷基(例如, C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经R³-取代或未经取代的亚杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经R³-取代或未经取代的亚环烷基(例如, C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R³-取代或未经取代的亚杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R³-取代或未经取代的亚芳基(例如, C₆-C₁₀或亚苯基)或经R³-取代或未经取代的亚杂芳基

(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

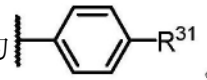
[0247] 在实施例中, L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经 R^3 -取代或未经取代的 C_1-C_8 亚烷基、经 R^3 -取代或未经取代的2元到8元亚杂烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_3-C_8 亚环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 亚芳基或经 R^3 -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基。

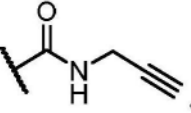
[0248] 在实施例中, L^3 为 $-N(R^3)-$ 。在实施例中, L^3 为 $-N(R^3)-$; R^3 独立地为经 R^{31} -取代的甲基、未经取代的苯基或未经取代的5元到6元杂芳基;并且 R^{31} 独立地为未经取代的苯基或未

经取代的5元到6元杂芳基。在实施例中, L^3 为  在实施例中, L^3 为  在

实施例中, L^3 为 $-CH_2NH-$ 。

[0249] 在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代或未经取代的 C_1-C_4 烷基。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代的 C_1-C_4 烷基。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代的甲基。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代的乙基。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代的丙基。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代的丁基。在实施例中, R^3 独立地为卤素。在实施例中, R^3 独立地为 $-F$ 。在实施例中, R^3 独立地为 $-Cl$ 。在实施例中, R^3 独立地为 $-Br$ 。在实施例中, R^3 独立地为 $-I$ 。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代或未经取代的苯基。在实施例中, R^3 独立地为经 R^{31} 取代的苯基。在实施例中, R^3

独立地为  在实施例中, R^{31} 独立地为 $C(O)H$ 、 $-COOH$ 或经 R^{32} 取代或未经取代的2元到6元杂烷基。在实施例中, R^{31} 独立地为 $-C(O)H$ 。在实施例中, R^{31} 独立地为 $-COOH$ 。在实施例中, R^{31} 独立地为经 R^{32} 取代的2元到6元杂烷基。在实施例中, R^{31} 独立地为未经取代的2元到

6元杂烷基。在实施例中, R^{31} 独立地为  在实施例中, R^{31} 独立地为经 R^{32} 取代或未经取代的苯基。在实施例中, R^{31} 独立地为未经取代的苯基。在实施例中, R^{32} 独立地为氧代。

[0250] 在实施例中, R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。

[0251] 在实施例中, R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、

OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0252] 在实施例中,R³独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0253] 在实施例中,经取代的R³(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的R³被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当R³被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当R³被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当R³被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0254] 在实施例中,R³独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³¹-取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经R³¹-取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经R³¹-取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R³¹-取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R³¹-取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经R³¹-取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0255] 在实施例中,R³独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R³¹-取代或未经取代的2元

到8元杂烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{31} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0256] R^{31} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。

[0257] 在实施例中， R^{31} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基(例如， C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、经取代或未经取代的杂烷基(例如，2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如， C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如，3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如， C_6 - C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如，5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0258] 在实施例中， R^{31} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代(例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如，被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0259] 在实施例中，经取代的 R^{31} (例如，经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代；其中如果经取代的 R^{31} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代；则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中，当 R^{31} 被取代时，其被至少一个取代基取代。在实施例中，当 R^{31} 被取代时，其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中，当 R^{31} 被取代时，其被至少一个低级取代基取代。

[0260] 在实施例中， R^{31} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、

SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³²-取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经R³²-取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经R³²-取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R³²-取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R³²-取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经R³²-取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0261] 在实施例中,R³¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R³²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R³²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R³²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R³²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R³²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0262] R³²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0263] 在实施例中,R³²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0264] 在实施例中,R³²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0265] 在实施例中,R³²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-

NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0266] 在实施例中, R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如, C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如, C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如, C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0267] 在实施例中, R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0268] 在实施例中, 经取代的R⁴(例如, 经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代; 其中如果经取代的R⁴被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代; 则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中, 当R⁴被取代时, 其被至少一个取代基取代。在实施例中, 当R⁴被取代时, 其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中, 当R⁴被取代时, 其被至少一个低级取代基取代。

[0269] 在实施例中, R⁴独立地为氢或经取代或未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中, R⁴独立地为氢。在实施例中, R⁴独立地为经取代或未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的C₁-C₄烷基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的乙基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的正丙基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R⁴独立地为未经取代的叔丁基。在实施例中, R⁴独立地为E, 其中E如本文所述, 包含在实施例中。

[0270] 在实施例中, R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-

CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁴¹-取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经R⁴¹-取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经R⁴¹-取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R⁴¹-取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R⁴¹-取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经R⁴¹-取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或E。

[0271] 在实施例中,R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁴¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁴¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或E。

[0272] R⁴¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。

[0273] 在实施例中,R⁴¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0274] 在实施例中,R⁴¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代

基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0275] 在实施例中,经取代的 R^{41} (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^{41} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^{41} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^{41} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^{41} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0276] 在实施例中, R^{41} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{42} -取代或未经取代的烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经 R^{42} -取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{42} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经 R^{42} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{42} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经 R^{42} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0277] 在实施例中, R^{41} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_1-C_8 烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_3-C_8 环烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 芳基或经 R^{42} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

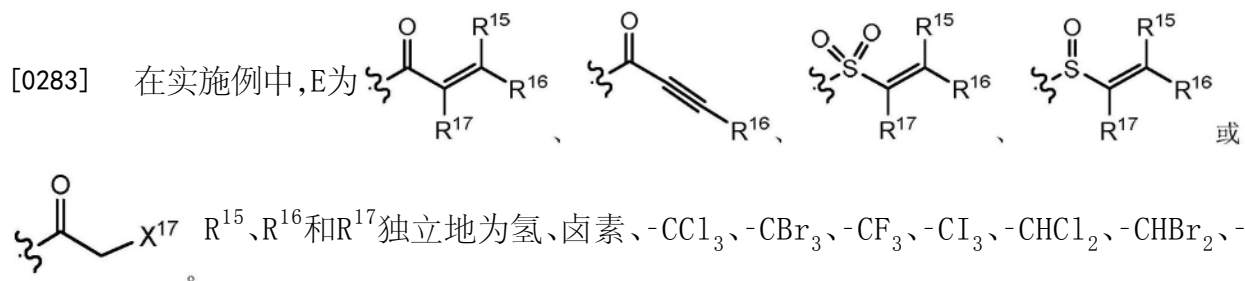
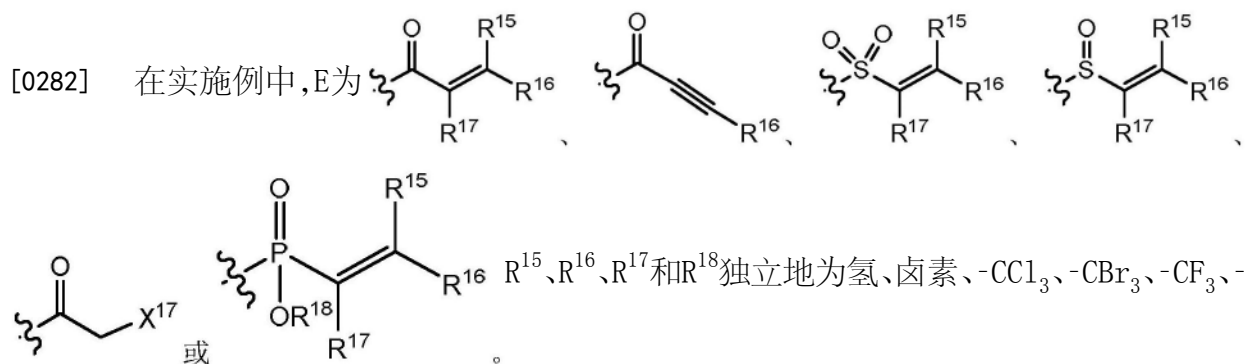
[0278] R^{42} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0279] 在实施例中, R^{42} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、

NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0280] 在实施例中,R⁴²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0281] 在实施例中,E是共价半胱氨酸修饰剂部分。



CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。

未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。 X^{17} 为卤素。在实施例中, X^{17} 为-F。在实施例中, X^{17} 为-Cl。

[0284] 在实施例中, R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0285] 在实施例中, R^{18} 独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0286] 在实施例中, R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 和 R^{18} 独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0287] 在实施例中, R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)

或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基。

[0288] 在实施例中,经取代的 R^{15} (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^{15} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^{15} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^{15} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^{15} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0289] 在实施例中,经取代的 R^{16} (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^{16} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^{16} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^{16} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^{16} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

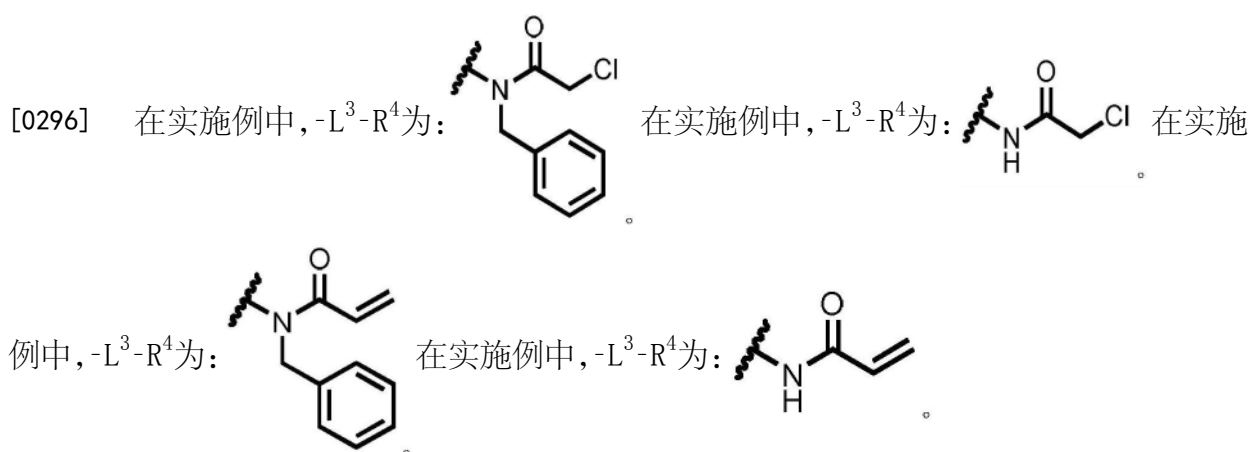
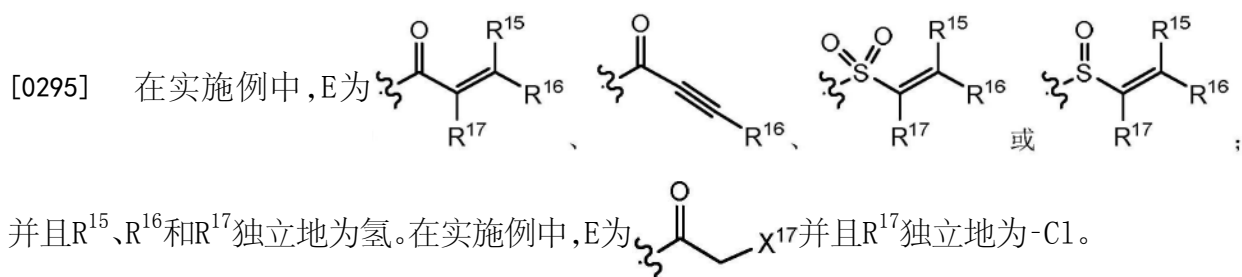
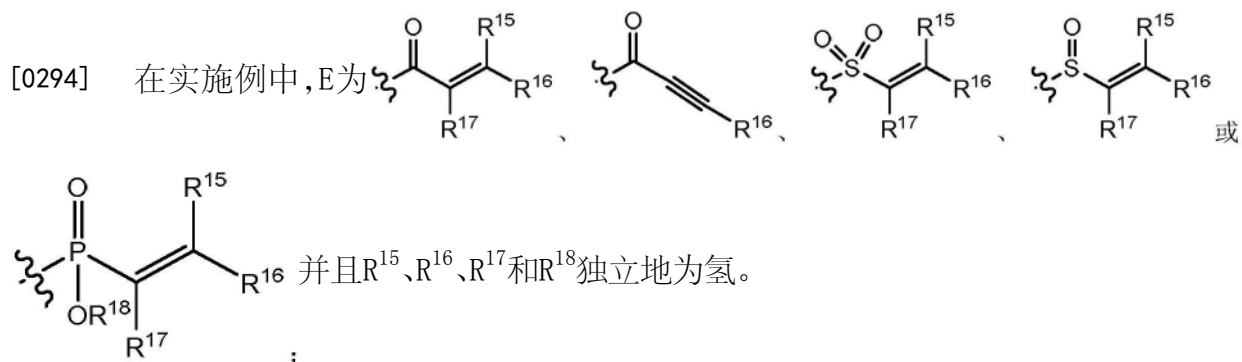
[0290] 在实施例中,经取代的 R^{17} (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^{17} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^{17} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^{17} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^{17} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0291] 在实施例中,经取代的 R^{18} (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^{18} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^{18} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^{18} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^{18} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0292] 在实施例中, R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 和 R^{18} 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环

烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、未经取代的杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或未经取代的杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0293] 在实施例中, R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NH_2OH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。



[0297] 在实施例中, z_1 为0到2的整数。在实施例中, z_2 为0到2的整数。在实施例中, z_1 为0。在实施例中, z_1 为1。在实施例中, z_1 为2。在实施例中, z_1 为3。在实施例中, z_1 为4。在实施例中, z_2 为0。在实施例中, z_2 为1。在实施例中, z_2 为2。在实施例中, z_2 为3。在实施例中, z_2 为4。在实施例中, z_2 为5。

[0298] 在实施例中, z_2 为1并且 R^2 为与结合剂接头相连的键。

[0299] 在实施例中, R^7 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-$

CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0300] 在实施例中,R⁷独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0301] 在实施例中,经取代的R⁷(例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的R⁷被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当R⁷被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当R⁷被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当R⁷被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0302] 在实施例中,R¹、R²和R⁷独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个R¹取代基或两个R²取代基或两个R⁷取代基可以任选地连接,以形成经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0303] 在实施例中,R⁷独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-

SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经R⁵¹-取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经R⁵¹-取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R⁵¹-取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R⁵¹-取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经R⁵¹-取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键;两个R⁷取代基可以任选地连接,以形成经R⁵¹-取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R⁵¹-取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R⁵¹-取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经R⁵¹-取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0304] 在实施例中,R⁷独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个R⁷取代基可以任选地连接,以形成经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0305] 在实施例中,R⁵独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0306] 在实施例中,R⁵独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代

基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0307] 在实施例中,经取代的 R^5 (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^5 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^5 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^5 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^5 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0308] 在实施例中, R^5 独立地为氢或经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^5 独立地为氢。在实施例中, R^5 独立地为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的乙基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的正丙基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R^5 独立地为未经取代的叔丁基。

[0309] 在实施例中, R^6 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、经取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0310] 在实施例中, R^6 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的芳基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0311] 在实施例中,经取代的 R^6 (例如,经取代的烷基、经取代的杂烷基、经取代的环烷

基、经取代的杂环烷基、经取代的芳基和/或经取代的杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 R^6 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 R^6 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 R^6 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 R^6 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0312] 在实施例中, R^6 独立地为氢或经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^6 独立地为氢。在实施例中, R^6 独立地为经取代或未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的 C_1 - C_4 烷基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的甲基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的乙基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的正丙基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的异丙基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的正丁基。在实施例中, R^6 独立地为未经取代的叔丁基。

[0313] 在实施例中, R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{51} -取代或未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、经 R^{51} -取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{51} -取代或未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、经 R^{51} -取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{51} -取代或未经取代的芳基(例如, C_6 - C_{10} 或苯基)或经 R^{51} -取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或与结合剂接头相连的键。

[0314] 在实施例中, R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键。

[0315] R^{51} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

[0316] 在实施例中, R^{51} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、

NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0317] 在实施例中,R⁵¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0318] 在实施例中,R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、经R⁵¹-取代或未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经R⁵¹-取代或未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、经R⁵¹-取代或未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经R⁵¹-取代或未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或经R⁵¹-取代或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元);或与结合剂接头相连的键;其中仅一个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹或R¹⁰为与结合剂接头相连的键;并且R⁵¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的烷基(例如,C₁-C₈、C₁-C₆、C₁-C₄或C₁-C₂)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如,C₃-C₈、C₃-C₆、C₄-C₆或C₅-C₆)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如,C₆-C₁₀或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0319] 在实施例中,R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代

或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；或与结合剂接头相连的键；其中仅一个 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 或 R^{10} 为与结合剂接头相连的键；并且 R^{51} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1-C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3-C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6-C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0320] 在实施例中，结合剂接头为 $L^{11}-L^{12}-L^{13}-L^{14}$ 。 L^{11} 直接连接到所述E3泛素连接酶结合剂。

[0321] L^{11} 为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0322] L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0323] 在实施例中， L^{11} 为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代或未经取代的亚烷基（例如， C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2 ）、经取代或未经取代的亚杂烷基（例如，2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元）、经取代或未经取代的亚环烷基（例如， C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6 ）、经取代或未经取代的亚杂环烷基（例如，3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元）、经取代或未经取代的亚芳基（例如， C_6-C_{10} 或苯基）或经取代或未经取代的亚杂芳基（例如，5元到10元、5元到9元或5元到6元）或生物缀合物接头。

[0324] 在实施例中， L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0325] 在实施例中， L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代或未经取代的亚烷基（例如， C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2 ）、经取代或未经取代的亚杂烷基（例如，2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元）、经取代或未经取代的亚环烷基（例如， C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6 ）、经取代或未经取代的亚杂环烷基（例如，3元到8元、3元到6

元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的亚芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的亚杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)或生物缀合物接头。

[0326] 在实施例中, L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的亚烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经 R^{61} -取代或未经取代的亚杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)或生物缀合物接头。在实施例中, L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、未经取代的亚烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、未经取代的亚杂烷基(例如, 2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的亚环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、未经取代的亚杂环烷基(例如, 3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、未经取代的亚芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或未经取代的亚杂芳基(例如, 5元到10元、5元到9元或5元到6元)或生物缀合物接头。

[0327] 在实施例中, L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1-C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂环基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3-C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头。在实施例中, L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、未经取代的亚烷基、未经取代的亚杂烷基、未经取代的亚环烷基、未经取代的亚杂环烷基、未经取代的亚芳基、未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0328] 在实施例中, L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代(例如, 被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0329] 在实施例中, 经取代的 L^{11} (例如, 经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 L^{11} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基

可以任选地不同。在实施例中,当 L^{11} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 L^{11} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 L^{11} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0330] 在实施例中, L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的亚烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经 R^{61} -取代或未经取代的亚芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经 R^{61} -取代或未经取代的亚杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)或生物缀合物接头。

[0331] 在实施例中, L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1-C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3-C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头。在实施例中, L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、未经取代的亚烷基、未经取代的亚杂烷基、未经取代的亚环烷基、未经取代的亚杂环烷基、未经取代的亚芳基、未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0332] 在实施例中, L^{12} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0333] 在实施例中,经取代的 L^{12} (例如,经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 L^{12} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 L^{12} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 L^{12} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 L^{12} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0334] 在实施例中, L^{13} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代

的亚杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0335] 在实施例中,经取代的 L^{13} (例如,经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 L^{13} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 L^{13} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 L^{13} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 L^{13} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

[0336] 在实施例中, L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

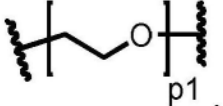
[0337] 在实施例中,经取代的 L^{14} (例如,经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 L^{14} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 L^{14} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 L^{14} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 L^{14} 被取代时,其被至少一个低级取代基取代。

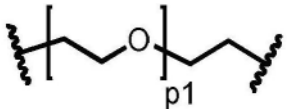
[0338] R^{61} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环烷基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。

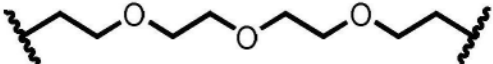
[0339] 在实施例中, R^{61} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的烷基(例如, C_1 - C_8 、 C_1 - C_6 、 C_1 - C_4 或 C_1 - C_2)、未经取代的杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、未经取代的环烷基(例如, C_3 - C_8 、 C_3 - C_6 、 C_4 - C_6 或 C_5 - C_6)、未经取代的杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、

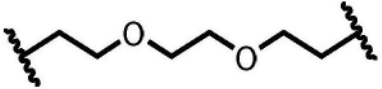
4元到5元或5元到6元)、未经取代的芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或未经取代的杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0340] 在实施例中, R^{61} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1-C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3-C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6-C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

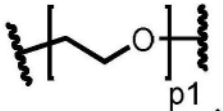
[0341] 在实施例中,结合剂接头具有下式:  其中p1为1到6的整数。在实施

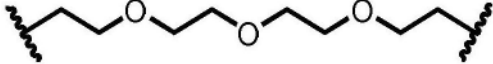
例中,结合剂接头具有下式:  其中p1为1到6的整数。在实施例中,p1为

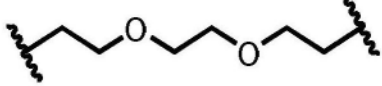
3。在实施例中,结合剂接头具有下式:  在实施例中,

结合剂接头具有下式:  在实施例中,结合剂接头为未经取代的

C_1-C_{12} 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1-C_8 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_2-C_{10} 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_2-C_6 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1-C_4 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_2 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_3 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_4 亚烷基。

[0342] 在实施例中,结合剂接头具有下式:  其中p1为1到6的整数。在实施

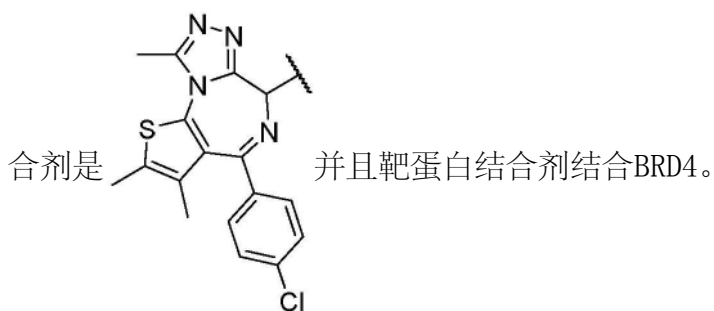
例中,p1为3。在实施例中,结合剂接头具有下式:  在实

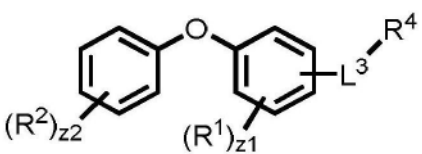
施例中,结合剂接头具有下式:  在实施例中,结合剂接头为未

经取代的 C_1-C_{12} 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1-C_8 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_2-C_{10} 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_2-C_6 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1-C_4 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_1 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_2 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_3 亚烷基。在实施例中,结合剂接头为未经取代的 C_4 亚烷基。

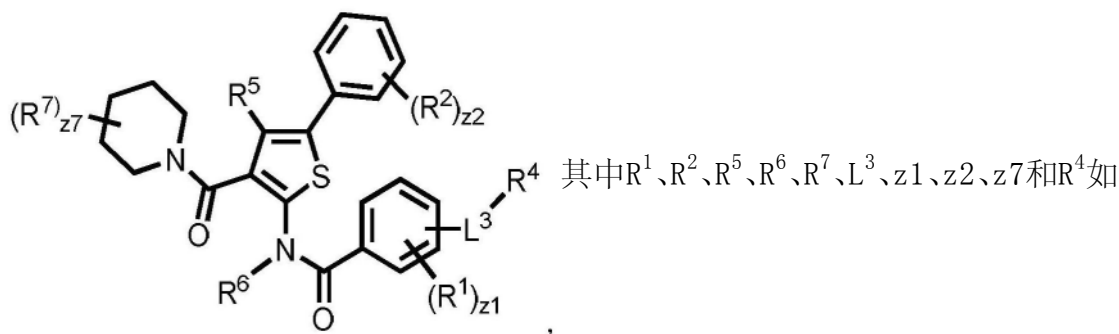
[0343] 在实施例中,z7为0到2的整数。在实施例中,z7为0。在实施例中,z7为1。在实施例中,z7为2。在实施例中,z7为3。在实施例中,z7为4。在实施例中,z7为5。在实施例中,z7为6。在实施例中,z7为7。在实施例中,z7为8。在实施例中,z7为9。在实施例中,z7为10。

[0344] 在实施例中,靶蛋白结合剂能够结合与疾病相关的靶蛋白。在实施例中,靶蛋白结

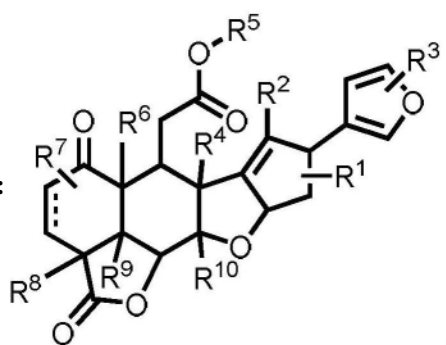


[0345] 在一个方面,提供了一种具有下式的化合物:  , 其中 R^1 、 R^2 、 $z1$ 、 $z2$ 、 L^3 和 R^4 如本文所述。

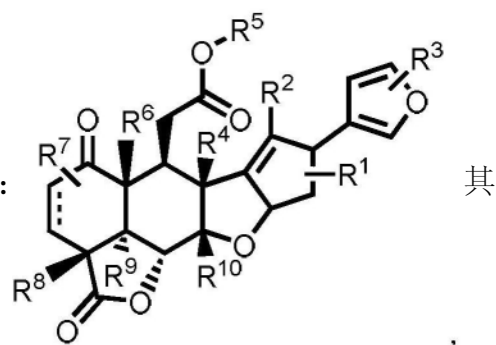
[0346] 在一个方面,提供了一种具有下式的化合物:



本文所述。

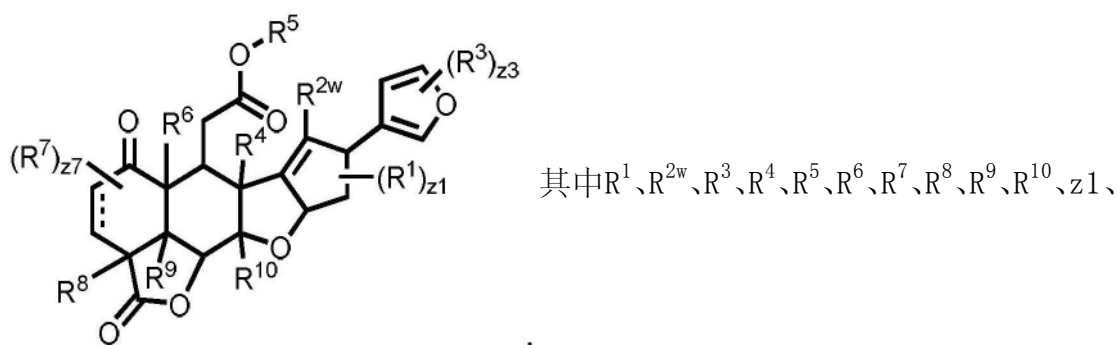
[0347] 在一方面,提供了一种具有下式的化合物:  其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 如本文所述。

[0348] 在一个方面,提供了一种具有下式的化合物:



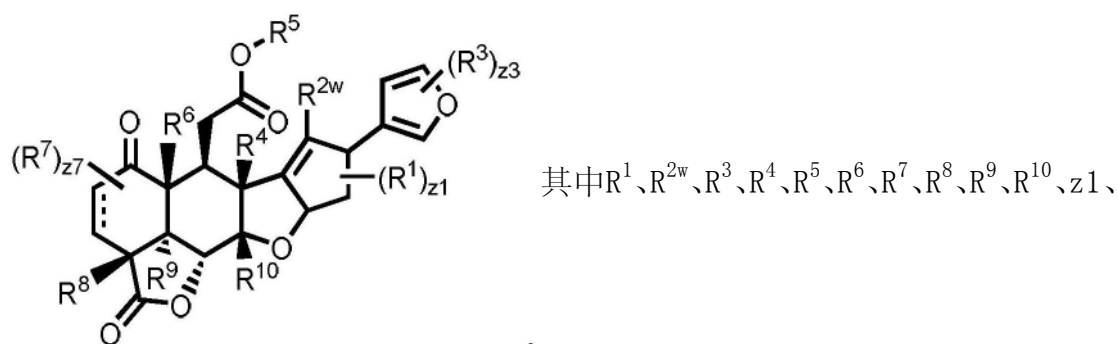
中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所述。

[0349] 在一个方面,提供了一种具有下式的化合物:



z3和z7如本文所述。

[0350] 在一个方面,提供了一种具有下式的化合物:



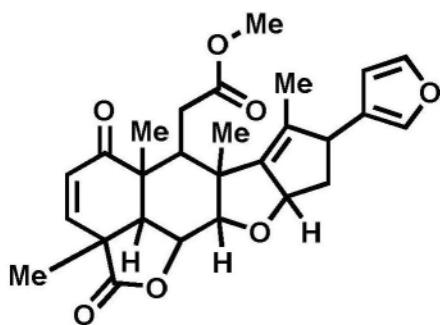
z3和z7如本文所述。

[0351] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



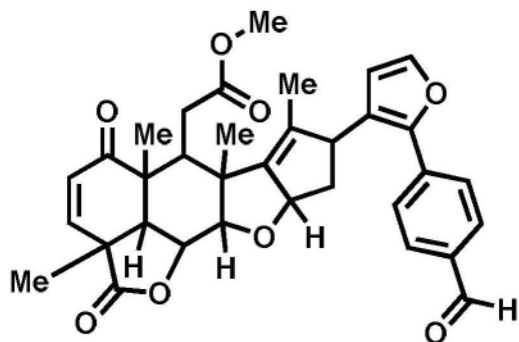
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单

价形式:



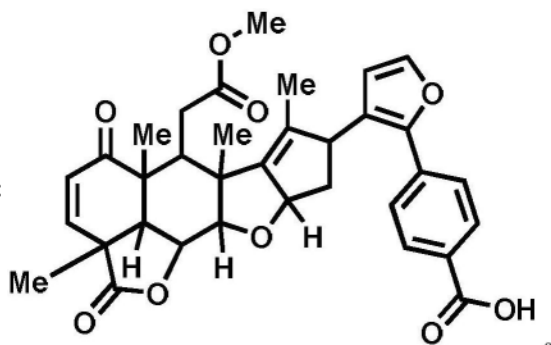
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价

形式:



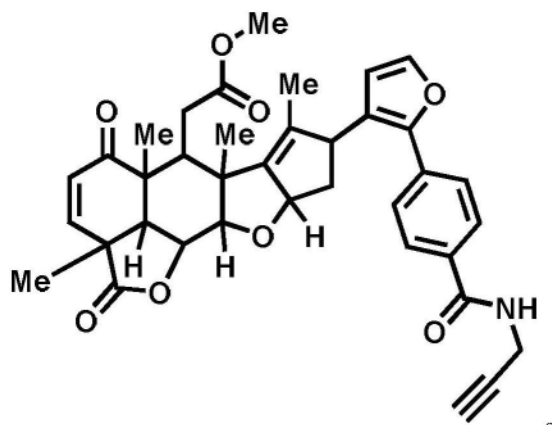
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的

单价形式:



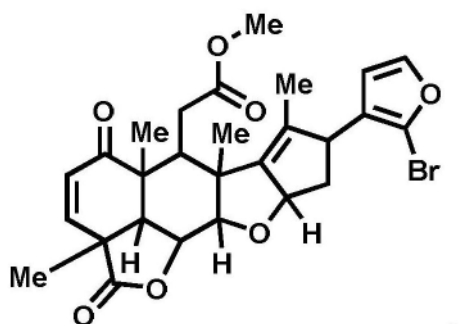
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下

式的单价形式:

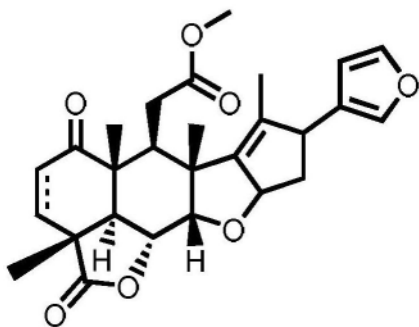


在实施例中,E3泛素连接酶结合剂

是下式的单价形式:

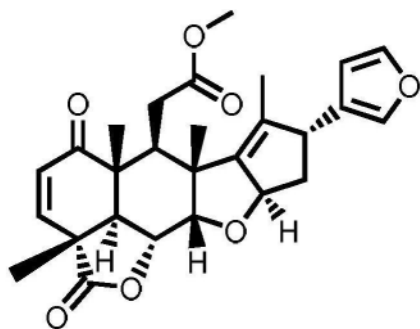


[0352] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



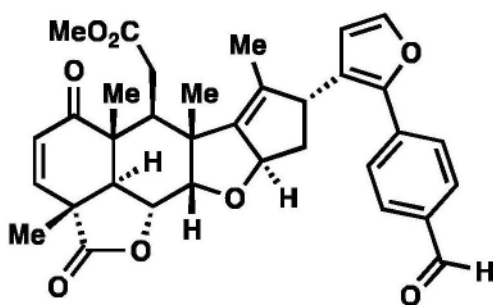
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价

形式:



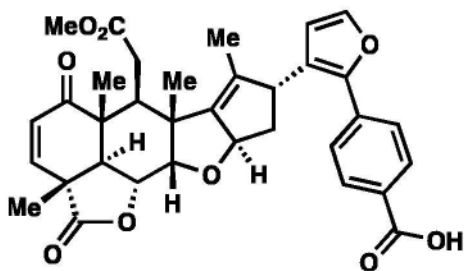
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形

式:



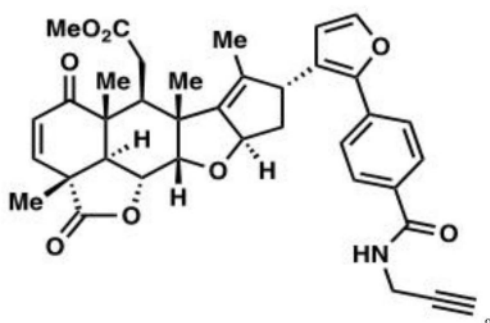
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价

形式:



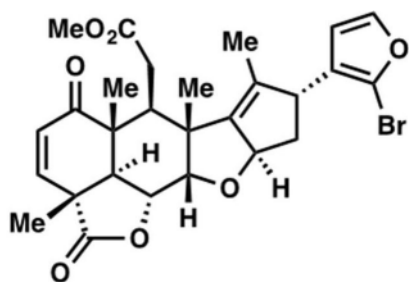
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价

形式:

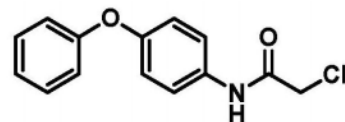


在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价

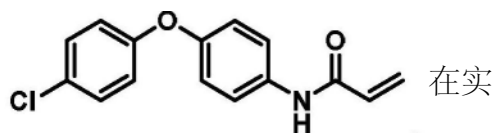
形式:



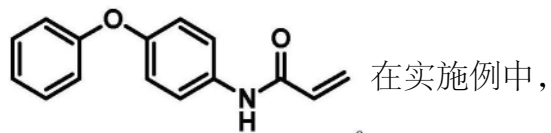
[0353] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



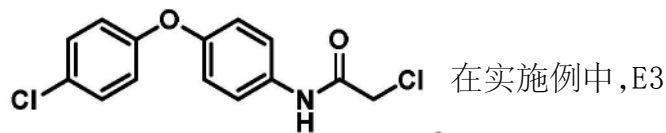
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



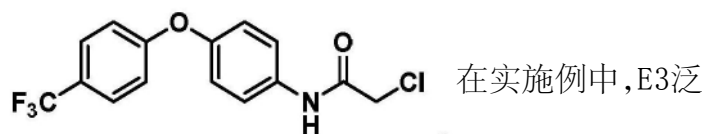
在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



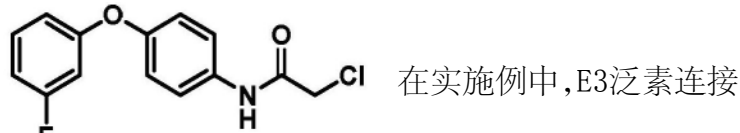
E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



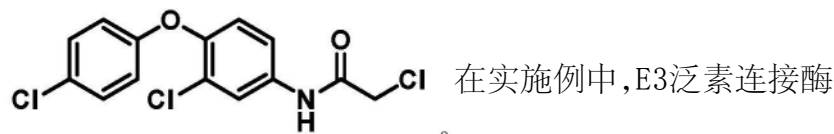
泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



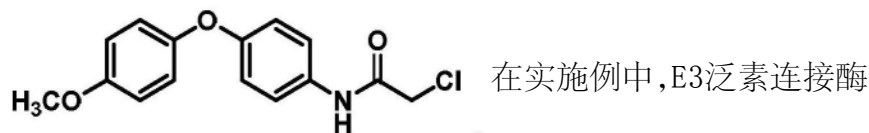
素连接酶结合剂是下式的单价形式:



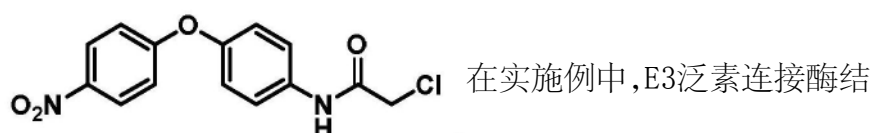
酶结合剂是下式的单价形式:

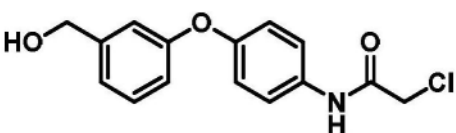


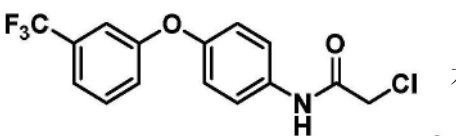
结合剂是下式的单价形式:

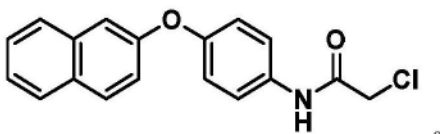


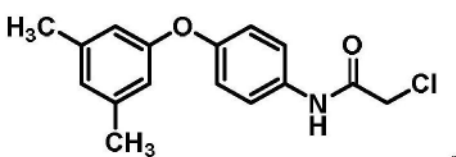
结合剂是下式的单价形式:

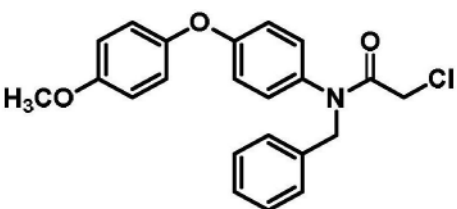


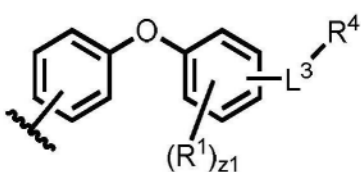
合剂是下式的单价形式： 在实施例中,E3泛素连接酶结

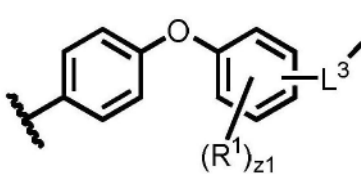
合剂是下式的单价形式： 在实施例中,E3泛素连接酶结合

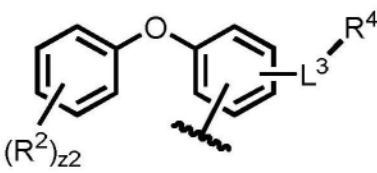
剂是下式的单价形式： 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂

是下式的单价形式： 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是

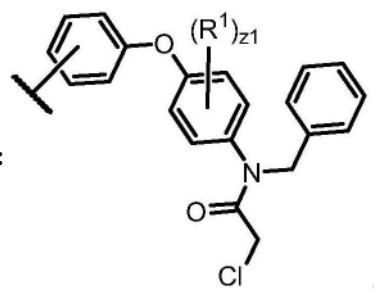
下式的单价形式：

[0354] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式： 在实施例中,R⁴独立地为E,其中E如本文所述,包含在实施例中。

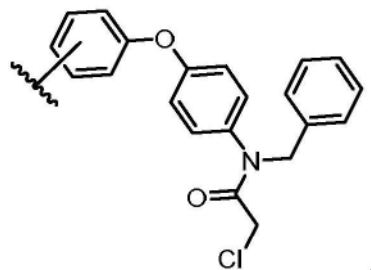
[0355] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式： 在实施例中,R⁴独立地为E,其中E如本文所述,包含在实施例中。

[0356] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式： 在实施例中,R⁴独立地为E,其中E如本文所述,包含在实施例中。

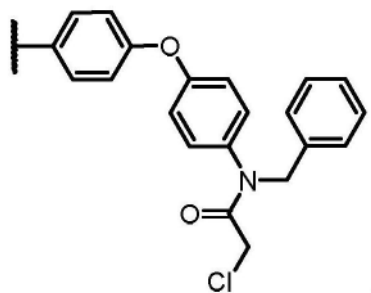
[0357] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



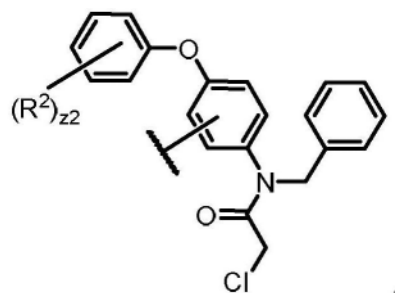
[0358] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



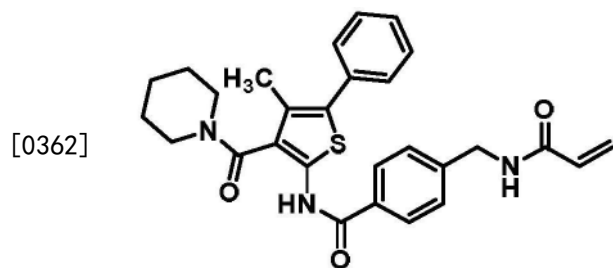
[0359] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



[0360] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:

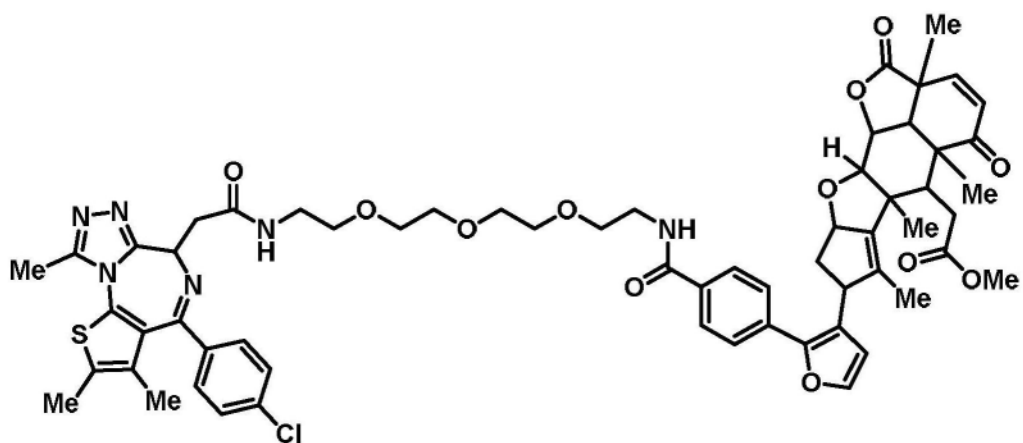


[0361] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



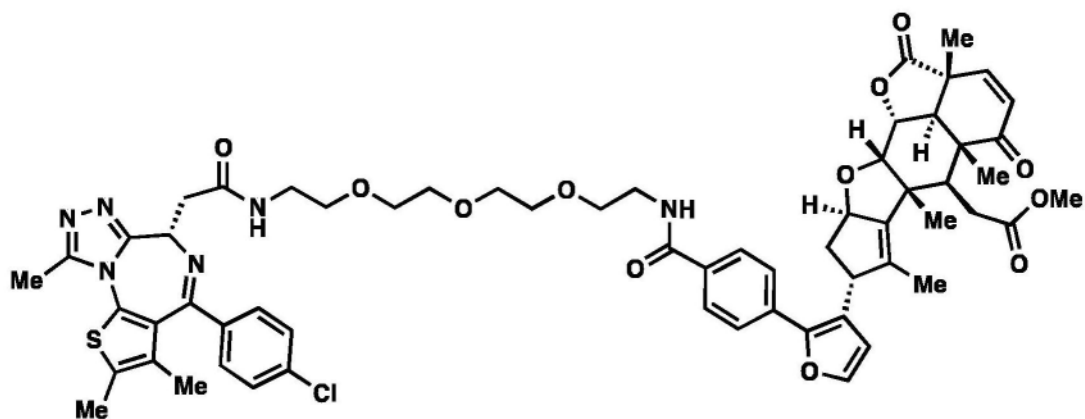
[0363] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0364]



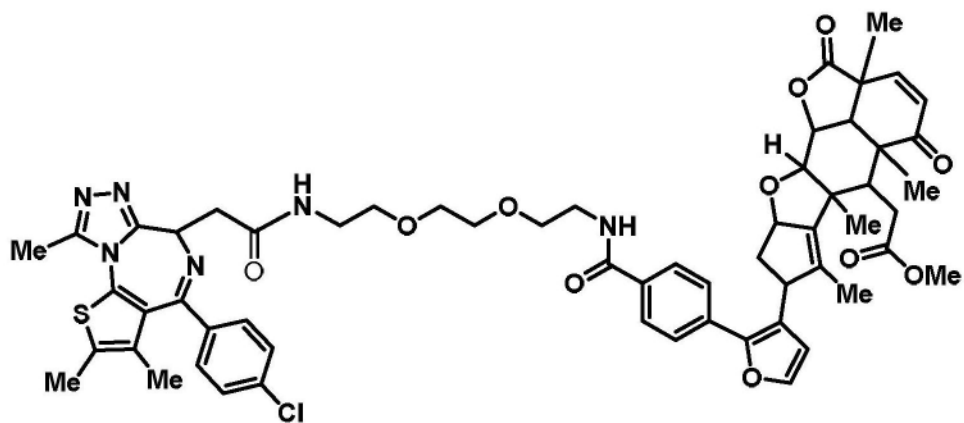
[0365] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0366]



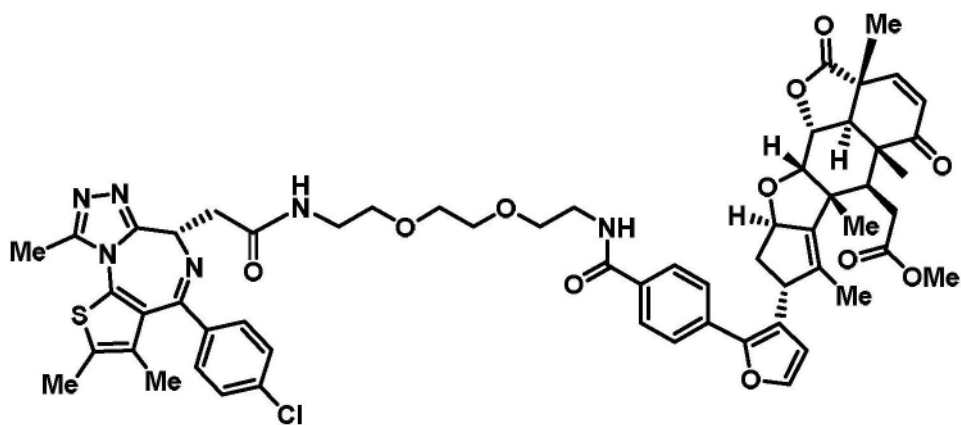
[0367] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0368]



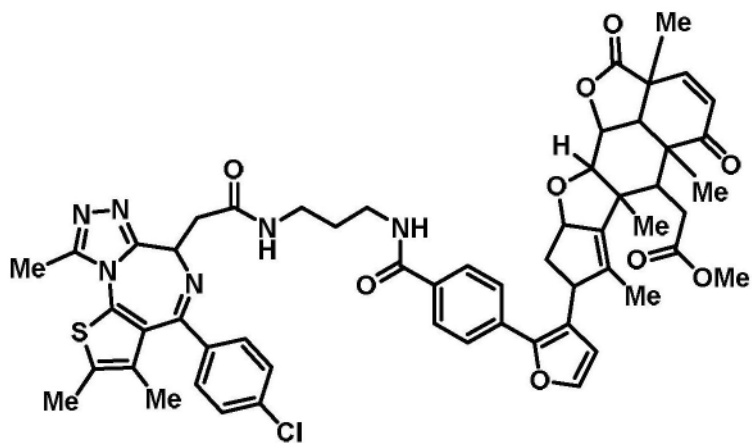
[0369] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0370]



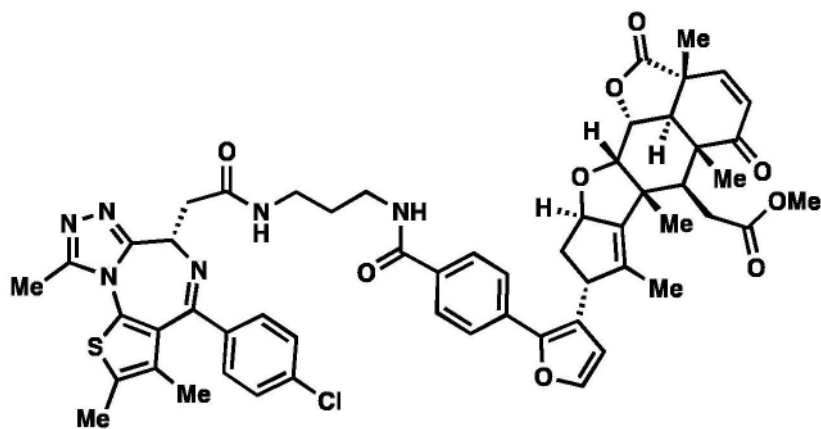
[0371] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0372]



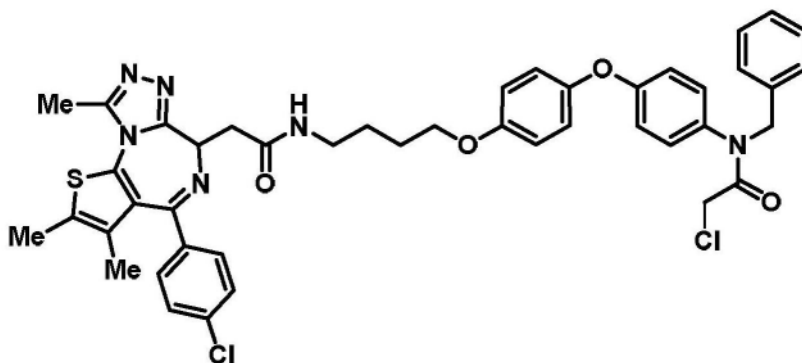
[0373] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0374]



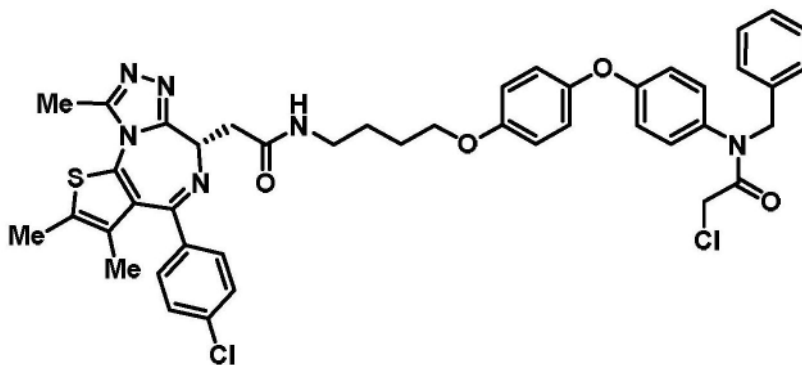
[0375] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0376]



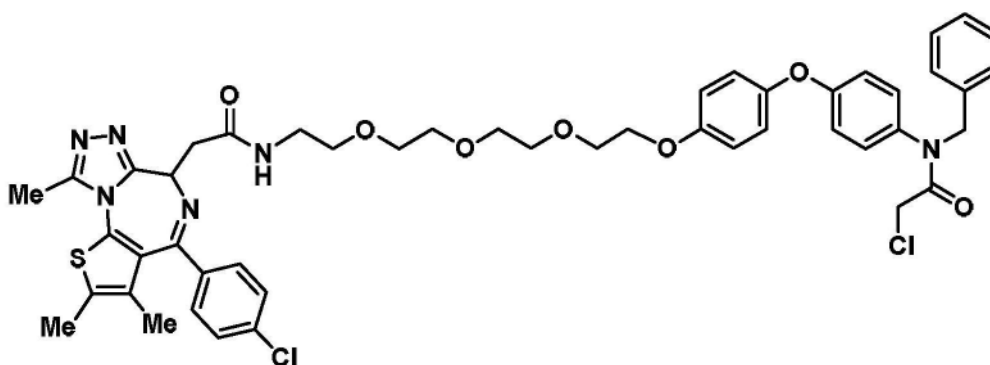
[0377] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0378]



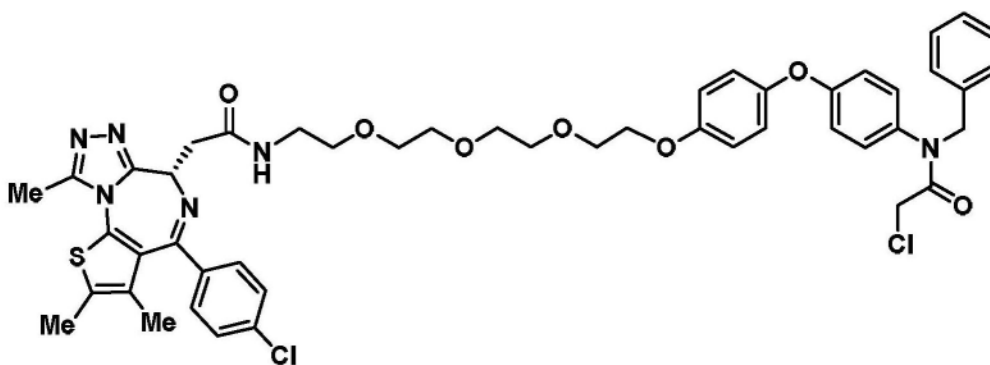
[0379] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0380]



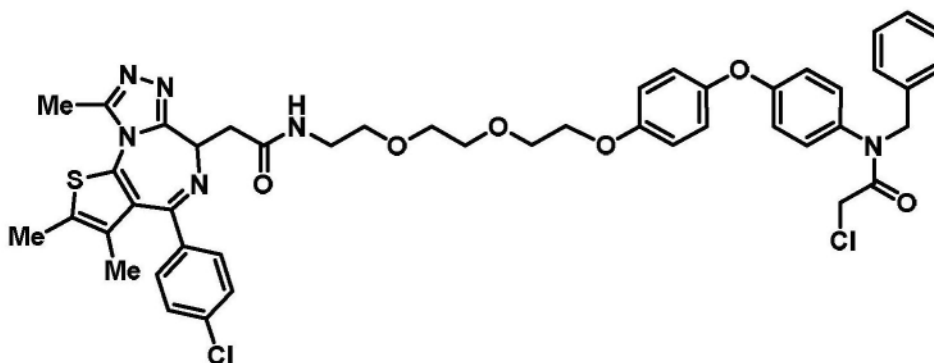
[0381] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0382]



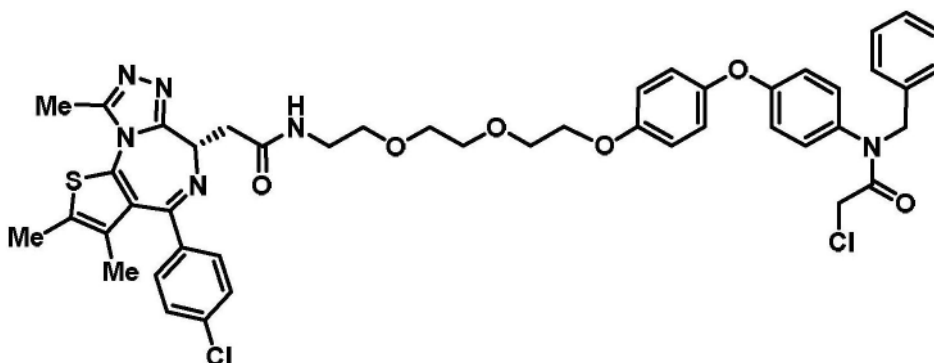
[0383] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0384]



[0385] 在实施例中,靶蛋白降解剂具有下式:

[0386]



[0387] 在实施例中,靶蛋白降解剂是本文(例如,在方面、实施例、实例、表格、附图或权利要求书中)所述的化合物。在实施例中,化合物是本文(例如,在方面、实施例、实例、表格、附图或权利要求书中)所述的化合物。在实施例中,化合物是本文(例如,在方面、实施例、实例、表格、附图或权利要求书中)所述的靶蛋白降解剂。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是本文(例如,在方面、实施例、实例、表格、附图或权利要求书中)所述的化合物的单价形式。在实施例中,靶蛋白结合剂是本文(例如,在方面、实施例、实例、表格、附图或权利要求书中)所述的化合物的单价形式。

[0388] III. 药物组合物

[0389] 在一个方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所述的化合物(例如,本文所述的靶蛋白降解剂),包含实施例,以及药学上可接受的赋形剂。在实施例中,本文所述的化合物以治疗有效量被包含在内。

[0390] 在药物组合物的实施例中,化合物或其药学上可接受的盐以治疗有效量被包含在内。

[0391] 在药物组合物的实施例中,药物组合物包含第二药剂(例如,治疗剂)。在药物组合物的实施例中,药物组合物包含治疗有效量的第二药剂(例如,治疗剂)。在药物组合物的实施例中,第二药剂为用于治疗癌症的药剂。在实施例中,第二药剂为抗癌药剂。在实施例中,第二药剂为化学治疗剂。在实施例中,第二药剂为抗炎药剂。在实施例中,施用不包含除列举的活性剂(例如,本文所述的化合物)以外的任何活性剂的施用。

[0392] 药物组合物可以包含本文公开的调节剂的旋光异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐。药物组合物中包含的化合物可以共价连接至载剂部分。可替代地,药物组合物中包含的化合物不与载剂部分共价连接。

[0393] 在一个方面,提供了一种药物组合物,其包含靶蛋白降解剂(例如,如本文所述或

本文所述的化合物)和药学上可接受的赋形剂。

[0394] 在实施例中,药物组合物包含有效量的靶蛋白降解剂。在实施例中,药物组合物包含治疗有效量的靶蛋白降解剂。在实施例中,药物组合物包含第二药剂。在药物组合物的实施例中,药物组合物包含治疗有效量的第二药剂。

[0395] IV. 使用方法

[0396] 在一个方面,提供了一种降低(例如,相对于对照降低)细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触。在实施例中,所述靶蛋白降解剂是本文所述的化合物。

[0397] 在一个方面,提供了一种降低(例如,相对于对照降低)细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂)接触。在实施例中,所述靶蛋白降解剂是本文所述的化合物。

[0398] 在实施例中,所述方法进一步包含以下步骤:(A)使与靶蛋白降解剂接触的细胞蛋白泛素化,并由此形成泛素化的细胞蛋白;以及(B)使泛素化的细胞蛋白与蛋白酶体接触,并由此形成泛素化的细胞蛋白-蛋白酶体复合物;以及通过蛋白酶体对细胞蛋白进行蛋白水解。

[0399] 在一个方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包含使与癌症相关的细胞蛋白与靶蛋白降解剂(例如,本文所述的化合物)接触。

[0400] 在一个方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包含使与癌症相关的细胞蛋白与靶蛋白降解剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂)接触。

[0401] 在一个方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的靶蛋白结合剂,包含实施例。

[0402] 在实施例中,所述癌症是乳腺癌。在实施例中,所述癌症是三阴性乳腺癌。在实施例中,所述癌症是肾细胞癌。在实施例中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。在实施例中,所述癌症是胶质母细胞瘤。在实施例中,所述癌症是结直肠癌。在实施例中,所述癌症是子宫内膜癌。在实施例中,所述癌症是肺癌。在实施例中,所述癌症是胰腺癌。在实施例中,所述癌症是黑色素瘤。在实施例中,所述癌症是急性髓细胞性白血病。在实施例中,所述癌症是子宫内膜癌。在实施例中,所述癌症是非霍奇金氏淋巴瘤。在实施例中,所述癌症是套细胞淋巴瘤。在实施例中,所述方法包含免疫调节。在实施例中,所述方法包含癌症免疫疗法(例如,免疫刺激剂、免疫毒素或放射免疫疗法)。

[0403] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i)E3泛素连接酶结合剂;(ii)靶蛋白结合剂;以及(iii)与所述E3泛素连接酶结合剂和所述靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0404] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i)单价E3泛素连接酶结合剂;(ii)单价靶蛋白结合剂;以及(iii)与所述单价E3泛

素连接酶结合剂和所述单价靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例1中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例1中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0405] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i) E3泛素连接酶结合剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂);(ii) 靶蛋白结合剂;以及(iii) 与所述E3泛素连接酶结合剂和所述靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例1中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例1中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0406] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i) 单价E3泛素连接酶结合剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂);(ii) 单价靶蛋白结合剂;以及(iii) 与所述单价E3泛素连接酶结合剂和所述单价靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例1中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例1中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0407] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i) E3泛素连接酶结合剂;(ii) 靶蛋白结合剂;以及(iii) 与所述E3泛素连接酶结合剂和所述靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例1中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例1中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0408] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i) 单价E3泛素连接酶结合剂;(ii) 单价靶蛋白结合剂;以及(iii) 与所述单价E3泛素连接酶结合剂和所述单价靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例1中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例1中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0409] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i) E3泛素连接酶结合剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂);(ii) 靶蛋白结合剂;以及(iii) 与所述E3泛素连接酶结合剂和所述靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例1中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接

酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0410] 在一个方面,提供了一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包含使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;其中所述靶蛋白降解剂包含:(i) 单价E3泛素连接酶结合剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂);(ii) 单价靶蛋白结合剂;以及(iii) 与所述单价E3泛素连接酶结合剂和所述单价靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。在实施例中,所述方法进一步包含,在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成靶蛋白降解剂。在实施例中,所述方法进一步包含在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出E3泛素连接酶结合剂。

[0411] 在实施例中,所述方法进一步包含通过包含以下步骤的方法来鉴定E3泛素连接酶结合剂:(i) 使E3泛素连接酶蛋白与候选E3泛素连接酶结合剂的混合物接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;并将来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的候选E3泛素连接酶结合剂鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0412] 在实施例中,所述方法进一步包含通过包含以下步骤的方法来鉴定E3泛素连接酶结合剂:(i) 使E3泛素连接酶蛋白与包含候选E3泛素连接酶结合剂的化合物的混合物接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;并将包含来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的候选E3泛素连接酶结合剂的化合物鉴定为包含E3泛素连接酶结合剂的化合物。

[0413] 在实施例中,所述方法进一步包含以下步骤:(i) 使E3泛素连接酶蛋白与多个E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;并将来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的E3泛素连接酶结合剂鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0414] 在实施例中,所述方法进一步包含以下步骤:(i) 使E3泛素连接酶蛋白与多个候选E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;并将来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的候选E3泛素连接酶结合剂鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0415] 在实施例中,候选E3泛素连接酶结合剂包含共价半胱氨酸修饰剂部分,并且候选E3泛素连接酶结合剂通过检测E3泛素连接酶结合剂与E3泛素连接酶蛋白的共价结合以形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物而被鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0416] 在实施例中,E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。在实施例中,在合成之前,鉴定靶蛋白结合剂。

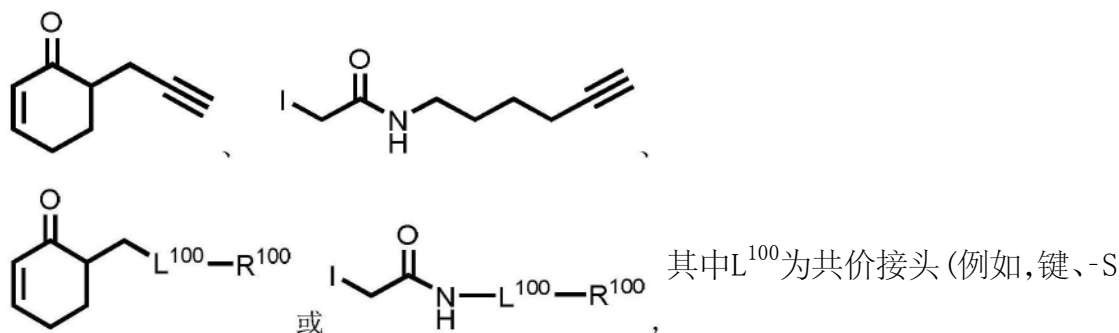
[0417] 在实施例中,通过包含以下步骤的方法来鉴定靶蛋白结合剂:(i) 将细胞蛋白与候选靶蛋白结合剂的库混合,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;以及(ii) 鉴定形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的靶蛋白结合剂。在实施例中,通过检测细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物,将形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的候选靶蛋白结合剂鉴定为靶蛋白结合剂。在实施例中,细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的检测包含使用可检测标记物或质谱。在实施例中,在合成之前,修饰E3泛素连接酶结合剂(例如,E3泛素连接酶结合剂进行化

学反应以去除共价半胱氨酸修饰剂部分)以去除共价半胱氨酸修饰剂部分。

[0418] 在实施例中,通过包含以下步骤的方法来鉴定靶蛋白结合剂:(i)将细胞蛋白与包含候选靶蛋白结合剂的化合物的库混合,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;以及(ii)鉴定包含形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的靶蛋白结合剂的化合物。在实施例中,通过检测细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物,将包含形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的候选靶蛋白结合剂的化合物鉴定为包含靶蛋白结合剂的化合物。在实施例中,细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的检测包含使用可检测标记物或质谱。在实施例中,在合成之前,修饰E3泛素连接酶结合剂(例如,E3泛素连接酶结合剂进行化学反应以去除共价半胱氨酸修饰剂部分)以去除共价半胱氨酸修饰剂部分。

[0419] 在实施例中,所述细胞蛋白是BRD4。在实施例中,与不存在靶蛋白降解剂的情况相比,BRD4的水平降低大于2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍或大于10,000倍。在实施例中,与不存在靶蛋白降解剂的情况相比,BRD4的水平降低约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍或约10,000倍。在实施例中,与不存在靶蛋白降解剂的情况相比,BRD4的水平降低2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍或10,000倍。

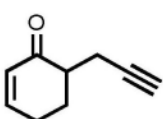
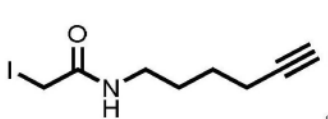
[0420] 在一个方面,提供了一种鉴定被靶蛋白结合剂接触的细胞蛋白的方法,所述方法包含:(A)使细胞蛋白质组或细胞的第一样品与所述靶蛋白结合剂接触,从而形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;(B)使步骤A的细胞蛋白质组或细胞的所得第一样品和尚未与所述靶蛋白结合剂接触的所述细胞蛋白质组或细胞的第二样品与具有下式的化合物接触:

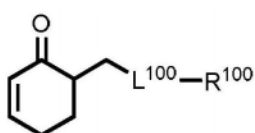
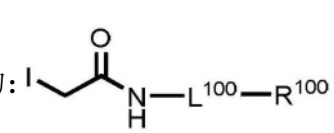


(O)₂-、-NH-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)NH-、-NHC(O)NH-、-C(O)O-、-OC(O)-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基)并且R¹⁰⁰为可检测部分;(C)使步骤B的所得第一样品与第一可检测剂接触,并使步骤B的所得第二样品与第二可检测剂接触;(D)测量结合至选定蛋白质的所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平;以及(E)通过测量所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平之间的差异来鉴定细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物中的所述细胞蛋白,所述第一可检测剂和所述第二

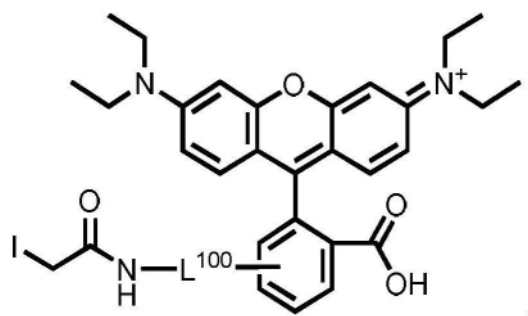
可检测剂结合至能够形成所述细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的所述细胞蛋白。在实施例中,所述方法进一步包含(A)第一可检测剂或第二可检测剂中的一个可检测剂包含原子的轻同位素,而第一可检测剂或第二可检测剂中的第二个可检测剂包含原子的重同位素;(B)通过液相色谱质谱法测定所选蛋白质的第一可检测剂和第二可检测剂的水平;以及(C)通过与第一可检测剂结合的细胞蛋白的水平和与第二可检测剂结合的细胞蛋白的水平之间的差异来鉴定能够结合靶蛋白结合剂的细胞蛋白。

[0421] 在实施例中,所述细胞是哺乳动物细胞。在实施例中,所述细胞是人细胞。在实施例中,所述细胞是疾病细胞。在实施例中,所述细胞是癌细胞。在实施例中,所述细胞是乳腺癌细胞。在实施例中,所述细胞是三阴性乳腺癌细胞。在实施例中,所述细胞是231MFP细胞。在实施例中,所述细胞是HCC38细胞。

[0422] 在实施例中,化合物为:  在实施例中,化合物为: 。

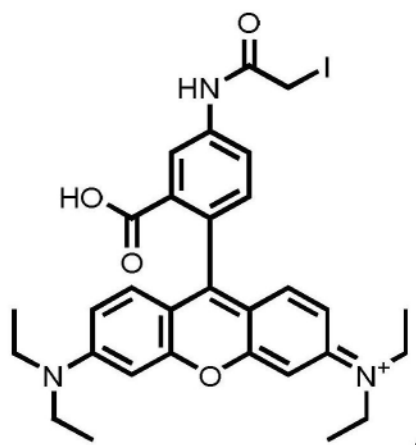
在实施例中,化合物为:  在实施例中,化合物为:  在

实施例中, L^{100} 为键、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。在实施例中, R^{100} 为若丹明部分。在实施例中,化合物为:



其中 L^{100} 如本文所述。在实施例中, L^{100} 为键或经取代

或未经取代的 C_1-C_4 亚烷基。在实施例中,化合物为:



[0423] 在实施例中, L^{100} 为键、 $-S(O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、经取代或未经取代的亚烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经取代或未经取代的亚杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或

未经取代的亚环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经取代或未经取代的亚杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的亚芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的亚杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。

[0424] 在实施例中, L^{100} 为键、 $-S(O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂芳基。

[0425] 在实施例中, L^{100} 为经取代或未经取代的亚烷基(例如, C_1-C_8 、 C_1-C_6 、 C_1-C_4 或 C_1-C_2)、经取代或未经取代的亚杂烷基(例如,2元到8元、2元到6元、4元到6元、2元到3元或4元到5元)、经取代或未经取代的亚环烷基(例如, C_3-C_8 、 C_3-C_6 、 C_4-C_6 或 C_5-C_6)、经取代或未经取代的亚杂环烷基(例如,3元到8元、3元到6元、4元到6元、4元到5元或5元到6元)、经取代或未经取代的亚芳基(例如, C_6-C_{10} 或苯基)或经取代或未经取代的亚杂芳基(例如,5元到10元、5元到9元或5元到6元)。在实施例中, L^{100} 为经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代(例如,被取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂芳基。在实施例中, L^{100} 为未经取代的亚烷基、未经取代的亚杂烷基、未经取代的亚环烷基、未经取代的亚杂环烷基、未经取代的亚芳基或未经取代的亚杂芳基。在实施例中, L^{100} 为键。

[0426] 在实施例中, L^{100} 为经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂环烷基、经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚芳基或经取代(例如,被至少一个取代基、大小受限的取代基或低级取代基取代)或未经取代的亚杂芳基。

[0427] 在实施例中,经取代的 L^{100} (例如,经取代的亚烷基、经取代的亚杂烷基、经取代的亚环烷基、经取代的亚杂环烷基、经取代的亚芳基和/或经取代的亚杂芳基)被至少一个取代基、大小限制的取代基或低级取代基取代;其中如果经取代的 L^{100} 被选自取代基、大小受限的取代基和低级取代基的多个基团取代;则每个取代基、大小受限的取代基和/或低级取代基可以任选地不同。在实施例中,当 L^{100} 被取代时,其被至少一个取代基取代。在实施例中,当 L^{100} 被取代时,其被至少一个大小受限的取代基取代。在实施例中,当 L^{100} 被取代时,其

被至少一个低级取代基取代。

[0428] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶半胱氨酸残基(例如,人RNF4中的半胱氨酸氨基酸或人RF114中的半胱氨酸氨基酸)。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶半胱氨酸残基(例如,人RNF4中的半胱氨酸氨基酸或人RF114中的半胱氨酸氨基酸)。在实施例中,所述E3泛素连接酶是人RNF4。在实施例中,半胱氨酸残基是人RNF4的C132。在实施例中,半胱氨酸残基是人RNF4的C135。在实施例中,所述E3泛素连接酶是人RNF114。在实施例中,半胱氨酸残基是人RNF114的C8。

[0429] 在一个方面是一种制备E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述E3泛素连接酶与靶蛋白降解剂接触,并由此形成E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂复合物;以及(B)使所述E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物。

[0430] 在一个方面是一种制备E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述E3泛素连接酶与靶蛋白降解剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的靶蛋白降解剂)接触,并由此形成E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂复合物;以及(B)使所述E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物。

[0431] 在一个方面,提供了一种制备细胞蛋白-靶蛋白降解剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白降解剂复合物;以及(B)使所述细胞蛋白-靶蛋白降解剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白降解剂-E3泛素连接酶复合物。

[0432] 在一个方面,提供了一种制备细胞蛋白-靶蛋白降解剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的靶蛋白降解剂)接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白降解剂复合物;以及(B)使所述细胞蛋白-靶蛋白降解剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白降解剂-E3泛素连接酶复合物。

[0433] 在一个方面是一种制备E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及(B)使所述E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物。

[0434] 在一个方面是一种制备E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂)接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及(B)使所述E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物。

[0435] 在一个方面,提供了一种制备细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述细胞蛋白与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及(B)使所述细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复

合物。

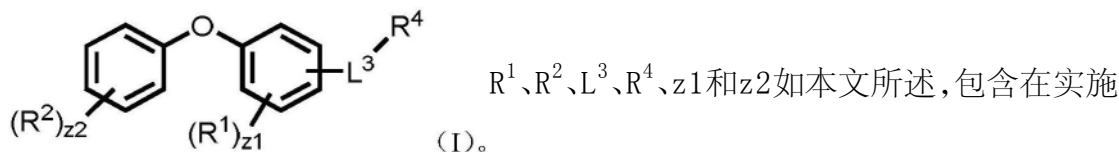
[0436] 在一个方面,提供了一种制备细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包含:(A)使所述细胞蛋白与E3泛素连接酶结合剂(例如,本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂)接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及(B)使所述细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物。

[0437] 在一个方面,提供了一种抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成的方法,所述方法包含使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成。

[0438] 在一个方面,提供了一种抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成的方法,所述方法包含使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂(本文所述的化合物或本文所述的E3泛素连接酶结合剂)接触,并由此抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成。

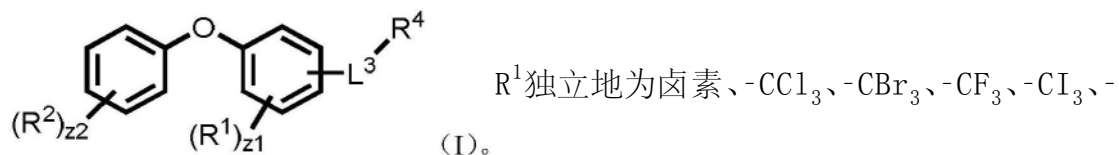
[0439] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂共价键合E3泛素连接酶的半胱氨酸。在实施例中,E3泛素连接酶结合剂在E3泛素连接酶的氨基酸处接触E3泛素连接酶,所述E3泛素连接酶能够在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下接触细胞蛋白以形成细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物。在实施例中,所述E3泛素连接酶是人RNF4。在实施例中,所述E3泛素连接酶是RNF4,并且半胱氨酸是人RNF4的C132。在实施例中,所述E3泛素连接酶是RNF4,并且半胱氨酸是人RNF4的C135。

[0440] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式的单价形式:



例中。

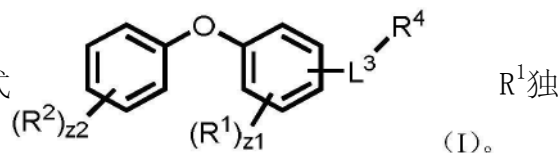
[0441] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



$CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^1 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。 R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。

OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R²取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。R³独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E为亲电部分。z₁为0到4的整数。z₂为0到5的整数。仅一个R¹或一个R²为与结合剂接头相连的键。

[0442] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂具有式

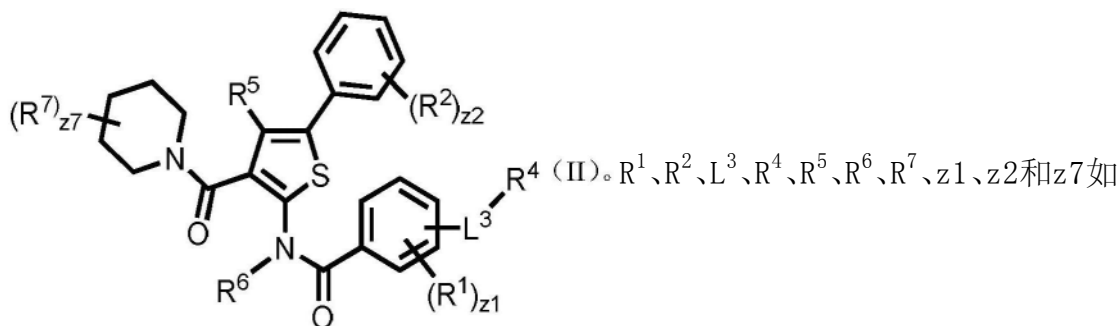


立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。R²独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连

的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。 L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。 R^3 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。 R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E为亲电部分。 z_1 为0到4的整数。 z_2 为0到5的整数。仅一个 R^1 或一个 R^2 为与结合剂接头相连的键。

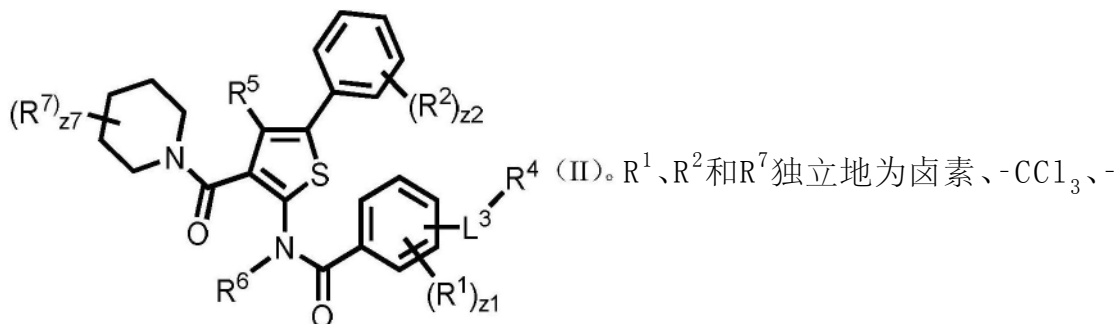
[0443] 在实施例中,E3泛素连接酶是人RNF114。在实施例中,所述E3泛素连接酶是人RNF114,并且半胱氨酸是人RNF114的C8。在实施例中,所述细胞蛋白是p21。

[0444] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



本文所述,包含在实施例中。

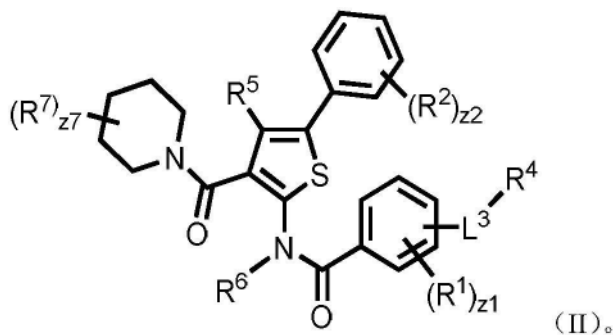
[0445] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



CBr_3 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-$

NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基或两个R²取代基或两个R⁴取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。R⁵和R⁶独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。R³独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E是亲电部分。z1为0到4的整数。z2为0到5的整数。z7为0到10的整数。仅一个R¹、R²、R⁵、R⁶或R⁷独立地为与结合剂接头相连的键。

[0446] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂具有下式：

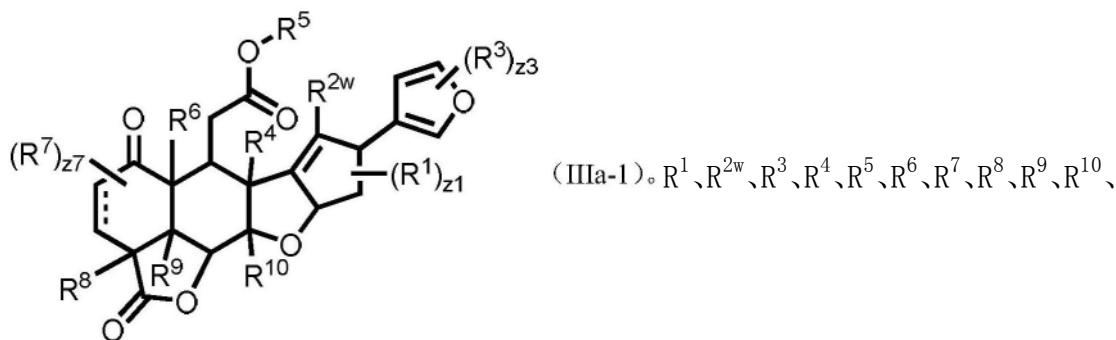


R¹、R²和R⁷独立地为卤素、-CCl₃、-

CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-

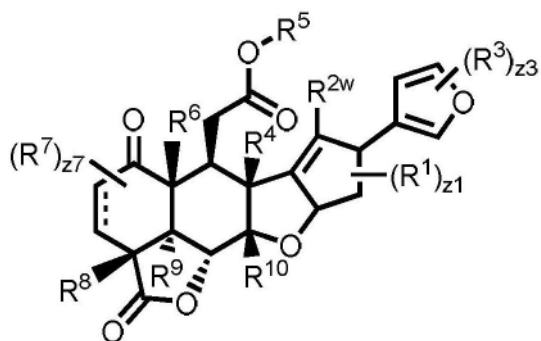
NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基或两个R²取代基或两个R⁴取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。R⁵和R⁶独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键。L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基。R³独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基。R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或E。E是亲电部分。z1为0到4的整数。z2为0到5的整数。z7为0到10的整数。仅一个R¹、R²、R⁵、R⁶或R⁷独立地为与结合剂接头相连的键。

[0447] 在实施例中，E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



z1、z3和z7如本文所述。

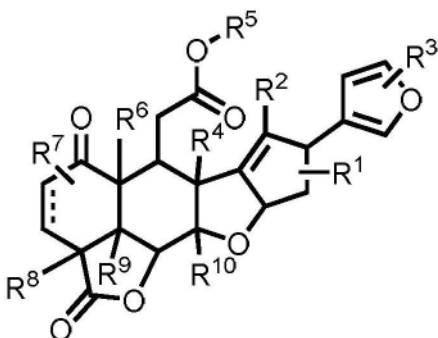
[0448] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



(III)。R¹、R^{2w}、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、

z1、z3和z7如本文所述。

[0449] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

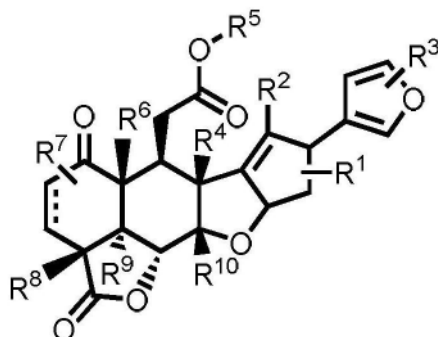


R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所

(III)。

述,包含在实施例中。

[0450] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

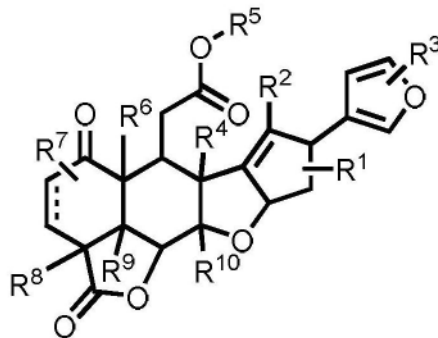


R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰如本文所

(III)。

述,包含在实施例中。

[0451] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



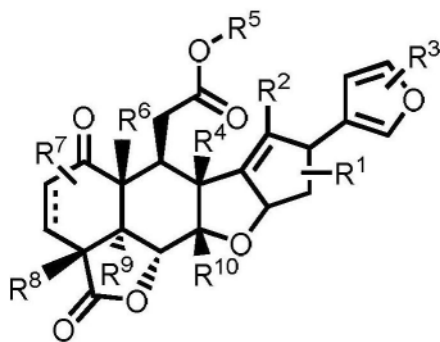
R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为

(III)。

氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-

CH_2I 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；或与结合剂接头相连的键。仅一个 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 或 R^{10} 为与结合剂接头相连的键。||为单键或双键。

[0452] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

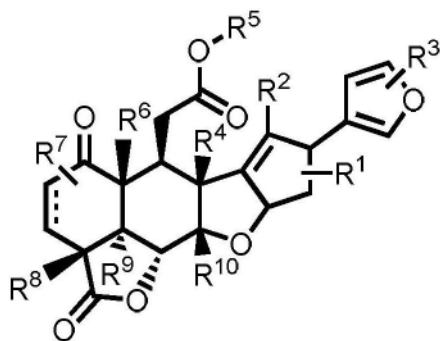


R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立地为

(III)。

氢、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；或与结合剂接头相连的键。仅一个 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 或 R^{10} 为与结合剂接头相连的键。||为单键或双键。

[0453] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂具有下式:



R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立地为

(III)。

氢、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；或与结合剂接头相连的键。仅一个 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 或 R^{10} 为与结合剂接头相连的键。||为单键或双键。

[0454] 在实施例中,E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸,所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。在实施例中,与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

[0455] 应理解,本文所描述的实例和实施例仅是出于说明性目的,并且根据其进行的各种修改或改变将启发本领域的技术人员并且将被包含在本申请的精神和权限内以及所附权利要求书的范围内。本文所引用的所有出版物、专利和专利申请均出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0456] V. 实施例

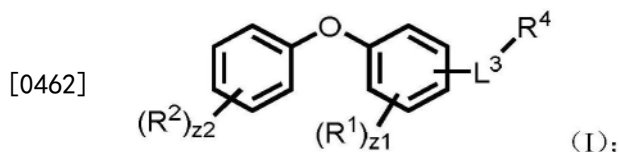
[0457] 实施例P1.一种靶蛋白降解剂,其包括1) 单价靶蛋白结合剂和2) 单价E3泛素连接酶结合剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4或人RNF114。

[0458] 实施例P2.根据实施例P1所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂能够与E3泛素连接酶的半胱氨酸形成共价键。

[0459] 实施例P3.根据实施例P1到P2中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述靶蛋白结合剂和E3泛素连接酶结合剂通过结合剂接头共价键合。

[0460] 实施例P4.根据实施例P1到P3中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

[0461] 实施例P5.根据实施例P1到P4中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



[0463] 其中

[0464] R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^1 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0465] R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经

取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0466] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基；

[0467] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0468] R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

[0469] E是亲电部分；

[0470] z_1 为0到4的整数；

[0471] z_2 为0到5的整数；并且

[0472] 其中仅一个 R^1 或一个 R^2 为与结合剂接头相连的键。

[0473] 实施例P6. 根据实施例P1到P5中任一项所述的靶蛋白降解剂，

[0474] 其中

[0475] R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{11} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{11} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{11} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{11} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{11} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{11} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^1 取代基可以任选地连接，以形成经 R^{11} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{11} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{11} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{11} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0476] R^{11} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、

N_3 、 $-SF_5$ 、经 R^{12} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{12} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{12} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0477] R^{12} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0478] R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{21} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^2 取代基可以任选地连接，以形成经 R^{21} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{21} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0479] R^{21} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{22} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{22} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0480] R^{22} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0481] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经 R^3 -取代或未经取代的 C_1 - C_8 亚烷基、经 R^3 -取代或未经取代的2元到8元亚杂烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基或经 R^3 -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基；

[0482] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R³¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R³¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R³¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R³¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R³¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0483] R³¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R³²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R³²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R³²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R³²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R³²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0484] R³²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0485] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁴¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁴¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或E；

[0486] R⁴¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁴²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁴²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁴²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁴²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁴²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁴²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0487] R⁴²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0488] 实施例P7. 根据实施例P6所述的靶蛋白降解剂, 其中R²独立地为卤素、-CF₃、-NO₂、经R²¹-取代或未经取代的C₁-C₃烷基、未经取代的2元到3元杂烷基或与结合剂接头相连的

键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成未经取代的苯基;并且

[0489] R^{21} 独立地为OH。

[0490] 实施例P8.根据实施例P6到P7中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中 z_2 为1并且 R^2 为与结合剂接头相连的键。

[0491] 实施例P9.根据实施例P6到P8中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中 R^1 独立地为卤素。

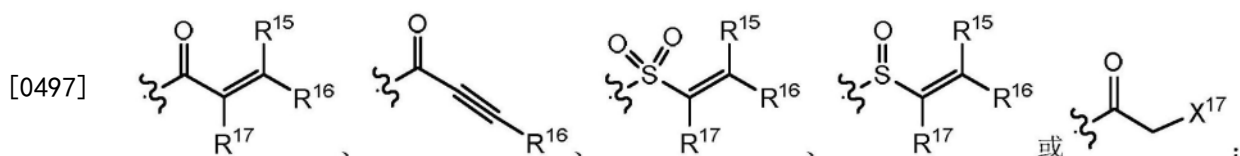
[0492] 实施例P10.根据实施例P6到P9中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中 z_1 为0。

[0493] 实施例P11.根据实施例P6到P10中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中 L^3 为 $-N(R^3)-$;

[0494] R^3 独立地为经 R^{31} -取代的甲基、未经取代的苯基或未经取代的5元到6元杂芳基;并且

[0495] R^{31} 独立地为未经取代的苯基或未经取代的5元到6元杂芳基。

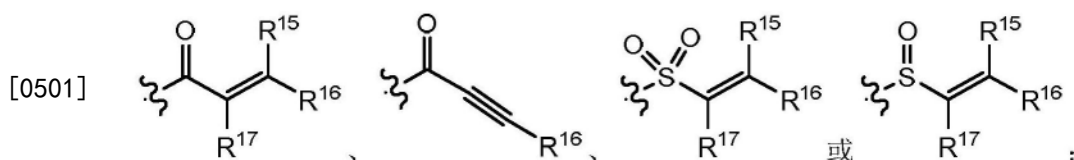
[0496] 实施例P12.根据实施例P6到P11中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中E为



[0498] R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0499] 并且 X^{17} 为卤素。

[0500] 实施例P13.根据实施例P6到P12中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中E为



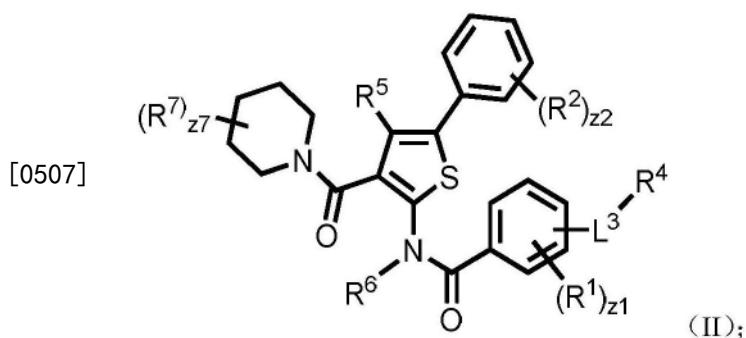
[0502] R^{15} 、 R^{16} 和 R^{17} 独立地为氢。

[0503] 实施例P14.根据实施例P6到P12中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中E为



[0505] 实施例P15.根据实施例P1到P3中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶是RNF114。

[0506] 实施例P16.根据实施例P1到P3和P15中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



[0508] 其中

[0509] R^1 和 R^2 独立地为卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^1 取代基或两个 R^2 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0510] R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；

[0511] R^7 独立地为氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^7 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0512] L^3 为键、 $-\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^3)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基；

[0513] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、

NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0514] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

[0515] E是亲电部分；

[0516] z₁为0到4的整数；

[0517] z₂为0到5的整数；

[0518] z₇为0到10的整数；并且

[0519] 其中仅一个R¹、R²、R⁵、R⁶或R⁷独立地为与结合剂接头相连的键。

[0520] 实施例P17. 根据实施例P16所述的靶蛋白降解剂，其中

[0521] R¹、R²和R⁷独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基或两个R²取代基可以任选地连接，以形成经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0522] R⁵和R⁶独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；

[0523] R⁷独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-

OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R⁷取代基可以任选地连接，以形成经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基

[0524] R⁵¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0525] L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经R³-取代或未经取代的C₁-C₈亚烷基、经R³-取代或未经取代的2元到8元亚杂烷基、经R³-取代或未经取代的C₃-C₈亚环烷基、经R³-取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经R³-取代或未经取代的C₆-C₁₀亚芳基或经R³-取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基；

[0526] R³独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R³¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R³¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R³¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R³¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R³¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0527] R³¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R³²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R³²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R³²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R³²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R³²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R³²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0528] R³²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

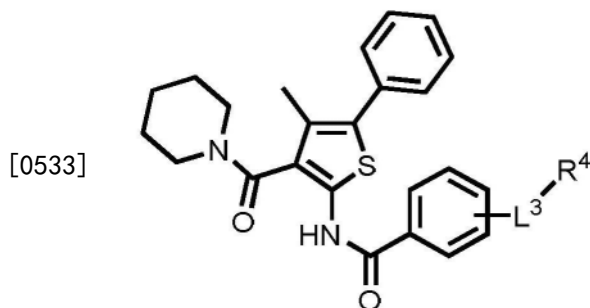
[0529] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-

CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁴¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁴¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁴¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或E；

[0530] R⁴¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁴²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁴²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁴²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁴²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁴²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁴²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

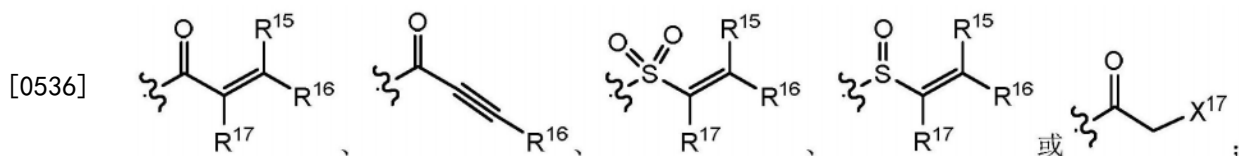
[0531] R⁴²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0532] 实施例P18. 根据实施例P17所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



[0534] 实施例P19. 根据实施例P17到P18中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中L³为-CH₂NH-。

[0535] 实施例P20. 根据实施例P17到P19中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中E为

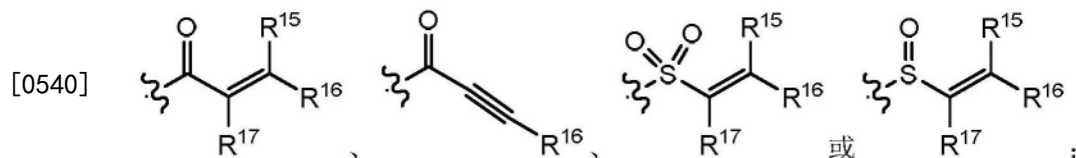


[0537] R¹⁵、R¹⁶和R¹⁷独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-Cl₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCl₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-

OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

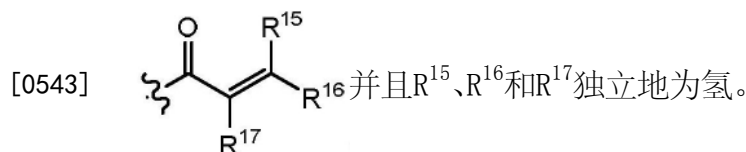
[0538] 并且X¹⁷为卤素。

[0539] 实施例P21. 根据实施例P17到P20中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中E为

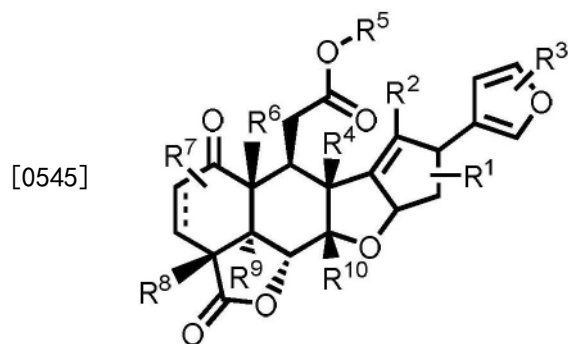


[0541] R¹⁵、R¹⁶和R¹⁷独立地为氢。

[0542] 实施例P22. 根据实施例P17到P21中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中E为



[0544] 实施例P23. 根据实施例P1到P3和P15中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



[0546] R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；或与结合剂接头相连的键；

[0547] 其中仅一个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹或R¹⁰为与结合剂接头相连的键；并且

[0548] 为单键或双键。

[0549] 实施例P24. 根据实施例P23所述的靶蛋白降解剂, 其中

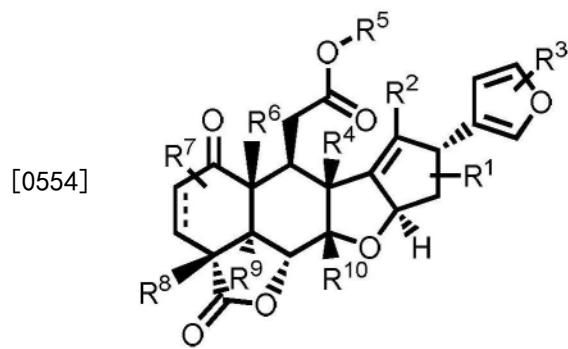
[0550] R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-

OCH_2Cl 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、 R^{51} -取代或未经取代的3元8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；或与结合剂接头相连的键；

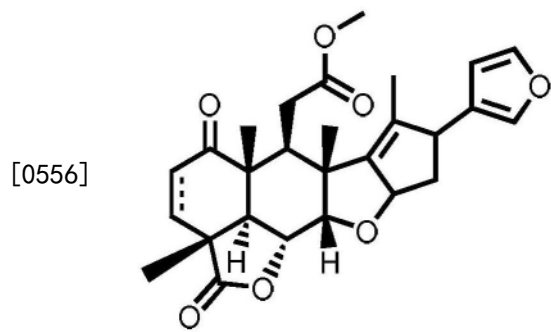
[0551] 其中仅一个 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 或 R^{10} 为与结合剂接头相连的键；

[0552] R^{51} 独立地为氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元10元杂芳基。

[0553] 实施例P25.根据实施例P23所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:

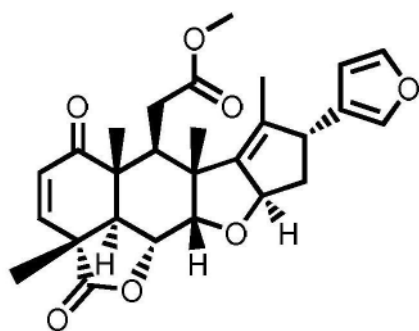


[0555] 实施例P26.根据实施例P24所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:



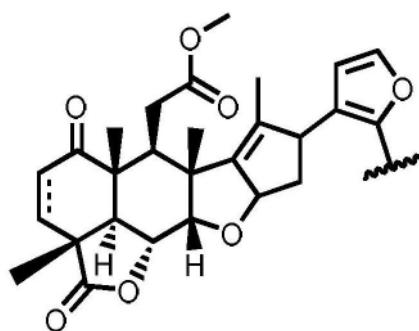
[0557] 实施例P27.根据实施例P24所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂是具有下式的单价化合物:

[0558]



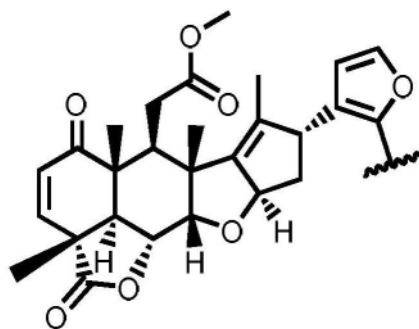
[0559] 实施例P28.根据实施例P24所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:

[0560]



[0561] 实施例P29.根据实施例P24所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:

[0562]



[0563] 实施例P30.根据实施例P3到P29中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述结合剂接头为 L^{11} - L^{12} - L^{13} - L^{14} ;

[0564] L^{11} 直接连接到所述E3泛素连接酶结合剂;

[0565] L^{11} 为-N(R^{61})-、-C(O)-、-C(O)N(R^{61})-、-N(R^{61})C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)₂-、-S(O)-、-O-、-S-、-NHC(O)NH-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头;并且

[0566] L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、-N(R^{61})-、-C(O)-、-C(O)N(R^{61})-、-N(R^{61})C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)₂-、-S(O)-、-O-、-S-、-NHC(O)NH-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0567] 实施例P31.根据实施例P30所述的靶蛋白降解剂,其中

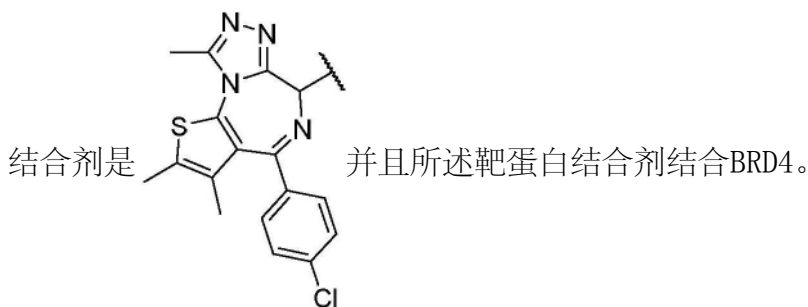
[0568] L^{11} 为 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1-C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3-C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头;

[0569] L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1-C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3-C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6-C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头;

[0570] R^{61} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1-C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3-C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6-C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0571] 实施例P32.根据实施例P1到P31中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述靶蛋白结合剂能够结合与疾病相关的靶蛋白。

[0572] 实施例P33.根据实施例P1到P32中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述靶蛋白



[0573] 实施例P34.一种药物组合物,其包括根据实施例P1到P33中任一项所述的靶蛋白降解剂和药学上可接受的赋形剂。

[0574] 实施例P35.一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包括使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触。

[0575] 实施例P36.一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包括使所述细胞蛋白与根据实施例1到P33中任一项所述的靶蛋白降解剂接触。

[0576] 实施例P37.根据实施例P35到P36中任一项所述的方法,其进一步包括以下步骤:

[0577] A) 使与靶蛋白降解剂接触的细胞蛋白泛素化,并由此形成泛素化的细胞蛋白;

[0578] B) 使泛素化的细胞蛋白与蛋白酶体接触,并由此形成泛素化的细胞蛋白-蛋白酶体复合物;以及

[0579] C) 通过蛋白酶体对细胞蛋白进行蛋白水解。

[0580] 实施例P38.一种治疗癌症的方法,所述方法包括使与癌症相关的细胞蛋白与靶蛋

白降解剂接触。

[0581] 实施例P39.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施例P1到P33中任一项所述的靶蛋白降解剂。

[0582] 实施例P40.一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包括使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包括:

[0583] i) 单价E3泛素连接酶结合剂;

[0584] ii) 单价靶蛋白结合剂;以及

[0585] iii) 与所述单价E3泛素连接酶结合剂和所述单价靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。

[0586] 实施例P41.根据实施例P40所述的方法,其中在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成所述靶蛋白降解剂。

[0587] 实施例P42.根据实施例P41所述的方法,其中在合成之前,从候选E3泛素连接酶结合剂中鉴定出所述E3泛素连接酶结合剂。

[0588] 实施例P43.根据实施例P42所述的方法,其中通过包括以下步骤的方法来鉴定所述E3泛素连接酶结合剂:

[0589] i) 使E3泛素连接酶蛋白与候选E3泛素连接酶结合剂的混合物接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

[0590] ii) 将来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的候选E3泛素连接酶结合剂鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0591] 实施例P44.根据实施例P43所述的方法,其中所述候选E3泛素连接酶结合剂包括共价半胱氨酸修饰剂部分,并且候选E3泛素连接酶结合剂通过检测E3泛素连接酶结合剂与E3泛素连接酶蛋白的共价结合以形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物而被鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0592] 实施例P45.根据实施例P44所述的方法,其中E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。

[0593] 实施例P46.根据实施例P40所述的方法,其中在合成之前,鉴定所述靶蛋白结合剂。

[0594] 实施例P47.根据实施例P46所述的方法,其中通过包括以下步骤的方法来鉴定所述靶蛋白结合剂:

[0595] i) 使细胞蛋白与候选靶蛋白结合剂的混合物接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;以及

[0596] ii) 鉴定形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的靶蛋白结合剂。

[0597] 实施例P48.根据实施例P47所述的方法,其中通过检测细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物,将形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的候选靶蛋白结合剂鉴定为靶蛋白结合剂。

[0598] 实施例P49.根据实施例P48所述的方法,其中细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。

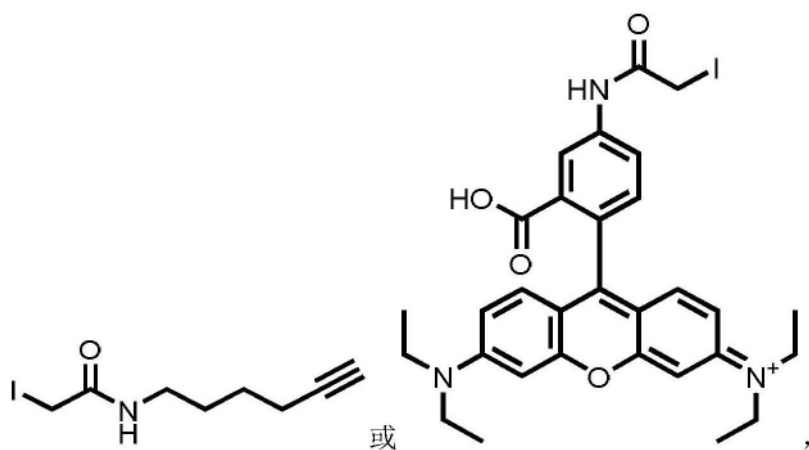
[0599] 实施例P50.根据实施例P40所述的方法,其中在合成之前,修饰E3泛素连接酶结合剂以去除共价半胱氨酸修饰剂部分。

[0600] 实施例P51.一种鉴定被靶蛋白结合剂接触的细胞蛋白的方法,所述方法包括:

[0601] A) 使细胞蛋白质组或细胞的第一样品与所述靶蛋白结合剂接触,从而形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;

[0602] B) 使步骤A的细胞蛋白质组或细胞的所得第一样品和尚未与所述靶蛋白结合剂接

触的所述细胞蛋白质组或细胞的第二样品与具有下式的化合物接触:



[0603] C) 使步骤B的所得第一样品与第一可检测剂接触,并使步骤B的所得第二样品与第二可检测剂接触;

[0604] D) 测量结合至选定蛋白质的所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平;以及

[0605] E) 通过测量所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平之间的差异来鉴定细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物中的所述细胞蛋白,所述第一可检测剂和所述第二可检测剂结合至能够形成所述细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的所述细胞蛋白。

[0606] 实施例P52.根据实施例P51所述的方法,其中

[0607] A) 第一可检测剂或第二可检测剂中的一个可检测剂包括原子的轻同位素,而第一可检测剂或第二可检测剂中的第二个可检测剂包括原子的重同位素;

[0608] B) 通过液相色谱质谱法测定所选蛋白质的第一可检测剂和第二可检测剂的水平;以及

[0609] C) 通过与第一可检测剂结合的细胞蛋白的水平和与第二可检测剂结合的细胞蛋白的水平之间的差异来鉴定能够结合靶蛋白结合剂的细胞蛋白。

[0610] 实施例P53.根据实施例P35到P52中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

[0611] 实施例P54.根据实施例P53所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价结合E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

[0612] 实施例P55.根据实施例P53到P54中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

[0613] 实施例P56.根据实施例P55所述的方法,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C132。

[0614] 实施例P57.根据实施例P55所述的方法,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C135。

[0615] 实施例P58.根据实施例P53到P54中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

[0616] 实施例P59.根据实施例P58所述的方法,其中所述半胱氨酸残基是人RNF114的C8。

[0617] 实施例P60.一种制备E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包括:

[0618] A) 使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

[0619] B) 使所述E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物。

[0620] 实施例P61.一种制备细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包括:

[0621] A) 使所述细胞蛋白与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

[0622] B) 使所述细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物。

[0623] 实施例P62.一种抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成的方法,所述方法包括使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成。

[0624] 实施例P63.根据实施例P60到P62中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价键合E3泛素连接酶的半胱氨酸。

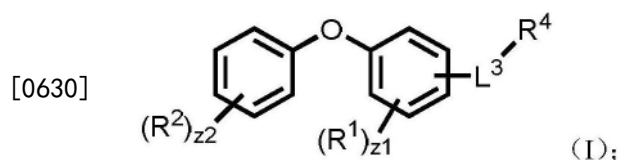
[0625] 实施例P64.根据实施例P62到P63中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂在E3泛素连接酶的氨基酸处接触E3泛素连接酶,所述E3泛素连接酶能够在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下接触细胞蛋白以形成细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物。

[0626] 实施例P65.根据实施例P60到P64中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

[0627] 实施例P66.根据实施例P63到P64中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是RNF4,并且半胱氨酸是人RNF4的C132。

[0628] 实施例P67.根据实施例P63到P64中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是RNF4,并且半胱氨酸是人RNF4的C135。

[0629] 实施例P68.根据实施例P65到P67中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:



[0631] 其中

[0632] R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-$

OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；两个R¹取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0633] R²独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；两个R²取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0634] L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基；

[0635] R³独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0636] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

[0637] E是亲电部分；

[0638] z₁为0到4的整数；并且

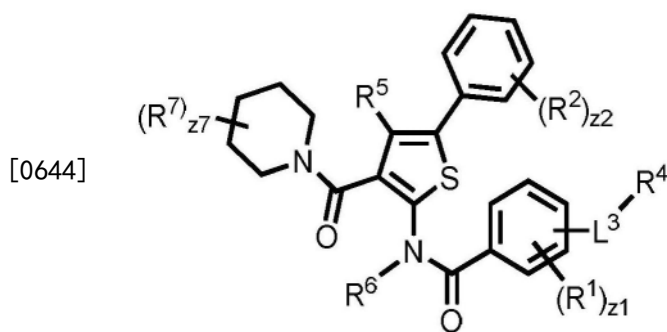
[0639] z₂为0到5的整数。

[0640] 实施例P69.根据实施例P60到P64中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

[0641] 实施例P70.根据实施例P63到P64中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF114，并且半胱氨酸是人RNF114的C8。

[0642] 实施例P71.根据实施例P69到P70中任一项所述的方法，其中所述细胞蛋白是p21。

[0643] 实施例P72.根据实施例P69到P71中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:



[0645] R^1 和 R^2 独立地为卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基;两个 R^1 取代基或两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0646] R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基;

[0647] R^7 独立地为氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基;两个 R^7 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0648] L^3 为键、 $-\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^3)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基;

[0649] R^3 独立地为氢、氧代、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{Cl}_3$ 、 CHCl_2 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCl}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基;

OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0650] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NH₂OH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

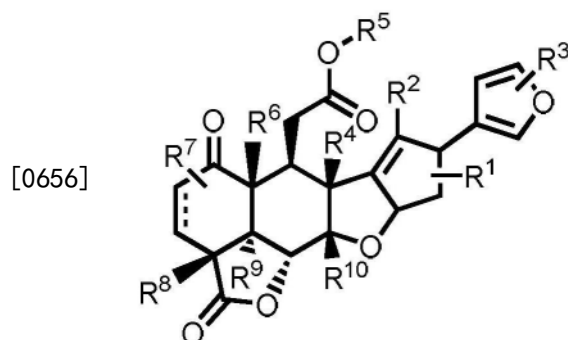
[0651] E是亲电部分；

[0652] z₁为0到4的整数；

[0653] z₂为0到5的整数；并且

[0654] z₇为0到10的整数。

[0655] 实施例P73.根据实施例P69到P71中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式：



[0657] R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NH₂OH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；并且

[0658] || 为单键或双键。

[0659] 实施例P74.根据实施例P35到P73中任一项所述的方法，其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸，所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

[0660] 实施例P75.根据实施例P74所述的方法，其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

[0661] VI. 另外的实施例

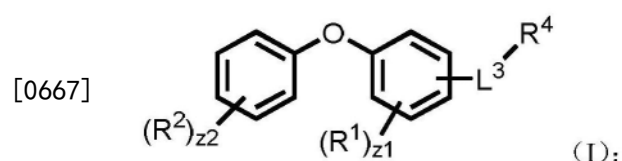
[0662] 实施例1.一种靶蛋白降解剂,其包括1)靶蛋白结合剂和2)E3泛素连接酶结合剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4或人RNF114。

[0663] 实施例2.根据实施例1所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂能够与E3泛素连接酶的半胱氨酸形成共价键。

[0664] 实施例3.根据实施例1到2中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述靶蛋白结合剂和E3泛素连接酶结合剂通过结合剂接头共价键合。

[0665] 实施例4.根据实施例1到3中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

[0666] 实施例5.根据实施例1到4中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0668] 其中

[0669] R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^1 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0670] R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0671] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基;

[0672] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、

N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0673] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

[0674] E是亲电部分；

[0675] z₁为0到4的整数；

[0676] z₂为0到5的整数；并且

[0677] 其中仅一个R¹或一个R²为与结合剂接头相连的键。

[0678] 实施例6. 根据实施例1到5中任一项所述的靶蛋白降解剂，

[0679] 其中

[0680] R¹独立地为卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R¹¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R¹¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R¹¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R¹¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基可以任选地连接，以形成经R¹¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R¹¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R¹¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0681] R¹¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R¹²-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R¹²-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R¹²-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R¹²-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R¹²-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R¹²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0682] R¹²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0683] R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{21} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个 R^2 取代基可以任选地连接，以形成经 R^{21} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{21} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0684] R^{21} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{22} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{22} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{22} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0685] R^{22} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0686] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经 R^3 -取代或未经取代的 C_1 - C_8 亚烷基、经 R^3 -取代或未经取代的2元到8元亚杂烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基或经 R^3 -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基；

[0687] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{31} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0688] R^{31} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{32} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经

R^{32} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{32} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0689] R^{32} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0690] R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{41} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{41} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或E；

[0691] R^{41} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{42} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0692] R^{42} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0693] 实施例7. 根据实施例6所述的靶蛋白降解剂, 其中 R^2 独立地为卤素、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、经 R^{21} -取代或未经取代的 C_1 - C_3 烷基、未经取代的2元到3元杂烷基或与结合剂接头相连的键；两个 R^2 取代基可以任选地连接, 以形成未经取代的苯基；并且

[0694] R^{21} 独立地为 $-OH$ 。

[0695] 实施例8. 根据实施例6到7中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中 z_2 为1并且 R^2 为与结合剂接头相连的键。

[0696] 实施例9. 根据实施例6到8中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中 R^1 独立地为卤素。

[0697] 实施例10. 根据实施例6到9中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中 z_1 为0。

[0698] 实施例11. 根据实施例6到10中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中 L^3 为 $-N(R^3)-$ ；

[0699] R^3 独立地为经 R^{31} -取代的甲基、未经取代的苯基或未经取代的5元到6元杂芳基；并且

OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R¹取代基或两个R²取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0715] R⁵和R⁶独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；

[0716] R⁷独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基或与结合剂接头相连的键；两个R⁷取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0717] L³为键、-N(R³)-、-C(O)-、-C(O)N(R³)-、-N(R³)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基；

[0718] R³独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0719] R⁴独立地为氢、氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基

或E;

[0720] E是亲电部分;

[0721] z1为0到4的整数;

[0722] z2为0到5的整数;

[0723] z7为0到10的整数;并且

[0724] 其中仅一个 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 或 R^7 独立地为与结合剂接头相连的键。

[0725] 实施例17. 根据实施例16所述的靶蛋白降解剂, 其中

[0726] R^1 、 R^2 和 R^7 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键; 两个 R^1 取代基或两个 R^2 取代基可以任选地连接, 以形成经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基;

[0727] R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键;

[0728] R^7 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或与结合剂接头相连的键; 两个 R^7 取代基可以任选地连接, 以形成经 R^{51} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{51} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{51} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基

[0729] R^{51} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、

N_3 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0730] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经 R^3 -取代或未经取代的 C_1 - C_8 亚烷基、经 R^3 -取代或未经取代的2元到8元亚杂烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^3 -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基或经 R^3 -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基；

[0731] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{31} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{31} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0732] R^{31} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{32} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{32} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{32} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

[0733] R^{32} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元到10元杂芳基；

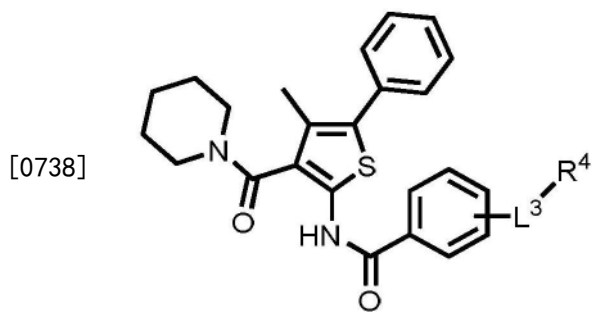
[0734] R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{41} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{41} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或经 R^{41} -取代或未经取代的5元到10元杂芳基或E；

[0735] R^{41} 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_1 - C_8 烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、经 R^{42} -取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经 R^{42} -取

代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁴²-取代或未经取代的5元到10元杂芳基；

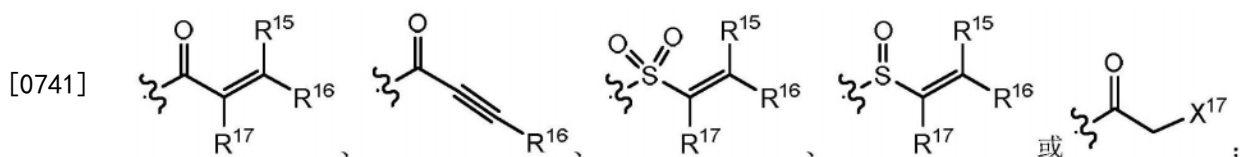
[0736] R⁴²独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

[0737] 实施例18. 根据实施例17所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0739] 实施例19. 根据实施例17到18中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中L³为-CH₂NH-。

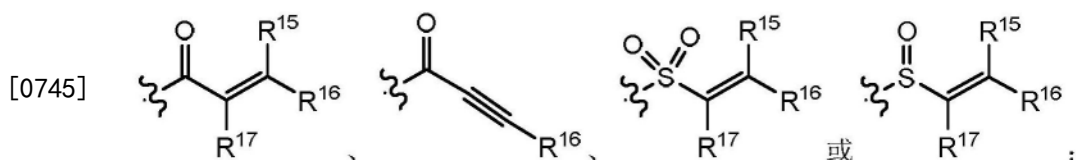
[0740] 实施例20. 根据实施例17到19中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中E为



[0742] R¹⁵、R¹⁶和R¹⁷独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

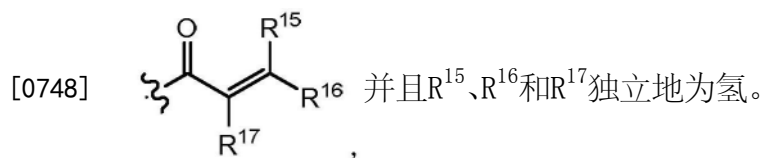
[0743] 并且X¹⁷为卤素。

[0744] 实施例21. 根据实施例17到20中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中E为

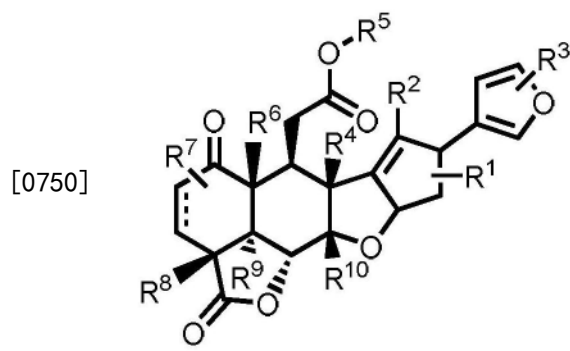


[0746] R¹⁵、R¹⁶和R¹⁷独立地为氢。

[0747] 实施例22. 根据实施例17到21中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中E为



[0749] 实施例23. 根据实施例1到3和15中任一项所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0751] R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基; 或与结合剂接头相连的键;

[0752] 其中仅一个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹或R¹⁰为与结合剂接头相连的键; 并且

[0753]  为单键或双键。

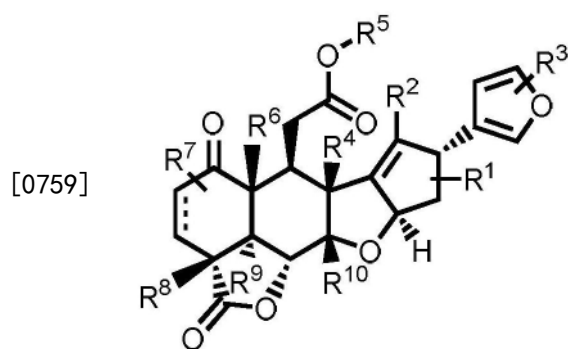
[0754] 实施例24. 根据实施例23所述的靶蛋白降解剂, 其中

[0755] R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地为氢、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、经R⁵¹-取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的2元到8元杂烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₃-C₈环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的3元到8元杂环烷基、经R⁵¹-取代或未经取代的C₆-C₁₀芳基或经R⁵¹-取代或未经取代的5元到10元杂芳基; 或与结合剂接头相连的键;

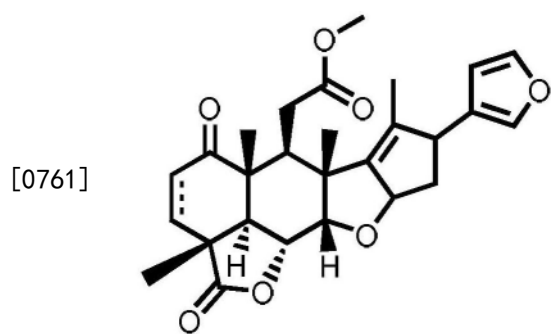
[0756] 其中仅一个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹或R¹⁰为与结合剂接头相连的键;

[0757] R⁵¹独立地为氧代、卤素、-CCl₃、-CBr₃、-CF₃、-CI₃、-CHCl₂、-CHBr₂、-CHF₂、-CHI₂、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂F、-CH₂I、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(O)NHNH₂、-NHC(O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl₃、-OCF₃、-OCBr₃、-OCI₃、-OCHCl₂、-OCHBr₂、-OCHI₂、-OCHF₂、-OCH₂Cl、-OCH₂Br、-OCH₂I、-OCH₂F、-N₃、-SF₅、未经取代的C₁-C₈烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的C₃-C₈环烷基、未经取代的3元到8元杂环烷基、未经取代的C₆-C₁₀芳基或未经取代的5元到10元杂芳基。

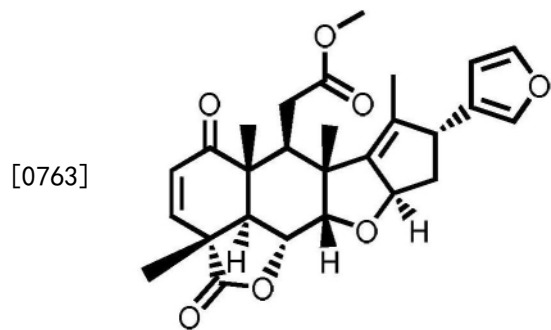
[0758] 实施例25. 根据实施例23所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



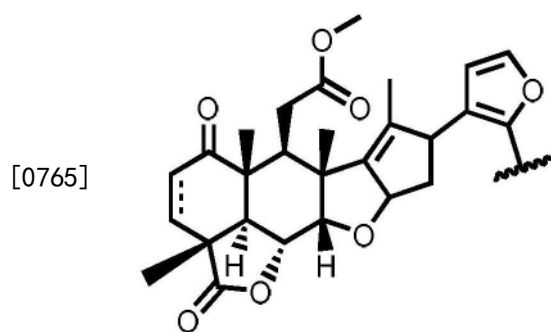
[0760] 实施例26. 根据实施例24所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0762] 实施例27. 根据实施例24所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:

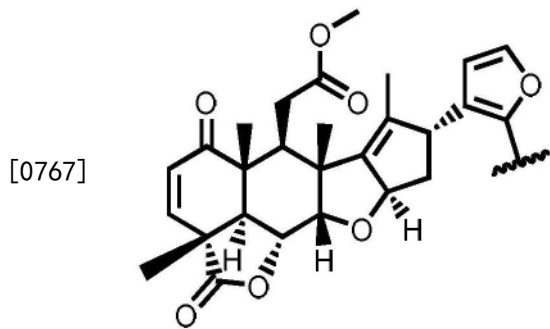


[0764] 实施例28. 根据实施例24所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂具有下式:



[0766] 实施例29. 根据实施例24所述的靶蛋白降解剂, 其中所述E3泛素连接酶结合剂具

有下式：



[0768] 实施例30.根据实施例3到29中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述结合剂接头为 L^{11} - L^{12} - L^{13} - L^{14} ;

[0769] L^{11} 直接连接到所述E3泛素连接酶结合剂;

[0770] L^{11} 为- $N(R^{61})$ -、- $C(O)$ -、- $C(O)N(R^{61})$ -、- $N(R^{61})C(O)$ -、- $N(H)$ -、- $C(O)N(H)$ -、- $N(H)C(O)$ -、- $C(O)O$ -、- $OC(O)$ -、- $S(O)_2$ -、- $S(O)$ -、- O -、- S -、- $NHC(O)NH$ -、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头;并且

[0771] L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、- $N(R^{61})$ -、- $C(O)$ -、- $C(O)N(R^{61})$ -、- $N(R^{61})C(O)$ -、- $N(H)$ -、- $C(O)N(H)$ -、- $N(H)C(O)$ -、- $C(O)O$ -、- $OC(O)$ -、- $S(O)_2$ -、- $S(O)$ -、- O -、- S -、- $NHC(O)NH$ -、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基或生物缀合物接头。

[0772] 实施例31.根据实施例30所述的靶蛋白降解剂,其中

[0773] L^{11} 为- $N(R^{61})$ -、- $C(O)$ -、- $C(O)N(R^{61})$ -、- $N(R^{61})C(O)$ -、- $N(H)$ -、- $C(O)N(H)$ -、- $N(H)C(O)$ -、- $C(O)O$ -、- $OC(O)$ -、- $S(O)_2$ -、- $S(O)$ -、- O -、- S -、- $NHC(O)NH$ -、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1 - C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头;

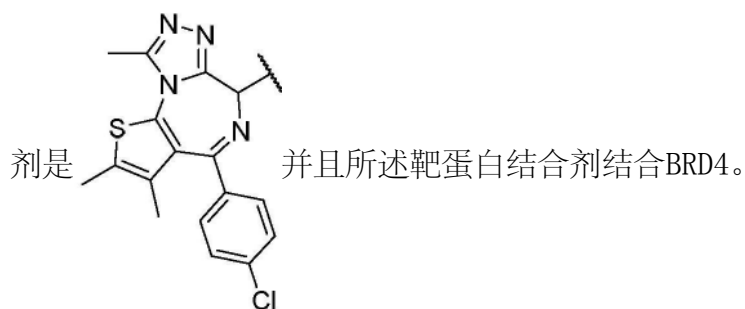
[0774] L^{12} 、 L^{13} 和 L^{14} 独立地为键、- $N(R^{61})$ -、- $C(O)$ -、- $C(O)N(R^{61})$ -、- $N(R^{61})C(O)$ -、- $N(H)$ -、- $C(O)N(H)$ -、- $N(H)C(O)$ -、- $C(O)O$ -、- $OC(O)$ -、- $S(O)_2$ -、- $S(O)$ -、- O -、- S -、- $NHC(O)NH$ -、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_1 - C_{20} 亚烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的2元到20元亚杂烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_3 - C_8 亚环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的3元到8元亚杂环烷基、经 R^{61} -取代或未经取代的 C_6 - C_{10} 亚芳基、经 R^{61} -取代或未经取代的5元到10元亚杂芳基或生物缀合物接头;

[0775] R^{61} 独立地为氧代、卤素、- CCl_3 -、- CBr_3 -、- CF_3 -、- CI_3 -、- $CHCl_2$ -、- $CHBr_2$ -、- CHF_2 -、- CHI_2 -、- CH_2Cl -、- CH_2Br -、- CH_2F -、- CH_2I -、- CN -、- OH -、- NH_2 -、- $COOH$ -、- $CONH_2$ -、- NO_2 -、- SH -、- SO_3H -、- SO_4H -、- SO_2NH_2 -、- $NHNH_2$ -、- ONH_2 -、- $NHC(O)NHNH_2$ -、- $NHC(O)NH_2$ -、- $NHSO_2H$ -、- $NHC(O)H$ -、- $NHC(O)OH$ -、- $NHOH$ -、- $OCCl_3$ -、- OCF_3 -、- $OCBr_3$ -、- OCl_3 -、- $OCHCl_2$ -、- $OCHBr_2$ -、- $OCHI_2$ -、- $OCHF_2$ -、- OCH_2Cl -、- OCH_2Br -、- OCH_2I -、- OCH_2F -、- N_3 -、- SF_5 -、未经取代的 C_1 - C_8 烷基、未经取代的2元到8元杂烷基、未经取代的 C_3 - C_8 环烷基、未经取代的3元8元杂环烷基、未经取代的 C_6 - C_{10} 芳基或未经取代的5元10元杂芳基。

[0776] 实施例32.根据实施例1到31中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述靶蛋白结合

剂能够结合与疾病相关的靶蛋白。

[0777] 实施例33.根据实施例1到32中任一项所述的靶蛋白降解剂,其中所述靶蛋白结合



[0778] 实施例34.一种药物组合物,其包括根据实施例1到33中任一项所述的靶蛋白降解剂和药学上可接受的赋形剂。

[0779] 实施35.一种降低细胞蛋白水平的方法方法,所述方法包括使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触。

[0780] 实施例36.一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包括使所述细胞蛋白与根据实施例1到33中任一项所述的靶蛋白降解剂接触。

[0781] 实施例37.根据实施例35到36中任一项所述的方法,其进一步包括以下步骤:

[0782] A) 使与靶蛋白降解剂接触的细胞蛋白泛素化,并由此形成泛素化的细胞蛋白;

[0783] B) 使泛素化的细胞蛋白与蛋白酶体接触,并由此形成泛素化的细胞蛋白-蛋白酶体复合物;以及

[0784] C) 通过蛋白酶体对细胞蛋白进行蛋白水解。

[0785] 实施例38.一种治疗癌症的方法,所述方法包括使与癌症相关的细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触。

[0786] 实施例39.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施例1到33中任一项所述的靶蛋白降解剂。

[0787] 实施例40.一种降低细胞蛋白水平的方法,所述方法包括使所述细胞蛋白与靶蛋白降解剂接触,并由此形成靶蛋白降解剂-细胞蛋白复合物;其中所述靶蛋白降解剂包括:

[0788] i) E3泛素连接酶结合剂;

[0789] ii) 靶蛋白结合剂;以及

[0790] iii) 与所述E3泛素连接酶结合剂和所述靶蛋白结合剂直接键合的结合剂接头。

[0791] 实施例41.根据实施例40所述的方法,其中在接触之前,通过使E3泛素连接酶结合剂、结合剂接头和靶蛋白结合剂共价反应以产生靶蛋白降解剂,来合成所述靶蛋白降解剂。

[0792] 实施例42.根据实施例41所述的方法,其中在合成之前,从候选E3泛素连接酶粘结合剂中鉴定出所述E3泛素连接酶结合剂。

[0793] 实施例43.根据实施例42所述的方法,其中通过包括以下步骤的方法来鉴定所述E3泛素连接酶结合剂:

[0794] i) 使E3泛素连接酶蛋白与候选E3泛素连接酶结合剂的混合物接触,并由此形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

[0795] ii) 将来自E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的候选E3泛素连接酶结合剂鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0796] 实施例44.根据实施例43所述的方法,其中所述候选E3泛素连接酶结合剂包括共价半胱氨酸修饰剂部分,并且候选E3泛素连接酶结合剂通过检测E3泛素连接酶结合剂与E3泛素连接酶蛋白的共价结合以形成E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物而被鉴定为E3泛素连接酶结合剂。

[0797] 实施例45.根据实施例44所述的方法,其中E3泛素连接酶蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。

[0798] 实施例46.根据实施例40所述的方法,其中在合成之前,鉴定所述靶蛋白结合剂。

[0799] 实施例47.根据实施例46所述的方法,其中通过包括以下步骤的方法来鉴定所述靶蛋白结合剂:

[0800] i) 使细胞蛋白与候选靶蛋白结合剂的混合物接触,并由此形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;以及

[0801] ii) 鉴定形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的靶蛋白结合剂。

[0802] 实施例48.根据实施例47所述的方法,其中通过检测细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物,将形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的候选靶蛋白结合剂鉴定为靶蛋白结合剂。

[0803] 实施例49.根据实施例48所述的方法,其中细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的检测包括使用可检测标记物或质谱。

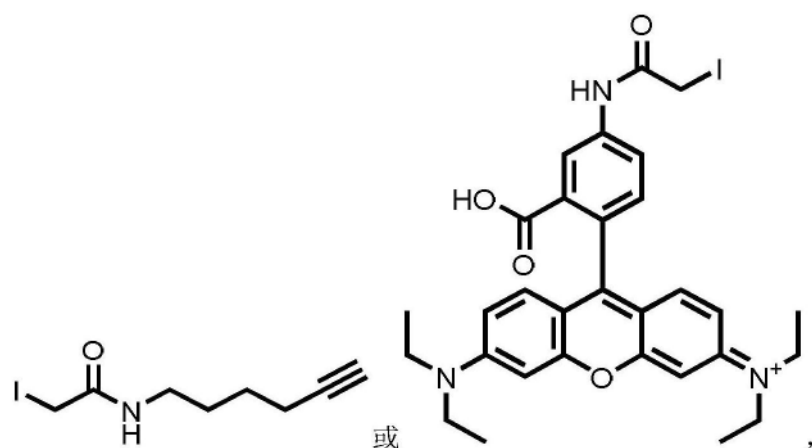
[0804] 实施例50.根据实施例40所述的方法,其中在合成之前,修饰E3泛素连接酶结合剂以去除共价半胱氨酸修饰剂部分。

[0805] 实施例51.一种鉴定被靶蛋白结合剂接触的细胞蛋白的方法,所述方法包括:

[0806] A) 使细胞蛋白质组或细胞的第一样品与所述靶蛋白结合剂接触,从而形成细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物;

[0807] B) 使步骤A的细胞蛋白质组或细胞的所得第一样品和尚未与所述靶蛋白结合剂接

触的所述细胞蛋白质组或细胞的第二样品与具有下式的化合物接触:



[0808] C) 使步骤B的所得第一样品与第一可检测剂接触,并使步骤B的所得第二样品与第二可检测剂接触;

[0809] D) 测量结合至选定蛋白质的所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平;以及

[0810] E) 通过测量所述第一可检测剂和所述第二可检测剂的水平之间的差异来鉴定细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物中的所述细胞蛋白,所述第一可检测剂和所述第二可检测剂结合至能够形成所述细胞蛋白-靶蛋白结合剂复合物的所述细胞蛋白。

[0811] 实施例52.根据实施例51所述的方法,其中

[0812] A) 第一可检测剂或第二可检测剂中的一个可检测剂包括原子的轻同位素,而第一可检测剂或第二可检测剂中的第二个可检测剂包括原子的重同位素;

[0813] B) 通过液相色谱质谱法测定所选蛋白质的第一可检测剂和第二可检测剂的水平;以及

[0814] C) 通过与第一可检测剂结合的细胞蛋白的水平和与第二可检测剂结合的细胞蛋白的水平之间的差异来鉴定能够结合靶蛋白结合剂的细胞蛋白。

[0815] 实施例53.根据实施例35到52中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

[0816] 实施例54.根据实施例53所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价结合E3泛素连接酶半胱氨酸残基。

[0817] 实施例55.根据实施例53到54中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

[0818] 实施例56.根据实施例55所述的方法,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C132。

[0819] 实施例57.根据实施例55所述的方法,其中所述半胱氨酸残基是人RNF4的C135。

[0820] 实施例58.根据实施例53到54中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

[0821] 实施例59.根据实施例58所述的方法,其中所述半胱氨酸残基是人RNF114的C8。

[0822] 实施例60.一种制备E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物的方法,所述方法包括:

[0823] A) 使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

[0824] B) 使所述E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述细胞蛋白接触,并由此形成E3泛素连接酶-E3泛素连接酶结合剂-细胞蛋白复合物。

[0825] 实施例61.一种制备细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物的方法,所述方法包括:

[0826] A) 使所述细胞蛋白与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物;以及

[0827] B) 使所述细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂复合物与所述E3泛素连接酶接触,并由此形成细胞蛋白-E3泛素连接酶结合剂-E3泛素连接酶复合物。

[0828] 实施例62.一种抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成的方法,所述方法包括使所述E3泛素连接酶与E3泛素连接酶结合剂接触,并由此抑制细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物的形成。

[0829] 实施例63.根据实施例60到62中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂共价键合E3泛素连接酶的半胱氨酸。

[0830] 实施例64.根据实施例62到63中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合

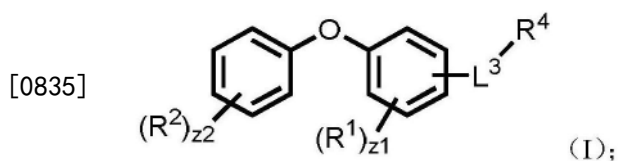
剂在E3泛素连接酶的氨基酸处接触E3泛素连接酶,所述E3泛素连接酶能够在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下接触细胞蛋白以形成细胞蛋白-E3泛素连接酶复合物。

[0831] 实施例65.根据实施例60到64中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是人RNF4。

[0832] 实施例66.根据实施例63到64中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是RNF4,并且半胱氨酸是人RNF4的C132。

[0833] 实施例67.根据实施例63到64中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶是RNF4,并且半胱氨酸是人RNF4的C135。

[0834] 实施例68.根据实施例65到67中任一项所述的方法,其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式:



[0836] 其中

[0837] R^1 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基;两个 R^1 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0838] R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基;两个 R^2 取代基可以任选地连接,以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基;

[0839] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基;

[0840] R^3 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、

N_3 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0841] R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

[0842] E是亲电部分；

[0843] z_1 为0到4的整数；并且

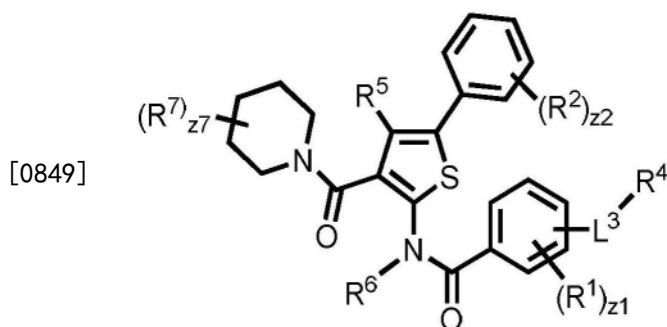
[0844] z_2 为0到5的整数。

[0845] 实施例69. 根据实施例60到64中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF114。

[0846] 实施例70. 根据实施例63到64中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶是人RNF114，并且半胱氨酸是人RNF114的C8。

[0847] 实施例71. 根据实施例69到70中任一项所述的方法，其中所述细胞蛋白是p21。

[0848] 实施例72. 根据实施例69到71中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：



[0850] R^1 和 R^2 独立地为卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；两个 R^1 取代基或两个 R^2 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0851] R^5 和 R^6 独立地为氢、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、

N_3 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0852] R^7 独立地为氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；两个 R^7 取代基可以任选地连接，以形成经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基；

[0853] L^3 为键、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂烷基、经取代或未经取代的亚环烷基、经取代或未经取代的亚杂环烷基、经取代或未经取代的亚芳基或经取代或未经取代的亚杂芳基；

[0854] R^3 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；

[0855] R^4 独立地为氢、氧代、卤素、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或E；

[0856] E是亲电部分；

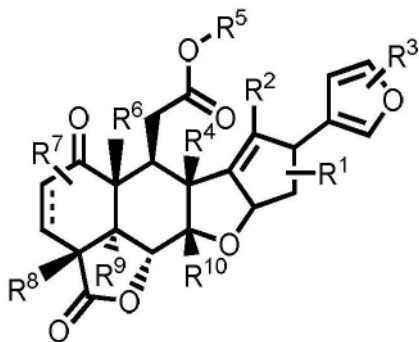
[0857] z_1 为0到4的整数；

[0858] z_2 为0到5的整数；并且

[0859] z_7 为0到10的整数。

[0860] 实施例73. 根据实施例69到71中任一项所述的方法，其中所述E3泛素连接酶结合剂是下式的单价形式：

[0861]



[0862] $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$ 和 R^{10} 独立地为氢、卤素、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基；并且

[0863] || 为单键或双键。

[0864] 实施例74. 根据实施例35到73中任一项所述的方法, 其中E3泛素连接酶结合剂接触E3泛素连接酶的氨基酸, 所述氨基酸在不存在E3泛素连接酶结合剂的情况下缺乏稳定的二级或三级构象结构。

[0865] 实施例75. 根据实施例74所述的方法, 其中与E3泛素连接酶结合剂接触的氨基酸在接触E3泛素连接酶结合剂时采用稳定的二级或三级构象结构。

[0866] 实例

[0867] 实例1: 共价配体筛选发现了针对靶蛋白降解应用的RNF4 E3连接酶募集剂

[0868] 靶蛋白降解已成为用于药物发现的有力策略, 其允许靶向无药可用性蛋白质以进行蛋白酶体降解。此方法采用双功能降解剂, 所述双功能降解剂由与E3连接酶募集剂连接的蛋白质靶向性配体组成, 所述募集剂将E3连接酶带到特定的蛋白质底物上, 从而以蛋白酶体依赖性方式泛素化并降解这些底物。然而, 这种方法面临的一个挑战是, 尽管人类基因组中有数百种已知的E3连接酶, 但目前针对靶蛋白降解应用而存在的E3连接酶募集剂相对较少。在这里, 我们已使用以基于活性的蛋白质谱分析 (ABPP) 为基础的共价配体筛选方法来鉴定与E3泛素连接酶RNF4反应的半胱氨酸反应性小分子。该筛选中的前导共价配体与RING结构域中的两个锌配位半胱氨酸 (C132和C135) 之一反应, 而对RNF4活性没有影响。我们进一步优化了该前导物的效力, 并将该潜在的RNF4募集剂纳入了与BRD4抑制剂JQ1: CCW28-3连接的双功能降解剂中。我们证明了CCW 28-3能够以蛋白酶体依赖性方式降解BRD4, 并且这种降解在RNF4敲除细胞中被减弱。我们证明了使用化学蛋白质组学启用的共价配体筛选平台来扩大E3连接酶募集剂的范围的可行性, 所述E3连接酶募集剂可用于靶蛋白降解应用。

[0869] 靶蛋白降解是一个突破性的药物发现平台, 可通过利用细胞蛋白降解机制来选择性消除靶蛋白, 从而解决无药可用性蛋白质组^{1,2}。该技术涉及利用被称为“降解剂”的双功能分子, 所述双功能分子由与E3连接酶募集剂相连的靶向蛋白质的配体组成。通常, 这些降

解剂能够将E3连接酶募集到特定的蛋白质靶标上,从而以蛋白酶体依赖性方式泛素化并降解靶标。由于对降解剂功效而言靶标的功能抑制不是必需的,因此该策略具有靶向并降解蛋白质组中存在配体的任何蛋白质的潜力。然而,应用该技术的主要挑战是E3连接酶募集剂的数量相对较少。尽管存在约600种不同的E3连接酶,但只有少数E3连接酶募集剂,包含cereblon、VHL、MDM2和cIAP的小分子募集剂^{2,3}。鉴定用于发现与E3连接酶结合的配体的简便策略对于扩展可用于靶蛋白降解应用的E3连接酶募集剂的集合仍然至关重要。

[0870] 基于活性的蛋白质谱分析(ABPP)已成为用于针对无药可用性蛋白质的配体发现的有效平台⁴⁻¹⁰。ABPP利用基于反应性的化学探针直接在复杂的生物系统中定位蛋白质组范围内的反应性和可配位热点^{11,12}。当以竞争方式使用时,共价作用的小分子可以与基于反应性的探针的结合竞争,从而促进针对所关注的蛋白质的共价配体发现^{4-7,9,13-15}。为了发现可能与E3泛素连接酶反应的共价配体,我们首先研究了是否可以用基于半胱氨酸反应性碘乙酰胺-若丹明(IA-若丹明)反应性的探针标记代表性的市售E3连接酶。IA-若丹明能够以剂量响应方式标记MDM2、RNF4和UBE3A(图1A)。尽管先前的研究已经发现了MDM2和UBE3A小分子调节剂¹⁶⁻¹⁸,但尚不存在用于E3泛素连接酶RNF4的化学工具,所述酶识别SUMO酰化的蛋白质并泛素化这些蛋白以用于随后的蛋白酶体降解^{19,20}。因此,我们将精力集中在针对RNF4开发潜在的E3连接酶募集剂上。

[0871] 为了搜索RNF4共价配体,我们使用基于凝胶的ABPP筛选了针对纯人RNF4的IA-若丹明标记的半胱氨酸反应性共价配体库(图1B;表1)。我们从该筛选中鉴定了一些潜在的命中,包含TRH 1-74、YP 1-44、DKM 2-76、TRH 1-23和TRH 1-163。其中,YP 1-44、TRH 1-163和TRH 1-23显示出对RNF4的IA-若丹明标记的可再现和剂量响应性抑制(图1D,图5)。根据这些实验中相应的RNF4银染,我们发现TRH1-163可能引起蛋白质沉淀。基于对231MFP裂解物中一般半胱氨酸反应性的基于凝胶的ABPP分析,与TRH 1-23相比,YP 1-44的选择性低得多(图5)。因此,TRH 1-23似乎是最有希望的RNF4命中(图1D)。

[0872] 我们接下来试图鉴定RNF4内TRH 1-23的修饰位点。我们对来自经TRH 1-23处理的RNF4纯蛋白的胰蛋白酶消化物进行了液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析,并发现TRH 1-23共价修饰了RNF4的RING结构域中的两个锌配位半胱氨酸C132和C135中的一个,但不是两个都被共价修饰(图2A,2B)。为了支持其作为功能性RNF4募集剂的效用,我们想看看TRH 1-23是否对RNF4自身泛素化活性有任何影响,因为先前的研究表明这些半胱氨酸突变为丝氨酸会抑制RNF4的功能21-23。令人惊讶的是,在体外重构测定中,TRH 1-23处理不抑制RNF4自身泛素化活性(图2C)。虽然我们尚不了解解释TRH 1-23治疗缺乏RNF4抑制作用的潜在机制,但我们推测锌可能仍会结合在配位位点,因为TRH 1-23未修饰三个半胱氨酸,或者TRH 1-23可能填充锌通常占据的空间,以维持RNF4活性。尽管如此,这种RNF4抑制作用的缺乏对于其作为E3连接酶募集剂的潜在应用而言是理想的。

[0873] 尽管有前景的针对RNF4的非功能性配体TRH 1-23没有显示出足够的效力以用作RNF4募集剂。因此,我们合成了几种TRH 1-23类似物,并使用基于凝胶的ABPP来测试其对RNF4的效力和构效关系(图3A-3B)。在这些类似物中,我们发现CCW16是最有效的类似物,其在氯乙酰胺支架上被N-苄基和4-甲氧基苯氧基苯基取代,其中观察到RNF4的IA-若丹明标记减少至1 μ M。进一步的验证性研究表明,CCW16的50%抑制浓度(IC₅₀)为1.8 μ M(图3C)。基于观察到的TRH 1-23类似物的结构-活性关系,我们认为CCW16上的4-甲氧基是延伸接头以

制备基于RNF4的降解剂的理想位置。

[0874] 为了证明我们可以将CCW16用作潜在的RNF4募集剂从而用于靶蛋白降解应用,我们合成了CCW-28-3,这是一种将CCW16与BRD4抑制剂JQ1连接的双功能降解剂(图4A)。CCW-28-3对RNF4的效力比CCW16高,其中IC₅₀为0.54 μ M(图4B)。令人信服的是,用CCW-28-3进行处理可在231MFP乳腺癌细胞中以剂量响应方式降解BRD4(图4C),并且通过用蛋白酶体抑制剂硼替佐米(BTZ)、BRD4抑制剂JQ1和E1泛素活化酶抑制剂TAK-243预处理细胞可防止这种降解(图4D-4E)。

[0875] 我们接下来使用同位素串联正交蛋白水解启用的ABPP(isoTOP-ABPP)平台评估了CCW-28-3的蛋白质组范围内的选择性^{4,6,7,12}(图6)。我们用媒剂或CCW-28-3处理了231MFP细胞,并用半胱氨酸反应性碘乙酰胺-炔(IA-炔)探针标记了所得的蛋白质组,然后将同位素轻或重的TEV蛋白酶可裂解的生物素-叠氮化物标签分别附加到媒剂处理组和CCW-28-3处理组中的经探针标记的蛋白质上。使用先前针对isoTOP-ABPP描述的方法富集、洗脱并分析经探针修饰的肽^{4,6,7,12}。尽管由于与其它经IA-炔标记的蛋白质相比其丰度低,我们无法在该实验中观察到RNF4的经探针修饰的肽,但我们证明了,在经鉴定最明显的1114个总定量的经探针修饰的肽中,只有7个同位素的轻重比大于4的靶标,CCW28-3的这些脱靶标均不属于泛素-蛋白酶体系统的一部分(图6)。

[0876] 因为CCW-28-3不是完全选择性的,并且我们针对E3连接酶的RING家族中保守的锌配位半胱氨酸,所以我们想确认RNF4对CCW-28-3介导的BRD4降解的贡献。因此,我们比较了CCW28-3介导的BRD4在对照和RNF4敲除HeLa细胞中的降解。令人信服的是,在HeLa对照细胞中观察到的CCW28-3介导的BRD4降解在RNF4敲除细胞中不明显(图4F;图7)。这些数据进一步表明CCW28-3通过募集RNF4降解了BRD4。

[0877] 我们的研究表明了使用基于ABPP的共价配体筛选方法来快速发现靶向E3连接酶的切入点的可行性,并且可以鉴定、优化这些共价配体命中,并将其掺入降解剂中以用于靶蛋白降解应用。尽管CCW16和CCW-28-3对细胞中的RNF4尚未是完全选择性的,但我们证明了我们仍然可以以RNF4依赖性方式降解BRD4。我们注意到CCW-28-3不会降解BRD4以及其它先前报道的BRD4降解剂(如MZ1),其利用与JQ1连接的VHL募集剂²⁴。可以采用未来的药物化学方法来优化CCW16对RNF4的效力和选择性,并优化CCW-28-3的接头定位和组成,以促进蛋白质底物的更好降解。尽管如此,CCW16代表了一种新颖的RNF4小分子E3连接酶募集剂,其超越了先前报道的其它四个针对cereblon、VHL、MDM2和cIAP的E3连接酶募集剂²。我们相信本文描述的方法可被用于扩大E3连接酶募集剂或调节剂范围的将来应用。

[0878] 实例2:与共价配体的筛选和合成有关的方法和测定

[0879] 在初始筛选中使用的共价配体库。先前已经报道了针对RNF4筛选的许多共价配体的合成和表征^{4-6,13}。

[0880] 基于凝胶的ABPP。如前所述执行基于凝胶的ABPP方法^{5,6,25,26}。纯重组人RNF4购自Boston Biochem(K-220)。将RNF4(0.25 μ g)稀释到50 μ L PBS和1 μ L DMSO(媒剂)或共价作用的小分子中,以达到期望的浓度。在室温下30分钟后,将样品在室温下用250nM IA-若丹明(Setareh Biotech,6222,在无水DMSO中制备)处理1小时。然后将样品用20 μ L的4x还原Laemmli SDS样品上样缓冲液(Alfa Aesar)稀释,并在90 $^{\circ}$ C下加热5分钟。在预制的4-20% Criterion TGX凝胶(Bio-Rad Laboratories, Inc.)上分离样品。在ChemiDoc MP(Bio-Rad

Laboratories, Inc.) 上进行荧光成像,通过使用ImageJ的光密度测定法评估靶标标记的抑制作用。

[0881] RNF4的LC-MS/MS分析。将纯化的RNF4 (10 μ g) 稀释到80 μ L PBS中,并用DMSO或化合物 (50 μ M) 处理30分钟。然后,分别在室温下将DMSO对照用轻质碘乙酰胺 (IA) 处理,同时将经化合物处理的样品用重质IA孵育1小时 (100 μ M, Sigma-Aldrich, 721328)。通过再加入20 μ L 100% (w/v) TCA来沉淀样品,并将样品成对合并,然后冷却至-80 $^{\circ}$ C,持续一小时。然后将合并的样品在4 $^{\circ}$ C下以最大速度离心20分钟,小心地除去上清液,并用冰冷的0.01M HCl/90%丙酮溶液洗涤样品。然后将样品重悬于在100mM碳酸氢铵缓冲液中含有0.1%Protease Max (Promega Corp.V2071)的2.4M尿素中。将样品在60 $^{\circ}$ C下用10mM TCEP还原30分钟。然后将样品用PBS稀释50%,然后加入测序级胰蛋白酶 (每个样品1 μ g, Promega Corp, V5111),在37 $^{\circ}$ C下过夜孵育。第二天,将样品以13200rpm离心30分钟。将上清液转移至新试管中,酸化至最终浓度为5%的甲酸,并保存在-80 $^{\circ}$ C下,直至进行MS分析。

[0882] RNF4泛素化测定。对于体外自体泛素化测定,将含200nM RNF4的15 μ L泛素化测定缓冲液 (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM DTT, pH 7.4) 与DMSO媒剂或共价作用的化合物一起在室温下预孵育30分钟。随后,在泛素化测定缓冲液中加入UBE1 (50nM, Boston Biochem, E-305)、UBE2D1 (400nM Boston Biochem, E2-615)、Flag-泛素 (4000nM, Boston Biochem, U-120) 和ATP (200 μ M),从而使总体积达到30 μ L。将混合物在室温下孵育30分钟,然后用10 μ L的4x Laemmli缓冲液淬灭。如前所述通过在SDS-PAGE凝胶上分离并进行蛋白质印迹来测量泛素化活性。

[0883] 细胞培养。231MFP细胞获得自本杰明·克拉瓦特 (Benjamin Cravatt) 教授,并从MDA-MB-231细胞的异种肿瘤移植物中产生,如先前所述²⁷。RNF4敲除HeLa细胞购自EdiGene USA (CL0033025003A)。RNF4野生型HeLa细胞由EdiGene USA或UC Berkeley细胞培养设施提供。在含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的L-15培养基 (Corning) 中培养231MFP细胞,并将其维持在37 $^{\circ}$ C下 (0% CO₂)。在含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的DMEM培养基 (Corning) 中培养HeLa细胞,并将其维持在37 $^{\circ}$ C下 (5% CO₂)。

[0884] 基于细胞的降解剂测定。为了测定降解剂的活性,将细胞接种到2.0-2.5mL培养基中的6cm组织培养皿 (Corning) 中 (对于231MFP细胞为500,000,对于HeLa细胞为300,000),并使其粘附过夜。第二天早上,将培养基替换成完全培养基,所述完全培养基含有从DMSO中的1000x储备液稀释的期望浓度的化合物。在指定的时间点,在冰上用PBS洗涤细胞一次,然后将150 μ L裂解缓冲液添加到平板中 (10mM磷酸钠, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% Triton X100)。将细胞在裂解缓冲液中孵育5分钟,然后刮取并转移至微量离心管中。然后将裂解物在-80 $^{\circ}$ C下冷冻或立即处理,以进行蛋白质印迹。为了准备进行蛋白质印迹,将裂解物用20,000g离心液离心10分钟,然后通过BCA分析对所得的上清液进行定量。通过用PBS稀释将裂解物归一化,以匹配最低浓度的裂解物,并加入适量的4x Laemmli还原缓冲液。

[0885] 蛋白质印迹。RNF4 (Proteintech, 17810-1-AP, 1:1000)、GAPDH (Proteintech, 60004-1-IG, 1:5000)、BRD4 (Abcam, Ab128874, 1:1000) 和 β -肌动蛋白 (Proteintech Group Inc., 6609-1-IG, 1:7000) 的抗体从指定的商业来源获得,并在5% BSA/TBST中以指定的稀释度制备稀释液。通过SDS/PAGE解析蛋白质,并使用iBlot系统 (Invitrogen) 将其转移到硝

酸纤维素膜上。在室温下,将印迹用含Tween20 (TBST) 溶液的Tris缓冲盐水中的5%BSA封闭1小时,在TBST中洗涤,然后用在每个制造商的推荐稀释剂中稀释的一抗在4℃下过夜探测。用TBST洗涤后,将印迹与购自Ly-Cor的二抗在黑暗中一起孵育,并在室温下在含5%BSA的TBST中以1:10,000的稀释度使用。额外清洗后,使用Odyssey Li-Cor扫描仪将印迹可视化。如果需要额外的一抗孵育,则使用ReBlotPlus强抗体剥离液(EMD Millipore,2504)剥离膜,清洗并再次封闭,然后再与一抗一起重新孵育。

[0886] IsoTOP-ABPP的化学计量学研究。如先前报道的进行IsoTOP-ABPP的研究^{4,6,7,12}。简而言之,通过在PBS中进行探针超声处理裂解细胞,并通过BCA分析测定蛋白质浓度²⁸。对于原位实验,在细胞收集和裂解之前,先用DMSO媒剂或共价作用的小分子(来自1000X DMSO储备液)将细胞处理90分钟。对于体外实验,将稀释在PBS中的蛋白质组样品(每个生物学复制4mg蛋白质组)在室温下用DMSO媒剂或共价作用的小分子处理30分钟。随后在室温下将蛋白质组用IA-炔烃(100μM,Chess GmbH,3187)处理1小时。通过依次添加三(2-羧乙基)膦(TCEP)(1mM,Sigma)、三[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(TBTA)(34μM,Sigma)、硫酸铜(II)(1mM,Sigma)和生物素-接头-叠氮化物(用TEV蛋白酶识别序列以及同位素轻或重缬氨酸功能化的接头)来进行CuAAC,以分别处理对照蛋白质组或经处理的蛋白质组。CuAAC后,通过以6500x g离心将蛋白质组沉淀,在冰冷的甲醇中洗涤,以1:1的对照/经处理比率合并,再次洗涤,然后变性,并通过在1.2%SDS/PBS中加热至80℃持续5分钟进行溶解。通过以6500xg离心沉淀不溶性组分,并将可溶性蛋白质组稀释于5ml 0.2%SDS/PBS中。将标记的蛋白质与抗生物素蛋白-琼脂糖珠(170μl重悬的珠/样品,Thermo Pierce)结合,同时在4℃下旋转过夜。通过分别在PBS和水中洗涤三次来富集与珠连接的蛋白质,然后将其重悬于6M尿素/PBS(Sigma)中,并在TCEP(1mM,Sigma)中还原,用碘乙酰胺(IA)(18mM,Sigma)烷基化,然后洗涤并重悬于2M尿素中,并用2ug/样品测序级胰蛋白酶(Promega)过夜进行胰蛋白酶消化。将胰蛋白酶肽洗脱掉。将珠分别在PBS和水中洗涤三次,在TEV缓冲溶液(水,TEV缓冲液,100μM二硫苏糖醇)中洗涤,并重悬于带有Ac-TEV蛋白酶的缓冲液(Invitrogen)中,并孵育过夜。将肽在水中稀释并用甲酸(1.2M,Spectrum)酸化,并准备进行分析。

[0887] 质谱分析。将来自所有蛋白质组学实验的肽通过压力上样到装有4cm Aqua C18反相树脂(Phenomenex#04A-4299)的250μm内径熔融石英毛细管上,所述反相树脂事先在10分钟内使用100%缓冲液A到100%缓冲液B的梯度在Agilent 600系列HPLC上进行平衡,然后用100%缓冲液B洗涤5分钟并用100%缓冲液A洗涤5分钟。然后使用MicroTee PEEK 360μm配件(Thermo Fisher Scientific#p-888)将样品连接到装有10cm Aqua C18反相树脂和3cm强阳离子交换树脂的13cm激光拉管柱上,以进行isoTOP-ABPP研究。使用Q Exactive Plus质谱仪(Thermo Fisher Scientific)使用5步多维蛋白质鉴定技术(MudPIT)程序,使用500mM醋酸铵水溶液的0%、25%、50%、80%、和100%盐块,并使用缓冲液A中5-55%缓冲液B的梯度(缓冲液A:95:5的水:乙腈,0.1%的甲酸;缓冲液B:80:20的乙腈:水,0.1%的甲酸),分析样品。在启用动态排除的情况下,以数据依赖性采集模式收集数据(60秒)。进行一次完整的MS(MS1)扫描(400-1800m/z),然后对第n个最丰富离子进行15次MS2扫描(ITMS)。将加热的毛细管温度设定为200℃,并且将纳米喷雾电压设定为2.75kV。

[0888] 使用Raw Extractor 1.9.9.2(Scripps研究院)以MS1和MS2文件的形式提取数据,并使用IP2 v.3(Integrated Proteomics Applications,Inc)中的ProLuCID搜索方法在

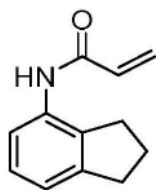
Uniprot人类数据库中进行搜索²⁹。搜索半胱氨酸残基,其中对羧基氨基甲基化进行静态修饰(+57.02146),对甲硫氨酸氧化和轻度或重度TEV标签进行至多三个差异修饰(分别为+464.28596或+470.29977)。要求肽具有至少一个胰蛋白酶末端并且含有TEV修饰。通过DTASelect过滤ProLUCID数据,以使肽假阳性率低于5%。仅对在三个生物学重复中的两个生物学重复中都明显可见的那些经探针修饰的肽解释其同位素轻重比。那些显示比率>3的经探针修饰的肽被进一步分析为共价作用的小分子的潜在靶标。对于比率>3的经修饰的肽,我们过滤了所有三个生物学重复中都存在的肽命中。对于那些经探针修饰的肽比率>3,只有那些3比率>3的肽被解释,否则用最低的比率替换。对于那些经探针修饰的肽比率>4,只有那些3比率>4的肽被解释,否则用最低的比率替换。然后,人工确认比率>3的任何所得经探针修饰的肽的MS1峰形对于所有生物学重复中的被解释的肽具有良好的质量。

[0889] 实例3. 针对RNF4筛选的共价配体的合成和表征

[0890] 通用程序A。将胺(1当量)溶解在DCM(5mL/mmol)中,并冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯(1.2当量),然后加入三乙胺(1.2当量)。使溶液温热至室温,并搅拌过夜。然后将溶液用盐水洗涤,并将粗产物通过硅胶色谱法纯化(并且如果需要的话,进行重结晶),从而得到相应的丙烯酰胺。

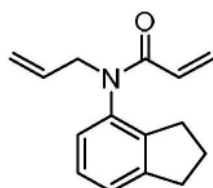
[0891] 通用程序B。将胺(1当量)溶解在DCM(5mL/mmol)中,并冷却至0℃。向溶液中加入氯乙酰氯(1.2当量),然后加入三乙胺(1.2当量)。使溶液温热至室温,并搅拌过夜。然后将溶液用盐水洗涤,并将粗产物通过硅胶色谱法纯化(并且如果需要的话,进行重结晶),从而得到相应的丙烯酰胺。

[0892]



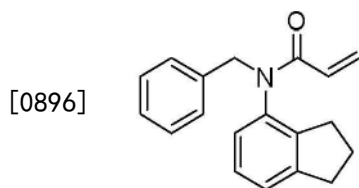
[0893] N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(DKM 2-84)。将4-氨基茚满(402mg,3.0mmol)于DCM(10mL)中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯(379mg,4.2mmol),然后加入三乙胺(379mg,3.7mmol)。使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤,并将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷),从而以59%的产率得到呈白色固体的产物(332mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.72(d,J=7.5Hz,1H),7.54(s,1H),7.10(t,J=7.7Hz,1H),7.01(d,J=7.2Hz,1H),6.40-6.26(m,2H),5.69(dd,J=1.9,9.7Hz,1H),2.91(t,J=7.4Hz,2H),2.78(t,J=7.4Hz,2H),2.05(quint,J=7.4Hz,2H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):163.5,145.3,134.4,133.6,131.2,127.5,127.2,12.0,19.2,33.2,30.1,24.8。HRMS(+ESI):计算值:188.1070(C₁₂H₁₄NO)。观察值:188.1069

[0894]

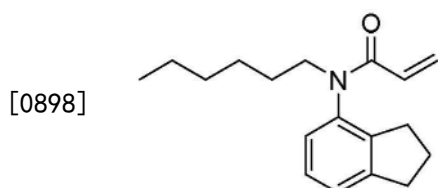


[0895] N-烯丙基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(IGA1-12)。将氢化钠(96mg,

4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液置于氮气气氛下。向溶液中加入含N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(187mg,1.0mmol)的四氢呋喃(2mL)。将溶液冷却到0℃并搅拌。30分钟后加入3-溴丙-1-烯(484mg,4.0mmol),然后使溶液温热至室温并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以67%的产率得到呈黄色结晶固体的产物(151mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.06-7.18(m,2H),6.80-6.88(m,1H),6.26-6.37(dd,J=16.8,2.0Hz,1H),5.76-5.96(m,2H),5.38-5.48(dd,J=10.3,2.1Hz,1H),4.98-5.08(m,2H),4.40-4.52(ddt,J=14.5,6.3,1.3Hz,1H),4.00-4.11(ddt,J=14.5,6.8,1.2Hz,1H),2.82-2.98(m,2H),2.59-2.79(m,2H),1.92-2.07(m,2H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):δ165.1,146.5,142.4,137.9,133.0,128.4,127.8,127.48,126.1,124.3,118.1,51.6,33.3,30.9,25.0。HRMS(+ESI):计算值:228.13(C₁₅H₁₇NO)。观察值:228.1381。



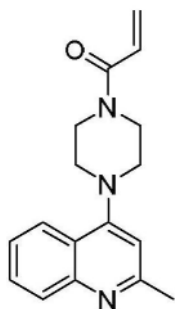
[0897] N-苄基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(IGA 1-14)。将氢化钠(96mg,4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液置于氮气气氛下。向溶液中加入含N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(187mg,1.0mmol)的四氢呋喃(2mL)。将溶液冷却到0℃并搅拌。30分钟后加入苄基溴(476mg,4.0mmol),然后使溶液温热至室温并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以63%的产率得到呈橙色油状物的产物(173mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.10-7.35(m,7H),6.74-6.85(dd,J=7.8,1.1Hz,1H),6.40-6.55(dd,J=16.8,2.1Hz,1H),5.93-6.08(dd,J=16.8,10.3Hz,1H),5.49-5.62(dd,J=10.3,2.1Hz,1H),4.78-5.10(m,2H),2.85-3.02(m,2H),2.52-2.67(m,1H),2.22-2.37(m,1H),1.83-2.01(m,2H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):δ146.4,142.9,137.7,137.3,129.3,128.4,128.3,128.0,127.5,127.5,126.0,124.3,52.3,33.2,30.6,25.1。HRMS(+ESI):计算值:278.15(C₁₉H₁₉NO)。观察值:278.1538。



[0899] N-烯丙基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(IGA1-15)。将氢化钠(96mg,4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液置于氮气气氛下。向溶液中加入含N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(187mg,1.0mmol)的四氢呋喃(2mL)。将溶液冷却到0℃并搅拌。30分钟后加入1-溴己烷(660mg,4.0mmol),然后使溶液温热至室温并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以34%的产率得到呈黄色油状物的产物(92mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.11-7.25(m,2H),6.86-6.96(dd,J=7.5,1.2Hz,1H),6.30-6.40(dd,J=16.8,2.1Hz,1H),5.86-6.00(m,1H),5.41-5.51(dd,J=10.3,2.1Hz,1H),3.82-3.96(m,1H),3.42-3.56(m,1H),2.90-3.04(m,2H),

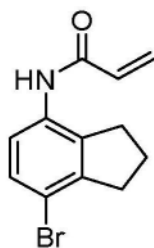
2.65-2.85 (m, 2H), 1.98-2.16 (m, 2H), 1.47-1.63 (m, 2H), 1.20-1.36 (m, 6H), 0.80-0.90 (m, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.16, 146.54, 142.38, 138.21, 128.59, 127.51, 127.35, 126.09, 124.13, 48.67, 33.26, 31.62, 30.85, 27.85, 26.72, 25.01, 22.59, 14.05. HRMS (+ESI): 计算值: 272.19 ($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}$). 观察值: 272.2007。

[0900]

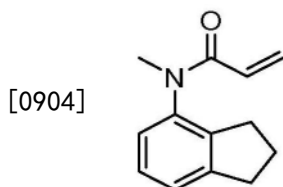


[0901] 1-(4-(2-甲基喹啉-4-基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (IGA 1-26)。将2-甲基-4-(哌嗪-1-基)喹诺酮 (455mg, 2.0mmol) 于DCM (20mL) 中的溶液冷却到0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (217mg, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (243mg, 2.4mmol)。使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤, 并将粗产物通过碱性氧化铝色谱法纯化 (100% 乙酸乙酯), 从而以26% 的产率得到呈黄色油状物的产物 (145mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.90-8.05 (m, 2H), 7.58-7.70 (ddd, $J=8.4, 6.8, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.40-7.50 (ddd, $J=8.2, 6.8, 1.3\text{Hz}$, 1H), 6.68-6.76 (s, 1H), 6.56-6.67 (dd, $J=16.8, 10.5\text{Hz}$, 1H), 6.30-6.40 (dd, $J=16.8, 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.70-5.80 (dd, $J=10.5, 2.0\text{Hz}$, 1H), 3.70-4.06 (d, $J=54.7\text{Hz}$, 4H), 3.10-3.30 (t, $J=5.0\text{Hz}$, 4H), 2.62-2.72 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.5, 159.4, 156.2, 149.2, 129.26, 129.24, 128.3, 127.3, 124.9, 123.0, 121.6, 109.8, 52.3, 51.9, 45.8, 42.0, 25.6. HRMS (+ESI): 计算值: 282.17 ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$). 观察值: 282.1597。

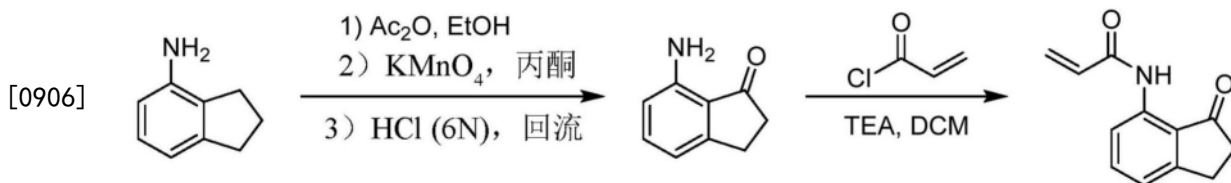
[0902]



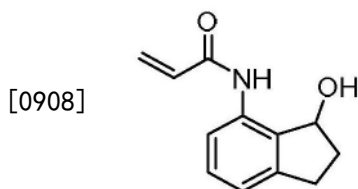
[0903] N-(7-溴-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-65)。向N-(2,3-二氢-1H-茚满-4-基)丙烯酰胺 (DKM 2-84, 469mg, 2.5mmol) 于乙酸 (10mL) 中的溶液中加入溴化铵 (305mg, 3.1mmol) 然后逐滴加入过氧化氢溶液 (50%, 于水中, 1.90mL)。将反应搅拌过夜, 然后将其用饱和碳酸氢钠溶液小心地中和, 并用乙酸乙酯 (3x20mL) 萃取。然后将合并的有机物蒸发, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化 (含20% 乙酸乙酯的己烷), 从而得到621mg呈白色固体的产物 (93%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD): δ 7.36 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 7.27 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 6.49 (dd, $J=10.2, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.35 (dd, $J=1.8, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.77 (dd, $J=1.8, 10.2\text{Hz}$, 1H), 2.95 (q, $J=8.0\text{Hz}$, 4H), 2.08 (quint, $J=7.5\text{Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, MeOD): δ 146.5, 140.2, 134.2, 132.0, 130.8, 128.1, 124.3, 116.9, 101.4, 35.8, 32.9, 24.9。



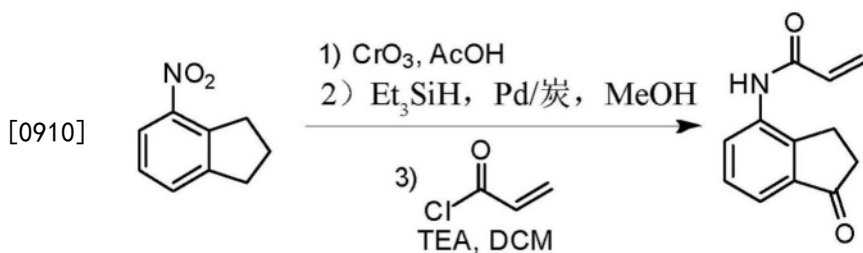
[0905] N-甲基-N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-115)。在氮气气氛,在0℃下向氢化钠(60%分散液,于矿物油中,167mg,4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液中加入N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺(DKM-2-84,188mg,1.0mmol)于四氢呋喃(2mL)中的溶液。搅拌30分钟后,加入碘甲烷(0.25mL,4.0mmol)。使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取三次。将合并的有机物用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,过滤,并蒸发,并将所得粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以35%的产率得到呈澄清油状物的产物(71mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ7.19-7.13(m,2H),6.90(d,J=7.4Hz,1H),6.32(dd,J=2.0,16.8Hz,1H),5.96(dd,J=10.3,16.8Hz,1H),5.43(dd,J=2.0,10.3Hz,1H),3.24(s,3H),2.93(t,J=7.5Hz,2H),2.81-2.66(m,2H),2.08-2.00(m,2H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ165.6,146.6,141.7,139.3,128.2,127.7,127.4,125.1,124.2,36.0,33.2,30.5,24.9。HRMS(+ESI):计算值:202.1226(C₁₃H₁₆NO)。观察值:202.1224。



[0907] N-(3-氧代-2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-129)。在0℃下向4-氨基茛满(1.0g,7.5mmol)于乙醇(20mL)中的溶液加入乙酸酐(1.4mL,15.0mmol)。使溶液升至室温并搅拌过夜,然后蒸发溶剂。然后将残余物溶解在丙酮(50mL)中,向其中加入15%硫酸镁水溶液(1.2g,于6.75mL水中),然后加入高锰酸钾(3.4g,17.0mmol),并将所得溶液搅拌24小时。将反应通过硅藻土垫过滤,先后用氯仿和水洗脱。分离洗脱液,并将水层用另外的氯仿萃取几次。将合并的有机物经硫酸镁干燥,过滤并蒸发。然后将残余物溶解在6N HCl溶液(20mL)中,并加热至90℃。搅拌5小时后,将溶液冷却,用少量碳酸钾中和,并用乙酸乙酯萃取。将合并的有机物用硫酸镁干燥,过滤并蒸发,从而得到610mg粗制的7-氨基茛满-1-酮(55%,经3个步骤),其无需进一步纯化即可使用。在N₂气氛下,在0℃下向7-氨基茛满-1-酮于二氯甲烷(15mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.39mL,4.8mmol),然后加入三乙胺(0.67mL,4.8mmol)。使反应混合物温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用1M HCl溶液(2x)和盐水洗涤,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含10%到20%乙酸乙酯的己烷),从而得到390mg白色固体(47%产率,26%合并,经4个步骤)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ10.64(s,1H),8.45(d,J=8.2Hz,1H),7.55(t,J=7.9Hz,1H),7.12(d,J=7.6Hz,1H),6.45(dd,J=1.0,17.0Hz,1H),6.33(dd,J=10.1,17.0Hz,1H),5.82(dd,J=1.0,10.1Hz,1H),3.11(t,J=11.5Hz,2H),2.74-2.71(m,2H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ209.3,164.4,155.9,138.7,137.0,131.7,128.0,123.1,120.8,116.9,36.5,25.5。HRMS(+ESI):计算值:202.0863(C₁₂H₁₂NO₂)。观察值:202.0860。

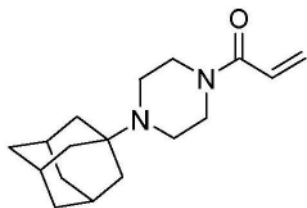


[0909] N-(3-羟基-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-133)。在氮气气氛下,向N-(3-氧代-2,3-二氢-1H-茚满-4-基)丙烯酰胺 (TRH-1-129, 201mg, 1.0mmol) 于无水甲醇 (7mL) 中的溶液中加入硼氢化钠 (46.1mg, 1.2mmol)。搅拌30分钟后,将反应用饱和碳酸氢钠溶液淬灭,并用DCM萃取三次。将合并的有机物用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。将粗品通过硅胶色谱法纯化(含30到50%乙酸乙酯的己烷),从而得到190mg呈白色固体的产物(94%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.93 (s, 1H), 7.98 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.19 (t, J=7.9Hz, 1H), 6.95 (d, J=7.4Hz, 1H), 6.29 (d, J=16.8Hz, 1H), 6.15 (dd, J=10.2, 16.9Hz, 1H), 5.66 (d, J=10.2Hz, 1H), 5.32 (q, J=6.9Hz, 1H), 3.60 (d, J=6.7Hz, 1H), 2.96 (ddd, J=2.4, 9.0, 15.7Hz), 2.73 (quint, J=8.1Hz, 1H), 2.56-2.48 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 1H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 164.1, 143.7, 135.6, 132.8, 131.6, 129.5, 127.3, 121.0, 118.5, 76.2, 36.0, 29.8。HRMS (-ESI): 计算值: 202.0874 (C₁₂H₁₂NO₂)。观察值: 202.0874。



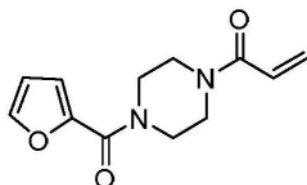
[0911] N-(1-氧代-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-134)。向4-硝基茚满 (5.38g, 33mmol) 于乙酸 (250mL) 中的溶液中缓慢加入三氧化铬 (8.95g, 90mmol)。搅拌24小时后,将反应用2M NaOH中和,并用乙酸乙酯萃取五次。将合并的有机物用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥,过滤并浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化(含10-20%乙酸乙酯的己烷),从而得到1.26g (约7.1mmol) 呈白色固体的4-硝基茚满酮。在氮气气球的气氛下,将该中间体与溶于无水甲醇 (21mL) 中的钯/活性炭 (125mg, 10wt%) 合并。在10分钟的过程中,通过加料漏斗缓慢加入三乙基硅烷 (11.3mL, 71mmol), 同时在室温水浴的冷却下搅拌反应。再搅拌20分钟后,将反应混合物通过硅藻土垫过滤,然后浓缩,从而得到粗制的4-氨基茚满酮,其无需进一步纯化即可使用。然后在N₂气氛下将最终中间体溶解在DCM (21mL) 中,并冷却至0℃,然后缓慢加入丙烯酰氯 (0.77mL, 9.5mmol) 和三乙胺 (1.19mL, 8.5mmol)。使反应温热至室温,同时搅拌过夜,这时将反应用盐水洗涤两次,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。将粗品通过硅胶色谱法纯化(含30-50%乙酸乙酯的己烷),从而得到989mg白色固体 (15%产率,经3个步骤)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.20 (d, J=5.8Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.39 (t, J=7.7Hz, 1H), 6.48 (d, J=16.7Hz, 1H), 6.37 (dd, J=10.0Hz, 16.8Hz, 1H), 5.83 (d, J=10.1Hz, 1H), 3.04 (t, J=5.6Hz, 2H), 2.70 (t, J=5.7Hz, 2H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 206.3, 163.9, 146.0, 138.0, 135.4, 130.7, 128.8, 128.7, 127.6, 120.4, 36.1, 23.4。HRMS (-ESI): 计算值: 200.0717 (C₁₂H₁₀NO₂)。观察值: 200.0715。

[0912]



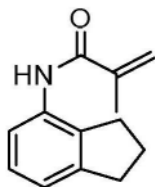
[0913] 1-(4-((3s,5s,7s)-金刚烷-1-基)哌嗪-1-基)内-2-烯-1-酮(TRH 1-143)。在 N_2 气氛下,在 $0^\circ C$ 下同1-(1-金刚烷基)哌嗪(441mg,2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.34mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌24小时。将溶液用盐水洗涤两次,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含0%到5%甲醇的DCM),从而得到131mg棕色固体(24%产率)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 6.59(dd, $J=10.5,16.8$ Hz,1H),6.31(dd, $J=1.8,16.8$ Hz,1H),5.77(dd, $J=5.77$ Hz,1H),4.12(s,4H),3.17(s,4H),2.25(s,3H),2.06(s,6H),1.71(q, $J=8.6$ Hz,6H)。 ^{13}C NMR(100MHz, $CDCl_3$): δ 165.0,129.0,126.4,63.3,44.6,44.1,42.9,39.0,36.4,35.5,29.3.HRMS(+ESI):计算值:275.2118($C_{17}H_{27}N_2O$)。观察值:275.2113。

[0914]



[0915] 1-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮(TRH 1-145)。在 N_2 气氛下,在 $0^\circ C$ 下同1-(2-呋喃基)哌嗪(362mg,2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.34mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌24小时。将溶液用盐水洗涤两次,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含70%到100%乙酸乙酯的己烷),从而得到446mg黄色固体(95%产率)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.53(m,1H),7.06(dd, $J=0.7,3.5$ Hz,1H),6.61(dd, $J=10.5,16.8$ Hz,1H),6.52(dd, $J=1.8,3.5$ Hz,1H),6.33(dd, $J=1.9,16.8$ Hz,1H),5.75(dd, $J=1.9,10.5$ Hz,1H),3.84-3.67(m,8H)。 ^{13}C NMR(100MHz, $CDCl_3$): δ 165.5,159.1,147.5,144.0,128.5,127.1,117.0,111.5,45.6,41.9.HRMS(+ESI):计算值:235.1077($C_{12}H_{15}N_2O_3$)。观察值:235.1075。

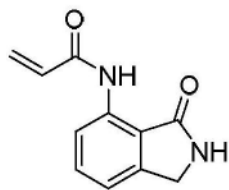
[0916]



[0917] N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)甲基丙烯酰胺(TRH 1-149)。在 N_2 气氛下,在 $0^\circ C$ 下同4-氨基茚满(0.24mL,2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入甲基丙烯酰氯(0.23mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.34mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌3.5小时。将溶液用盐水洗涤两次,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含35%到40%乙酸乙酯的己烷),从而得到378mg灰白色固体(94%产率)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.72(d, $J=8.0$ Hz,1H),7.55(s,1H),7.12(t, $J=7.7$ Hz,1H),7.01(d, $J=7.4$ Hz,1H),5.79(s,1H),5.42(s,1H),2.93(t, $J=7.5$ Hz,2H),2.79(t, $J=7.4$ Hz,2H),7.12-

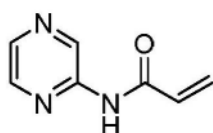
2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.3, 145.1, 140.6, 134.5, 133.7, 127.0, 120.7, 119.8, 118.9, 33.1, 29.9, 24.7, 18.6. HRMS (+ESI): 计算值: 202.1226 ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}$). 观察值: 202.1224。

[0918]

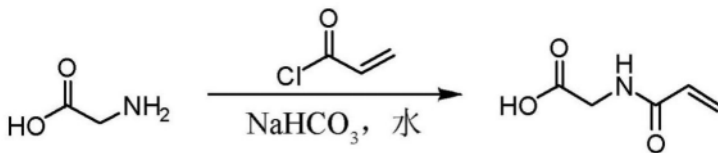


[0919] N-(3-氧代异吲哚啉-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-152)。在 N_2 气氛下,在 0°C 下向7-氨基异吲哚啉-1-酮(99mg, 0.67mmol)于二氯甲烷(4mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.07mL, 0.8mmol),然后加入三乙胺(0.11mL, 0.8mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含50到60%乙酸乙酯的己烷),从而得到58mg白色固体(43%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 10.50 (s, 1H), 8.58 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.55 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.46 (dd, $J=1.3, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.36 (dd, $J=10.0, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.81 (dd, $J=1.3, 10.0\text{Hz}$, 1H), 4.46 (s, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 172.9, 164.2, 143.9, 138.2, 133.8, 131.8, 127.8, 118.0, 117.7, 117.6, 45.6. HRMS (+ESI): 计算值: 203.0815 ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$). 观察值: 203.0814。

[0920]



[0921] N-(吡嗪-2-基)丙烯酰胺 (TRH 1-156)。在 N_2 气氛下,在 0°C 下向氨基吡嗪(192mg, 2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL, 2.4mmol),然后加入三乙胺(0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含50%到70%乙酸乙酯的己烷),从而得到22mg白色固体(7%产率)。 ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 9.65 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 8.38 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 8.27 (dd, $J=1.6, 2.5\text{Hz}$, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.54 (dd, $J=0.8, 16.9\text{Hz}$, 1H), 6.33 (dd, $J=10.3, 16.9\text{Hz}$, 1H), 5.90 (dd, $J=0.8, 10.3\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3): δ 163.5, 148.2, 142.2, 140.6, 137.4, 130.2, 129.8. HRMS (+ESI): 计算值: 150.0662 ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3\text{O}$). 观察值: 150.0660。

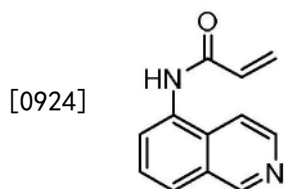


[0922]

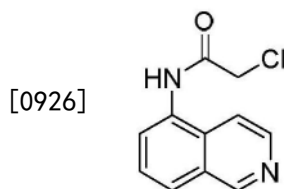


[0923] N-(2-氧代-2-(苯氨基)乙基)丙烯酰胺 (TRH 1-160)。在 0°C 下向甘氨酸(1.50g,

20.0mmol)和碳酸氢钠(1.70g,20.2mmol)于水(30mL)中的溶液中缓慢加入丙烯酰氯(2.45mL,30.2mmol)。搅拌3.5小时后,将反应用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机物经硫酸镁干燥,过滤并浓缩,从而得到油状物。用己烷处理油状物,使白色固体沉淀出来,通过重力过滤收集所述白色固体,从而得到124mg粗制丙烯酰甘氨酸,其中的58mg(粗物质的47%)无需进一步纯化即可立即使用。将该固体(约0.45mmol)溶解在DMF(2.5mL)中,并加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(104mg,0.54mmol)和4-二甲基氨基吡啶(68mg,0.56mmol)于DMF(2.5mL)中的溶液,然后加入苯胺(0.050mL,0.54mmol)。将溶液搅拌过夜,用乙酸乙酯稀释,并用碳酸氢钠饱和溶液和盐水洗涤。然后将有机物经硫酸镁干燥,过滤并浓缩,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含30-60%乙酸乙酯的己烷),从而得到19mg呈白色固体的标题化合物(1%产率,经两个步骤)。¹H NMR(400MHz,MeOD): δ 7.56-7.53(m,2H),7.30(t,J=8.0Hz,2H),7.08(t,J=7.4Hz,1H),6.35(dd,J=9.9,17.1Hz,1H),6.26(dd,J=2.0,17.1Hz,1H),5.71(dd,J=2.0,9.9Hz,1H),4.08(s,2H)。¹³C NMR(100MHz,MeOD): δ 169.4,168.6,139.5,131.7,129.8,127.2,125.3,121.2,44.0。HRMS(-ESI):计算值:203.0826(C₁₁H₁₁N₂O₂)。观察值:203.0825。

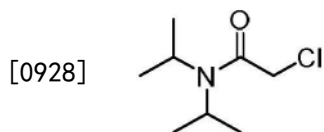


[0925] N-(异喹啉-5-基)丙烯酰胺(TRH 1-162)。在N₂气氛下,在0℃下向5-氨基异喹啉(287mg,2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.34mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤,将所得水层用2:1的氯仿:甲醇溶液萃取。将所得粗品通过碱性氧化铝上的色谱法纯化(含50%乙酸乙酯的己烷到含4%乙醇的乙酸乙酯),从而得到43mg黄色固体(11%产率)。¹H NMR(400MHz,MeOD): δ 9.23(s,1H),8.45(d,J=6.1Hz,1H),8.03(d,J=7.5Hz,1H),7.97(d,J=8.2Hz,1H),7.88(d,J=6.1Hz,1H),7.68(t,J=7.9Hz,1H),6.66(dd,J=10.2,17.0Hz,1H),6.47(dd,J=1.5,17.0Hz,1H),5.88(dd,J=1.7,10.2Hz,1H)。¹³C NMR(100MHz,MeOD): δ 167.1,153.5,143.0,133.6,132.4,131.9,130.6,128.7,127.9,127.1,117.2。HRMS(+ESI):计算值:199.0866(C₁₂H₁₁N₂O)。观察值:199.0863。

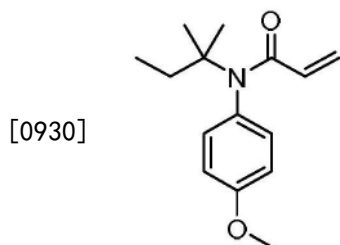


[0927] 2-氯-N-(异喹啉-5-基)乙酰胺(TRH 1-163)。在N₂气氛下,在0℃下向5-氨基异喹啉(289mg,2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入氯乙酰氯(0.19mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.34mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过碱性氧化铝上的色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷到含4%乙醇的乙酸乙酯),从而得到157mg黄色固体(36%产率)。¹H NMR(600MHz,MeOD): δ 9.26(s,1H),8.48(d,J=6.1Hz,1H),8.03(d,J=

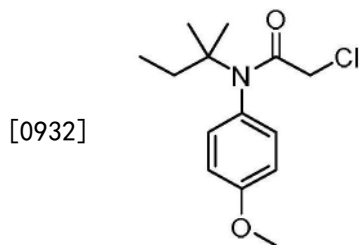
8.2Hz, 1H), 7.98 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.91 (d, J=6.1Hz, 1H), 7.71 (t, J=7.9Hz, 1H), 4.39, (s, 2H). ^{13}C NMR (150MHz, MeOD): δ 167.4, 152.1, 141.7, 131.8, 131.2, 129.2, 127.3, 127.0, 126.1, 115.7, 42.3. HRMS (+ESI): 计算值: 221.0476 ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$). 观察值: 221.0473。



[0929] 2-氯-N,N-二异丙基乙酰胺 (TRH 1-168)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向二异丙胺 (0.42mL, 3.0mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入氯乙酰氯 (0.29mL, 3.6mmol), 然后加入三乙胺 (0.50mL, 3.6mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化 (含0到20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到376mg白色固体 (70%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 3.93 (s, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.38-3.31 (m, 1H), 1.29 (d, J=6.5Hz, 6H), 1.14 (d, J=6.4Hz, 6H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.0, 49.7, 46.1, 43.2, 20.7, 20.0. HRMS (+ESI): 计算值: 200.0813 ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NOClNa}$). 观察值: 200.0811。

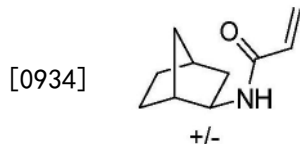


[0931] N-(4-甲氧基苯基)-N-(叔戊基)丙烯酰胺 (TRH 1-170)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向4-甲氧基-N-(叔戊基)苯胺 (94mg, 0.49mmol) 于二氯甲烷 (5mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.05mL, 0.6mmol), 然后加入三乙胺 (0.09mL, 0.6mmol)。搅拌15分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌18小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤, 然后用盐水洗涤, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化 (含0%到20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到82mg浅黄色油状物 (68%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.99 (d, J=8.7Hz, 2H), 6.85 (d, J=8.7Hz, 2H), 6.17 (dd, J=1.9, 16.7Hz, 1H), 5.76 (dd, J=10.3, 16.7Hz, 1H), 5.28 (dd, J=1.9, 10.3Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (q, J=7.5Hz, 2H), 1.20 (s, 6H), 0.91 (t, J=7.5Hz, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.3, 159.0, 134.3, 131.49, 131.45, 125.6, 114.1, 61.7, 55.5, 32.0, 27.4, 9.4. HRMS (+EI): 计算值: 247.1572 ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2$). 观察值: 247.1577。



[0933] 2-氯-N-(4-甲氧基苯基)-N-(叔戊基)乙酰胺 (TRH 1-171)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向4-甲氧基-N-(叔戊基)苯胺 (95mg, 0.5mmol) 于二氯甲烷 (5mL) 中的溶液中加入氯乙酰氯 (0.05mL, 0.6mmol), 然后加入三乙胺 (0.085mL, 0.6mmol)。搅拌15分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤, 用硫酸镁干燥, 并将所得

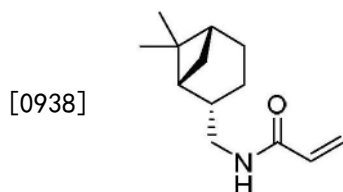
粗品通过硅胶色谱法纯化(含0到10%乙酸乙酯的己烷),从而得到99mg黄色油状物(74%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ7.04 (d, J=8.6Hz, 2H), 6.87 (d, J=8.6Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.05 (q, J=7.4Hz, 2H), 1.16 (s, 6H), 0.90 (t, J=7.4Hz, 3H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ166.0, 159.5, 133.2, 131.0, 114.5, 62.5, 55.5, 44.8, 31.8, 27.1, 9.3。HRMS (+ESI): 计算值: 270.1255 (C₁₄H₂₁NO₂Cl)。观察值: 270.1254。



[0935] N-(外-降冰片-2-基)丙烯酰胺 (TRH 1-176)。在N₂气氛下,在0℃下向外-2-氨基降冰片烷(0.24mL, 2mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL, 2.4mmol),然后加入三乙胺(0.33mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌18小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤,然后用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷),从而得到271mg白色固体(82%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ6.42 (s, 1H), 6.25 (dd, J=2.3, 17.0Hz, 1H), 6.18 (dd, J=9.5, 17.0Hz, 1H), 5.58 (dd, J=2.3, 9.5Hz, 1H), 3.8-3.77 (m, 1H), 2.27-2.24 (m, 2H), 1.78 (ddd, J=2.1, 8.1, 13.0Hz, 1H), 1.55-1.38 (m, 3H), 1.30-1.10 (m, 4H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ165.0, 131.4, 125.8, 52.9, 42.4, 40.0, 35.7, 35.6, 28.2, 26.6。HRMS (+EI): 计算值: 165.1154 (C₁₀H₁₅NO)。观察值: 165.1155。

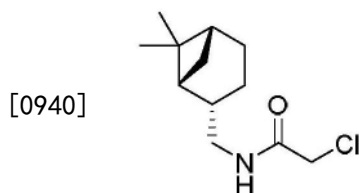


[0937] 2-氯-N-(外-降冰片-2-基)乙酰胺 (TRH 1-177)。在N₂气氛下,在0℃下向外-2-氨基降冰片烷(0.24mL, 2mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入氯乙酰氯(0.19mL, 2.4mmol),然后加入三乙胺(0.33mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含20到40%乙酸乙酯的己烷),从而得到345mg白色固体(91%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ6.48 (s, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.67-3.63 (m, 1H), 2.24-2.22 (m, 1H), 2.16-2.15 (m, 1H), 1.74 (ddd, J=1.9, 8.1, 13.0Hz, 1H), 1.50-1.36 (m, 2H), 1.30-1.26 (m, 1H), 1.21-1.14 (m, 3H), 1.09-1.03 (m, 1H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ165.0, 53.1, 42.6, 42.2, 40.0, 35.6, 35.5, 28.0, 26.3。HRMS (+ESI): 计算值: 187.0764 (C₉H₁₄NOCl)。观察值: 187.0765。

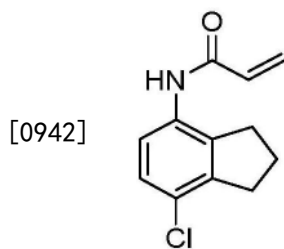


[0939] N-(((1R,2S,5R)-6,6-二甲基双环[3.1.1]庚-2-基)甲基)丙烯酰胺 (TRH 1-178)。在N₂气氛下,在0℃下向(-)-顺式-甲基乙胺(0.34mL, 2mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中

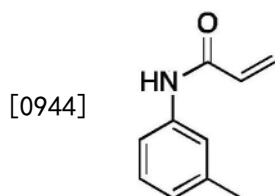
加入丙烯酰氯(0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺(0.33mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌21小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤, 然后用盐水洗涤, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含20到30%乙酸乙酯的己烷), 从而得到369mg白色固体(89%产率)。 ^1H NMR(600MHz, CDCl_3): δ 6.26(dd, $J=1.5, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.11(dd, $J=10.3, 17.0\text{Hz}$, 1H) 5.85(s, 1H), 5.61(dd, $J=1.5, 10.3\text{Hz}$, 1H), 3.39-3.29(m, 2H), 2.38-2.34(m, 1H), 2.26-2.21(m, 1H), 1.98-1.90(m, 4H), 1.88-1.83(m, 1H), 1.53-1.47(m, 1H), 1.19(s, 3H), 1.04(s, 3H), 0.89(d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H)。 ^{13}C NMR(150MHz, CDCl_3): δ 165.7, 131.2, 126.2, 45.3, 43.9, 41.5, 38.8, 33.3, 28.1, 26.1, 23.3, 19.9。HRMS(-ESI): 计算值: 206.1550($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$)。观察值: 206.1551。



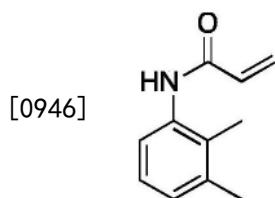
[0941] 2-氯-N-(((1R,2S,5R)-6,6-二甲基双环[3.1.1]庚-2-基)甲基)乙酰胺(TRH 1-179)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向(-)-顺式-甲基乙胺(0.34mL, 2mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入氯乙酰氯(0.19mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺(0.33mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含0到20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到405mg灰白色固体(88%产率)。 ^1H NMR(600MHz, CDCl_3): δ 6.61(s, 1H), 4.05(s, 2H), 3.33-3.30(m, 2H), 2.40-2.36(m, 1H), 2.27-2.21(m, 1H), 1.99-1.83(m, 5H), 1.53-1.46(m, 1H), 1.20(s, 3H), 1.05(s, 3H), 0.90(d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H)。 ^{13}C NMR(150MHz, CDCl_3): δ 165.8, 45.5, 43.8, 42.9, 41.4, 41.2, 38.8, 33.3, 28.0, 26.0, 23.3, 19.8。HRMS(-ESI): 计算值: 228.1161($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NOCl}$)。观察值: 228.1162。



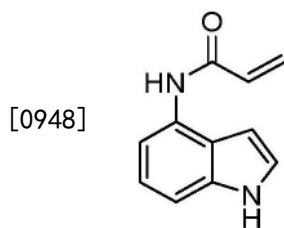
[0943] N-(7-氯-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(YP 1-1)。将N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(187mg, 1.0mmol)于PEG 400(5.2mL)中的溶液冷却至 0°C 。向溶液中加入N-氯琥珀酰亚胺(140mg, 1.0mmol)。30分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用乙酸乙酯稀释, 并用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶柱色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷)。通过重结晶分离所得异构体混合物, 从而以22%的产率得到呈白色固体的产物(47mg)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.78(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.15-7.11(m, 2H), 6.42(dd, $J=1.4, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.26(dd, $J=10.2, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.77(dd, $J=1.4, 10.2\text{Hz}$, 1H), 2.98(t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.87(t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.12(quint, $J=7.5\text{Hz}$, 2H)。 ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3): δ 163.4, 143.1, 136.1, 132.2, 131.0, 128.0, 127.2, 126.7, 120.9, 32.7, 31.1, 24.0。HRMS(+ESI): 计算值: 220.0535($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}$)。观察值: 220.0533。



[0945] N-(间甲苯基)丙烯酰胺 (YP 1-16)。将邻甲苯胺 (107mg, 1.0mmol) 于 DCM (10mL) 中的溶液冷却至 0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。40 分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含 20% 到 40% 乙酸乙酯的己烷), 从而以 86% 的产率得到呈白色固体的产物 (139mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.82 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.21-7.17 (m, 2H), 7.10-7.06 (m, 1H), 6.43-6.38 (m, 1H), 6.29 (dd, J=10.2, 17.1Hz, 1H), 5.75-5.72 (m, 1H), 2.25 (s, 1H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 135.5, 131.2, 130.5, 127.5, 126.8, 125.5, 123.4, 17.8。HRMS (+ESI): 计算值: 162.0913 (C₁₀H₁₂NO)。观察值: 162.0912。



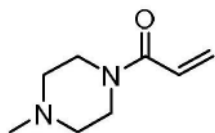
[0947] N-(2,3-二甲基苯基)丙烯酰胺 (YP 1-18)。将 2,3-二甲基苯胺 (121mg, 1.0mmol) 于 DCM (10mL) 中的溶液冷却至 0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。29 分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含 30% 到 40% 乙酸乙酯的己烷), 从而以 88% 的产率得到呈白色固体的产物 (154mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.49 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.11-7.07 (m, 1H), 7.01 (d, J=7.7, 1H), 6.40 (d, J=17.1, 1H), 6.30 (dd, J=7.3, 17.1Hz, 1H), 5.74 (d, J=10.1Hz, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.13 (s, 1H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 135.1, 131.2, 127.6, 127.3, 125.9, 122.3, 20.6, 13.9。HRMS (+ESI): 计算值: 176.1070 (C₁₁H₁₄NO)。观察值: 176.1068。



[0949] N-(1H-吲哚-4-基)丙烯酰胺 (YP 1-19)。将 4-氨基吲哚 (132mg, 1mmol) 于 DCM (5mL) 和 DMF (5mL) 中的溶液冷却至 0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。26 分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过碱性氧化铝色谱法纯化 (含 60% 到 75% 乙酸乙酯的己烷), 从而以 30% 的产率得到呈白灰色固体的产物 (56mg)。¹H NMR (600MHz, MeOD): δ 7.51 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.24-7.22 (m, 2H), 7.08 (t, J=7.6Hz, 1H), 6.64 (dd, J=10.1, 16.7Hz, 2H), 6.38 (dd, J=1.7, 16.9Hz, 1H), 5.78 (dd, J=1.7, 10.3Hz, 1H), 4.6 (s, 1H)。¹³C NMR (150MHz, MeOD): δ 165.0, 137.2, 131.1, 129.2, 126.0, 123.8, 121.5, 120.9, 112.2, 108.4, 98.5。HRMS

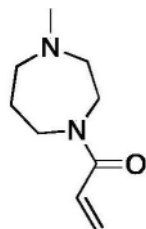
(+ESI): 计算值: 187.0866 ($C_{11}H_{11}N_2O$)。观察值: 187.0865。

[0950]



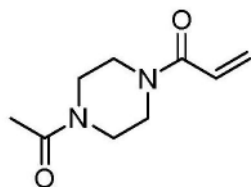
[0951] 1-(4-甲基哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-22)。将1-甲基哌嗪 (100mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。30分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含85%到100%乙酸乙酯的己烷), 从而以29%的产率得到呈黄色凝胶的产物 (44mg)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 6.56 (dd, $J=10.6$, 16.9Hz, 1H), 6.29 (dd, $J=2.0$, 16.8Hz, 1H), 5.69 (dd, $J=2.0$, 10.6Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.42 (t, $J=5.1$ Hz, 4H), 2.32 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 165.4, 127.8, 127.5, 55.2, 54.6, 46.0, 45.7, 41.9。HRMS (+ESI): 计算值: 155.1179 ($C_8H_{15}N_2O$)。观察值: 155.1178。

[0952]



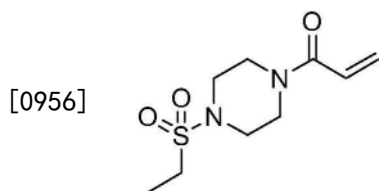
[0953] 1-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-23)。将1-甲基高哌嗪 (114mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。32分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含1%到10%甲醇的DCM), 从而以51%的产率得到呈黄色油状物的产物 (58mg)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 6.61-6.53 (m, 1H), 6.35-6.29 (m, 1H), 5.70-5.66 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.69 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 3.65-3.61 (m, 2H), 2.66-2.63 (m, 2H), 2.59-2.54 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.94 (quint, $J=6.2$ Hz, 2H)。 ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 166.4, 166.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 59.1, 58.0, 57.1, 56.8, 47.4, 47.1, 46.7, 46.6, 45.3, 44.8, 28.1, 26.9。HRMS (+ESI): 计算值: 169.1335 ($C_9H_{17}N_2O$)。观察值: 169.1333。

[0954]

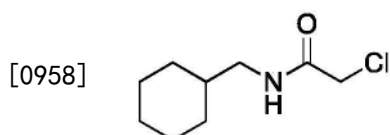


[0955] 1-(4-乙酰基哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP1-24)。将1-乙酰基哌嗪 (128mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。23分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌两小时。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含0%到10%甲醇的DCM), 从而以18%的产率得到呈黄色油状物的产物 (40mg)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 6.57 (dd, $J=10.5$, 16.8Hz, 1H), 6.33 (dd, $J=1.8$, 16.8Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=1.9$, 10.5Hz, 1H), 3.72 (s,

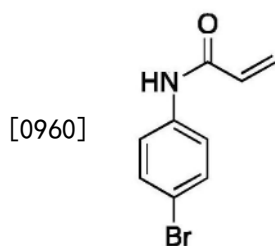
1H), 3.66-3.64 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.51-3.49 (m, 2H), 2.13 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.6, 128.7, 127.0, 41.9, 41.4, 21.4. HRMS (+ESI): 计算值: 183.1128 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$). 观察值: 183.1126。



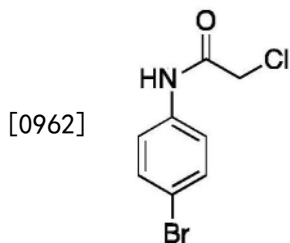
[0957] 1-(4-(乙基磺酰基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-25)。将1-(乙磺酰基)哌嗪 (178mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。27分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌两小时。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含1%到10% 甲醇的DCM), 从而以70%的产率得到呈白黄色固体的产物 (163mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.57 (dd, $J=10.5, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.32 (dd, $J=1.9, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.76 (dd, $J=1.8, 10.5\text{Hz}$, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.32 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 4H), 2.98 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 1.37 (t, $J=7.4$, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.5, 128.8, 127.0, 77.4, 45.9, 45.6, 44.2, 41.9, 7.8. HRMS (+ESI): 计算值: 233.0954 ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_1$)。观察值: 233.0953。



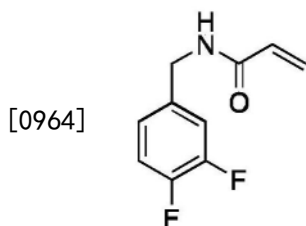
[0959] 2-氯-N-(环己基甲基)乙酰胺 (YP 1-31)。按照通用程序B, 从环己烷甲胺 (113mg, 1.0mmol) 开始, 在硅胶色谱法 (100% 二氯甲烷到3% 甲醇, 于二氯甲烷中) 后以60%的产率获得呈白色固体的产物 (112mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.70 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.15 (t, $J=6.47\text{Hz}$, 2H), 1.77-1.65 (m, 5H), 1.56-1.46 (m, 1H), 1.30-1.10 (m, 3H), 1.00-0.90 (m, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.8, 58.1, 46.0, 42.8, 37.7, 30.7, 26.3, 25.7, 18.2. HRMS (+ESI): 计算值: 190.0993 ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{ONCl}$)。观察值: 190.0992。



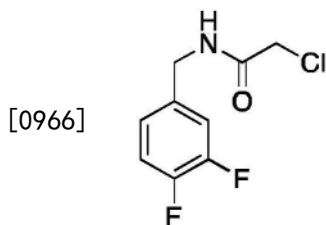
[0961] N-(4-溴苯基)丙烯酰胺 (YP 1-36)。按照通用程序A, 从4-溴苯胺 (688mg, 4.0mmol) 开始, 在硅胶色谱法 (含30%到60% 乙酸乙酯的己烷) 后以28%的产率获得呈白色固体的产物 (250mg)。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 7.90 (s, 1H), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.47-7.44 (m, 2H), 6.45-6.33 (m, 2H), 5.78 (dd, $J=2.8, 9.1\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD): δ 164.7, 137.7, 131.4, 130.9, 126.7, 121.5, 116.3, 101.1, 78.1. HRMS (+ESI): 计算值: 223.9716 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{NOBr}$)。观察值: 223.9719。



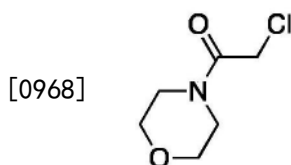
[0963] N-(4-溴苯基)-2-氯乙酰胺 (YP 1-37)。按照通用程序B,从4-溴苯胺 (688mg, 4.0mmol) 开始,在硅胶色谱法 (含30%到60%乙酸乙酯的己烷) 后以49%的产率获得呈白色固体的产物 (491mg)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ7.9 (s, 1H) , 7.57-7.53 (m, 2H) , 7.50-7.47 (m, 2H) , 4.17 (s, 2H) 。¹³C NMR (100MHz, CD₃OD) : δ166.0, 137.2, 131.5, 121.6, 116.7, 99.3, 78.1, 42.6。HRMS (+ESI) : 计算值: 245.9327 (C₈H₆NOBrCl) 。观察值: 245.9329。



[0965] N-(3,4-二氟苄基)丙烯酰胺 (YP 1-38)。按照通用程序A,从3,4-二氟苄基胺 (286mg, 2.0mmol) 开始,在硅胶色谱法 (含40%到80%乙酸乙酯的己烷) 后以61%的产率获得呈白色固体的产物 (239mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ7.56 (t, J=6.2, 1H) , 7.07-7.00 (m, 2H) , 6.95-6.91 (m, 1H) , 6.21-6.20 (m, 2H) , 5.62-5.59 (m, 1H) , 4.35 (d, J=6.1, 2H) 。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) : δ166.1, 151.4 (d) , 150.7 (d) , 148.9 (d) , 148.2 (d) , 135.5-135.4 (m) , 130.5, 126.8, 123.5-123.4 (m) , 117.2 (d) , 116.3 (d) , 42.4。HRMS (+ESI) : 计算值: 196.0579 (C₁₀H₈NOF₂) 。观察值: 196.0582。

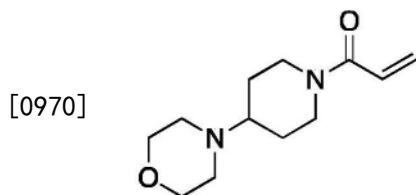


[0967] 2-氯-N-(3,4-二氟苄基)乙酰胺 (YP 1-39)。按照通用程序B,从3,4-二氟苄基胺 (286mg, 2.0mmol) 开始,在硅胶色谱法 (含40%到50%乙酸乙酯的己烷) 后以82%的产率获得呈白色固体的产物 (359mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ7.23 (s, 1H) , 7.15-7.08 (m, 2H) , 7.03-7.6.99 (m, 1H) , 4.42 (d, J=6.1Hz, 2H) , 4.08 (s, 2H) 。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) : δ166.3, 151.5 (d) , 151.0 (d) , 149.1 (d) , 148.5 (d) , 134.7-134.6 (m) , 123.7-123.6 (m) , 117.5 (d) , 116.6 (d) , 42.6 (d) 。HRMS (+ESI) : 计算值: 218.0190 (C₉H₇NOC1F₂) 。观察值: 218.0192

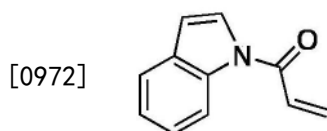


[0969] 2-氯-1-吗啉代-1-酮 (YP 1-40)。按照通用程序B,从吗啉 (174mg, 2.0mmol) 开始,在硅胶色谱法 (含85%乙酸乙酯的己烷) 后以61%的产率获得呈白色固体的产物 (200mg)。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 4.01 (s, 2H), 3.65-3.59 (m, 4H), 3.55-3.52 (m, 2H), 3.45 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.1, 66.5 (d), 46.6, 42.4, 40.7. HRMS (+ESI): 计算值: 186.0292 ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2\text{NClNa}$). 观察值: 186.0292.



[0971] 1-(4-吗啉代哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-42)。按照通用程序A, 从4-吗啉代哌啶 (336mg, 2.0mmol) 开始, 在硅胶色谱法 (含1% 甲醇和80% 乙酸乙酯的己烷) 后以58% 的产率获得呈无色油状物的产物 (259mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.42 (dd, $J=10.6, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.06 (dd, $J=2.0, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.49 (dd, $J=2.0, 10.6\text{Hz}$, 1H), 4.45 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 3.86 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 3.52 (t, $J=4.7\text{Hz}$, 4H), 2.90 (t, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 2.55-2.48 (m, 1H), 2.37-2.35 (m, 4H), 2.26 (tt, $J=3.7, 11.0\text{Hz}$, 1H), 1.72 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 2H), 1.30-1.20 (m, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.0, 127.7, 127.3, 67.1, 61.6, 49.6, 44.9, 41.1, 28.9, 27.8. HRMS (+ESI): 计算值: 225.1598 ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$). 观察值: 225.1595.



[0973] 1-(1H-吲哚-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-44)。将吲哚 (117mg, 1.0mmol) 于2-甲基四氢呋喃 (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入氢化钠 (60mg, 2.5mmol)。对所得中间体进行通用程序A, 并且在氧化铝凝胶色谱法 (含10% 到40% 乙酸乙酯的己烷) 后以8% 的产率获得呈白色固体的产物 (14mg)。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 8.48-8.46 (m, 1H), 7.82 (d, $J=3.9\text{Hz}$, 1H), 7.61-7.59 (m, 1H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.31-7.21 (m, 2H), 6.73 (dd, $J=0.8, 3.8\text{Hz}$, 1H), 6.64 (dd, $J=1.7, 16.7\text{Hz}$, 1H), 6.09 (dd, $J=1.7, 10.5\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD): δ 164.3, 135.7, 131.0, 130.9, 128.0, 125.0, 124.4, 123.6, 120.5, 116.2, 108.9. HRMS (+ESI): 计算值: 172.0757 ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}$). 观察值: 172.0756.

[0974] TRH 1-23类似物和CCW 28-3降解剂的合成和表征。

[0975] 通用的合成方法。化学品和试剂购自主要的商业供应商, 无需进一步纯化即可使用。除非另有说明, 否则在氮气气氛下进行反应。使用EMD或Sigma Aldrich硅胶60 (230-400目) 进行硅胶快速柱色谱法。在加利福尼亚大学伯克利分校的Bruker AVB 400、AVQ 400或AV 600光谱仪上获得质子和碳核磁共振 (^1H NMR和 ^{13}C NMR) 数据。使用正或负电喷雾电离 (+ESI或-ESI) 从QB3质谱仪设施获得高分辨率质谱图。产量报告为单次运行。

[0976] 用于氯乙酰胺合成的通用方法。将胺 (1当量) 溶解在20mL闪烁小瓶中的无水DCM (2-10mL) 中。向溶液中加入2-氯乙酰氯 (Sigma, 1.2当量), 然后加入三乙胺 (Sigma, 1.2当量)。将溶液在氮气下搅拌过夜。通过具有茚三酮染色的TLC监测反应。反应完成后, 通过旋转蒸发除去溶剂, 并将粗品直接施加至硅胶柱上以进行快速色谱法, 从而得到相应的氯乙酰胺。

[0977] 2-氯-N-(4-(4-(三氟甲基)苯氧基)苯基)乙酰胺 (CCW 1)。向4-(4-(三氟甲基)苯

氧基)苯胺(AK Scientific,63mg,0.25mmol)于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯(Sigma,34mg,0.30mmol)和三乙胺(Sigma,30.4mg,0.30mmol),并将反应搅拌过夜。反应完成后,将粗品通过硅胶色谱法纯化(10-40%EtOAc/己烷),从而得到65mg(78%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.25(s,1H),7.63-7.51(m,4H),7.12-6.99(m,4H),4.22(s,2H)。HRMS:(-ESI):计算得出:C₁₅H₁₀O₂NF₃Cl=328.0358,实际值:327.0356。

[0978] 2-氯-N-(4-(3-氟苯氧基)苯基)乙酰胺(CCW 2)。向4-(3-氟苯氧基)苯胺(AK Scientific,63mg,0.31mmol)于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯(Sigma,42mg,0.37mmol)和三乙胺(Sigma,38mg,0.37mmol),并将反应搅拌过夜。反应完成后,将粗品通过硅胶色谱法纯化(10-40%EtOAc/己烷),从而得到53mg(61%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.24(s,1H),7.55(dq,J=10.0,3.5,2.4Hz,2H),7.33-7.23(m,1H),7.05(dq,J=10.1,3.5,2.6Hz,2H),6.85-6.74(m,2H),6.69(dq,J=10.2,2.3Hz,1H),4.21(s,2H)。¹³C NMR(151MHz,CDCl₃): δ 164.29,163.75,162.66,158.85,158.78,153.31,132.67,130.51,130.45,121.95,120.13,113.71,113.69,109.98,109.84,105.92,105.75,77.19,76.97,76.76,42.79。HRMS:(-ESI):计算得出:C₁₄H₁₀O₂NFC1=278.0390,实际值:278.0389。

[0979] 2-氯-N-(3-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酰胺(CCW 3)。向3-氯-4-(4-氯苯氧基)苯胺(Sigma,64mg,0.25mmol)于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯(Sigma,34mg,0.30mmol)和三乙胺(Sigma,30.4mg,0.30mmol),并将反应搅拌过夜。反应完成后,将粗品通过硅胶色谱法纯化(10-40%EtOAc/己烷),从而得到69mg(83%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.28(s,1H),7.83(d,J=2.6Hz,1H),7.44(dd,J=8.8,2.6Hz,1H),7.36-7.28(m,3H),7.05(d,J=8.8Hz,1H),6.95-6.89(m,2H),4.25(s,2H)。¹³C NMR(151MHz,CDCl₃): δ 163.85,155.67,148.97,133.57,129.72,128.30,126.60,122.59,121.48,119.87,118.65,77.20,76.98,76.77,42.73。HRMS:(-ESI):计算得出:C₁₄H₉O₂NC1=327.9704,实际值:327.9702

[0980] 2-氯-N-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)乙酰胺(CCW 5)。向氯4-(4-甲氧基苯氧基)苯胺HCl(Astatech,63mg,0.25mmol)于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯(Sigma,34mg,0.30mmol)和三乙胺(Sigma,60.8mg,0.60mmol),并将反应搅拌过夜。反应完成后,将粗品通过硅胶色谱法纯化(10-40%EtOAc/己烷),从而得到69mg(95%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.18(s,1H),7.49-7.42(m,2H),7.00-6.84(m,6H),4.19(s,2H),3.80(s,3H)。¹³C NMR(151MHz,CDCl₃): δ 163.67,155.92,155.72,150.11,131.22,121.95,120.57,118.14,114.87,77.18,76.97,76.76,55.63,42.79。HRMS:(-ESI):计算得出:C₁₅H₁₃O₃NC1=290.0589,实际值:290.0587。

[0981] 2-氯-N-(4-(4-硝基苯氧基)苯基)乙酰胺(CCW 6)。向4-(4-硝基苯氧基)苯胺(Sigma,50mg,0.22mmol)于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯(Sigma,29mg,0.26mmol)和三乙胺(Sigma,26mg,0.26mmol),并将反应搅拌过夜。反应完成后,将粗品通过硅胶色谱法纯化(10-40%EtOAc/己烷),从而得到62.5mg(93%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.29(s,1H),8.25-8.16(m,2H),7.67-7.59(m,2H),7.14-7.07(m,2H),7.05-6.96(m,2H),4.22(s,2H)。¹³C NMR(101MHz,CDCl₃): δ 163.93,163.27,151.63,142.77,133.98,126.01,122.18,121.26,117.01,77.36,77.04,76.73,42.85。HRMS:(+ESI):计算得出:C₁₄H₁₀O₄N₂Cl=305.0335,实际值:305.0332。

[0982] 2-氯-N-(4-(萘-2-基氧基)苯基)乙酰胺(CCW 7)。向2-(4-氨基苯氧基)萘(TCI,

118mg, 0.50mmol) 于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯 (Sigma, 67.8mg, 0.60mmol) 和三乙胺 (Sigma, 60.8mg, 0.60mmol), 并将反应搅拌过夜。反应完成后, 将粗品通过硅胶色谱法纯化 (10-40% EtOAc/己烷), 从而得到111mg (71%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.25 (s, 1H), 7.83 (dt, $J=7.8, 3.3\text{Hz}$, 2H), 7.69 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.57-7.50 (m, 2H), 7.49-7.37 (m, 2H), 7.31-7.22 (m, 2H), 7.12-7.03 (m, 2H), 4.21 (s, 2H)。 ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3): δ 163.86, 155.13, 154.31, 134.30, 132.22, 130.19, 129.99, 127.77, 127.14, 126.63, 124.80, 122.10, 119.84, 119.76, 113.84, 77.39, 77.07, 76.75, 42.89。HRMS: (+ESI): 计算得出: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{NCl}$ = 312.0786, 实际值: 312.0785。

[0983] 2-氯-N-(4-(3,5-二甲基苯氧基)苯基)乙酰胺 (CCW 8)。向4-(3,5-二甲基苯氧基)苯胺 (Enamine, 107mg, 0.50mmol) 于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯 (Sigma, 67.8mg, 0.60mmol) 和三乙胺 (Sigma, 60.8mg, 0.60mmol), 并将反应搅拌过夜。反应完成后, 将粗品通过硅胶色谱法纯化 (10-40% EtOAc/己烷), 从而得到60mg (41%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.22 (s, 1H), 7.53-7.46 (m, 2H), 7.03-6.96 (m, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.61 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 2.28 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3): δ 163.80, 157.21, 154.61, 139.67, 131.79, 125.09, 121.98, 119.55, 116.36, 77.37, 77.06, 76.74, 42.87, 21.33。HRMS: (+ESI): 计算得出: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{NCl}$ = 290.0942, 实际值: 290.0941。

[0984] N-苄基-4-(4-甲氧基苯氧基)苯胺 (CCW 14)。将4-(4-甲氧基苯氧基)苯胺 (Astatech, 108mg, 0.50mmol) 溶解在20mL闪烁小瓶中的无水DCM (5mL) 中。加入苯甲醛 (Alfa Aesar, 53mg, 0.50mmol), 并将溶液在氮气下搅拌2小时。以小等分试样添加三乙氧基硼氢化钠 (Sigma, 159mg, 0.75mmol), 并将反应搅拌过夜。TLC (20% EtOAc/己烷) 显示起始材料已完全转化。将溶液先后用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。将含水级分合并, 用3x5mL EtOAc萃取, 并将所有有机级分合并, 浓缩并在硅胶柱上纯化 (10-40% EtOAc/己烷), 从而得到89.7mg (58.8%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.42-7.33 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 1H), 6.94-6.81 (m, 6H), 6.64-6.59 (m, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.79 (s, 3H)。HRMS: (+ESI): 计算得出: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_1$ = 306.1489, 实际值: 307.1481。

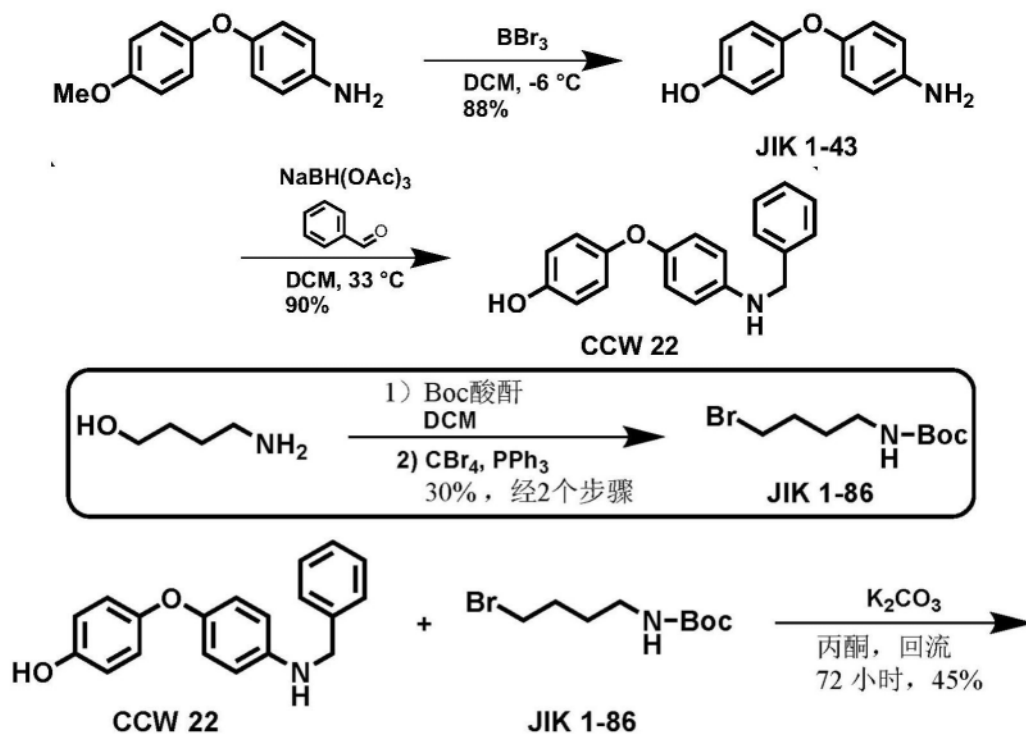
[0985] N-苄基-2-氯-N-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)乙酰胺 (CCW 16)。向N-苄基-4-(4-甲氧基苯氧基)苯胺 (CCW 14) (25mg, 0.081mmol) 于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯 (Sigma, 11mg, 0.097mmol) 和三乙胺 (Sigma, 9.8mg, 0.097mmol), 并将反应搅拌过夜。反应完成后, 将粗品通过硅胶色谱法纯化 (10-40% EtOAc/己烷), 从而得到26mg (84%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.26 (s, 3H), 7.20 (dd, $J=7.3, 2.3\text{Hz}$, 2H), 7.01-6.96 (m, 2H), 6.93-6.82 (m, 6H), 4.86 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.81 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3): δ 166.45, 158.95, 156.54, 148.89, 136.63, 134.71, 129.54, 129.03, 128.51, 127.71, 121.47, 117.82, 115.07, 77.36, 77.25, 77.05, 76.73, 55.69, 53.85, 42.09。HRMS: (+ESI): 计算得出: $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{NCl}$ = 382.1204, 实际值: 307.1199。

[0986] 2-氯-N-(4-(4-(羟甲基)苯氧基)苯基)乙酰胺 (JIK 1-36)。向(4-(4-氨基苯氧基)苯基)甲醇 (Sigma, 54.8mg, 0.25mmol) 于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯 (Sigma, 34mg, 0.30mmol) 和三乙胺 (Sigma, 30.4mg, 0.30mmol), 并将反应搅拌过夜。反应完成后, 将粗品通过硅胶色谱法纯化 (10-40% EtOAc/己烷), 从而得到55mg (74%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.21 (s, 1H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.34 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.05-6.96 (m, 4H), 4.67 (s, 2H),

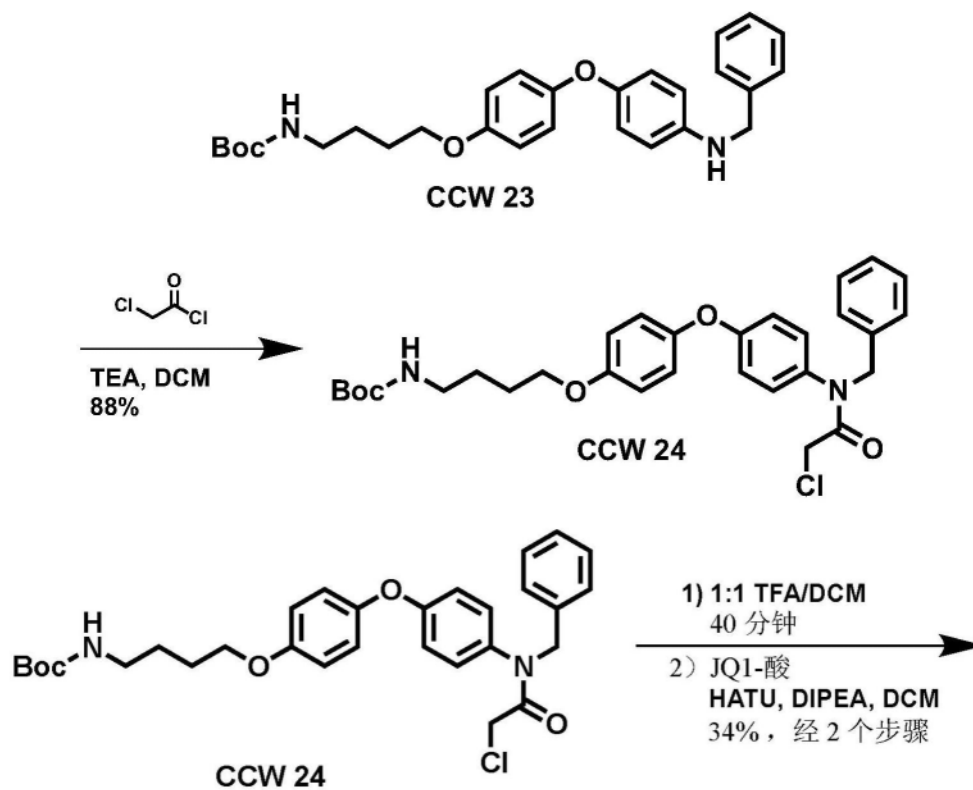
4.20 (s, 2H). ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 163.70, 156.77, 154.32, 135.82, 132.01, 128.68, 121.93, 119.46, 118.71, 64.85, 42.79. HRMS: (-ESI): 计算得出 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{NO}_2 = 328.0352$; 实际值: 328.0358。

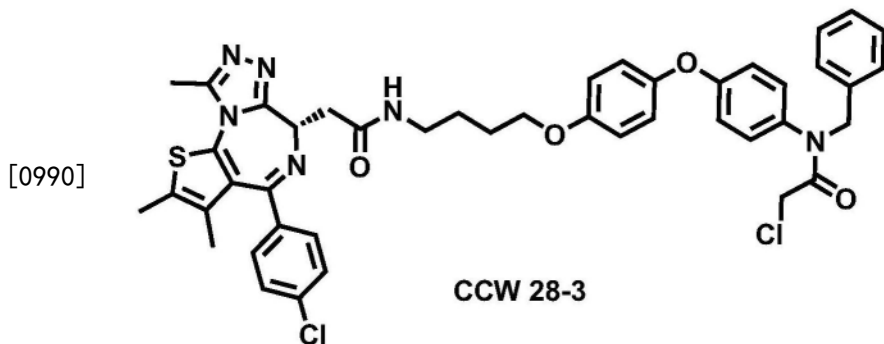
[0987] 2-氯N-(4-(3-(三氟甲基)苯氧基)苯基)乙酰胺(JIK 1-37)。向(4-(3-三氟甲基)苯基)苯胺(Sigma, 64.5mg, 0.25mmol)于DCM中的溶液中加入2-氯乙酰氯(Sigma, 34mg, 0.30mmol)和三乙胺(Sigma, 30.4mg, 0.30mmol), 并将反应搅拌过夜。反应完成后, 将粗品通过硅胶色谱法纯化(10-40% EtOAc/己烷), 从而得到80mg (95%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.26 (s, 1H), 7.56 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.44 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.34 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.04 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 4.21 (s, 2H). ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 163.76, 157.81, 153.12, 132.85, 130.30, 124.51, 122.71, 122.04, 121.31, 120.10, 119.69, 115.02, 42.78. HRMS: (-ESI): 计算得出 $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClNO}_3 = 290.0585$; 实际值: 290.0589。

[0988] CCW-16+JQ1双功能降解剂的合成方案(CCW 28-3):



[0989]





[0991] (4-溴丁基)氨基甲酸叔丁酯(JIK 1-86)。将4-氨基-1-丁醇(TCI;5.0g,56.0mmol)溶解在干燥的DCM(22mL)中。向溶液中加入二碳酸二叔丁酯(Chem-Impex Int'l Inc.;17.3g,79.4mmol)。将反应在室温下搅拌3小时,并通过TLC监测(在100%EtOAc中展开,通过茚三酮可视化)。完成后,通过旋转蒸发除去溶剂。将粗品通过硅胶色谱法部分纯化(含55到100%EtOAc的己烷),以除去基线杂质;对来自柱的洗脱液继续进行下一步反应。将DCM(22mL,干燥)添加至柱洗脱液,并将溶液冷却至0℃。向溶液中加入四溴化碳(Aldrich;23.9g,72.0mmol)并溶解,然后加入三苯基膦(Sigma Aldrich;22.3g,84.9mmol)。将反应搅拌1小时,然后温热至室温并运行过夜。24小时后,通过旋转蒸发除去溶剂。将粗品通过硅胶色谱法纯化(含2-15%EtOAc的己烷),从而得到4.1g呈浅黄色油状物的产物(29.6%,两个反应)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ4.55(s,1H),3.42(t,J=6.7Hz,2H),3.15(q,J=6.8Hz,2H),1.93-1.83(m,2H),1.63(m,1H),1.43(s,10H)。

[0992] 4-(4-氨基苯氧基)苯酚(JIK 1-43)。在-6℃下,将4-(4-甲氧基苯氧基)苯胺(AstaTech;2.5g,11.6mmol)溶解在DCM(40mL)中。在3小时的过程中逐滴加入三溴化硼(Acros;34.8mL,1M,于DCM中,34.8mmol),通过TLC(40%EtOAc/Hex,KMnO₄)监测。完成后,将溶液用1体积的碳酸氢钠淬灭。将两相混合物冷冻过夜,并结晶出产物,并通过过滤除去产物。将水层用NaOH中和,并用3x25mL EtOAc反萃取。将合并的有机层用MgSO₄干燥并浓缩。得到2.33g(88%)呈棕褐色固体的产物,其不需要进一步纯化。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄):δ5.22-5.09(m,8H),1.73(p,J=1.6Hz,3H)。HRMS:(+ESI):计算得出C₁₂H₁₂N₂O₂=202.0863;实际值202.0860。

[0993] 4-(4-(苄基氨基)苯氧基)苯酚(CCW22)。在33℃下将4-(4-氨基苯氧基)苯酚(JIK 1-43)(604mg,3.0mmol)溶解在无水DCM(50mL)中以帮助溶解,加入苯甲醛(Alfa Aesar,240mg,3.0mmol),并将反应在氮气下搅拌两小时。加入三乙酰氧基硼氢化钠(Sigma,952mg,4.5mmol),并将反应搅拌过夜。将混合物浓缩并直接施加至二氧化硅柱上以进行快速色谱法,从而得到787mg(90%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.41-7.24(m,5H),6.89-6.80(m,4H),6.78-6.71(m,2H),6.65-6.58(m,2H),4.31(s,2H)。

[0994] (4-(4-(4-(苄基氨基)苯氧基)苯氧基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(CCW 23)。将4-(4-(苄基氨基)苯氧基)苯酚(CCW 22)(450mg,1.55mmol)和(4-溴丁基)氨基甲酸叔丁酯(JIK 1-86)(585mg,2.32mmol)溶解在丙酮(20mL)中。加入碳酸钾(642mg,4.65mmol),使溶液回流并搅拌72小时。将混合物浓缩并直接施加至二氧化硅柱上以进行快速色谱法(10-30%EtOAc/己烷),从而得到325mg(45.3%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.41-7.27(m,5H),6.91-6.77(m,6H),6.60(d,J=8.8Hz,2H),4.62(s,1H),4.30(s,2H),3.93(t,J=6.2Hz,2H),3.19

(q, J=6.4Hz, 2H), 1.83-1.74(m, 2H), 1.66(p, J=7.1Hz, 2H), 1.44(s, 9H). HRMS: (+ESI): 计算得出 $C_{28}H_{35}O_4N_2=463.2591$; 实际值462.2583。

[0995] (4-(4-(4-(N-苄基-2-氯乙酰胺基)苯氧基)苯氧基)丁基)氨基甲酸叔丁酯(CCW 24)。向CCW 23(200mg, 0.43mmol)于DCM(10mL)中的溶液中加入2-氯乙酰胺(Sigma, 59mg, 0.52mmol)和三乙胺(Sigma, 53mg, 0.52mmol), 并将反应搅拌过夜。反应完成后, 将粗品通过硅胶色谱法纯化(20-60%EtOAc/己烷), 从而得到232mg(87.6%)。 ^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 7.29(d, J=4.8Hz, 2H), 7.20(dd, J=7.2, 2.2Hz, 3H), 6.97(d, J=9.0Hz, 2H), 6.93-6.83(m, 6H), 4.86(s, 2H), 4.61(s, 1H), 3.96(t, J=6.2Hz, 2H), 3.87(s, 2H), 3.20(q, J=6.4Hz, 2H), 1.87-1.77(m, 2H), 1.68(p, J=7.1Hz, 2H), 1.45(s, 9H)。

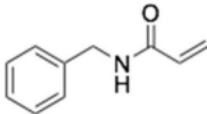
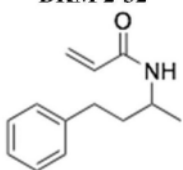
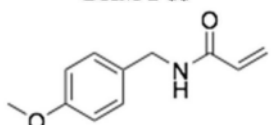
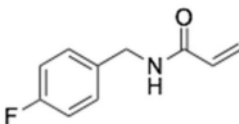
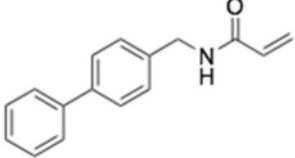
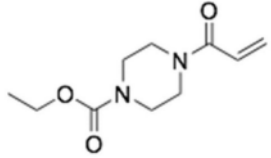
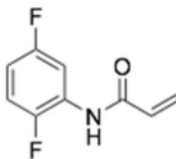
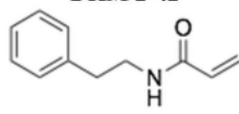
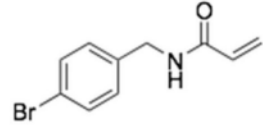
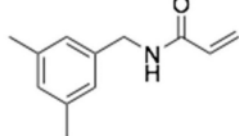
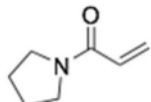
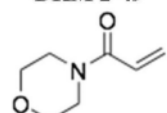
[0996] (S)-2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂-6-基)乙酸(JQ1-酸)。根据先前的程序制备(S)-2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂-6-基)乙酸叔丁酯(JQ1)¹。将JQ1(eNovation Chemicals, 204mg, 0.446mmol)溶解在甲酸(3mL)中, 并在45℃下搅拌过夜。将混合物用DCM稀释, 并真空除去溶剂。将所得黄色油状物重新溶解在3mL DCL中, 并蒸发至干, 重复直到该过程得到精细的黄棕色固体: 178mg(99.8%)。无需进一步纯化。 ^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 7.46-7.40(m, 2H), 7.34(d, J=8.7Hz, 2H), 4.59(t, J=6.8Hz, 1H), 3.75-3.55(m, 2H), 2.68(s, 3H), 2.41(s, 3H), 1.74-1.65(m, 3H)。HRMS: (-ESI): 计算得出 $C_{19}H_{16}O_2N_4ClS=399.0688$; 实际值399.0683。

[0997] (S)-N-苄基-2-氯N-(4-(4-(4-(2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂-6-基)乙酰胺基)丁氧基)苯氧基)苯基)乙酰胺(CCW-28-3)。通过在20分钟内缓慢加入三氟乙酸(Sigma-Aldrich)然后再搅拌20分钟, 将CCW 24(175mg, 0.325mmol)在1:1 DCM/TFA(5mL)中脱保护。TLC显示完全转化为胺, 并真空除去溶剂, 并用3mL DCM追踪三次以除去过量的TFA。脱保护的粗品无需进一步纯化即可用于酰胺偶联。将所得TFA盐溶解在8mL DCM、JQ1-酸(180mg, 0.390mmol)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)(Small Molecules Inc., 201.5mg, 0.530mmol)和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(Sigma-Aldrich, 168mg, 1.30mmol)中。搅拌过夜, 并通过TLC(含5%MeOH的DCM, 100%EtOAc)监测。将粗品浓缩并直接施加至二氧化硅柱上以进行快速色谱法(1-5%MeOH/DCM)。洗脱的级分纯度不够, 将含有产物的级分合并, 浓缩并通过快速硅胶色谱法再次纯化(100-0%EtOAc/DCM, 然后0-5%MeOH/DCM), 从而得到91.4mg(34.2%)。 ^1H NMR(600MHz, $CDCl_3$): δ 7.36(dd, J=50.3, 8.3Hz, 4H), 7.26(s, 2H), 7.22-7.18(m, 2H), 6.99-6.95(m, 2H), 6.92-6.83(m, 6H), 6.59(d, J=6.1Hz, 1H), 4.86(s, 2H), 4.62(dd, J=7.9, 6.1Hz, 1H), 3.96(t, J=6.2Hz, 2H), 3.87(s, 2H), 3.57(dd, J=14.1, 7.9Hz, 1H), 3.42(dq, J=13.3, 6.7Hz, 1H), 3.32(ddd, J=13.2, 11.4, 6.2Hz, 2H), 2.67(s, 3H), 2.40(s, 3H), 1.82(td, J=13.8, 13.2, 6.9Hz, 2H), 1.74(p, J=6.8Hz, 2H), 1.67(s, 3H)。 ^{13}C NMR(151MHz, $CDCl_3$): δ 170.46, 166.38, 163.87, 158.90, 155.84, 155.63, 149.84, 148.82, 136.79, 136.58, 136.56, 134.65, 132.10, 130.87, 130.82, 130.42, 129.76, 129.46, 128.97, 128.69, 128.44, 127.63, 121.39, 117.78, 115.64, 67.84, 54.53, 53.78, 42.01, 39.60, 39.20, 29.65, 26.59, 26.26, 14.32, 13.04, 11.78。HRMS: (+ESI): 计算得出 $C_{44}H_{43}Cl_2N_6O_4S=821.2438$; 实际值: 821.2426。

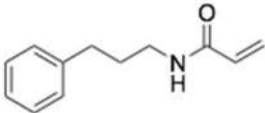
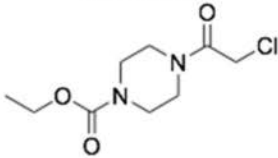
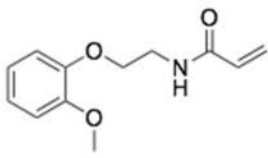
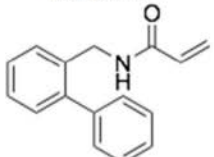
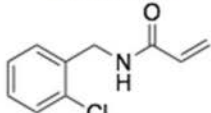
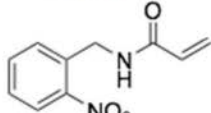
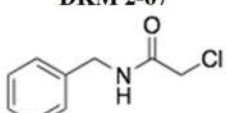
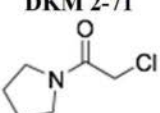
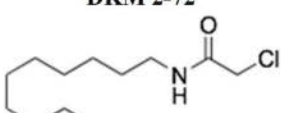
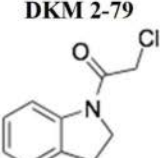
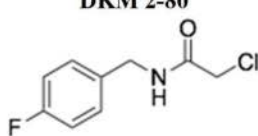
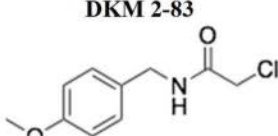
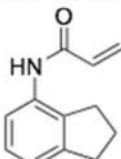
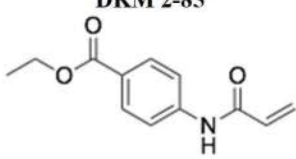
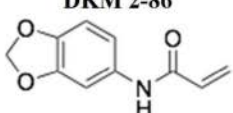
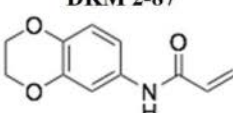
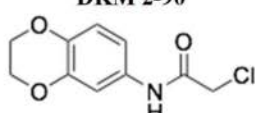
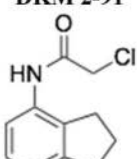
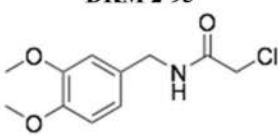
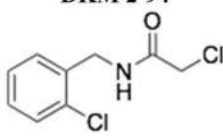
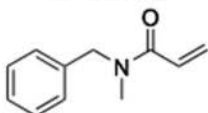
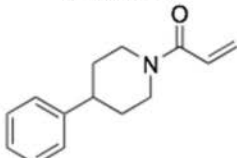
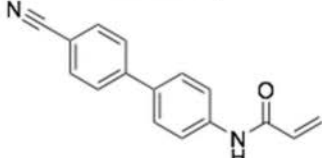
[0998] 表1. 针对RNF4筛选的共价配体的结构。

[0999] 表1. 针对RNF114筛选的共价配体的结构

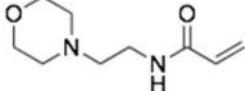
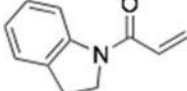
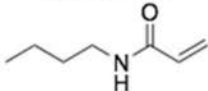
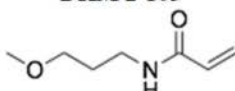
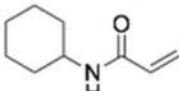
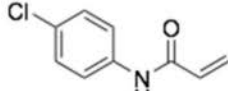
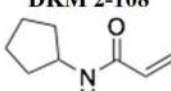
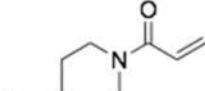
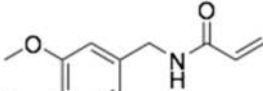
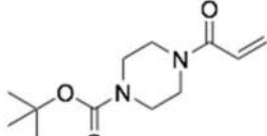
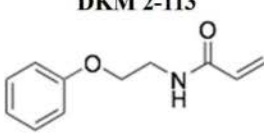
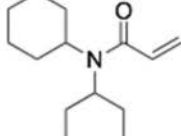
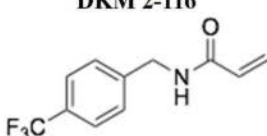
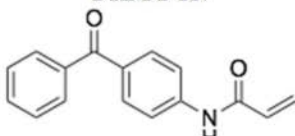
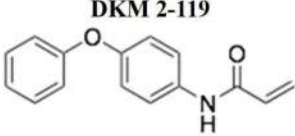
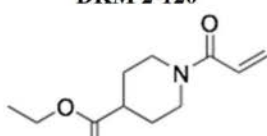
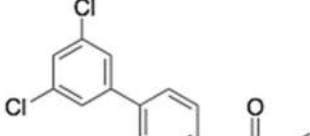
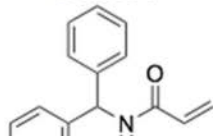
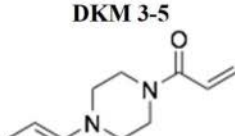
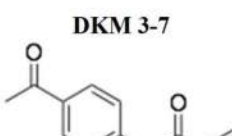
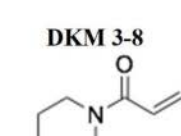
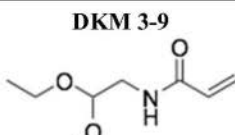
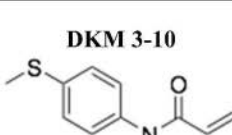
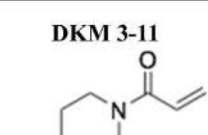
[1000]

DKM 2-31 	DKM 2-32 	DKM 2-33 
DKM 2-34 	DKM 2-37 	DKM 2-39 
DKM 2-40 	DKM 2-42 	DKM 2-43 
DKM 2-47 	DKM 2-48 	DKM 2-49 

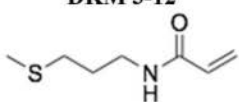
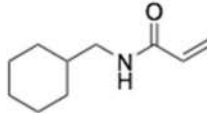
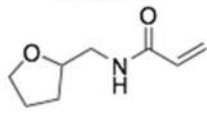
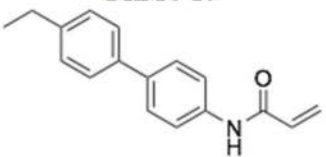
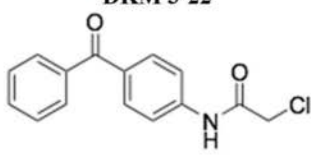
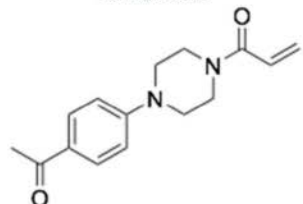
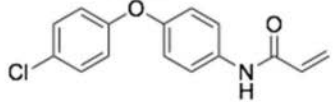
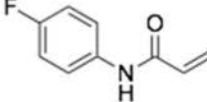
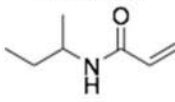
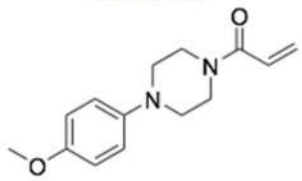
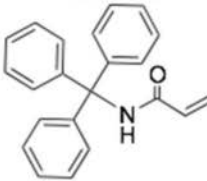
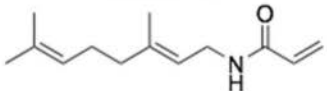
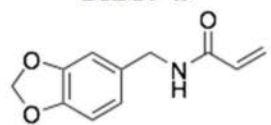
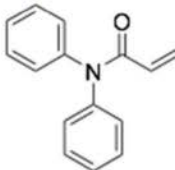
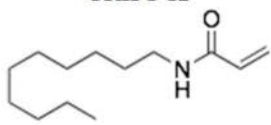
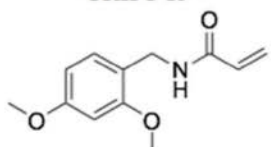
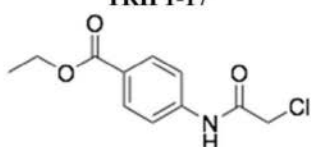
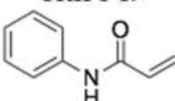
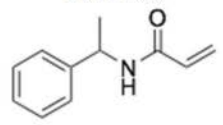
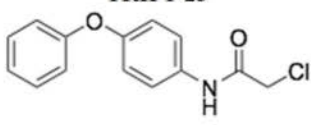
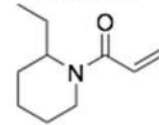
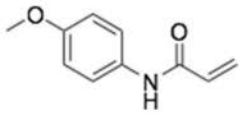
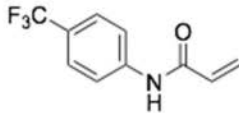
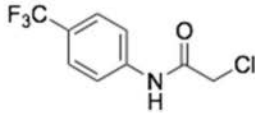
[1001]

DKM 2-50 	DKM 2-52 	DKM 2-58 
DKM 2-59 	DKM 2-60 	DKM 2-62 
DKM 2-67 	DKM 2-71 	DKM 2-72 
DKM 2-76 	DKM 2-79 	DKM 2-80 
DKM 2-83 	DKM 2-84 	DKM 2-85 
DKM 2-86 	DKM 2-87 	DKM 2-90 
DKM 2-91 	DKM 2-93 	DKM 2-94 
DKM 2-95  (等量的两个旋转异构体)	DKM 2-97 	DKM 2-98 

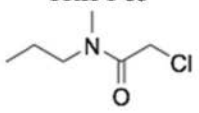
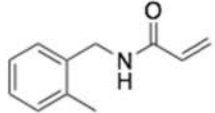
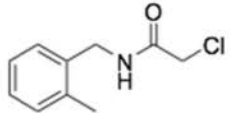
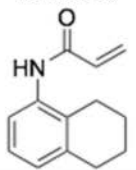
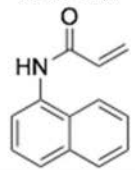
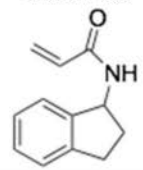
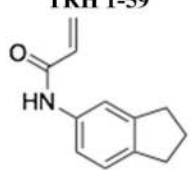
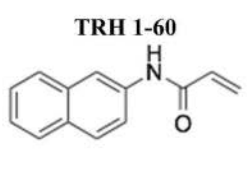
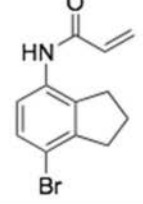
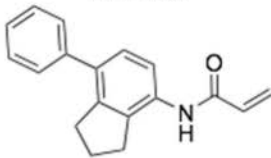
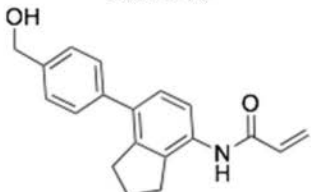
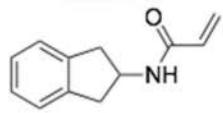
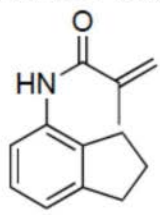
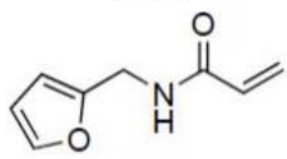
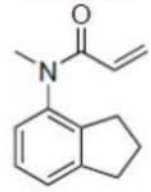
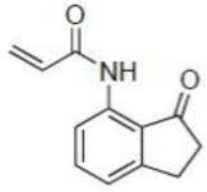
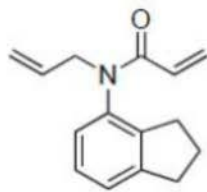
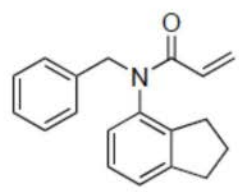
[1002]

DKM 2-100 	DKM 2-101 	DKM 2-102 
DKM 2-103 	DKM 2-106 	DKM 2-107 
DKM 2-108 	DKM 2-109 	DKM 2-110 
DKM 2-111 	DKM 2-113 	DKM 2-114 
DKM 2-116 	DKM 2-117 	DKM 2-119 
DKM 2-120 	DKM 3-3 	DKM 3-4 
DKM 3-5 	DKM 3-7 	DKM 3-8 
DKM 3-9 	DKM 3-10 	DKM 3-11 

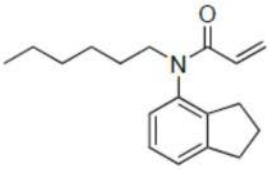
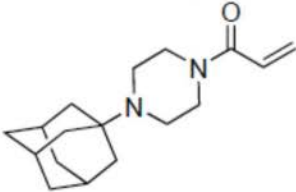
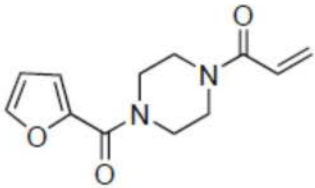
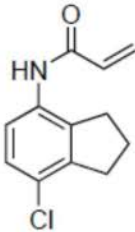
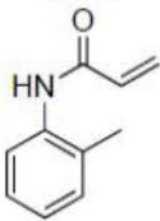
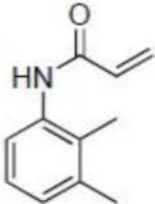
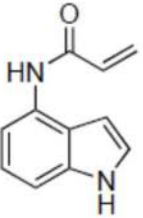
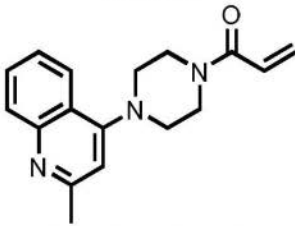
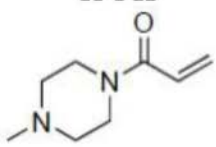
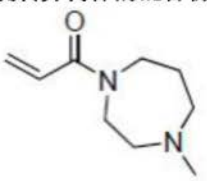
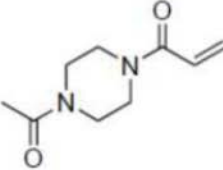
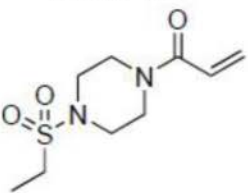
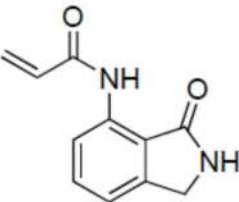
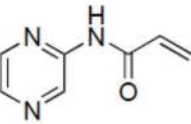
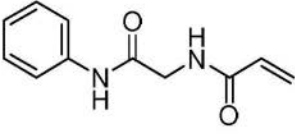
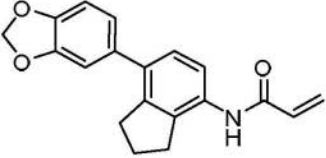
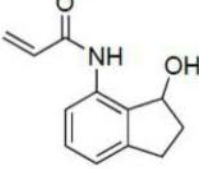
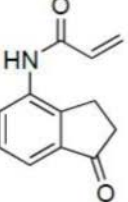
[1003]

DKM 3-12 	DKM 3-13 	DKM 3-15 
DKM 3-16 	DKM 3-22 	DKM 3-29 
DKM 3-30 	DKM 3-31 	DKM 3-32 
DKM 3-36 	DKM 3-41 	DKM 3-42 
DKM 3-43 	DKM 3-70 	TRH 1-12 
TRH 1-13 	TRH 1-17 	TRH 1-19 
TRH 1-20 	TRH 1-23 	TRH 1-27 
TRH 1-32 	TRH 1-50 	TRH 1-51 

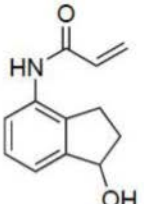
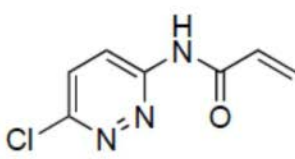
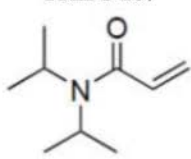
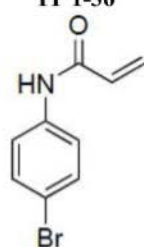
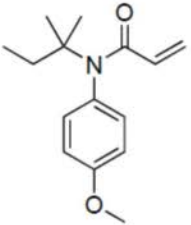
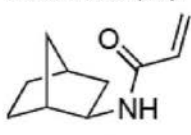
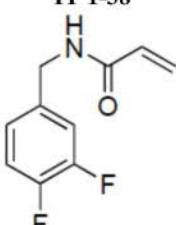
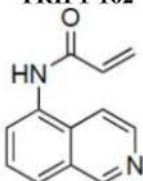
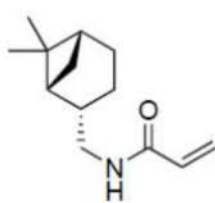
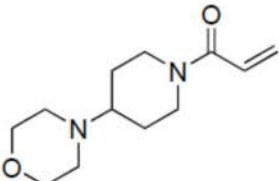
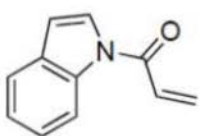
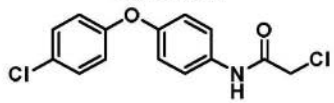
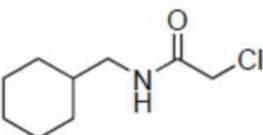
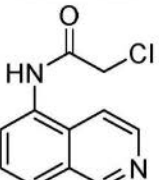
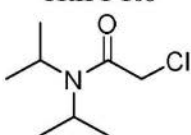
[1004]

TRH 1-53 	TRH 1-54 	TRH 1-55 
TRH 1-56 	TRH 1-57 	TRH 1-58 
TRH 1-59 	TRH 1-60 	TRH 1-65 
TRH 1-68 	TRH 1-70 	TRH 1-74 
TRH 1-149 (18) 	YP 1-26 	TRH 1-115 
TRH 1-129 (13) 	IGA 1-12 (31) 	IGA 1-14 

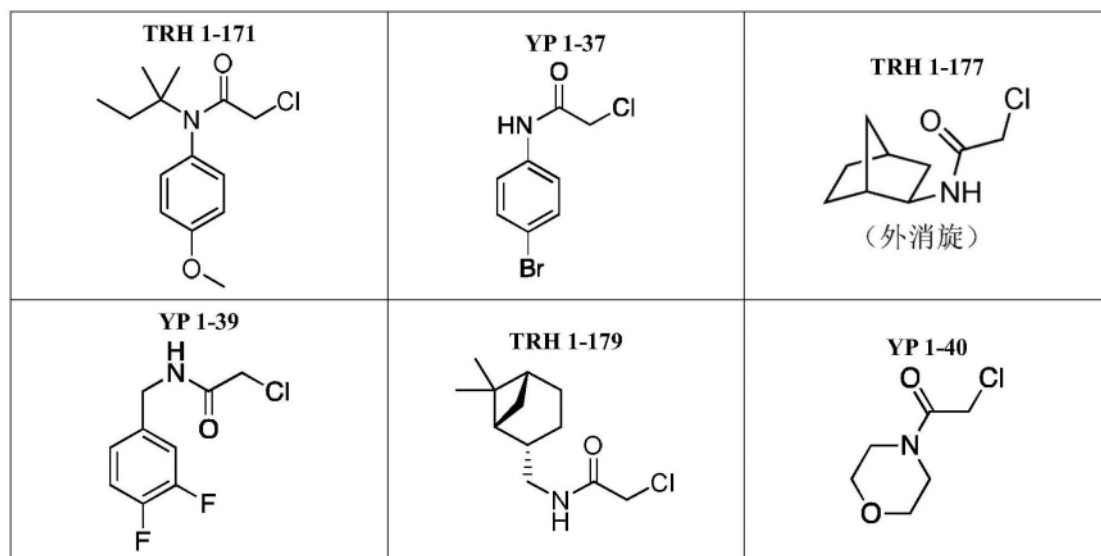
[1005]

IGA 1-15 (32) 	TRH 1-143 	TRH 1-145 (17) 
YP 1-1 (24) 	YP 1-16 	YP 1-18 (25) 
YP 1-19 (26) 	IGA 1-26 	YP 1-22 
YP 1-23 (27) (旋转异构体的混合物) 	YP 1-24 (28) 	YP 1-25 (29) 
TRH 1-152 (19) 	TRH 1-156 	TRH 1-160 
TRH 1-78 	TRH 1-133 (14) 	TRH 1-134 (15) 

[1006]

TRH 1-135 (16) 	TRH 1-155 (20) 	TRH 1-167 
YP 1-36 	TRH 1-170 (21) 	TRH 1-176 (22)  (外消旋)
YP 1-38 	TRH 1-162 	TRH 1-178 (23) 
YP 1-42 (30) 	YP 1-44 	TRH 1-140 
YP 1-31 	TRH 1-163 	TRH 1-168 

[1007]



[1008] 注:括号中的数字对应于实例9中的化合物编号。

[1009] 将231MFP细胞用DMSO溶剂或CCW 28-3 (10 μ M) 原位处理1小时,然后用IA-炔烃 (100 μ M) 对蛋白质组进行体外标记,持续1小时。通过CuAAC附加同位素轻 (对于DMSO处理) 或重 (对于化合物处理) TEV蛋白酶-可裂解生物素-叠氮化物标签,以进行isoTOP-ABPP分析。仅解释了存在于三个生物学重复中的两个生物学重复中的经探针修饰的肽。对于那些>3的比率,我们仅解释所有重复比率>3的所有生物学重复中存在的那些肽。对于那些>4的比率,我们仅解释所有重复比率>4的所有生物学重复中存在的那些肽。手动管理MS1峰形质量,以确认所有重复样品均具有良好的峰质量。

[1010] 与实例1-3相关的参考文献

[1011] (1) Burslem, G.M.; Crews, C.M. “蛋白质稳态的小分子调节 (Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis.)”《化学评论 (Chem.Rev.)》2017, 117 (17), 11269-11301。(2) Lai, A.C.; Crews, C.M. “经诱导的蛋白质降解:新兴的药物发现范例 (Induced Protein Degradation: An Emerging Drug Discovery Paradigm.)”《自然综述:药物发现 (Nat.Rev.Drug Discov.)》2017, 16 (2), 101-114。(3) Rape, M. “泛素化处于发展与疾病的十字路口 (Ubiquitylation at the Crossroads of Development and Disease.)”《自然综述:分子细胞生物学 (Nat.Rev.Mol.Cell Biol.)》2018, 19 (1), 59-70。(4) Grossman, E.A.; Ward, C.C.; Spradlin, J.N.; Bateman, L.A.; Huffman, T.R.; Miyamoto, D.K.; Kleinman, J.I.; Nomura, D.K. “针对抗癌天然产物靶向的有药可用性热点的共价配体发现 (Covalent Ligand Discovery against Druggable Hotspots Targeted by Anti-Cancer Natural Products.)”《细胞化学生物学 (Cell Chem.Biol.)》2017, 24 (11), 1368-1376.e4。(5) Counihan, J.L.; Wiggenhorn, A.L.; Anderson, K.E.; Nomura, D.K. “化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了ALDH3A1作为肺癌的治疗靶标 (Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals ALDH3A1 as a Lung Cancer Therapy Target.)”《美国化学学会化学生物学杂志 (ACS Chem.Biol.)》2018。(6) Bateman, L.A.; Nguyen, T.B.; Roberts, A.M.; Miyamoto, D.K.; Ku, W.-M.; Huffman, T.R.; Petri, Y.; Heslin, M.J.; Contreras, C.M.; Skibola, C.F.; 等人 “化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了削弱ER形态和癌症致病性的网状蛋白4中的半胱氨酸热点 (Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screen

Reveals a Cysteine Hotspot in Reticulon 4 That Impairs ER Morphology and Cancer Pathogenicity.)”《英国剑桥化学通讯 (Chem. Commun. Camb. Engl.)》2017, 53 (53), 7234-7237。(7) Backus, K.M.; Correia, B.E.; Lum, K.M.; Forli, S.; Horning, B.D.; González-Páez, G.E.; Chatterjee, S.; Lanning, B.R.; Teijaro, J.R.; Olson, A.J.; 等人“在原生生物系统中蛋白质组范围内的共价配体发现 (Proteome-Wide Covalent Ligand Discovery in Native Biological Systems.)”《自然 (Nature)》2016, 534 (7608), 570-574。(8) Wang, C.; Weerapana, E.; Blewett, M.M.; Cravatt, B.F. “一种定量映射脂质衍生的亲电体的靶标的化学计量学平台 (A Chemoproteomic Platform to Quantitatively Map Targets of Lipid-Derived Electrophiles.)”《自然方法 (Nat. Methods)》2014, 11 (1), 79-85。(9) Hacker, S.M.; Backus, K.M.; Lazear, M.R.; Forli, S.; Correia, B.E.; Cravatt, B.F. “人类蛋白质组中赖氨酸反应性和可配体性的全球概况 (Global Profiling of Lysine Reactivity and Ligandability in the Human Proteome.)”《自然化学 (Nat. Chem.)》2017, 9 (12), 1181-1190。(10) Backus, K.M. “反应性半胱氨酸分析的应用 (Applications of Reactive Cysteine Profiling.)”《微生物学和免疫学的最新课题 (Curr. Top. Microbiol. Immunol.)》2018。(11) Liu, Y.; Patricelli, M.P.; Cravatt, B.F. “基于活性的蛋白质组分析: 丝氨酸水解酶 (Activity-Based Protein Profiling: The Serine Hydrolases.)”《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)》1999, 96 (26), 14694-14699。(12) Weerapana, E.; Wang, C.; Simon, G.M.; Richter, F.; Khare, S.; Dillon, M.B.D.; Bachovchin, D.A.; Mowen, K.; Baker, D.; Cravatt, B.F. “定量反应性分析可预测蛋白质组中的功能性半胱氨酸 (Quantitative Reactivity Profiling Predicts Functional Cysteines in Proteomes.)”《自然》2010, 468 (7325), 790-795。(13) Roberts, A.M.; Miyamoto, D.K.; Huffman, T.R.; Bateman, L.A.; Ives, A.N.; Akopian, D.; Heslin, M.J.; Contreras, C.M.; Rape, M.; Skibola, C.F.; 等人“对共价配体的化学蛋白质组学筛查揭示了UBA5作为新型胰腺癌靶标 (Chemoproteomic Screening of Covalent Ligands Reveals UBA5 As a Novel Pancreatic Cancer Target.)”《美国化学学会化学生物学杂志》2017, 12 (4), 899-904。(14) Wang, C.; Weerapana, E.; Blewett, M.M.; Cravatt, B.F. “一种定量映射脂质衍生的亲电体的靶标的化学计量学平台”《自然方法》2014, 11 (1), 79-85。(15) Anderson, K.E.; To, M.; Olzmann, J.A.; Nomura, D.K. “化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了削弱乳腺癌致病性的硫氧还蛋白-胱天蛋白酶3相互作用破坏者 (Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals a Thioredoxin-Caspase 3 Interaction Disruptor That Impairs Breast Cancer Pathogenicity.)”《美国化学学会化学生物学杂志》2017, 12 (10), 2522-2528。(16) Vassilev, L.T.; Vu, B.T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; 等人“MDM2的小分子拮抗剂体内活化P53路径 (In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2.)”《科学 (Science)》2004, 303 (5659), 844-848。(17) Schneekloth, A.R.; Pucheault, M.; Tae, H.S.; Crews, C.M. “小分子诱导的靶向细胞内蛋白质降解: 化学蛋白质组学的途中 (Targeted Intracellular Protein Degradation Induced by a Small Molecule: En Route to Chemical Proteomics.)”《生物有机化学与医药化学通讯 (Bioorg. Med. Chem. Lett.)》2008, 18 (22), 5904-5908。(18)

Malecka, K.A.; Fera, D.; Schultz, D.C.; Hodawadekar, S.; Reichman, M.; Donover, P.S.; Murphy, M.E.; Marmorstein, R. “小分子人乳头瘤病毒E6抑制剂的鉴定和表征 (Identification and Characterization of Small Molecule Human Papillomavirus E6 Inhibitors.)”《美国化学学会化学生物学杂志》2014, 9 (7), 1603-1612。(19) Staudinger, J.L. “SUMO和泛素系统之间的分子界面 (The Molecular Interface Between the SUMO and Ubiquitin Systems.)”《实验医学与生物学进展 (Adv. Exp. Med. Biol.)》2017, 963, 99-110。(20) Sriramachandran, A.M.; Dohmen, R.J. “靶向SUMO的泛素天冬氨酸 (SUMO-Targeted Ubiquitin Linkases.)”《生物化学与生物物理学报 (Biochim. Biophys. Acta)》2014, 1843 (1), 75-85。(21) Tan, B.; Mu, R.; Chang, Y.; Wang, Y.-B.; Wu, M.; Tu, H.-Q.; Zhang, Y.-C.; Guo, S.-S.; Qin, X.-H.; Li, T.; 等人 “RNF4通过下调TAB2对NF-KB信号传导进行负调节 (RNF4 Negatively Regulates NF-KB Signaling by down-Regulating TAB2.)”《欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Lett.)》2015, 589 (19 Pt B), 2850-2858。(22) Fryrear, K.A.; Guo, X.; Kerscher, O.; Semmes, O.J. “靶向Sumo的泛素连接酶RNF4调节HTLV-1癌蛋白Tax的定位和功能 (The Sumo-Targeted Ubiquitin Ligase RNF4 Regulates the Localization and Function of the HTLV-1 Oncoprotein Tax.)”《血液学 (Blood)》2012, 119 (5), 1173-1181。(23) Bilodeau, S.; Caron, V.; Gagnon, J.; Kuftedjian, A.; Tremblay, A. “CK2-RNF4相互作用协调核受体FXR的非规范SUMO化和降解 (A CK2-RNF4 Interplay Coordinates Non-Canonical SUMOylation and Degradation of Nuclear Receptor FXR.)”《分子细胞生物学杂志 (J. Mol. Cell Biol.)》2017, 9 (3), 195-208。(24) Zengerle, M.; Chan, K.-H.; Ciulli, A. “选择性小分子诱导的BET溴结构域蛋白BRD4降解 (Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4.)”《美国化学学会化学生物学杂志》2015, 10 (8), 1770-1777。(25) Louie, S.M.; Grossman, E.A.; Crawford, L.A.; Ding, L.; Camarda, R.; Huffman, T.R.; Miyamoto, D.K.; Goga, A.; Weerapana, E.; Nomura, D.K. “GSTP1是三阴性乳腺癌细胞代谢和致病性的驱动器 (GSTP1 Is a Driver of Triple-Negative Breast Cancer Cell Metabolism and Pathogenicity.)”《细胞化学生物学》2016, 23 (5), 567-578。(26) Medina-Cleghom, D.; Bateman, L.A.; Ford, B.; Heslin, A.; Fisher, K.J.; Dalvie, E.D.; Nomura, D.K. “使用基于反应性的化学计量学平台对环境化学物质的蛋白质组范围内的靶标进行定位 (Mapping Proteome-Wide Targets of Environmental Chemicals Using Reactivity-Based Chemoproteomic Platforms.)”《化学生物学 (Chem. Biol.)》2015, 22 (10), 1394-1405。(27) Jessani, N.; Humphrey, M.; McDonald, W.H.; Niessen, S.; Masuda, K.; Gangadharan, B.; Yates, J.R.; Mueller, B.M.; Cravatt, B.F. “与体内乳腺肿瘤生长相关的癌和基质酶活性谱 (Carcinoma and Stromal Enzyme Activity Profiles Associated with Breast Tumor Growth in Vivo.)”《美国国家科学院院刊》2004, 101 (38), 13756-13761。(28) Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. “使用二金鸡宁酸测量蛋白质 (Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid.)”《分析生物化学 (Anal. Biochem.)》1985, 150 (1), 76-85。(29) Xu, T.; Park, S.K.; Venable, J.D.; Wohlschlegel, J.A.; Diedrich, J.K.; Cociorva, D.; Lu, B.; Liao, L.; Hewel, J.; Han, X.; 等

人“ProLuCID:一种改进的类似于SEQUEST的算法,具有增强的灵敏度和特异性(ProLuCID: An Improved SEQUEST-like Algorithm with Enhanced Sensitivity and Specificity.)”《蛋白质组学期刊(J.Proteomics)》2015,129,16-24。实例3(1) Zengerle, M.; Chan, K. -H.; Ciulli, A. “选择性小分子诱导的BET溴结构域蛋白BRD4降解”《美国化学学会化学生物学杂志》2015,10(8),1770-1777。

[1012] 实例4. 利用抗癌天然产物印苦楝内酯进行靶蛋白降解

[1013] 印苦楝内酯,一种来自印度楝树(Neem tree)的萜类天然产物,削弱了多种人类癌症的致癌性;然而,对印苦楝内酯的直接靶标和抗癌机制了解甚少。在这里,我们使用基于活性的蛋白质谱分析(ABPP)的化学蛋白质组学平台,发现印苦楝内酯与对E3泛素连接酶RNF114中的底物识别至关重要的新型功能性半胱氨酸反应。印苦楝内酯通过破坏RNF114底物识别来削弱乳腺癌细胞的增殖,从而导致肿瘤抑制物p21的泛素化和降解受到抑制,从而使其迅速稳定。我们进一步证明了在靶蛋白降解应用中利用RNF114中的此反应性节点进行E3连接酶募集的能力,并显示出合成上更简单的支架也能够进入此独特的反应性位点。

[1014] 来自如植物和微生物等生物的天然产物是治疗性前导化合物的丰富来源¹⁻⁵。其生物学活性的表征导致了针对不同病理(如癌症、细菌和真菌感染、炎症和糖尿病)的多种药物¹⁻⁵。在天然产物中,存在共价作用的分子的子集,这些分子带有亲电部分,能够与蛋白质中的亲核氨基酸热点进行很大程度上不可逆的反应,从而发挥其治疗活性。这些天然产物实例包含青霉素,其不可逆地抑制诱导抗菌活性的丝氨酸转氨酶,或渥曼青霉素,其共价修饰PI3激酶上的功能性赖氨酸以抑制其活性⁵⁻⁷。发现抗癌和共价作用的天然产物靶向的有药可用性热点不仅可以产生新的抗癌药物和治疗靶标,还可以揭示蛋白质靶标中天然产物获得的有药可用性药征的独特见解,所述蛋白质靶标通常被认为无药可用性或难以通过标准药物发现工作来解决。难以预测先验的有药可用性药征的一个实例是FK506或他克莫司(Tacrolimus),其通过结合并创建新的FKBP12-FK506复合物来调节T细胞信号传导而抑制肽基脯氨酰异构酶活性⁸。因此,深入了解自然界用于参与蛋白质靶标的策略可以获得有关药物可控性的新的出乎意料的规则。

[1015] 在此实例中,我们表征了天然产物印苦楝内酯作用的抗癌机制,所述印苦楝内酯是源自印度楝树(印楝(*Azadirachta indica*))的柠檬苦素类天然产物(图8A)⁹。印苦楝内酯已显示出多种治疗作用,并具有能够与半胱氨酸反应的环状烯酮¹⁰⁻¹²。在癌症的背景下,已证明印苦楝内酯可以抑制多种癌症的肿瘤发生和转移,而不会引起任何毒性或不良副作用^{10,11,13-17}。尽管先前的研究表明,印苦楝内酯可以通过调节与存活、生长、侵袭、血管生成和炎症相关的信号传导路径和转录因子并通过影响氧化应激,从而削弱癌症的致病性,但印苦楝内酯的直接靶标仍然难以表征^{10,15,18-22}。

[1016] 鉴定复杂天然产物的直接蛋白质靶标仍然具有挑战性,并且经常需要合成带有光亲和性和富集柄的这些化合物的类似物,这通常是在合成上具有挑战性的任务,并且可能改变分子的活性²³⁻²⁵。即使生成了这种探针,鉴定天然产物靶向的特定氨基酸位点也是具有挑战性的。在这项研究中,我们利用基于活性的蛋白质谱分析(ABPP)的化学蛋白质组学方法来定位乳腺癌细胞蛋白质组中印苦楝内酯的蛋白质组范围内的靶标。使用ABPP平台,我们揭示了乳腺癌细胞中印苦楝内酯的主要靶标之一是E3泛素连接酶RNF114的C8。印苦楝内酯对RNF114进行共价修饰会导致其底物(肿瘤抑制物p21)的识别、泛素化和降解受损,从而

使其快速稳定。有趣的是,由于印苦楝内酯在RNF114内的底物识别位点处结合,因此我们证明了印苦楝内酯可用于将RNF114募集到其它蛋白质底物上,以用于靶蛋白降解应用。使用化学蛋白质组学启用的共价配体筛选平台,我们还鉴定了可以与RNF114的C8类似地反应并表现出印苦楝内酯作用的更易于合成处理的化合物。

[1017] 印苦楝内酯对乳腺癌细胞的存活和增殖的影响。尽管已证明印苦楝内酯可削弱许多不同类型人类癌症的致癌性,但我们选择集中精力阐明印苦楝内酯在三阴性乳腺癌(TNBC)中的作用。TNBC不含雌激素、孕酮和HER2受体,并且是最具侵袭性的癌症,其预后最差^{26,27}。目前,针对TNBC患者的靶向治疗很少。因此,在TNBC中发现新的治疗方式将可能显著有助于减少与乳腺癌相关的死亡率。与先前的报告一致,该报告显示了在乳腺癌细胞中的抗癌活性,印苦楝内酯削弱了231MFP细胞和HCC38TNBC细胞中的细胞增殖或无血清细胞存活(图8B)^{14,15,17}。

[1018] 使用ABPP平台定位乳腺癌细胞中印苦楝内酯靶向的有药可用性热点。为了更好地了解印苦楝内酯如何削弱乳腺癌的致病性,我们应用了一种化学同位素平台,其被称为同位素串联正交蛋白水解启用的基于活性的蛋白质质谱分析(isoTOP-ABPP),以定位印苦楝内酯靶向的有药可用性热点。isoTOP-ABPP由Cravatt和Weerapana率先开发,其使用基于反应性的化学探针直接在复杂的蛋白质组中定位反应性、功能性和有药可用性的热点²⁸⁻³¹。当以竞争方式使用时,可以将共价作用的小分子与基于反应性的探针结合竞争,以促进靶标的鉴定³¹⁻³⁸(图9A)。在这项研究中,我们用媒剂或印苦楝内酯在体外治疗乳腺癌细胞蛋白质组或在原位治疗乳腺癌细胞,然后用半胱氨酸反应性炔烃官能化的碘乙酰胺探针(IA-炔烃)对蛋白质组进行竞争性标记,之后,将同位素轻或重的可裂解的富集柄连接到经探针标记的蛋白质上,以进行isoTOP-ABPP分析。通过液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)分析经探针修饰的胰蛋白酶肽,并定量轻与重胰蛋白酶探针修饰的肽的比率,其代表对照对比经处理的IA-炔烃标记的位点。对231MFP TNBC蛋白质组中印苦楝内酯靶向的可配位热点的IsoTOP-ABPP分析显示了三个主要的体外靶标(PTOV1 C308、RNF114 C8和PFKP C123)和一个主要的原位靶标RNF114 C8(图9B,2C;表S1)。使用RNA干扰对这些靶标中的每一个靶标进行敲低显示,RNF114的敲低与231MFP细胞中印苦楝内酯的抗增殖作用最为相似(图9D,图S1)。进一步证明了RNF114是负责印苦楝内酯作用的靶标,RNF114敲低表现出对印苦楝内酯介导的抗增殖作用的显著提高的敏感性(图9E)。

[1019] 印苦楝内酯与RNF114相互作用的生化表征。RNF114是RING家族的E3泛素连接酶^{39,40}。被isoTOP-ABPP鉴定为印苦楝内酯的靶标C8的RNF114上的位点落入蛋白质的N端区域内(所述蛋白质据预测是本质上无序的),并且位于两个带注释的锌指结构域之外(图10A)。天然产物对蛋白质的内在无序区域的明显选择性靶向引起了我们的兴趣,我们试图进一步确认和表征印苦楝内酯和RNF114之间的相互作用。

[1020] 因为isoTOP-ABPP是共价作用的分子与更广泛的反应性探针之间的竞争性测定方法,所以其是潜在的印苦楝内酯靶向性热点的间接读数。为了确认印苦楝内酯直接靶向RNF114,我们由印苦楝内酯合成了三步中所示的炔基官能化的探针(图10B)。呋喃部分的选择性溴化和与4-甲酰基苯基硼酸的Suzuki偶联提供了醛2,其通过Pinnick氧化转化为相应的羧酸(3)。最后,将3与炔丙基胺(HATU,DIPEA)偶联得到目标探针。尽管该探针标记了231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中的多种蛋白质,但其中只有两种蛋白质被印苦楝内酯自身竞

争。这些竞争性蛋白质的分子量与PTOV1和RNF114的分子量一致(图10C)。我们进一步证明了该印苦楝内酯探针与纯人RNF114反应,并且也被印苦楝内酯竞争,并且该标记在C8A RNF114突变体中被废除(图10D)。此外,在将纯蛋白质与天然产物一起孵育后,通过LC-MS/MS观察到了印苦楝内酯在RNF114的C8上的直接质量加合物(图10E)。综上所述,这些发现提供了令人信服的证据,表明印苦楝内酯在C8处共价修饰了RNF114的内在无序区域。

[1021] 印苦楝内酯对RNF114活性和体外和原位底物结合的影响。先前已显示,在其它底物中,RNF114泛素化并降解肿瘤抑制物p21^{39,41,42}。在体外重构系统中,印苦楝内酯抑制RNF114自体泛素化和p21泛素化活性两者(图11A)。RNF114 C8A突变不影响基础RNF114自体泛素化活性,但是减弱了用印苦楝内酯治疗所观察到的抑制作用(图11B)。先前对RNF114的表征表明N端可能参与底物识别³⁹。与此相一致,我们发现印苦楝内酯抑制p21的RNF114下拉,这表明RNF114的明显抑制可能是由于底物识别受损,而不是直接抑制活性(图11C)。我们进一步证明,在231MFP细胞中进行印苦楝内酯处理可在1小时内稳定p21蛋白表达,而p53水平无明显变化(图11D,图S2)。总的来说,该数据表明印苦楝内酯与RNF114的内在无序的C8反应,以破坏RNF114-p21底物的识别,从而导致p21泛素化的抑制、p21的快速稳定和乳腺癌细胞中细胞增殖的削弱。

[1022] 使用印苦楝内酯作为RNF114募集剂进行靶蛋白降解。靶蛋白降解是一个强大的药物发现平台,其通过利用被称为“降解剂”的双功能分子将E3连接酶带入所关注的蛋白质,以蛋白酶体依赖性方式泛素化和降解靶标,从而解决了无药可用性蛋白质组,所述双功能分子由靶向蛋白质的配体、接头和E3连接酶募集剂组成⁴³⁻⁵¹。因为印苦楝内酯靶向潜在的底物识别位点,所以我们推测,通过使用印苦楝内酯作为RNF114募集剂开发双功能降解剂,印苦楝内酯可用于将RNF114募集到其它蛋白质底物上,以进行蛋白酶体降解。为了证明可行性,合成了通过将印苦楝内酯与BRD4抑制剂JQ1连接而形成的两个降解剂(图12A)。先前的研究表明,与cereblon募集剂沙利度胺(thalidomide)或VHL募集剂连接的基于JQ1的降解剂有效地以蛋白酶体依赖性方式降解BRD4^{44,47,51}。将先前制备的酸3与含有较长(PEG类)和较短(烷基类)间隔子单元的JQ1功能化的胺偶联,从而到达降解剂XH1和XH2。尽管XH1没有显示出明显的BRD4降解,但是231MFP细胞中的XH2处理(100nM)导致BRD4在12小时内降解,并且该降解通过用蛋白酶体抑制剂硼替佐米(BTZ)治疗而减弱(图12C)。我们将用XH2降解BRD4的剂量反应与先前报道的利用与JQ1连接的VHL配体的BRD4降解剂MZ1的剂量反应进行了比较(图12D)。MZ1在1和0.1 μ M下表现出更好的BRD4降解,而在10nM下表现出与XH2相当的降解。有趣的是,与0.1和0.01 μ M相比,XH2在1 μ M下的降解更少,这归因于先前报道的包含MZ1的降解剂的“钩效应”^{43,44}。通过用E1泛素活化的酶抑制剂(TAK-243)处理或用BRD4配体本身(JQ1)预竞争,XH2介导的BRD4降解也被减弱(图12E-12F)。然而,用翻译抑制剂(依米丁)处理对观察到的BRD4降解没有影响(图12G)。这些结果强烈表明,可以利用印苦楝内酯与RNF114的C8的反应性来将该E3连接酶募集到其它蛋白质底物(如BRD4)上,以泛素化并降解所述蛋白质底物。

[1023] 化学蛋白质组学启用的共价配体筛选,其用于鉴定针对RNF114的共价配体。通过了解RNF114的C8是一种独特的可用于癌症治疗和靶蛋白降解应用的有药可用性药征,我们寻找了类似地靶向RNF114的更易于合成处理的共价配体。为实现此目标,我们使用中通量基于凝胶的ABPP方法筛选了针对RNF114的半胱氨酸反应性共价配体库,其中共价配体与

RNF114的IA-炔烃标记竞争,随后添加若丹明-叠氮化物并通过SDS/PAGE和凝胶内荧光进行分析。初步研究使印苦楝内酯与RNF114的IA-炔烃标记竞争,但并未显示出对标记的完全抑制作用,这可能是由于IA-炔烃进行的多个半胱氨酸的烷基化超过了C8。因此,我们合成了更定制的炔烃官能化的环状烯酮探针JNS27,其显示了RNF114上的C8的选择性标记,如通过C8A RNF114突变蛋白的标记缺乏以及观察到的与印苦楝内酯的完全竞争所证明的(图13A)。在针对RNF114筛选的约200个半胱氨酸反应性共价配体中,丙烯酰胺EN62作为有前景的命中出现(图13B;图16A-16C)。EN62以C8依赖性方式抑制RNF114自体泛素化活性,并且在231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中也表现出蛋白质组范围内的选择性(图13C-13D)。EN62还削弱免疫缺陷小鼠中的231MFP乳腺癌细胞存活并减弱体内231MFP肿瘤异种移植物的生长(图13E-13F)。尽管EN62需要进一步提高效力,但这种共价配体代表了未来癌症治疗和蛋白质降解应用的更易于合成处理的起点。

[1024] 我们示出了令人信服的证据,表明印苦楝内酯通过靶向RNF114内C8处的底物识别结构域来抑制p21泛素化和降解,从而部分地削弱了乳腺癌的致病性,从而使其稳定。我们证明了RNF114上C8的印苦楝内酯靶向可用于募集RNF114用于靶蛋白降解应用,并证明了印苦楝内酯-JQ1降解剂XH2降解BRD4。此外,使用化学蛋白质组学启用的共价配体筛选方法,我们示出了概念证明,即可以快速鉴定出更易于合成处理的共价配体(如EN62),以靶向复杂天然产物(如RNF114的C8)所采用的有药可用性药征。

[1025] 我们在此报告了印苦楝内酯破坏RNF114与p21的相互作用,并且我们还显示p21水平在乳腺癌细胞中以p53独立性方式迅速稳定。据报道,在细胞周期或外源性胁迫的不同条件下,其它几种E3连接酶也可以降解p21,包含SCF^{Skp2}、CRL4^{Cdt2}和CHIP⁵²⁻⁵⁴。先前的研究表明,RNF114的表达在G1期后期升高,从而调节p21的水平,并且对于G1到S期的过渡至关重要³⁹。已报道的其它RNF114底物包含参与母体到合子转变的TAB1和参与NF- κ B活性和T细胞活化的A20^{55,56}。因此,在癌症或其它细胞和组织类型中,印苦楝内酯可以通过调节其它RNF114蛋白底物的水平而具有额外的活性。此外,尽管我们显示RNF114是印苦楝内酯的主要功能靶标之一,但可能还存在其它可逆或不可逆的蛋白质靶标,这些靶标可能无法使用此方法轻易鉴定。尽管如此,我们证明了RNF114是乳腺癌细胞增殖中重要且功能强大的印苦楝内酯靶标,这是由于RNF114超敏细胞对印苦楝内酯的敲低。

[1026] 我们的结果还表明,印苦楝内酯在功能上靶向RNF114内的内在无序区域。因此,迄今为止,用印苦楝内酯解决RNF114的结构仍具有挑战性,但是研究印苦楝内酯是否在N端诱导有序性的未来研究将为深入了解内在无序且无药可用性的蛋白质靶标的可配体性以及潜在地靶向其它E3连接酶的策略提供参考。

[1027] 靶蛋白降解已成为用于靶向蛋白质以通过蛋白酶体进行消除的强大且有效的药物发现范例^{43,45}。然而,挑战之一是,在人类基因组中大约600种E3连接酶中,只有少数E3连接酶募集剂得到开发⁵⁷。这些E3连接酶募集剂包含募集cereblon的沙利度胺型免疫调节药物(IMiD)、募集VHL的配体、募集MDM2的nutlin和募集cIAP的配体^{43,45}。在这里,我们报告了印苦楝内酯可以潜在地作用于靶蛋白降解应用的新型RNF114募集剂。通过进一步的接头修饰,应该可以极大地优化此类降解剂的性能,该分子的面积已被证明是重要的。也可以利用能够靶向RNF114的C8的更易于合成处理的共价配体(如EN62)作为RNF114募集剂。由于印苦楝内酯靶向RNF114内的底物识别结构域,因此如针对IMiD所报道的那样,确定印苦楝内

酯否可作为分子胶来募集和降解新底物也将具有未来的意义⁵⁸⁻⁶⁰。

[1028] 总的来说,这证明了使用基于ABPP的化学蛋白质组学平台来鉴定天然产物所采用的独特有药可用性药征的实用性。有趣的是,我们表明天然产物可以功能性地访问E3连接酶蛋白质-蛋白质相互作用位点,以用于潜在的癌症治疗和靶蛋白降解应用,并且在蛋白质的内在无序区域中确实如此。我们的研究还展示了如何利用共价配体筛选方法来鉴定更易于合成处理的小分子,这些小分子的作用类似于更复杂的天然产物,并且所述小分子可能能够利用其它E3连接酶来扩大E3连接酶募集剂的范围。

[1029] 实例5.方法和测定

[1030] 细胞培养。如先前所述,从MDA-MB-231细胞的已移植肿瘤异种移植物中产生231MFP细胞⁶¹。HCC38细胞和HEK293T细胞获自美国典型培养物保藏中心。在含有10% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的DMEM中培养HEK293T细胞,并将其维持在37℃下 (5% CO₂)。在含有10% FBS的L15培养基中培养231MFP,并将其维持在37℃下 (0% CO₂)。在含有10% FBS的RPMI培养基中培养HCC38细胞,并将其维持在37℃下 (5% CO₂)。

[1031] 存活和增殖测定。根据制造商的方案并如先前所述,使用Hoechst 33342染料 (Invitrogen) 如先前所述进行细胞存活和增殖测定⁶²。将231MFP细胞以150μl的体积接种到96孔板中 (40,000个用于存活,20,000个用于增殖),并使其粘附过夜。用另外的50μL培养基处理细胞,所述培养基含有1:250稀释的DMSO中的1000x化合物储备液。适当的孵育期后,从每个孔中移出培养基,并向每个孔中添加含有10%福尔马林和Hoechst 33342染料的100μl染色溶液,并在黑暗中于室温下孵育15分钟。孵育后,除去染色溶液,并在成像前用PBS洗涤孔。还如上所述进行了关于HCC38细胞的研究,但是接种了20,000个细胞用于存活,并接种了10,000个细胞用于增殖。

[1032] IsoTOP-ABPP的化学蛋白质组学研究。如先前所报道的完成IsoTOP-ABPP研究^{28,31,35,63}。通过在PBS中进行探针超声处理裂解细胞,并通过BCA分析测定蛋白质浓度⁶⁴。对于原位实验,在细胞收集和裂解之前,先用DMSO媒剂或共价作用的小分子 (来自1000X DMSO储备液) 将细胞处理90分钟。对于体外实验,将稀释在PBS中的蛋白质组样品 (每个生物学复制4mg蛋白质组) 在室温下用DMSO媒剂或共价作用的小-分子处理30分钟。随后在室温下用IA-炔烃标记 (100μM) 标记蛋白质组,持续1小时。通过依次添加三 (2-羧乙基) 膦 (1mM, Sigma)、三 [(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基) 甲基] 胺 (34μM, Sigma)、硫酸铜 (II) (1mM, Sigma) 和生物素-接头-叠氮化物 (用TEV蛋白酶识别序列以及同位素轻或重缬氨酸功能化的接头) 来使用CuAAC,以分别处理对照蛋白质组或经处理的蛋白质组。CuAAC后,通过以6500x g离心将蛋白质组沉淀,在冰冷的甲醇中洗涤,以1:1的对照/经处理比率合并,再次洗涤,然后变性,并通过在1.2% SDS/PBS中加热至80℃持续5分钟进行溶解。通过以6500x g离心沉淀不溶性组分,并将可溶性蛋白质组稀释于5ml 0.2% SDS/PBS中。将标记的蛋白质与抗生物素蛋白-琼脂糖珠 (170μl重悬的珠/样品, Thermo Pierce) 结合,同时在4℃下旋转过夜。通过分别在PBS和水中洗涤三次来富集与珠连接的蛋白质,然后将其重悬于6M尿素/PBS (Sigma) 中,并在TCEP (1mM, Sigma) 中还原,用碘乙酰胺 (IA) (18mM, Sigma) 烷基化,然后洗涤并重悬于2M尿素中,并用0.5μg/μl测序级胰蛋白酶 (Promega) 过夜进行胰蛋白酶消化。将胰蛋白酶肽洗脱掉。将珠分别在PBS和水中洗涤三次,在TEV缓冲溶液 (水, TEV缓冲液, 100 μM二硫苏糖醇) 中洗涤,并重悬于带有Ac-TEV蛋白酶的缓冲液中,并孵育过夜。将肽在水中

稀释并用甲酸(1.2M, Spectrum)酸化,并准备进行分析。

[1033] 质谱分析。将来自所有蛋白质组学实验的肽通过压力上样到装有4cm Aqua C18反相树脂(Phenomenex#04A-4299)的250 μ m内径熔融石英毛细管上,所述反相树脂事先在10分钟内使用100%缓冲液A到100%缓冲液B的梯度在Agilent 600系列HPLC上进行平衡,然后用100%缓冲液B洗涤5分钟并用100%缓冲液A洗涤5分钟。然后使用MicroTee PEEK 360 μ m配件(Thermo Fisher Scientific#p-888)将样品连接到装有10cm Aqua C18反相树脂和3cm强阳离子交换树脂的13cm激光拉管柱上,以进行isoTOP-ABPP研究。使用Q Exactive Plus质谱仪(Thermo Fisher Scientific)使用5步多维蛋白质鉴定技术(MudPIT)程序,使用500mM醋酸铵水溶液的0%、25%、50%、80%、和100%盐块,并使用缓冲液A中5-55%缓冲液B的梯度(缓冲液A:95:5的水:乙腈,0.1%的甲酸;缓冲液B:80:20的乙腈:水,0.1%的甲酸),分析样品。在启用动态排除的情况下,以数据依赖性采集模式收集数据(60秒)。进行一次完整的MS(MS1)扫描(400-1800m/z),然后对第n个最丰富离子进行15次MS2扫描(ITMS)。将加热的毛细管温度设定为200 $^{\circ}$ C,并且将纳米喷雾电压设定为2.75kV。

[1034] 使用Raw Extractor 1.9.9.2(Scripps研究院)以MS1和MS2文件的形式提取数据,并使用IP2 v.3(Integrated Proteomics Applications, Inc)中的ProLuCID搜索方法在Uniprot人类数据库中进行搜索⁶⁵。搜索半胱氨酸残基,其中对羧基氨基甲基化进行静态修饰(+57.02146),对甲硫氨酸氧化和轻度或重度TEV标签进行至多两个差异修饰(分别为+464.28596或+470.29977)。要求肽具有至少一个胰蛋白酶末端并且含有TEV修饰。通过DTASelect过滤ProLuCID数据,以使肽假阳性率低于5%。仅对在三个生物学重复中的两个生物学重复中都明显可见的那些经探针修饰的肽解释其同位素轻重比。那些显示比率>3的经探针修饰的肽被进一步分析为共价作用的小分子的潜在靶标。对于比率>3的经修饰的肽,我们过滤了所有三个生物学重复中都存在的肽命中。对于那些经探针修饰的肽比率>3,只有那些3比率>3的肽被解释,否则用最低的比率替换。对于那些经探针修饰的肽比率>4,只有那些3比率>4的肽被解释,否则用最低的比率替换。然后,人工确认比率>3的任何所得经探针修饰的肽的MS1峰形对于所有生物学重复中的被解释的肽具有良好的质量。

[1035] 构造敲低系。我们使用短发夹寡核苷酸使用先前描述的方法抑制231MFP细胞中RNF114的表达⁶⁶。为了生成稳定的shRNA系,使用Lipofectamine(Invitrogen)将pLK0.1主链中含有针对人RNF114的shRNA(Sigma)的慢病毒质粒转染到HEK293T细胞中。从过滤的培养基中收集慢病毒,并用Polybrene感染目标癌细胞系。用1 μ g/ml嘌呤霉素在3天之内选择靶细胞。用于生成RNF114敲低系的短发夹序列为:

[1036] CCGCCATGGCTGCCGTAAGAATTTCTCGAGAAATCTTACGGCAGCCATGGTTTTTG (SEQ ID NO: 4)

[1037] (Sigma RNF114 MISSION shRNA细菌甘油储备液, TRCN0000314877)。

[1038] 对照shRNA靶向具有靶序列GCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT (SEQ ID NO: 5)的GFP

[1039] 通过qPCR确认敲低。

[1040] 通过qPCR的基因表达。使用制造商的Fisher Maxima SYBR Green方案通过qPCR确认基因表达。Fisher Maxima SYBR Green的引物序列来自引物库(Primer Bank)。引物的序列如下:

[1041] RNF114正向:AAT GTT CCA AAC CG(SEQ ID NO:6)

[1042] RNF114反向:TTG CAG TGT TCC AC(SEQ ID NO:7)

[1043] 亲环素正向:CCC ACC GTG TTC TTC GAC ATT(SEQ ID NO:8)

[1044] 亲环素反向:GGA CCC GTA TGC TTT AGG ATG A(SEQ ID NO:9)

[1045] 基于凝胶的ABPP。如前所述执行基于凝胶的ABPP方法^{34,62,63,67}。重组纯人蛋白质购自Origene。将纯蛋白(0.1 μ g)在室温下以50 μ L PBS的孵育体积用DMSO媒剂或共价作用的小分子预处理30分钟,然后用JNS-1-27(50 μ M最终浓度)在室温下处理1小时。进行CuAAC以将若丹明-叠氮化物(1 μ M最终浓度)附加到炔烃探针标记的蛋白上。然后将样品用20 μ L的4x还原Laemmli SDS样品上样缓冲液(Alfa Aesar)稀释,并在90 $^{\circ}$ C下加热5分钟。在预制的4-20% TGX凝胶(Bio-Rad Laboratories, Inc.)上分离样品。在通过ChemiDoc MP(Bio-Rad Laboratories, Inc)扫描之前,将凝胶固定在10%乙酸、30%乙醇的溶液中2小时。使用ImageJ通过光密度测定法评估靶标标记的抑制作用。

[1046] 共价配体库。先前已经报道了针对RNF114筛选的大多数共价配体的合成和表征^{31,32,34,63}。以“EN”开头的化合物购自Enamine LLC。实例6中描述了先前未报道的其它共价配体的合成和表征。

[1047] 蛋白质印迹。RNF114(Millipore Sigma, HPA021184)、p21(Cell Signaling Technology, 12D1)、GAPDH(Proteintech Group Inc., 60004-1-Ig)、BRD4(Abcam plc, Ab128874)、DYKDDDDK标签(Cell Signaling Technology, D6W5B)和 β -肌动蛋白(Proteintech Group Inc., 6609-1-Ig)可从各种商业渠道获得,并按照推荐的制造商程序制备稀释液。通过SDS/PAGE解析蛋白质,并使用iBlot系统(Invitrogen)将其转移到硝酸纤维素膜上。在室温下,将印迹用含Tween 20(TBST)溶液的Tris缓冲盐水中的5%BSA封闭1小时,在TBST中洗涤,然后用在每个制造商的推荐稀释剂中稀释的一抗在4 $^{\circ}$ C下过夜探测。用TBST洗涤后,将印迹与购自Ly-Cor的二抗在黑暗中一起孵育,并在室温下在含5%BSA的TBST中以1:10,000的稀释度使用。额外清洗后,使用Odyssey Li-Cor扫描仪将印迹可视化。如果需要额外的一抗孵育,则使用ReBlotPlus强抗体剥离液(EMD Millipore, 2504)剥离膜,清洗并再次封闭,然后再与一抗一起重新孵育。

[1048] 野生型和C8A RNF114的表达和纯化。使用几种方法表达和纯化RNF114。在每种情况下,都证实了RNF114活性和对印苦楝内酯的敏感性。对于第一种方法,我们从Origene(Origene Technologies Inc., RC209752)购买了具有C端FLAG标签的野生型哺乳动物表达质粒。根据制造商的说明(New England Biolabs, E0554S),使用Q5定点诱变试剂盒产生了RNF114 C8A突变体。如前所述优化了表达和纯化条件⁶⁸。将HEK293T细胞在补充有10%FBS(Corning)和2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)的DMEM(Corning)中生长至60%融合,并保持在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下。转染前,立即用含有5%FBS的DMEM替换培养基。用20 μ g具有100 μ g PEI(Sigma)的过表达质粒转染每个板。48小时后,将细胞收集在TBS中,通过超声处理裂解,并与抗DYKDDDDK树脂(GenScript, L00432)分批结合,持续90分钟。将裂解液和树脂上样至重力流柱并洗涤,然后用250ng/ μ L 3 x FLAG肽(ApexBio, A6001)洗脱。通过PAGE、UV/光谱和BCA分析验证纯度和浓度。

[1049] 对于第二种方法,对编码RNF114的完整人类同工型的DNA(Uniprot id:Q9Y508)进行密码子优化以在大肠杆菌中表达,并通过整合DNA技术进行合成。使用含有与pET24a质粒

(Novagen) 同源的20个碱基对的引物,从完整的RNF114序列中扩增期望的构建体,所述质粒已被修饰为含有NdeI和BamHI限制性酶切位点之间的His8-MBP-TEV序列。使用预制的1%琼脂糖凝胶 (Invitrogen) 分析PCR产物,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 纯化正确长度的PCR产物。使用Gibson Assembly (NEB Gibson Assembly 2x Master Mix) 将纯化的PCR产物组装到线性化的载体中,并转化到大肠杆菌10G化学感受态细胞 (Lucigen, Middleton, WI) 中。将对卡那霉素 (Kan) 具有抗性的菌落在LB培养基中生长,并在正向和反向引物进行序列验证之前,先通过Miniprep (Qiagen) 分离出质粒。

[1050] 将含有期望的RNF114构建体的100ng pET24a His8-MBP质粒转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 化学感受态细胞 (NEB产品编号C2530H) 中。第二天,使用单个转化菌落接种50mL含有卡那霉素 (50 μ g/mL) 的富含营养的LB培养基,并在250rpm的搅拌下于37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天早晨,用过夜的发酵剂培养物将补充有50mM 3-(N-吗啉代) 丙烷磺酸 (MOPS) pH 7.5、1mM 氯化锌和卡那霉素 (50 μ g/mL) 的1L超级肉汤 (TB) 接种至在600nm处的起始光密度 (OD_{600}) 为0.1。使细胞在37 $^{\circ}$ C, 250rpm搅拌下生长直至 OD_{600} 为0.8。在这一阶段,用1mM异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导RNF114融合蛋白的表达,并将孵育箱的温度降至18 $^{\circ}$ C。将细胞在18 $^{\circ}$ C下生长18小时,然后通过离心收获,用1x磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 缓冲液洗涤,并保存在-20 $^{\circ}$ C下。

[1051] 将10g含有过量表达的RNF114融合蛋白的大肠杆菌细胞重悬于80mL裂解缓冲液 (50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 2个罗氏 (Roche) 蛋白酶抑制剂片剂[无EDTA], 200mM ZnCl₂, 1mM DTT) 中并在冰上进行超声处理,循环时间为打开60秒,关闭60秒,整个超声处理时间为三分钟。将细胞裂解液以18,000rpm离心20分钟,然后将可溶性蛋白与2mL已用洗涤缓冲液 (50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 200mM ZnCl₂, 1mM DTT, 25mM咪唑) 预先平衡的Ni-NTA树脂一起在4 $^{\circ}$ C下搅拌下孵育四小时。将细胞裂解物/Ni-NTA树脂混合物放入一次性柱中,并收集未结合树脂的所有未标记的可溶性蛋白质,以进行第二轮纯化。用25mL洗涤缓冲液洗涤树脂,然后用25mL洗脱缓冲液 (50mM tris, pH 7.5, 500mM咪唑, 200mM ZnCl₂, 150mM NaCl, 1mM DTT) 从Ni-NTA树脂中洗脱His-MBP-RNF114蛋白。重复该过程,用另外的2mL预平衡的Ni-NTA树脂彻底孵育所收集的液流。

[1052] 将His-MBP-RNF114蛋白在4 $^{\circ}$ C下用TEV蛋白酶 (100单位/mg MBP-RNF114) 同时消化,并在透析缓冲液 (50mM tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 200mM ZnCl₂, 1mM DTT) 中透析过夜。第二天早晨,将两个串联组装的5mL His Trap Excel 色谱柱放在Äkta Avant上,并用五个柱体积的洗涤缓冲液平衡。将TEV裂解的样品以2毫升/分钟的速率上样到色谱柱上,并用另外五个柱体积的洗涤缓冲液洗涤树脂。将被鉴定为含有裂解的RNF114的所有级分浓缩至5mL体积,并上样到已使用结晶缓冲液 (25mM Tris, pH 7.5, 137mM NaCl) 或NMR缓冲液 (20mM磷酸钠pH 6.8, 150mM NaCl) 进行了预平衡的HiLoad 16/60 Superdex 75凝胶过滤柱 (GE Healthcare) 上。使用0.25毫升/分钟的流速运行凝胶过滤柱,并收集2mL级分。使用SDS-PAGE分析与从凝胶过滤柱洗脱出的峰相对应的级分,并将含有RNF114的所有级分浓缩至最终浓度为10mg/mL,在液氮中速冻,并保存在-80 $^{\circ}$ C下,直至需要。

[1053] RNF114的LC-MS/MS分析。将50 μ L PBS中的纯化的RNF114 (10 μ g) 与DMSO媒剂或共价作用的化合物 (100 μ M) 一起在室温下孵育30分钟。然后,分别在室温下将DMSO对照用轻质IA处理,同时将经化合物处理的样品用重质IA孵育1小时 (200 μ M最终浓度, Sigma-Aldrich,

721328)。通过再加入12.5 μ L 100% (w/v) TCA来沉淀样品,并将治疗组和对照组成对合并,然后冷却至-80 $^{\circ}$ C,持续1小时然后将合并的样品在4 $^{\circ}$ C下以最大速度离心10分钟,小心地除去上清液,并用冰冷的0.01M HCl/90%丙酮溶液洗涤样品。将沉淀物重悬于含有0.1% Protease Max(Promega Corp.V2071)的4M尿素中,并在40mM碳酸氢铵缓冲液中稀释。将样品在60 $^{\circ}$ C下用10mM TCEP还原30分钟。然后将样品用PBS稀释50%,然后加入测序级胰蛋白酶(每个样品1 μ g,Promega Corp,V5111),在37 $^{\circ}$ C下过夜孵育。第二天,将样品以13200rpm离心30分钟。将上清液转移至新试管中,酸化至最终浓度为5%的甲酸,并保存在-80 $^{\circ}$ C下,直至进行MS分析。

[1054] RNF114泛素化测定。如上所述,从HEK292T细胞纯化重组Myc-Flag-RNF114蛋白,或从Origene(Origene Technologies Inc.,TP309752)购买。对于体外自体泛素化测定,将25 μ L TBS中的0.2 μ g RNF114与DMSO溶剂或共价作用的化合物一起在室温下预孵育30分钟。随后,加入0.1 μ g UBE1(Boston Biochem.Inc,E-305)、0.1 μ g UBE2D1(Boston Bichem.Inc,e2-615)、5 μ g的Flag-泛素(Boston Bichem.Inc,u-120)(于含2mM ATP的25 μ L Tris缓冲液中),以达到50 μ L的最终体积。将混合物在37 $^{\circ}$ C下搅拌孵育1.5小时。加入20 μ L的Laemmli缓冲液以淬灭反应,并通过蛋白质印迹测定法对蛋白质进行分析。

[1055] RNF114/p21下拉。使用抗Flag琼脂糖珠(GenScript Biotech Corp.,L00432),将带有Flag标签的重组RNF114用作诱饵,以沉淀纯的重组p21(Origene Technologies Inc.,TP309752和TP720567)。将一微克的Flag-RNF114添加到50 μ L的TBS中,然后添加印苦楝内酯(100 μ M最终浓度,Cayman Chemical Co.,19230)或等体积的DMSO。将样品在室温下孵育30分钟。向每个样品中加入一微克纯p21,并将样品在室温下搅拌孵育30分钟。将十微升的Flag琼脂糖珠粒添加到每个样品中,并将样品在室温下搅拌30分钟。进行洗涤(3次,1mL TBS),然后使用补充有250ng/ μ L 3 x FLAG肽(ApexBio A6001)的50 μ L TBS洗脱蛋白质。收集上清液(30 μ L),在加入Laemmli还原剂(10 μ L)后,将样品在95 $^{\circ}$ C下煮沸5分钟,然后冷却。如上所述,通过蛋白质印迹分析样品。

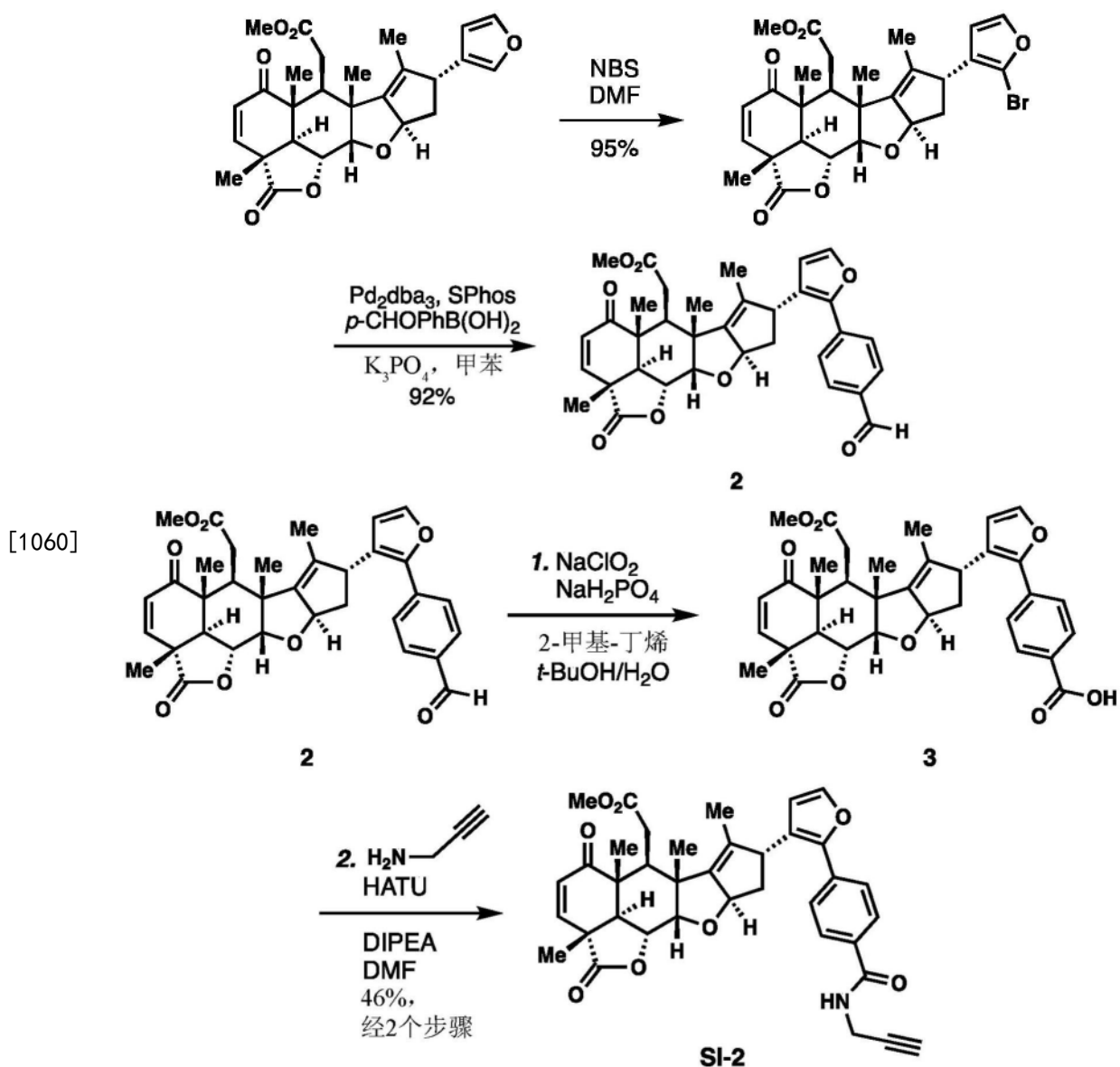
[1056] 肿瘤异种移植研究。如先前所述,通过将癌细胞异位移植到雌性C.B17严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠(Taconic Farms)的腹侧来建立人肿瘤异种移植^{66,69}。简而言之,将细胞用PBS洗涤,用胰蛋白酶消化,并收集在含血清的培养基中。将收获的细胞在无血清培养基中洗涤,然后以 2.0×10^4 个细胞/ μ L的浓度重新悬浮在无血清培养基中,并将100 μ L皮下注射到每只小鼠的腹侧。用卡尺测量肿瘤。根据加利福尼亚大学伯克利分校的机构动物护理和使用委员会的指导进行动物实验。

[1057] 实例6. 另外的合成和表征数据

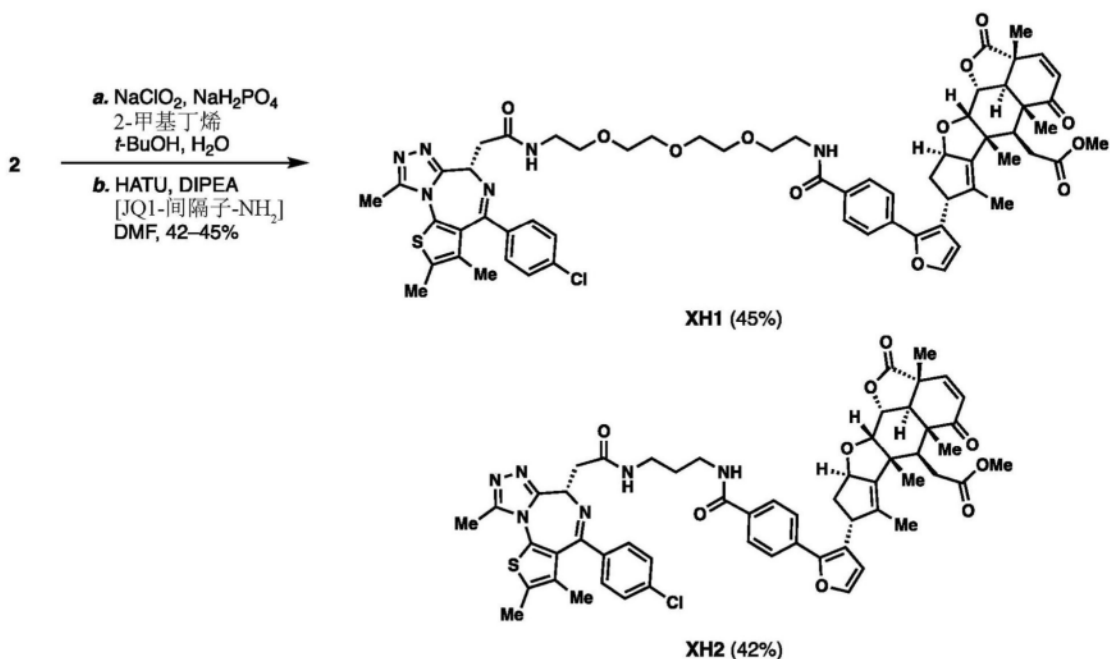
[1058] 印苦楝内酯-炔烃探针(SI-2)和降解剂XH1和XH2的合成和表征

[1059] 通用程序。除非另有说明,否则所有反应均在干燥的氮气气氛下,在带有黑色酚醛螺帽(13-425)的烤箱干燥或火焰干燥的Fisherbrand®硼硅酸盐玻璃管(Fisher Scientific,1495925A,13 $\times$ 100mm)中进行。使这些预先脱气的溶剂通过活性氧化铝柱,即可得到干燥的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、甲苯和乙腈。印苦楝内酯购自Sigma-Aldrich或Cayman Chemical,并且无需进一步纯化即可直接使用。炔丙基胺和N-甲基炔丙基胺购自Fisher Scientific,并且无需进一步纯化即可直接使用。通过薄层色谱法(TLC)在TLC硅胶60 F254玻璃板(EMD Millipore)上监测反应,并通过UV辐射可视化并用对甲氧基苯甲醛、磷钼酸或

高锰酸钾进行染色。使用旋转蒸发仪在减压下除去挥发性溶剂。使用Silicycle F60硅胶(60Å, 230-400目, 40-63μm)进行快速柱色谱法。乙酸乙酯和己烷购自Fisher Chemical, 并且无需进一步纯化即可用于色谱法。将质子核磁共振(^1H NMR)和碳核磁共振(^{13}C NMR)光谱记录在Bruker AV-600和AV-700光谱仪上, 对于 ^1H , 所述光谱仪分别在600和700MHz下工作, 而对于 ^{13}C , 则在150和175MHz下工作。相对于残留的溶剂信号 CDCl_3 (^1H NMR: $\delta=7.26$; ^{13}C NMR: $\delta=77.16$)、 CD_2Cl_2 (^1H NMR: $\delta=5.32$; ^{13}C NMR: $\delta=53.84$), 以百万分之一(ppm)报告化学位移。峰多重性报告如下: s=单峰, d=二重峰, t=三重峰, dd=双二重峰, tt=三个三重峰, m=多重峰, br=宽信号, app=表观。在Nicolet 380 FT-IR光谱仪上记录IR光谱。通过加利福尼亚大学伯克利分校的QB3/化学质谱仪设施获得高分辨率质谱(HRMS)。在Perkin-Elmer 241旋光仪上测量旋光度。



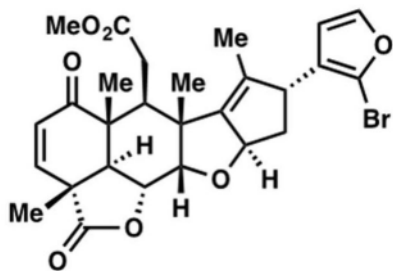
[1061] 方案S1. 印苦楝内酯炔烃探针(SI-2)的合成。



[1062]

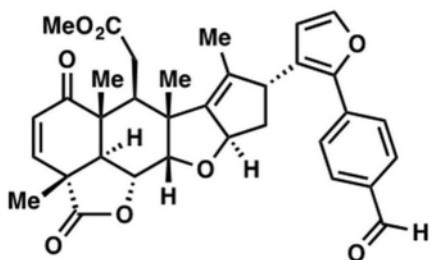
[1063] 方案S2. 印苦楝内酯来源的双功能降解剂XH1和XH2的合成。

[1064]



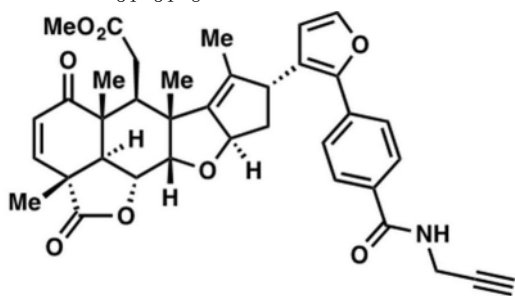
[1065] 溴呋喃SI-1: 将印苦楝内酯 (100mg, 0.214mmol) 均匀分成四个反应管 (Fisher Scientific, 13×100mm), 每个反应管装有搅拌棒。将试管抽真空并用氮气回填, 加入干燥的DMF (各0.25mL), 然后将所得溶液在冰浴中冷却至0℃。将重结晶的N-溴琥珀酰亚胺 (40.0mg, 0.225mmol) 溶解在干燥DMF (4mL) 中, 并将溶液缓慢添加到每个反应管中 (各1mL)。将反应混合物在0℃下搅拌1小时, 然后通过加入饱和Na₂S₂O₃水溶液 (各5mL) 进行淬灭。将所得混合物合并, 并用EtOAc (3X20mL) 萃取。将合并的有机层用H₂O (50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 经MgSO₄干燥, 并真空浓缩。将粗混合物通过柱色谱法纯化 (EtOAc: 己烷=1:3到1:1), 从而得到呈白色泡沫的SI-1 (111mg, 95%): $[\alpha]_D^{20} = +190.3^\circ$ (c 0.010 g/mL, CHCl₃); ¹H NMR (700MHz, CDCl₃) δ 7.34 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.28 (d, J=9.7Hz, 1H), 6.29 (d, J=2.1Hz, 1H), 5.92 (d, J=9.7Hz, 1H), 5.56 (app. tt, J=7.4, 1.8Hz, 1H), 4.62 (dd, J=12.5, 3.7Hz, 1H), 4.27 (d, J=3.7Hz, 1H), 3.67 (brd, J=7.0Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.24 (dd, J=16.3, 5.5Hz, 1H), 3.18 (d, J=12.5Hz, 1H), 2.75 (dd, J=5.5, 5.5Hz, 1H), 2.36 (dd, J=16.3, 5.5Hz, 1H), 2.18-2.13 (m, 2H), 1.66 (d, J=1.4Hz, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H); ¹³C NMR (175MHz, CDCl₃) δ 200.9, 175.0, 173.2, 149.8, 145.4, 144.2, 136.1, 131.2, 125.2, 120.3, 112.1, 88.5, 83.1, 73.5, 52.0, 50.5, 50.0, 47.9, 45.4, 43.8, 41.2, 40.4, 32.2, 18.7, 17.3, 15.3, 13.0; IR (薄膜, cm⁻¹) 2974, 2929, 2875, 1783, 1734, 1678, 1594, 1438, 1394, 1373; HRMS (ESI) 计算得出 [C₂₇H₂₉O₇BrNa]⁺ (M+Na)⁺: m/z 567.0989, 实测值567.0990。

[1066]



[1067] 醛2:向反应管(Fisher Scientific,13×100mm)中装入搅拌棒、SI-1(12mg,0.022mmol,1当量)、Pd₂(dba)₃(10mg,0.011mmol,0.5当量)、SPhos(10mg,0.024mmol,1当量)、无水K₃PO₄(35mg,0.17mmol,7.5当量)和4-甲酰基苯基硼酸(16mg,0.11mmol,5当量)。将管抽空,并用氮气回填,并加入干燥的甲苯(0.5mL)。将所得混合物在60℃下加热48小时,冷却至室温,并通过Celite®塞。将滤液真空浓缩并通过柱色谱法纯化(EtOAc:己烷=1:3到1:1),从而得到呈淡黄色油状物的醛2(11.5mg,92%): $[\alpha]_D^{20} = +4.8^\circ$ (c 0.005 g/mL, CHCl₃);¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ10.01(s,1H),7.92(d,J=8.3Hz,2H),7.71(d,J=8.3Hz,2H),7.42(d,J=1.9Hz,1H),7.29(d,J=9.7Hz,1H),6.39(d,J=1.9Hz,1H),5.93(d,J=9.7Hz,1H),5.60(app.tt,J=7.3,1.7Hz,1H),4.64(dd,J=12.5,3.6Hz,1H),4.32(d,J=3.6Hz,1H),4.17-4.13(m,1H),3.69(s,3H),3.23(dd,J=16.4,5.5Hz,1H),3.20(d,J=12.5Hz,1H),2.78(dd,J=5.5,5.5Hz,1H),2.41(dd,J=16.4,5.5Hz,1H),2.31-2.27(m,2H),1.69(d,J=1.7Hz,3H),1.49(s,3H),1.38(s,3H),1.25(s,3H);¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ200.8,191.7,175.0,173.2,149.8,147.9,146.3,143.1,137.0,136.1,134.8,131.1,130.3,126.1,126.0,112.6,88.4,83.3,73.4,52.1,50.8,50.0,47.9,45.5,43.8,41.3,32.5,18.8,17.5,15.3,13.4;IR(薄膜,cm⁻¹) 2977,2935,2873,1782,1733,1702,1677,1608,1438,1393,1372;HRMS(ESI)计算得出[C₃₄H₃₄O₈Na]⁺(M+Na)⁺:m/z 593.2146,实测值593.2154。

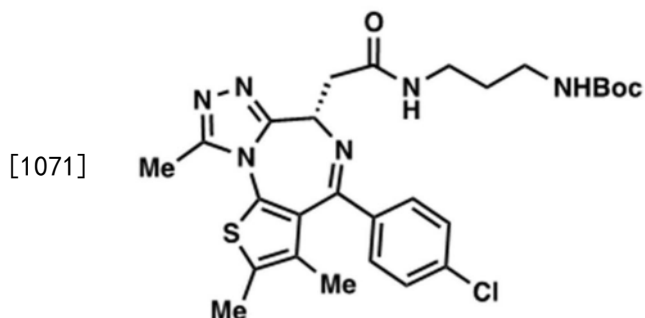
[1068]



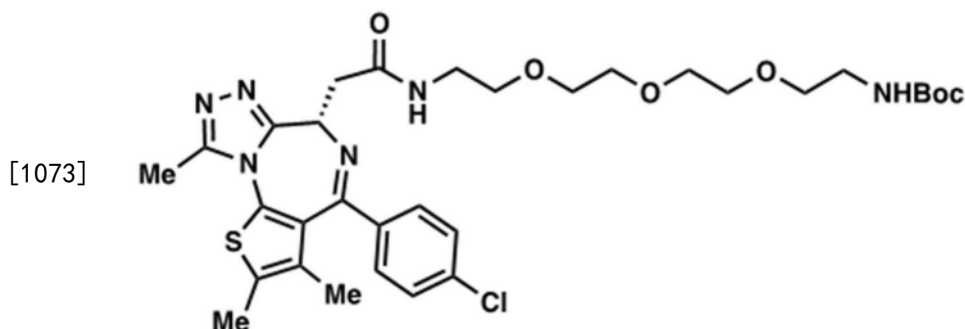
[1069] 印苦楝内酯炔烃探针SI-2:i.向反应管(Fisher Scientific,13×100mm)中装入搅拌棒、醛2(7.0mg,0.012mmol,1当量)以及t-BuOH和2-甲基-2-丁烯的混合物(0.6mL,3:5 v/v)。一份地添加NaClO₂(3.3mg,3当量)和NaH₂PO₄(13.2mg,9当量)于H₂O(0.2mL)中的溶液,并将所得混合物在室温下搅拌6小时。通过TLC判断反应完成后(EtOAc:己烷=2:1),将混合物用EtOAc(10mL)和饱和NH₄Cl水溶液(10mL)稀释,并通过EtOAc(10mL×2)萃取水相。将合并有机层用盐水(20mL)洗涤,经MgSO₄干燥,并真空浓缩。所得粗物质无需进一步纯化即可直接使用。

[1070] ii.向装有搅拌棒、粗品3(假定0.012mmol)和HATU(13.7mg,0.036mmol,3当量)的反应管(Fisher Scientific,13×100mm)中加入DIPEA(6.4μL,0.036mmol,3当量)DMF(0.1mL)中的溶液。将所得混合物冷却至0℃,并搅拌10分钟。然后加入炔丙胺(1.6μL,

0.024mmol, 2当量)于DMF(0.2mL)中的溶液,并将反应混合物在0-4℃下进一步搅拌12小时。通过TLC判断反应完成后(EtOAc:己烷=2:1),将混合物用EtOAc(10mL)和饱和NH₄Cl水溶液(10mL)稀释,并通过EtOAc(10mL×2)萃取水相。将合并的有机层用H₂O(20mL)、盐水(20mL)洗涤,经MgSO₄干燥,并真空浓缩。将所得粗品通过制备型TLC纯化(EtOAc:己烷=2:1),从而得到呈白色固体的SI-3(3.5mg, 46%, 经2个步骤): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +21.5^{\circ}$ (c 0.002 g/mL, CHCl₃); ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.83 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.61 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.39 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.29 (d, J=9.7Hz, 1H), 6.36 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.27 (t, J=5.2Hz, 1H), 5.93 (d, J=9.7Hz, 1H), 5.60 (app. t, J=7.6Hz, 1H), 4.64 (dd, J=12.6, 3.7Hz, 1H), 4.31 (d, J=3.7Hz, 1H), 4.28 (dd, J=5.2, 2.6Hz, 2H), 4.11 (brd, J=7.6Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.78 (dd, J=5.5, 5.5Hz, 1H), 2.40 (dd, J=16.4, 5.5Hz, 1H), 2.32-2.24 (m, 3H), 1.67 (brs, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.24 (s, 3H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ200.8, 175.0, 173.2, 166.6, 149.8, 148.2, 146.1, 142.5, 136.3, 134.7, 132.1, 131.2, 127.6, 126.1, 124.8, 112.3, 88.5, 83.2, 79.6, 73.5, 72.2, 52.1, 50.8, 50.0, 48.0, 45.5, 43.8, 41.3, 41.3, 32.5, 30.0, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4; IR (薄膜, cm⁻¹) 3337, 2954, 2921, 2852, 1781, 1734, 1663, 1609; HRMS (ESI) 计算得出[C₃₇H₃₇N₈O₈Na]⁺ (M+Na)⁺: m/z 646.2417, 实测值646.2417。

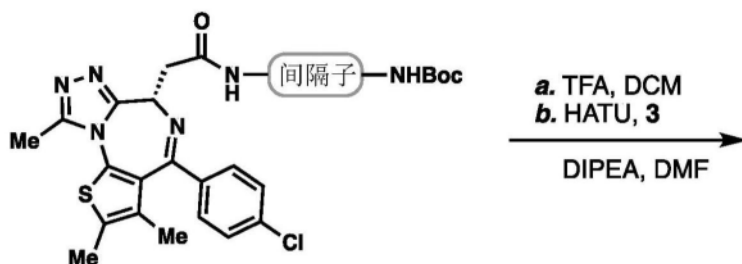


[1072] 根据Waring及其同事报道的条件制备该化合物(《药物化学杂志(J. Med. Chem.)》, 2016, 59, 7801)。

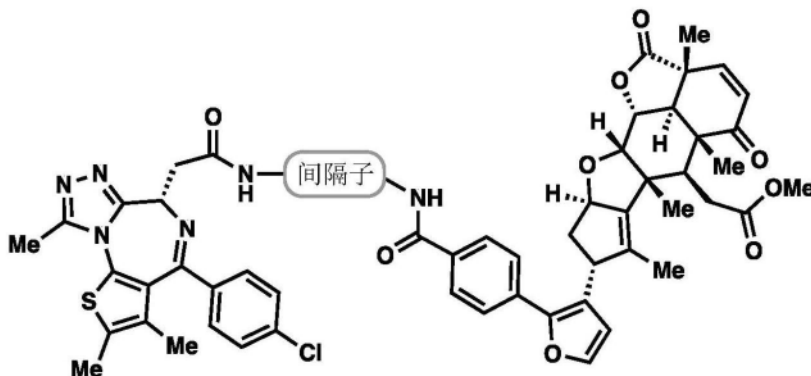


[1074] 根据Bradner及其同事报道的条件制备该化合物(《PCT国际申请(PCT Int. Appl.)》2017, WO 2017091673 A2)。

[1075] 用于合成双功能降解剂XH1和XH2的通用程序:



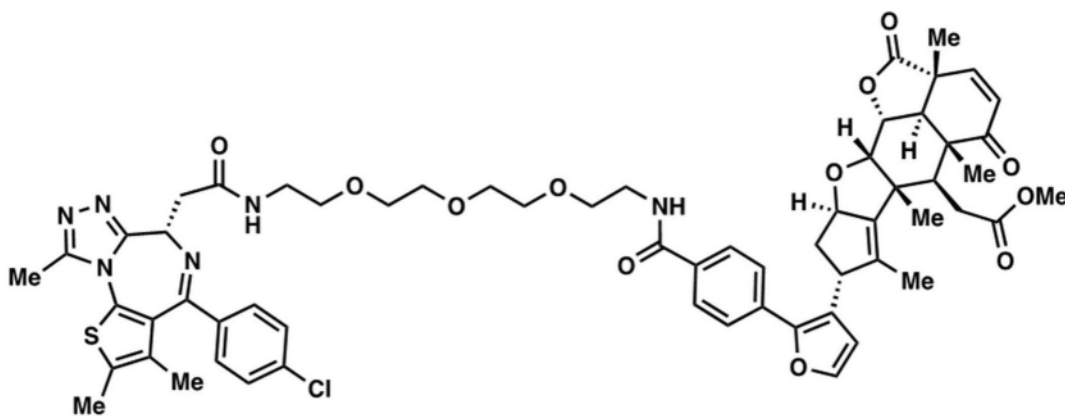
[1076]



[1077] i. 向反应管 (Fisher Scientific, 13×100mm) 中装入搅拌棒、Boc保护的胺 (0.04mmol)、三乙基硅烷 (12μL, 0.075mmol) 和DCM (0.4mL)。将所得混合物冷却至0℃, 然后逐滴加入TFA (0.12mL)。使反应混合物温热至室温, 并进一步搅拌2小时。通过TLC判断反应完成后 (MeOH:DCM=1:10), 将混合物用甲苯 (2mL) 稀释, 并真空浓缩。将所得粗品在高真空下干燥30分钟, 并且无需进一步纯化即可直接用于下一步骤。根据上述程序, 由醛2制备酸3, 其无需进一步纯化即可使用。

[1078] ii. 向反应管 (Fisher Scientific, 13×100mm) 中装入搅拌棒、粗胺 (假定 0.04mmol)、未纯化的3 (假定0.02mmol) 和DMF (0.6mL)。将所得混合物在冰浴中冷却至0℃, 然后加入HATU (23.0mg, 0.06mmol) 和DIPEA (11μL, 0.06mmol)。将反应混合物在4℃下搅拌16小时。通过TLC判断反应完成后 (MeOH:DCM=1:10), 将混合物用EtOAc (10mL) 和饱和NH₄Cl水溶液 (10mL) 稀释, 并用EtOAc (2×10mL) 萃取水相。将合并的有机层用H₂O (20mL)、盐水 (20mL) 洗涤, 经MgSO₄干燥, 并真空浓缩。将所得粗物质通过制备型TLC纯化 (MeOH:DCM=1:15, 展开两次), 从而得到双功能降解剂XH1或XH2。

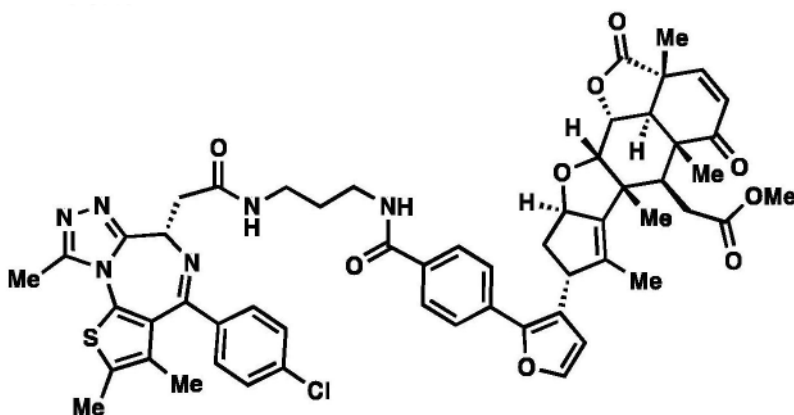
[1079]



[1080] 呈白色泡沫的XH1 (45%产率, 米目SI-2): $[\alpha]_D^{20} = +48.7^\circ$ (c 0.0052 g/mL, CHCl₃); ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.87 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.53 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.40 (d, J=8.2Hz, 3H),

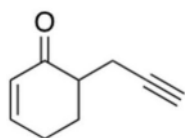
7.36(d, J=1.9Hz, 1H), 7.34-7.29(m, 2H), 7.28(d, J=9.7Hz, 1H), 6.33(d, J=1.9Hz, 1H), 5.93(d, J=9.7Hz, 1H), 5.61-5.55(m, 1H), 4.73(app. t, J=7.1Hz, 1H), 4.64(dd, J=12.5, 3.7Hz, 1H), 4.30(d, J=3.6Hz, 1H), 4.12-4.08(m, 1H), 3.75-3.64(m, 15H), 3.64-3.53(m, 3H), 3.51-3.40(m, 3H), 3.25-3.16(m, 2H), 2.77(app. t, J=5.5Hz, 1H), 2.70(s, 3H), 2.42-2.36(m, 4H), 2.26-2.20(m, 2H), 1.68-1.65(m, 3H), 1.65(d, J=1.8Hz, 3H), 1.48(s, 3H), 1.37(s, 3H), 1.24(s, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 200.6, 174.8, 173.0, 170.1, 167.0, 164.4, 155.3, 149.9, 149.6, 148.3, 146.1, 145.6, 142.1, 137.2, 136.3, 135.8, 133.8, 133.0, 131.6, 131.2, 131.0, 130.6, 130.0, 130.0, 128.7, 128.7, 127.6, 127.6, 125.7, 125.7, 124.1, 112.0, 88.3, 83.0, 73.3, 70.5, 70.5, 70.3, 70.2, 69.7, 69.6, 54.1, 51.9, 50.5, 49.7, 47.8, 45.3, 43.6, 41.1, 41.1, 39.7, 39.4, 38.5, 32.3, 18.6, 17.3, 15.1, 14.4, 13.1, 13.1, 11.6; IR(薄膜, cm^{-1}) 3339, 2923, 2866, 1781, 1734, 1659, 1540, 1487, 1437, 1419, 1300; HRMS (ESI) 计算得出 $[\text{C}_{61}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{Cl}_1\text{S}_1\text{Na}]^+(\text{M}+\text{Na})^+$: m/z 1165.4118, 实测值1165.4142。

[1081]



[1082] 呈白色泡沫的XH2 (42%产率, 来自SI-2): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +18.6^\circ$ (c 0.004 g/mL, CHCl_3); ^1H NMR (600MHz, CD_2Cl_2) δ 7.90(d, J=8.3Hz, 2H), 7.65-7.57(m, 3H), 7.44-7.39(m, 3H), 7.33(d, J=8.5Hz, 2H), 7.25(d, J=9.7Hz, 1H), 7.07(t, J=6.5Hz, 1H), 6.36(d, J=1.9Hz, 1H), 5.89(d, J=9.7Hz, 1H), 5.52(app. t, J=7.6Hz, 1H), 4.66-4.59(m, 2H), 4.26(d, J=3.6Hz, 1H), 4.12(brd, J=7.6Hz, 1H), 3.63(s, 3H), 3.52-3.45(m, 2H), 3.44-3.34(m, 4H), 3.20(dd, J=16.4, 5.5Hz, 1H), 3.15(d, J=12.5Hz, 1H), 2.74(app. t, J=5.5Hz, 1H), 2.63(s, 3H), 2.45-2.37(m, 4H), 2.25-2.21(m, 2H), 1.75-1.70(m, 2H), 1.65(s, 6H), 1.46(s, 3H), 1.36(s, 3H), 1.22(s, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, CD_2Cl_2) δ 201.2, 175.6, 173.5, 171.9, 166.7, 164.5, 156.1, 150.5, 149.9, 148.8, 146.3, 142.5, 137.1, 137.0, 136.6, 134.2, 133.7, 132.7, 131.6, 131.3, 131.2, 130.8, 130.3, 130.3, 129.0, 129.0, 127.8, 127.8, 126.2, 126.2, 124.8, 112.6, 88.6, 83.4, 73.9, 54.9, 52.1, 51.0, 50.2, 48.2, 45.8, 44.1, 41.6, 41.5, 39.7, 36.5, 36.2, 32.7, 29.9, 18.8, 17.5, 15.4, 14.6, 13.4, 13.3, 12.0; IR(薄膜, cm^{-1}) 3308, 3023, 2930, 2867, 1782, 1734, 1654, 1540, 1488, 1437, 1301; HRMS (ESI) 计算得出 $[\text{C}_{56}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_9\text{S}]^+(\text{M}+\text{H})^+$: m/z 1025.3669, 实测值1025.3669。

[1083]



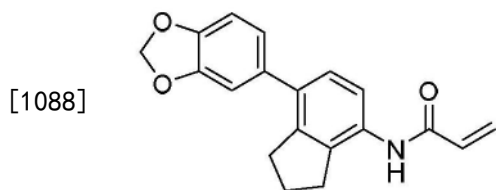
[1084] JNS27的合成和表征。JNS27。在氮气气氛下, 于-78℃下, 向二异丙基氨基化锂

(6mL, 1.2当量)的搅拌溶液中逐滴加入环己烯酮(0.48mL, 1量)于5mL THF中的溶液。45分钟后,逐渐加入3-溴-1-(三甲基甲硅烷基)-丙炔(0.85mL, 2.4当量)于5mL THF中的溶液,然后使反应升至室温过夜。将反应用饱和 NH_4Cl (20mL)淬灭。将混合物用EtOAc (20mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,用 Na_2SO_4 干燥,并浓缩。将残余物在硅胶上进行快速色谱法(含10-20% EtOAc的己烷),从而以25.4%的产率得到TMS-炔烃(261mg)。在 N_2 下,向TMS-炔烃(261mg, 1当量)于5mL THF中的溶液中加入TBAF (0.44mL, 1当量)。在室温下搅拌4小时后,通过加入饱和 NH_4Cl (15mL)淬灭反应。将混合物用EtOAc (15mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,用 Na_2SO_4 干燥,并浓缩。将残余物在硅胶上进行快速色谱法(含0-20% EtOAc的己烷),从而以81%的产率得到呈浅黄色蜡状物的JNS-27 (168mg, 20.6%, 经2个步骤)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6.99 (m, 1H), 6.03 (dt, $J=10.02, 1.97\text{Hz}$, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.48 (m, 3H), 2.33 (m, 2H), 1.98 (t, $J=2.68$, 1H), 1.88 (m, 1H); ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) δ 150.30, 129.34, 45.74, 27.68, 25.78, 20.27; HRMS (ESI) 计算得出 $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ONa}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$; m/z 134.0732, 实测值 134.0728。

[1085] 通用的合成方法。化学品和试剂购自主要的商业供应商,无需进一步纯化即可使用。除非另有说明,否则在氮气气氛下进行反应。使用EMD或Sigma Aldrich硅胶60 (230-400目)进行硅胶快速柱色谱法。在加利福尼亚大学伯克利分校的Bruker AVB 400、AVQ 400或AV 600光谱仪上获得质子和碳核磁共振(^1H NMR和 ^{13}C NMR)数据。使用正或负电喷雾电离(+ESI或-ESI)从加利福尼亚大学伯克利分校的QB3质谱仪设施获得高分辨率质谱图。产量报告为单次运行。

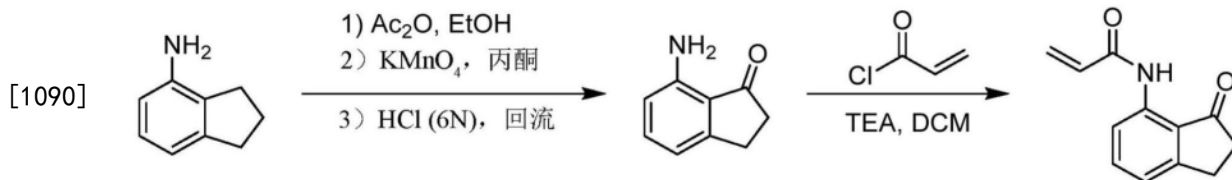
[1086] 通用程序A。将胺(1当量)溶解在DCM (5mL/mmol)中,并冷却至 0°C 。向溶液中加入丙烯酰氯(1.2当量),然后加入三乙胺(1.2当量)。将溶液温热至室温,并搅拌过夜。然后将溶液用盐水洗涤,并将粗产物通过硅胶色谱法纯化(并且如果需要的话,进行重结晶),从而得到相应的丙烯酰胺。

[1087] 通用程序B。将胺(1当量)溶解在DCM (5mL/mmol)中,并冷却至 0°C 。向溶液中加入氯乙酰氯(1.2当量),然后加入三乙胺(1.2当量)。将溶液温热至室温,并搅拌过夜。然后将溶液用盐水洗涤,并将粗产物通过硅胶色谱法纯化(并且如果需要的话,进行重结晶),从而得到相应的氯乙酰胺。



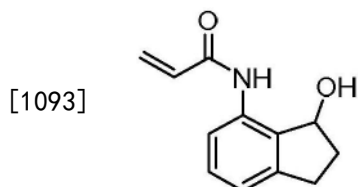
[1089] N-(7-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-78)。在氮气气氛下,向N-(7-溴-2,3-二氢-1H-茚-4基)丙烯酰胺 (TRH 1-65, 55mg, 0.2mmol)于二噁烷和水(4:1二噁烷:水, 2.1mL)的混合物中的溶液中依次加入3,4-(亚甲基二氧基)苯基硼酸(70mg, 0.4mmol)、碳酸钾(74mg, 0.5mmol)和四(三苯基膦)钯(0) (24mg, 10mol%)。将反应混合物加热以回流,并搅拌过夜。将反应用水(20mL)稀释,并用DCM (3 $\times$ 20mL)萃取。将合并的有机物用硫酸镁干燥,过滤,并蒸发,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含0%到25%乙酸乙酯的己烷),从而得到7mg白色固体(11%产率)。 ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 7.93 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 7.18 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.90 (s,

1H), 6.86 (t, J=8.1Hz, 2H), 6.45 (d, J=16.8Hz, 1H), 6.30 (dd, J=10.3, 16.8Hz, 1H), 5.79 (d, J=10.2Hz, 1H), 3.00 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.88 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.10 (quint, 7.3Hz, 2H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ147.7, 146.7, 142.84, 142.81, 135.2, 134.9, 132.8, 131.3, 127.9, 127.8, 122.1, 119.8, 109.2, 108.3, 101.2, 36.8, 33.5, 30.5, 25.4. HRMS (-ESI): 计算值: 306.1136 (C₁₉H₁₆NO₃). 观察值: 306.1130.



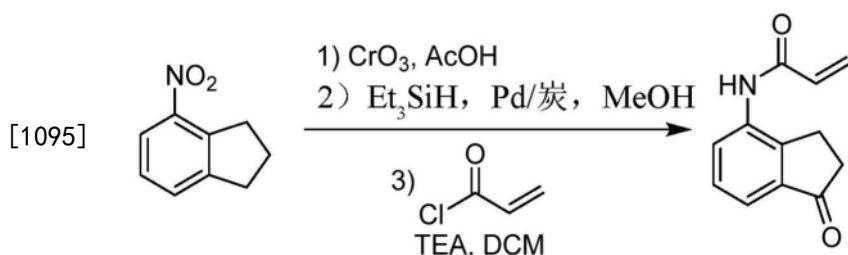
[1091] N-(3-氧代-2,3-二氢-1H茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-129)。在0℃下向4-氨基茚满 (1.0g, 7.5mmol) 于乙醇 (20mL) 中的溶液加入乙酸酐 (1.4mL, 15.0mmol)。使溶液升至室温并搅拌过夜, 然后蒸发溶剂。然后将残余物溶解在丙酮 (50mL) 中, 向其中加入15%硫酸镁水溶液 (1.2g, 于6.75mL水中), 然后加入高锰酸钾 (3.4g, 17.0mmol), 并将所得溶液搅拌24小时。将反应通过硅藻土垫过滤, 先后用氯仿和水洗脱。分离洗脱液, 并将水层用另外的氯仿萃取几次。将合并的有机物经硫酸镁干燥, 过滤并蒸发。然后将残余物溶解在6N HCl溶液 (20mL) 中, 并加热至90℃。搅拌5小时后, 将溶液冷却, 用少量碳酸钾中和, 并用乙酸乙酯萃取。将合并的有机物用硫酸镁干燥, 过滤并蒸发, 从而得到610mg粗制的7-氨基茚满-1-酮 (55%, 经3个步骤), 其无需进一步纯化即可使用。

[1092] 在N₂气氛下, 在0℃下向7-氨基茚满-1-酮于二氯甲烷 (15mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.39mL, 4.8mmol), 然后加入三乙胺 (0.67mL, 4.8mmol)。使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用1M HCl溶液 (2x) 和盐水洗涤, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化 (含10%到20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到390mg白色固体 (47%产率, 26%合并, 经4个步骤)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ10.64 (s, 1H), 8.45 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.55 (t, J=7.9Hz, 1H), 7.12 (d, J=7.6Hz, 1H), 6.45 (dd, J=1.0, 17.0Hz, 1H), 6.33 (dd, J=10.1, 17.0Hz, 1H), 5.82 (dd, J=1.0, 10.1Hz, 1H), 3.11 (t, J=11.5Hz, 2H), 2.74-2.71 (m, 2H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ209.3, 164.4, 155.9, 138.7, 137.0, 131.7, 128.0, 123.1, 120.8, 116.9, 36.5, 25.5. HRMS (+ESI): 计算值: 202.0863 (C₁₂H₁₂NO₂). 观察值: 202.0860.



[1094] N-(3-羟基-2,3-二氢-1H茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-133)。在氮气气氛下, 向N-(3-氧代-2,3-二氢-1H-茚满-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-129, 201mg, 1.0mmol) 于无水甲醇 (7mL) 中的溶液中加入硼氢化钠 (46.1mg, 1.2mmol)。搅拌30分钟后, 将反应用饱和碳酸氢钠溶液淬灭, 并用DCM萃取三次。将合并的有机物用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。将粗品通过硅胶色谱法纯化 (含30到50%乙酸乙酯的己烷), 从而得到190mg呈白色固体的产物 (94%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ8.93 (s, 1H), 7.98 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.19 (t, J=7.9Hz, 1H), 6.95 (d, J=7.4Hz, 1H), 6.29 (d, J=16.8Hz, 1H), 6.15 (dd, J=10.2, 16.9Hz, 1H), 5.66 (d, J=10.2Hz,

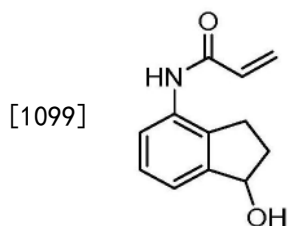
1H), 5.32 (q, J=6.9Hz, 1H), 3.60 (d, J=6.7Hz, 1H), 2.96 (ddd, J=2.4, 9.0, 15.7Hz), 2.73 (quint, J=8.1Hz, 1H), 2.56-2.48 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 164.1, 143.7, 135.6, 132.8, 131.6, 129.5, 127.3, 121.0, 118.5, 76.2, 36.0, 29.8. HRMS (-ESI): 计算值: 202.0874 ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_2$). 观察值: 202.0874。



[1096] N-(1-氧代-2,3-二氢-1H茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-134)。向4-硝基茚满 (5.38g, 33mmol) 于乙酸 (250mL) 中的溶液中缓慢加入三氧化铬 (8.95g, 90mmol)。搅拌24小时后, 将反应用2M NaOH中和, 并用乙酸乙酯萃取五次。将合并的有机物用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤, 然后经硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含10-20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到1.26g (约7.1mmol) 呈白色固体的4-硝基茚满酮。

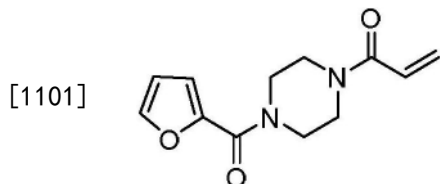
[1097] 在氮气气球的气氛下, 将该中间体与溶于无水甲醇 (21mL) 中的钯/活性炭 (125mg, 10wt%) 合并。在10分钟的过程中, 通过加料漏斗缓慢加入三乙基硅烷 (11.3mL, 71mmol), 同时在室温水浴的冷却下搅拌反应。再搅拌20分钟后, 将反应混合物通过硅藻土垫过滤, 然后浓缩, 从而得到粗制的4-氨基茚满酮, 其无需进一步纯化即可使用。

[1098] 然后在 N_2 气氛下将最终中间体溶解在DCM (21mL) 中, 并冷却至 0°C , 然后缓慢加入丙烯酰氯 (0.77mL, 9.5mmol) 和三乙胺 (1.19mL, 8.5mmol)。使反应温热至室温, 同时搅拌过夜, 这时将反应用盐水洗涤两次, 用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。将粗品通过硅胶色谱法纯化 (含30-50%乙酸乙酯的己烷), 从而得到989mg白色固体 (15%产率, 经3个步骤)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.20 (d, J=5.8Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.39 (t, J=7.7Hz, 1H), 6.48 (d, J=16.7Hz, 1H), 6.37 (dd, J=10.0Hz, 16.8Hz, 1H), 5.83 (d, J=10.1Hz, 1H), 3.04 (t, J=5.6Hz, 2H), 2.70 (t, J=5.7Hz, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 206.3, 163.9, 146.0, 138.0, 135.4, 130.7, 128.8, 128.7, 127.6, 120.4, 36.1, 23.4. HRMS (-ESI): 计算值: 200.0717 ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_2$). 观察值: 200.0715。

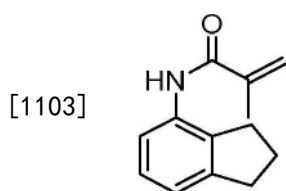


[1100] N-(1-羟基-2,3-二氢-1H茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-135)。在氮气气氛下, 向N-(1-氧代-2,3-二氢-1H-茚满-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-134, 1.26g, 6.25mmol) 于无水甲醇 (50mL) 中的溶液中加入硼氢化钠 (292.7mg, 7.7mmol)。搅拌30分钟后, 将反应用水淬灭, 并真空除去甲醇。将残余物用NaCl饱和, 并用2:1氯仿:甲醇溶液萃取五次。将合并的有机物经3埃分子筛干燥, 过滤并浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含40到70%乙酸乙酯的己烷), 从而得到1.05g呈白色固体的产物 (83%产率)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD): δ 7.50 (dd, J=2.3,

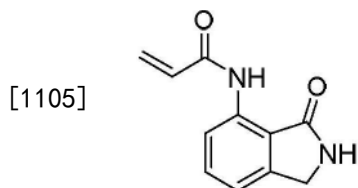
6.3Hz, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 6.51 (dd, $J=10.2, 17.0$ Hz, 1H), 6.35 (dd, $J=1.7, 17.0$ Hz, 1H), 5.77 (dd, $J=1.7, 10.2$ Hz, 1H), 5.17 (t, $J=6.3$ Hz, 1H), 2.97 (ddd, $J=4.5, 8.6, 16.2$, 1H), 2.74 (quint, $J=7.8$ Hz, 1H), 2.47-2.39 (m, 1H), 1.95-1.86 (m, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, MeOD): δ 166.3, 148.0, 137.8, 134.8, 132.1, 128.3, 127.9, 124.0, 122.7, 76.9, 36.1, 28.6. HRMS (-ESI): 计算值: 202.0874 ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_2$). 观察值: 202.0872。



[1102] 1-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (TRH 1-145)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向1-(2-呋喃基)哌嗪 (362mg, 2.0mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌24小时。将溶液用盐水洗涤两次, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化 (含70%到100%乙酸乙酯的己烷), 从而得到446mg黄色固体 (95%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.53 (m, 1H), 7.06 (dd, $J=0.7, 3.5$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J=10.5, 16.8$ Hz, 1H), 6.52 (dd, $J=1.8, 3.5$ Hz, 1H), 6.33 (dd, $J=1.9, 16.8$ Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=1.9, 10.5$ Hz, 1H), 3.84-3.67 (m, 8H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.5, 159.1, 147.5, 144.0, 128.5, 127.1, 117.0, 111.5, 45.6, 41.9. HRMS (+ESI): 计算值: 235.1077 ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$). 观察值: 235.1075。

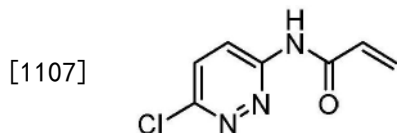


[1104] N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)甲基丙烯酰胺 (TRH 1-149)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向4-氨基茛满 (0.24mL, 2.0mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入甲基丙烯酰氯 (0.23mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌3.5小时。将溶液用盐水洗涤两次, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化 (含35%到40%乙酸乙酯的己烷), 从而得到378mg灰白色固体 (94%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.72 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 2.93 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.12-2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.3, 145.1, 140.6, 134.5, 133.7, 127.0, 120.7, 119.8, 118.9, 33.1, 29.9, 24.7, 18.6. HRMS (+ESI): 计算值: 202.1226 ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}$). 观察值: 202.1224。

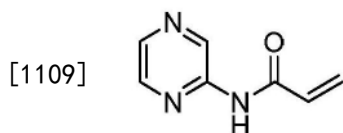


[1106] N-(3-氧代异吲哚啉-4-基)丙烯酰胺 (TRH1-152)。在 N_2 气氛下, 在 0°C 下向7-氨基

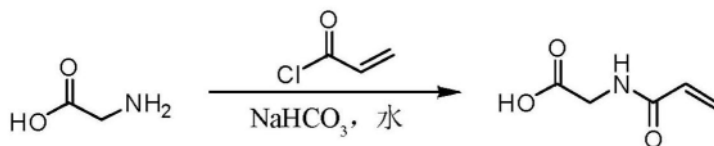
异吡啶啉-1-酮(99mg, 0.67mmol)于二氯甲烷(4mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.07mL, 0.8mmol), 然后加入三乙胺(0.11mL, 0.8mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含50到60%乙酸乙酯的己烷), 从而得到58mg白色固体(43%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ10.50(s, 1H), 8.58(d, J=8.2Hz, 1H), 7.55(t, J=7.9Hz, 1H), 7.15(d, J=7.5Hz, 1H), 6.82(s, 1H), 6.46(dd, J=1.3, 17.0Hz, 1H), 6.36(dd, J=10.0, 17.0Hz, 1H), 5.81(dd, J=1.3, 10.0Hz, 1H), 4.46(s, 2H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ172.9, 164.2, 143.9, 138.2, 133.8, 131.8, 127.8, 118.0, 117.7, 117.6, 45.6。HRMS(+ESI): 计算值: 203.0815 (C₁₁H₁₁N₂O₂)。观察值: 203.0814。



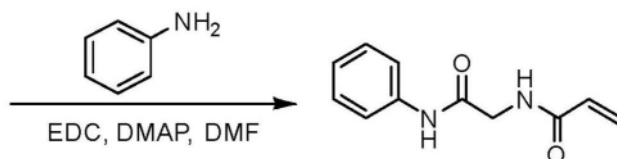
[1108] N-(6-氯吡啶-3-基)丙烯酰胺(TRH 1-155)。在N₂气氛下, 在0℃下向3-氨基-6-氯吡啶(261mg, 2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺(0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含40%到50%乙酸乙酯的己烷), 从而得到23mg浅黄色固体(6%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ10.06(s, 1H), 8.70(d, J=9.4Hz, 1H), 7.57(d, J=9.4Hz, 1H), 6.73(dd, J=10.2, 16.8Hz, 1H), 6.56(dd, J=1.2, 16.8, 1H), 5.94(dd, J=1.2, 10.2Hz, 1H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ164.8, 155.2, 152.3, 130.7, 130.4, 130.3, 122.0。HRMS(+ESI): 计算值: 182.0127 (C₇H₅N₃OCl)。观察值: 182.0126。



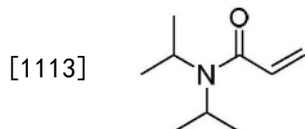
[1110] N-(吡啶-2-基)丙烯酰胺(IRH 1-156)。在N₂气氛下, 在0℃下向氨基吡啶(192mg, 2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺(0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 使反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 用硫酸镁干燥, 并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含50%到70%乙酸乙酯的己烷), 从而得到22mg白色固体(7%产率)。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ9.65(d, J=1.3Hz, 1H), 8.38(d, J=2.5Hz, 1H), 8.27(dd, J=1.6, 2.5Hz, 1H), 8.19(s, 1H), 6.54(dd, J=0.8, 16.9Hz, 1H), 6.33(dd, J=10.3, 16.9Hz, 1H), 5.90(dd, J=0.8, 10.3Hz, 1H)。¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ163.5, 148.2, 142.2, 140.6, 137.4, 130.2, 129.8。HRMS(+ESI): 计算值: 150.0662 (C₇H₈N₃O)。观察值: 150.0660。



[1111]

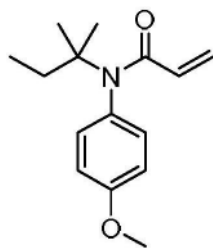


[1112] N-(2-氧代-2-(苯氨基)乙基)丙烯酰胺 (TRH 1-160)。在0℃下向甘氨酸(1.50g, 20.0mmol)和碳酸氢钠(1.70g, 20.2mmol)于水(30mL)中的溶液中缓慢加入丙烯酰氯(2.45mL, 30.2mmol)。搅拌3.5小时后,将反应用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机物经硫酸镁干燥,过滤并浓缩,从而得到油状物。用己烷处理油状物,使白色固体沉淀出来,通过重力过滤收集所述白色固体,从而得到124mg粗制丙烯酰甘氨酸,其中的58mg(粗物质的47%)无需进一步纯化即可立即使用。将该固体(约0.45mmol)溶解在DMF(2.5mL)中,并加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(104mg, 0.54mmol)和4-二甲基氨基吡啶(68mg, 0.56mmol)于DMF(2.5mL)中的溶液,然后加入苯胺(0.050mL, 0.54mmol)。将溶液搅拌过夜,用乙酸乙酯稀释,并用碳酸氢钠饱和溶液和盐水洗涤。然后将有机物经硫酸镁干燥,过滤并浓缩,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含30-60%乙酸乙酯的己烷),从而得到19mg呈白色固体的标题化合物(1%产率,经两个步骤)。¹H NMR (400MHz, MeOD): δ7.56-7.53 (m, 2H), 7.30 (t, J=8.0Hz, 2H), 7.08 (t, J=7.4Hz, 1H), 6.35 (dd, J=9.9, 17.1Hz, 1H), 6.26 (dd, J=2.0, 17.1Hz, 1H), 5.71 (dd, J=2.0, 9.9Hz, 1H), 4.08 (s, 2H)。¹³C NMR (100MHz, MeOD): δ169.4, 168.6, 139.5, 131.7, 129.8, 127.2, 125.3, 121.2, 44.0。HRMS (-ESI): 计算值: 203.0826 (C₁₁H₁₁N₂O₂)。观察值: 203.0825。



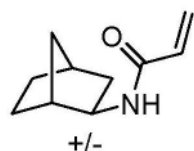
[1114] N,N-二异丙基丙烯酰胺 (TRH 1-167)。在N₂气氛下,在0℃下向二异丙胺(0.42mL, 3.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.29mL, 3.6mmol),然后加入三乙胺(0.50mL, 3.6mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌19小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤,然后用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含0%到30%乙酸乙酯的己烷),从而得到392mg浅黄色油状物(84%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ6.35 (dd, J=10.6, 16.8Hz, 1H), 5.98 (dd, J=1.7, 16.8Hz, 1H), 5.36 (dd, J=1.7, 10.6Hz, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.56 (s, 1H), 1.18 (s, 6H), 1.06 (s, 6H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ165.9, 130.5, 125.3, 47.9, 45.4, 21.1, 20.3。HRMS (+ESI): 计算值: 178.1202 (C₉H₁₇NONa)。观察值: 178.1201。

[1115]



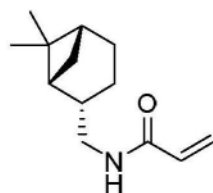
[1116] N-(4-甲氧基苯基)-N-(叔戊基)丙烯酰胺 (TRH 1-170)。在 N_2 气氛下,在 0°C 下向4-甲氧基-N-(叔戊基)苯胺 (94mg, 0.49mmol) 于二氯甲烷 (5mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.05mL, 0.6mmol), 然后加入三乙胺 (0.09mL, 0.6mmol)。搅拌15分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌18小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤,然后用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含0%到20%乙酸乙酯的己烷),从而得到82mg浅黄色油状物(68%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.99 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.85 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.17 (dd, $J=1.9, 16.7\text{Hz}$, 1H), 5.76 (dd, $J=10.3, 16.7\text{Hz}$, 1H), 5.28 (dd, $J=1.9, 10.3\text{Hz}$, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 1.20 (s, 6H), 0.91 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.3, 159.0, 134.3, 131.49, 131.45, 125.6, 114.1, 61.7, 55.5, 32.0, 27.4, 9.4。HRMS (+ESI): 计算值: 247.1572 ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2$)。观察值: 247.1577。

[1117]



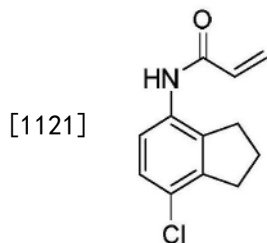
[1118] N-(外-降冰片-2-基)丙烯酰胺 (TRH 1-176)。在 N_2 气氛下,在 0°C 下向外-2-氨基降冰片烷 (0.24mL, 2mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (0.33mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌18小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤,然后用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷),从而得到271mg白色固体(82%产率)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.42 (s, 1H), 6.25 (dd, $J=2.3, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.18 (dd, $J=9.5, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.58 (dd, $J=2.3, 9.5\text{Hz}$, 1H), 3.8-3.77 (m, 1H), 2.27-2.24 (m, 2H), 1.78 (ddd, $J=2.1, 8.1, 13.0\text{Hz}$, 1H), 1.55-1.38 (m, 3H), 1.30-1.10 (m, 4H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.0, 131.4, 125.8, 52.9, 42.4, 40.0, 35.7, 35.6, 28.2, 26.6。HRMS (+ED): 计算值: 165.1154 ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$)。观察值: 165.1155。

[1119]

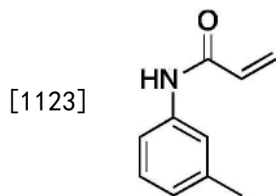


[1120] N-(((1R,2S,5R)-6,6-二甲基双环[3.1.1]庚-2-基)甲基)丙烯酰胺 (TRH 1-178)。在 N_2 气氛下,在 0°C 下向(-)-顺式-甲基乙胺 (0.34mL, 2mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (0.33mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后,使反应混合物温热至室温,并搅拌21小时。将溶液用碳酸氢钠饱和溶液洗涤,然后用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,并将所得粗品通过硅胶色谱法纯化(含20到30%乙酸乙酯的己烷),从而得到369mg白色固体(89%产率)。 ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 6.26 (dd, $J=1.5, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.11

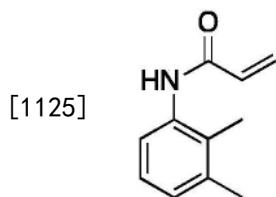
(dd, $J=10.3, 17.0\text{Hz}$, 1H) 5.85 (s, 1H), 5.61 (dd, $J=1.5, 10.3\text{Hz}$, 1H), 3.39-3.29 (m, 2H), 2.38-2.34 (m, 1H), 2.26-2.21 (m, 1H), 1.98-1.90 (m, 4H), 1.88-1.83 (m, 1H), 1.53-1.47 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.89 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3): δ 165.7, 131.2, 126.2, 45.3, 43.9, 41.5, 38.8, 33.3, 28.1, 26.1, 23.3, 19.9. HRMS (-ESI): 计算值: 206.1550 ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$). 观察值: 206.1551。



[1122] N-(7-氯-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (YP 1-1)。将N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (187mg, 1.0mmol) 于PEG 400 (5.2mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入N-氯琥珀酰亚胺 (140mg, 1.0mmol)。30分钟后,使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用乙酸乙酯稀释,并用盐水洗涤两次,并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶柱色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷)。通过重结晶分离所得异构体混合物,从而以22%的产率得到呈白色固体的产物 (47mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.78 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.15-7.11 (m, 2H), 6.42 (dd, $J=1.4, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.26 (dd, $J=10.2, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.77 (dd, $J=1.4, 10.2\text{Hz}$, 1H), 2.98 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.87 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.12 (quint, $J=7.5\text{Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 163.4, 143.1, 136.1, 132.2, 131.0, 128.0, 127.2, 126.7, 120.9, 32.7, 31.1, 24.0. HRMS (+ESI): 计算值: 220.0535 ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}$). 观察值: 220.0533。

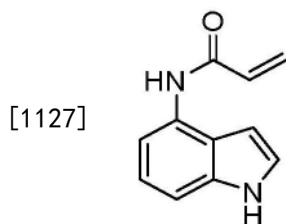


[1124] N-(间甲苯基)丙烯酰胺 (YP 1-16)。将邻甲苯胺 (107mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。40分钟后,使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次,并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%到40%乙酸乙酯的己烷),从而以86%的产率得到呈白色固体的产物 (139mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.82 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.21-7.17 (m, 2H), 7.10-7.06 (m, 1H), 6.43-6.38 (m, 1H), 6.29 (dd, $J=10.2, 17.1\text{Hz}$, 1H), 5.75-5.72 (m, 1H), 2.25 (s, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 135.5, 131.2, 130.5, 127.5, 126.8, 125.5, 123.4, 17.8. HRMS (+ESI): 计算值: 162.0913 ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}$). 观察值: 162.0912。

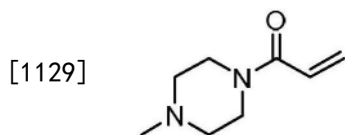


[1126] N-(2,3-二甲基苯基)丙烯酰胺 (YP 1-18)。将2,3-二甲基苯胺 (121mg, 1.0mmol) 于

DCM(10mL)中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯(109mg,1.2mmol),然后加入三乙胺(121mg,1.2mmol)。29分钟后,使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次,并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含30%到40%乙酸乙酯的己烷),从而以88%的产率得到呈白色固体的产物(154mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 7.49(d,J=7.9Hz,1H),7.29(s,1H),7.11-7.07(m,1H),7.01(d,J=7.7,1H),6.40(d,J=17.1,1H),6.30(dd,J=7.3,17.1Hz,1H),5.74(d,J=10.1Hz,1H),2.29(s,1H),2.13(s,1H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ 135.1,131.2,127.6,127.3,125.9,122.3,20.6,13.9。HRMS(+ESI):计算值:176.1070(C₁₁H₁₄NO)。观察值:176.1068。

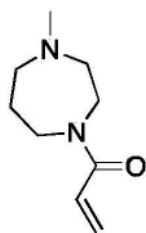


[1128] N-(1H-吡啶-4-基)丙烯酰胺(YP 1-19)。将4-氨基吡啶(132mg,1mmol)于DCM(5mL)和DMF(5mL)中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯(109mg,1.2mmol),然后加入三乙胺(121mg,1.2mmol)。26分钟后,使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次,并用硫酸镁干燥。将粗产物通过碱性氧化铝色谱法纯化(含60%到75%乙酸乙酯的己烷),从而以30%的产率得到呈白灰色固体的产物(56mg)。¹H NMR(600MHz,MeOD): δ 7.51(d,J=7.6Hz,1H),7.24-7.22(m,2H),7.08(t,J=7.6Hz,1H),6.64(dd,J=10.1,16.7Hz,2H),6.38(dd,J=1.7,16.9Hz,1H),5.78(dd,J=1.7,10.3Hz,1H),4.6(s,1H)。¹³C NMR(150MHz,MeOD): δ 165.0,137.2,131.1,129.2,126.0,123.8,121.5,120.9,112.2,108.4,98.5。HRMS(+ESI):计算值:187.0866(C₁₁H₁₁N₂O)。观察值:187.0865。



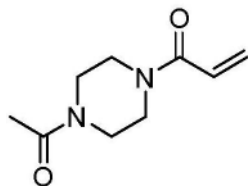
[1130] 1-(4-甲基哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(YP 1-22)。将1-甲基哌啶(100mg,1.0mmol)于DCM(10mL)中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯(109mg,1.2mmol),然后加入三乙胺(121mg,1.2mmol)。30分钟后,使溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次,并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含85%到100%乙酸乙酯的己烷),从而以29%的产率得到呈黄色凝胶的产物(44mg)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 6.56(dd,J=10.6,16.9Hz,1H),6.29(dd,J=2.0,16.8Hz,1H),5.69(dd,J=2.0,10.6Hz,1H),3.71(s,2H),3.58(s,2H),2.42(t,J=5.1Hz,4H),2.32(s,3H)。¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ 165.4,127.8,127.5,55.2,54.6,46.0,45.7,41.9。HRMS(+ESI):计算值:155.1179(C₈H₁₅N₂O)。观察值:155.1178。

[1131]



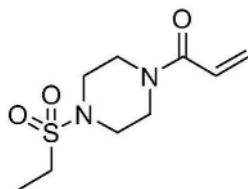
[1132] 1-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-23)。将1-甲基高哌嗪 (114mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。32分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含1%到10%甲醇的DCM), 从而以51%的产率得到呈黄色油状物的产物 (58mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 6.61-6.53 (m, 1H), 6.35-6.29 (m, 1H), 5.70-5.66 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.69 (t, J=6.4Hz, 1H), 3.65-3.61 (m, 2H), 2.66-2.63 (m, 2H), 2.59-2.54 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.94 (quint, J=6.2Hz, 2H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 166.4, 166.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 59.1, 58.0, 57.1, 56.8, 47.4, 47.1, 46.7, 46.6, 45.3, 44.8, 28.1, 26.9。HRMS (+ESI): 计算值: 169.1335 (C₉H₁₇N₂O)。观察值: 169.1333。

[1133]



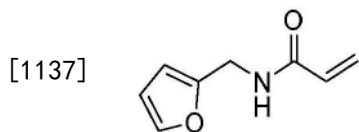
[1134] 1-(4-乙酰基哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP1-24)。将1-乙酰基哌嗪 (128mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。23分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌两小时。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含0%到10%甲醇的DCM), 从而以18%的产率得到呈黄色油状物的产物 (40mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 6.57 (dd, J=10.5, 16.8Hz, 1H), 6.33 (dd, J=1.8, 16.8Hz, 1H), 5.75 (dd, J=1.9, 10.5Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.66-3.64 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.51-3.49 (m, 2H), 2.13 (s, 3H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 165.6, 128.7, 127.0, 41.9, 41.4, 21.4。HRMS (+ESI): 计算值: 183.1128 (C₉H₁₅N₂O₂)。观察值: 183.1126。

[1135]

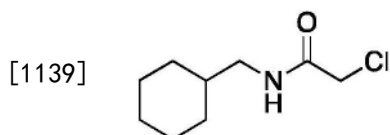


[1136] 1-(4-(乙基磺酰基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-25)。将1-(乙磺酰基)哌嗪 (178mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。27分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌两小时。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含1%到10%甲醇的DCM), 从而以70%的产率得到呈白黄色固体的产物 (163mg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 6.57 (dd, J=10.5, 16.8Hz, 1H), 6.32 (dd, J=1.9, 16.8Hz, 1H), 5.76 (dd, J=1.8, 10.5Hz,

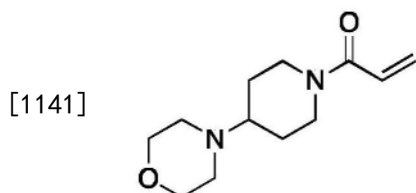
1H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.32 (t, J=5.2Hz, 4H), 2.98 (q, J=7.5Hz, 2H), 1.37 (t, J=7.4, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.5, 128.8, 127.0, 77.4, 45.9, 45.6, 44.2, 41.9, 7.8. HRMS (+ESI): 计算值: 233.0954 ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_1$). 观察值: 233.0953。



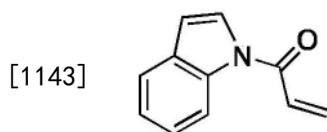
[1138] N-(呋喃-2-基甲基)丙烯酰胺 (YP1-26)。将呋喃甲胺 (97mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol), 然后加入三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。17分钟后, 使溶液温热至室温, 并搅拌两个半小时。将溶液用盐水洗涤两次, 并用硫酸镁干燥。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含35%到70%乙酸乙酯的己烷), 从而以86%的产率得到呈白色固体的产物 (132mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.33 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.31-6.22 (m, 3H), 6.15 (dd, J=10.1, 16.9Hz, 1H), 5.63 (dd, J=1.6, 10.1Hz, 1H), 4.48 (d, J=5.6Hz, 2H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.5, 151.2, 142.2, 130.6, 126.8, 110.5, 107.5, 36.5. HRMS (+ESI): 计算值: 152.0706 ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_1$)。观察值: 152.0706。



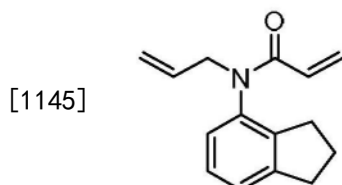
[1140] 2-氯-N-(环己基甲基)乙酰胺 (YP 1-31)。按照通用程序B, 从环己烷甲胺 (113mg, 1.0mmol) 开始, 在硅胶色谱法 (100%二氯甲烷到3%甲醇, 于二氯甲烷中) 后以60%的产率获得呈白色固体的产物 (112mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.70 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.15 (t, J=6.47Hz, 2H), 1.77-1.65 (m, 5H), 1.56-1.46 (m, 1H), 1.30-1.10 (m, 3H), 1.00-0.90 (m, 2H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.8, 58.1, 46.0, 42.8, 37.7, 30.7, 26.3, 25.7, 18.2. HRMS (+ESI): 计算值: 190.0993 ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{ONCl}$)。观察值: 190.0992。



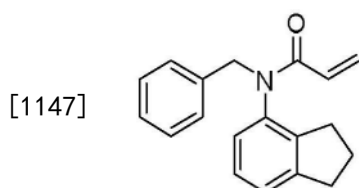
[1142] 1-(4-吗啉代哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-42)。按照通用程序A, 从4-吗啉代哌啶 (336mg, 2.0mmol) 开始, 在硅胶色谱法 (含1%甲醇和80%乙酸乙酯的己烷) 后以58%的产率获得呈无色油状物的产物 (259mg)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.42 (dd, J=10.6, 16.8Hz, 1H), 6.06 (dd, J=2.0, 16.8Hz, 1H), 5.49 (dd, J=2.0, 10.6Hz, 1H), 4.45 (d, J=12.8Hz, 1H), 3.86 (d, J=12.8Hz, 1H), 3.52 (t, J=4.7Hz, 4H), 2.90 (t, J=12.8Hz, 1H), 2.55-2.48 (m, 1H), 2.37-2.35 (m, 4H), 2.26 (tt, J=3.7, 11.0Hz, 1H), 1.72 (d, J=12.8Hz, 2H), 1.30-1.20 (m, 2H)。 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.0, 127.7, 127.3, 67.1, 61.6, 49.6, 44.9, 41.1, 28.9, 27.8. HRMS (+ESI): 计算值: 225.1598 ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$)。观察值: 225.1595。



[1144] 1-(1H-吡啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(YP 1-44)。将吡啶(117mg, 1.0mmol)于2-甲基四氢呋喃(10mL)中的溶液冷却至0℃。向溶液中加入氢化钠(60mg, 2.5mmol)。对所得中间体进行通用程序A,并且在氧化铝凝胶色谱法(含10%到40%乙酸乙酯的己烷)后以8%的产率获得呈白色固体的产物(14mg)。¹H NMR(400MHz, CD₃OD): δ8.48-8.46(m, 1H), 7.82(d, J=3.9Hz, 1H), 7.61-7.59(m, 1H), 7.36-7.32(m, 1H), 7.31-7.21(m, 2H), 6.73(dd, J=0.8, 3.8Hz, 1H), 6.64(dd, J=1.7, 16.7Hz, 1H), 6.09(dd, J=1.7, 10.5Hz, 1H)。¹³C NMR(100MHz, CD₃OD): δ164.3, 135.7, 131.0, 130.9, 128.0, 125.0, 124.4, 123.6, 120.5, 116.2, 108.9。HRMS(+ESI): 计算值: 172.0757(C₁₁H₁₀NO)。观察值: 172.0756。



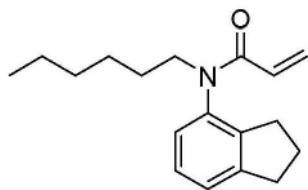
[1146] N-烯丙基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(IGA 1-12)。将氢化钠(96mg, 4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液置于氮气气氛下。向溶液中加入含N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(187mg, 1.0mmol)的四氢呋喃(2mL)。将溶液冷却到0℃并搅拌。30分钟后加入3-溴丙-1-烯(484mg, 4.0mmol),然后使溶液温热至室温并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以67%的产率得到呈黄色结晶固体的产物(151mg)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ7.06-7.18(m, 2H), 6.80-6.88(m, 1H), 6.26-6.37(dd, J=16.8, 2.0Hz, 1H), 5.76-5.96(m, 2H), 5.38-5.48(dd, J=10.3, 2.1Hz, 1H), 4.98-5.08(m, 2H), 4.40-4.52(ddt, J=14.5, 6.3, 1.3Hz, 1H), 4.00-4.11(ddt, J=14.5, 6.8, 1.2Hz, 1H), 2.82-2.98(m, 2H), 2.59-2.79(m, 2H), 1.92-2.07(m, 2H)。¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ165.1, 146.5, 142.4, 137.9, 133.0, 128.4, 127.8, 127.48, 126.1, 124.3, 118.1, 51.6, 33.3, 30.9, 25.0。HRMS(+ESI): 计算值: 228.13(C₁₅H₁₇NO)。观察值: 228.1381。



[1148] N-苄基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(IGA 1-14)。将氢化钠(96mg, 4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液置于氮气气氛下。向溶液中加入含N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺(187mg, 1.0mmol)的四氢呋喃(2mL)。将溶液冷却到0℃并搅拌。30分钟后加入苄基溴(476mg, 4.0mmol),然后使溶液温热至室温并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以63%的产率得到呈橙色油状物的产物(173mg)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ7.10-7.35(m, 7H), 6.74-6.85(dd, J=7.8, 1.1Hz, 1H), 6.40-6.55(dd, J=16.8, 2.1Hz, 1H), 5.93-6.08(dd, J=16.8, 10.3Hz, 1H), 5.49-5.62(dd, J=10.3, 2.1Hz, 1H), 4.78-5.10(m, 2H), 2.85-3.02(m, 2H), 2.52-2.67(m, 1H), 2.22-2.37(m, 1H), 1.83-2.01(m, 2H)。¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ146.4, 142.9, 137.7, 137.3, 129.3, 128.4, 128.3, 128.0, 127.5, 127.5, 126.0, 124.3, 52.3, 33.2,

30.6, 25.1. HRMS (+ESI): 计算值: 278.15 ($C_{19}H_{19}NO$)。观察值: 278.1538。

[1149]



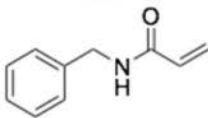
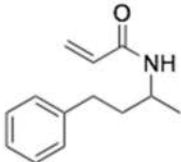
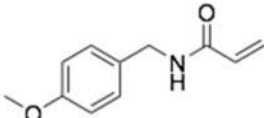
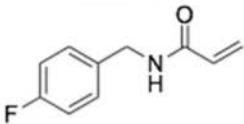
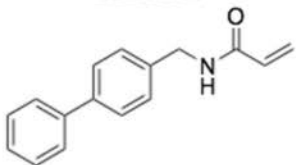
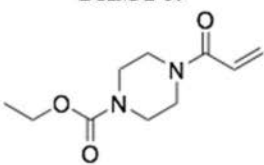
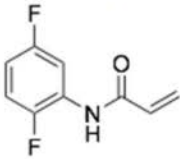
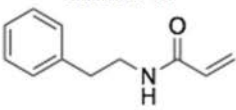
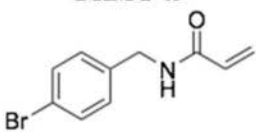
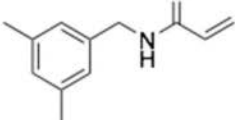
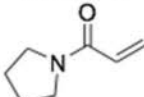
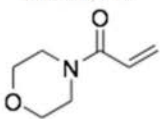
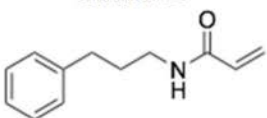
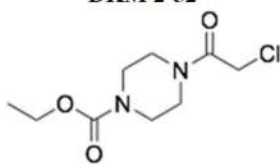
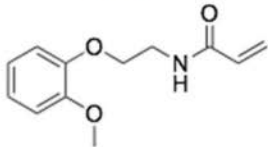
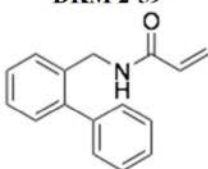
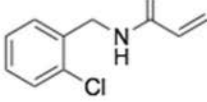
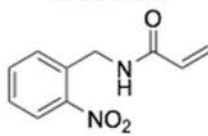
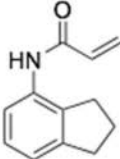
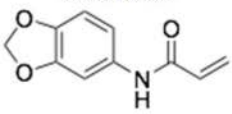
[1150] N-烯丙基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (IGA 1-15)。将氢化钠 (96mg, 4.0mmol) 于四氢呋喃 (8mL) 中的溶液置于氮气气氛下。向溶液中加入含N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (187mg, 1.0mmol) 的四氢呋喃 (2mL)。将溶液冷却到0℃并搅拌。30分钟后加入1-溴己烷 (660mg, 4.0mmol), 然后使溶液温热至室温并搅拌过夜。将溶液用水淬灭, 并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含20%乙酸乙酯的己烷), 从而以34%的产率得到呈黄色油状物的产物 (92mg)。 ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.11-7.25 (m, 2H), 6.86-6.96 (dd, $J=7.5, 1.2$ Hz, 1H), 6.30-6.40 (dd, $J=16.8, 2.1$ Hz, 1H), 5.86-6.00 (m, 1H), 5.41-5.51 (dd, $J=10.3, 2.1$ Hz, 1H), 3.82-3.96 (m, 1H), 3.42-3.56 (m, 1H), 2.90-3.04 (m, 2H), 2.65-2.85 (m, 2H), 1.98-2.16 (m, 2H), 1.47-1.63 (m, 2H), 1.20-1.36 (m, 6H), 0.80-0.90 (m, 3H)。 ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 165.16, 146.54, 142.38, 138.21, 128.59, 127.51, 127.35, 126.09, 124.13, 48.67, 33.26, 31.62, 30.85, 27.85, 26.72, 25.01, 22.59, 14.05。HRMS (+ESI): 计算值: 272.19 ($C_{18}H_{25}NO$)。观察值: 272.2007。

[1151] 对于体外实验, 在231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中将DMSO媒剂、印苦楝内酯或EN62处理30分钟, 然后用IA-炔烃 (100 μ M) 将蛋白质组标记1小时。通过CuAAC附加同位素轻 (对于DMSO处理) 或重 (对于化合物处理) TEV蛋白酶-可裂解生物素-叠氮化物标签, 以进行isoTOP-ABPP分析。对于原位实验, 在231MFP乳腺癌细胞中将DMSO媒剂或印苦楝内酯原位处理1小时, 然后用IA-炔烃 (100 μ M) 对蛋白质组进行体外标记, 持续1小时。通过CuAAC附加同位素轻 (对于DMSO处理) 或重 (对于化合物处理) TEV蛋白酶-可裂解生物素-叠氮化物标签, 以进行isoTOP-ABPP分析。仅解释了存在于三个生物学重复中的两个生物学重复中的经探针修饰的肽。对于那些>3的比率, 我们仅解释所有重复比率>3的所有生物学重复中存在的那些肽。对于那些>4的比率, 我们仅解释所有重复比率>4的所有生物学重复中存在的那些肽。手动管理MS1峰形质量, 以确认所有重复样品均具有良好的峰质量。

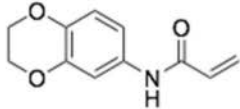
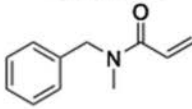
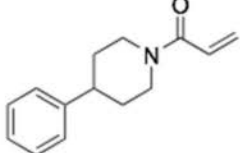
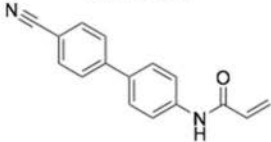
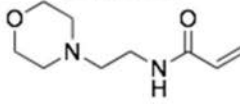
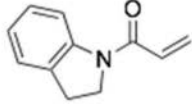
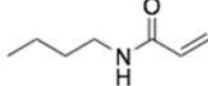
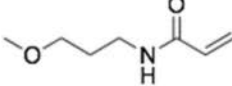
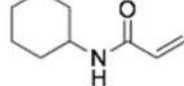
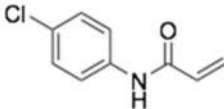
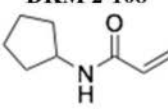
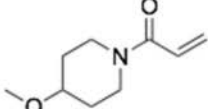
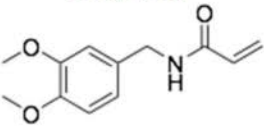
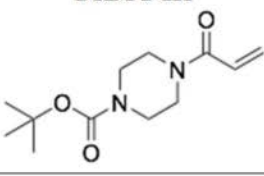
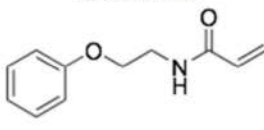
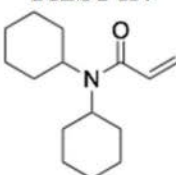
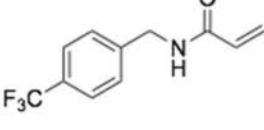
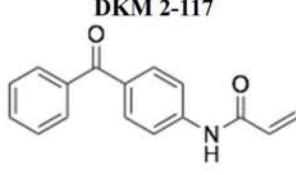
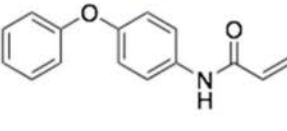
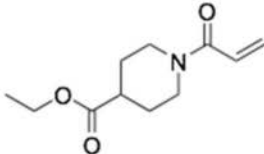
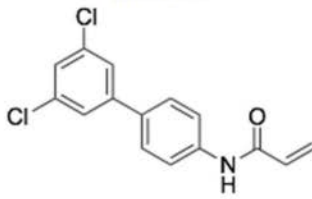
[1152] 表2. 针对RNF114筛选的共价配体的结构。

[1153] 表2. 针对RNF114筛选的共价配体的结构

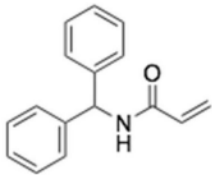
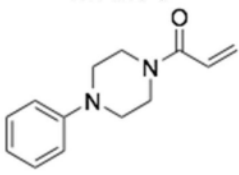
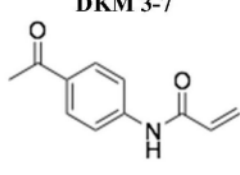
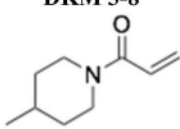
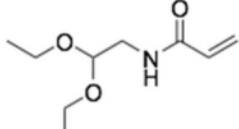
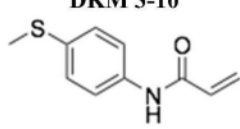
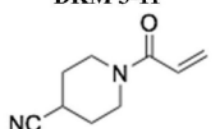
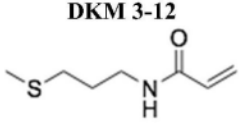
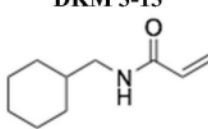
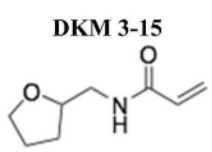
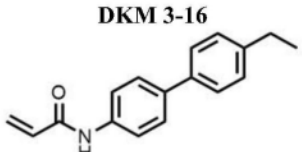
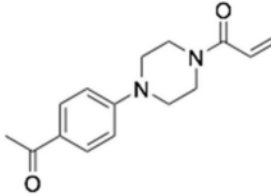
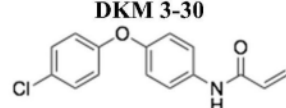
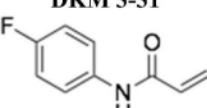
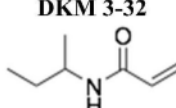
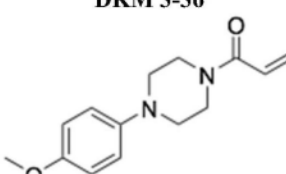
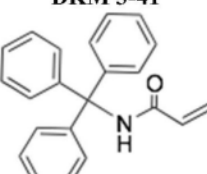
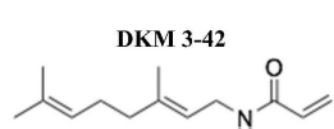
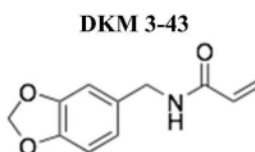
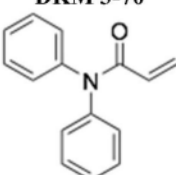
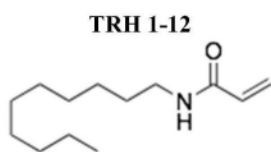
[1154]

DKM 2-31 	DKM 2-32 	DKM 2-33 
DKM 2-34 	DKM 2-37 	DKM 2-39 
DKM 2-40 	DKM 2-42 	DKM 2-43 
DKM 2-47 	DKM 2-48 	DKM 2-49 
DKM 2-50 	DKM 2-52 	DKM 2-58 
DKM 2-59 	DKM 2-60 	DKM 2-62 
DKM 2-84 	DKM 2-85 	DKM 2-86 

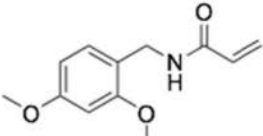
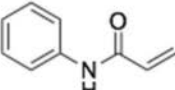
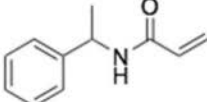
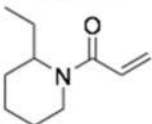
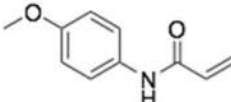
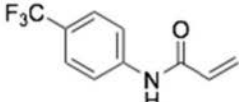
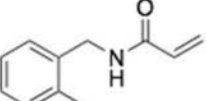
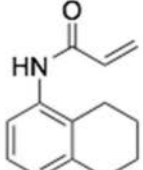
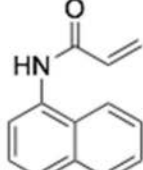
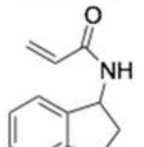
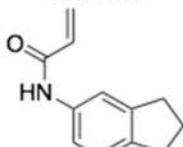
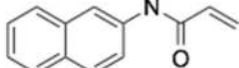
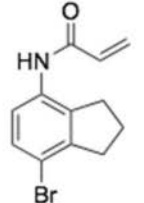
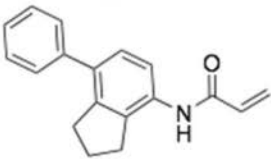
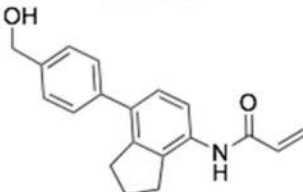
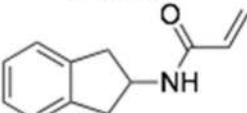
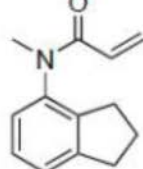
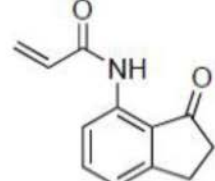
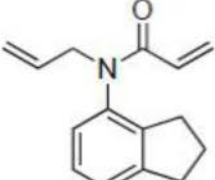
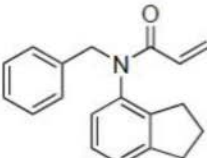
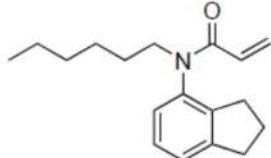
[1155]

DKM 2-87 	DKM 2-95  (等量的两个旋转异构体)	DKM 2-97 
DKM 2-98 	DKM 2-100 	DKM 2-101 
DKM 2-102 	DKM 2-103 	DKM 2-106 
DKM 2-107 	DKM 2-108 	DKM 2-109 
DKM 2-110 	DKM 2-111 	DKM 2-113 
DKM 2-114 	DKM 2-116 	DKM 2-117 
DKM 2-119 	DKM 2-120 	DKM 3-3 

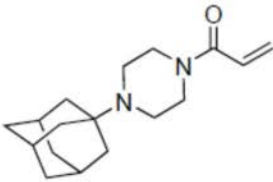
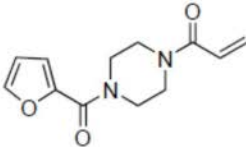
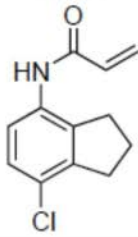
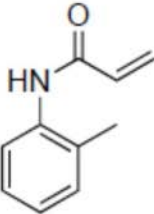
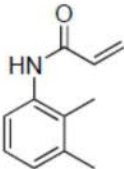
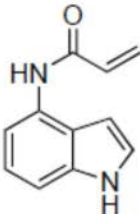
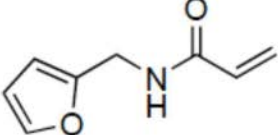
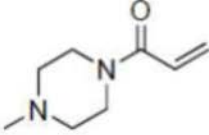
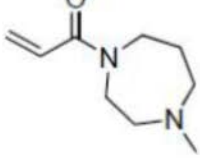
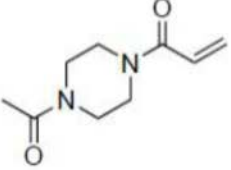
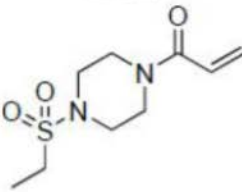
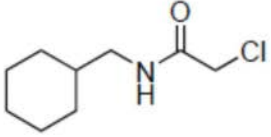
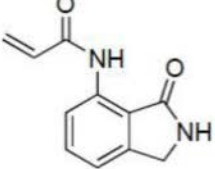
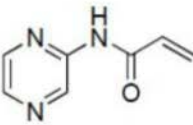
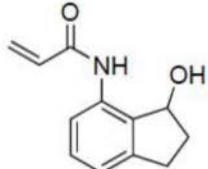
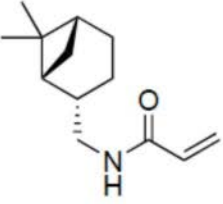
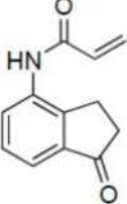
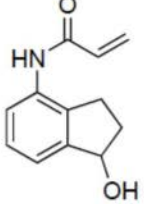
[1156]

DKM 3-4 	DKM 3-5 	DKM 3-7 
DKM 3-8 	DKM 3-9 	DKM 3-10 
DKM 3-11 	DKM 3-12 	DKM 3-13 
DKM 3-15 	DKM 3-16 	DKM 3-29 
DKM 3-30 	DKM 3-31 	DKM 3-32 
DKM 3-36 	DKM 3-41 	DKM 3-42 
DKM 3-43 	DKM 3-70 	TRH 1-12 

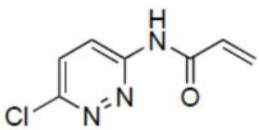
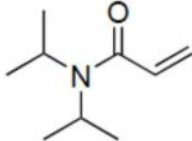
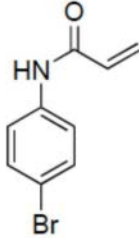
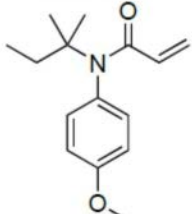
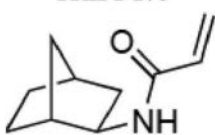
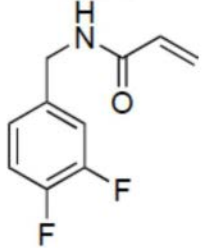
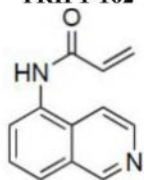
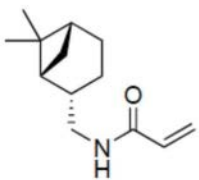
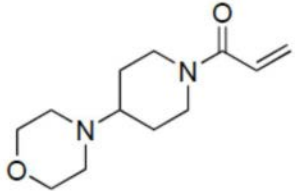
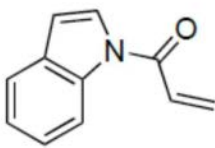
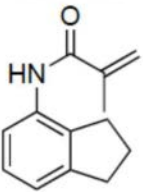
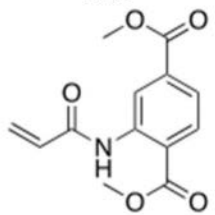
[1157]

TRH 1-13 	TRH 1-19 	TRH 1-20 
TRH 1-27 	TRH 1-32 	TRH 1-50 
TRH 1-54 	TRH 1-56 	TRH 1-57 
TRH 1-58 	TRH 1-59 	TRH 1-60 
TRH 1-65 	TRH 1-68 	TRH 1-70 
TRH 1-74 	TRH 1-115 	TRH 1-129 
IGA 1-12 	IGA 1-14 	IGA 1-15 

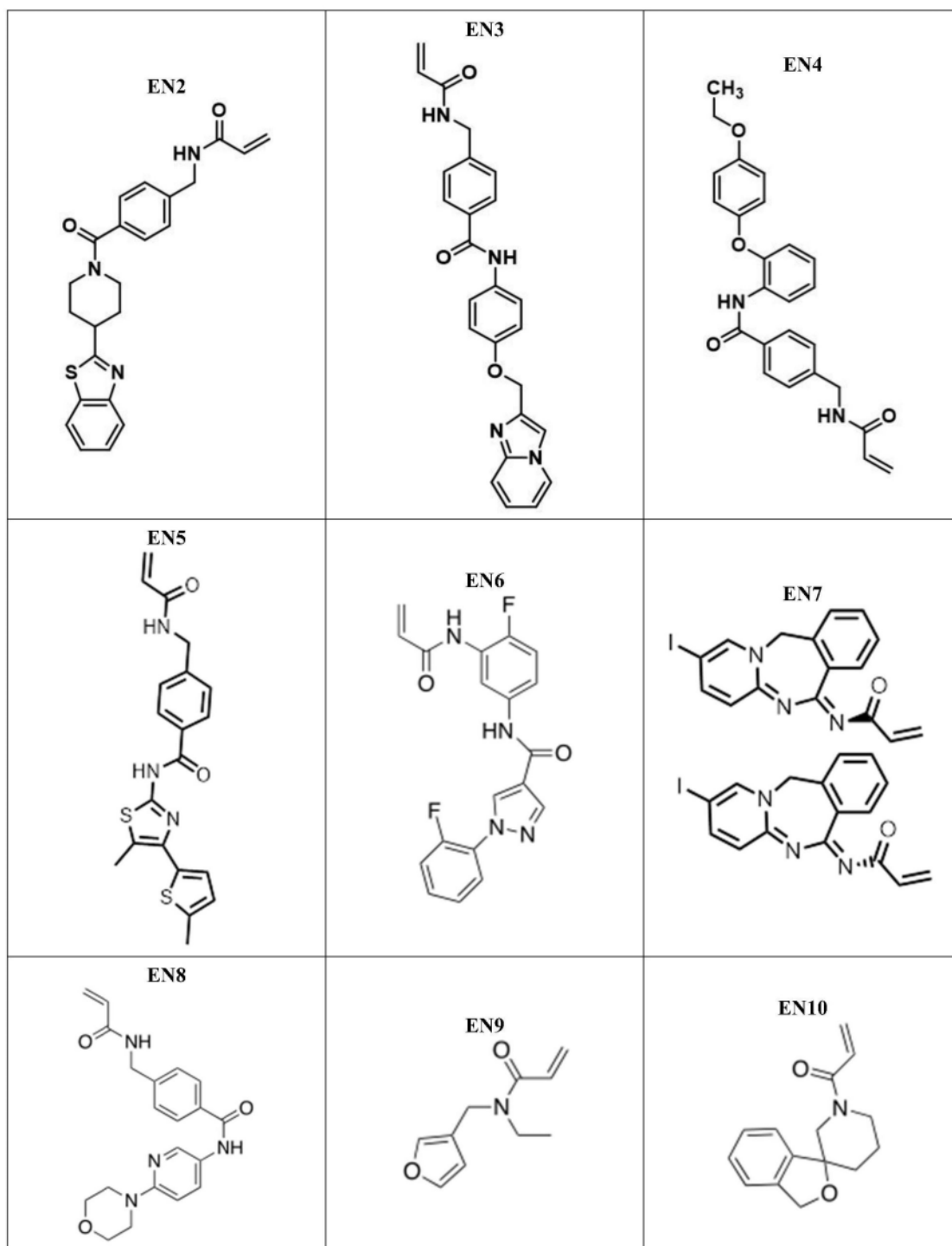
[1158]

TRH 1-143 	TRH 1-145 	YP 1-1 
YP 1-16 	YP 1-18 	YP 1-19 
YP 1-26 	YP 1-22 	YP 1-23 
YP 1-24 	YP 1-25 	YP 1-31 
TRH 1-152 	TRH 1-156 	TRH 1-133 
TRH 1-133 	TRH 1-134 	TRH 1-135 

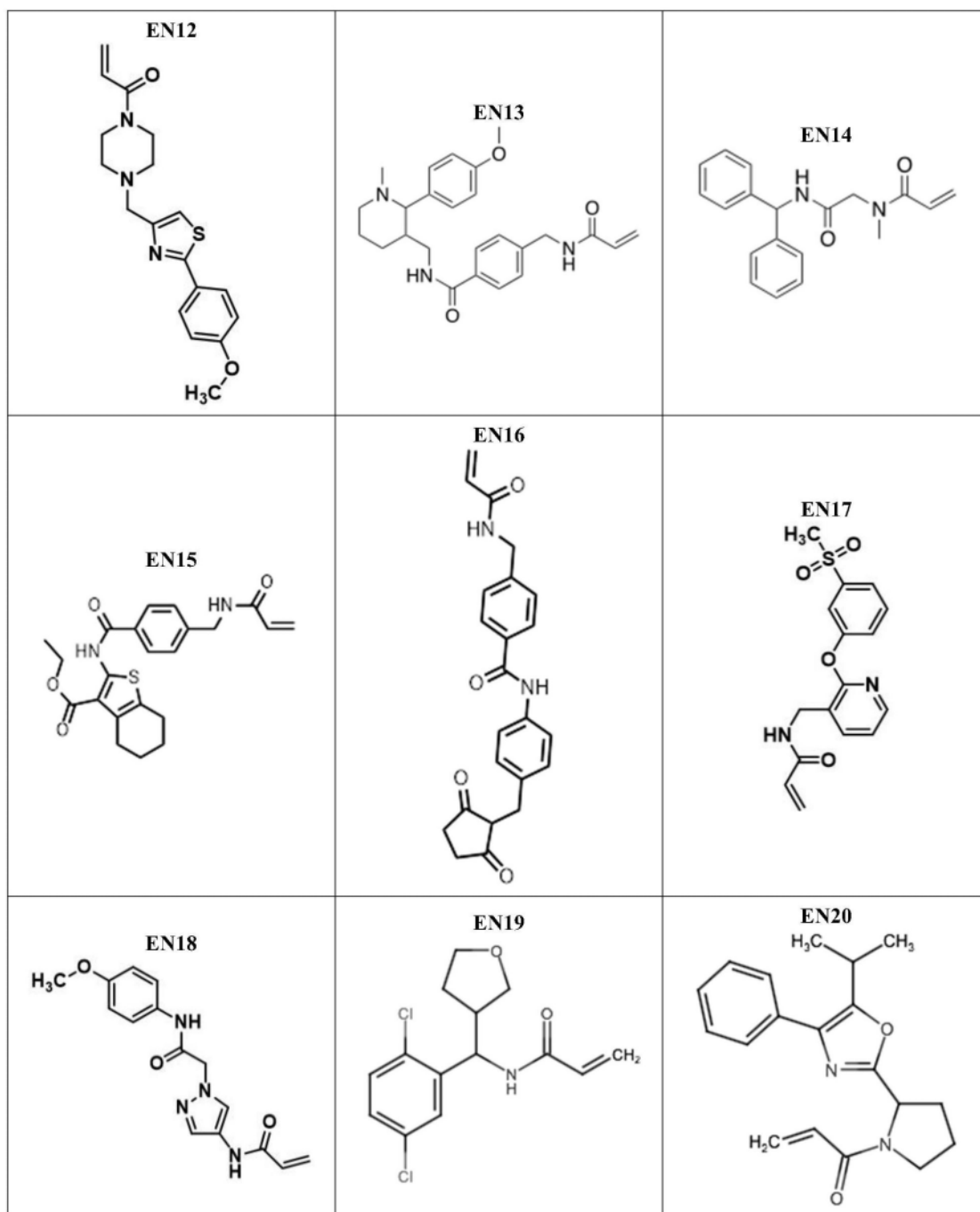
[1159]

TRH 1-155 	TRH 1-167 	YP 1-36 
TRH 1-170 	TRH 1-176  (外消旋)	YP 1-38 
TRH 1-162 	TRH 1-178 	YP 1-42 
YP 1-44 	TRH 1-149 	EN1 

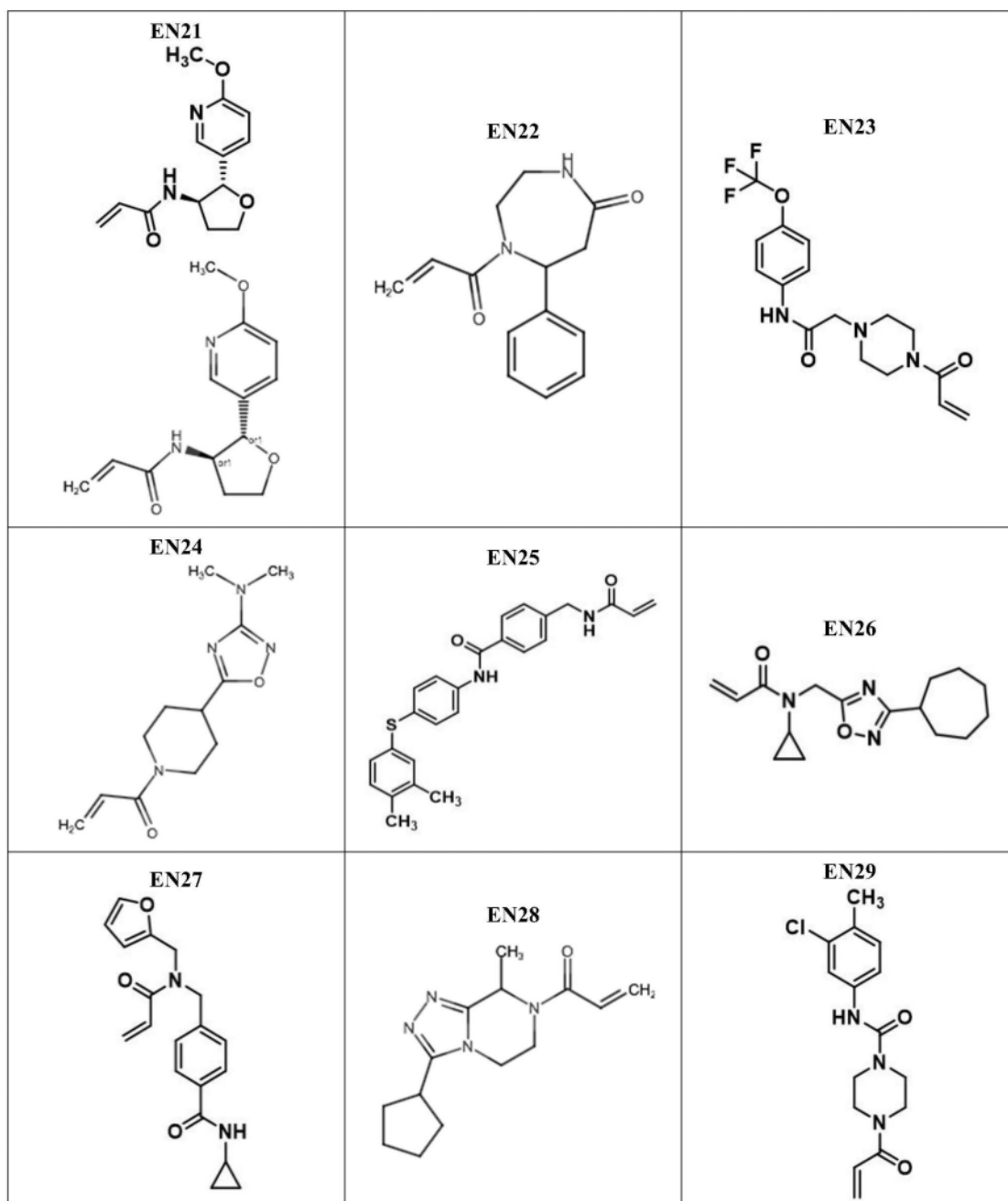
[1160]



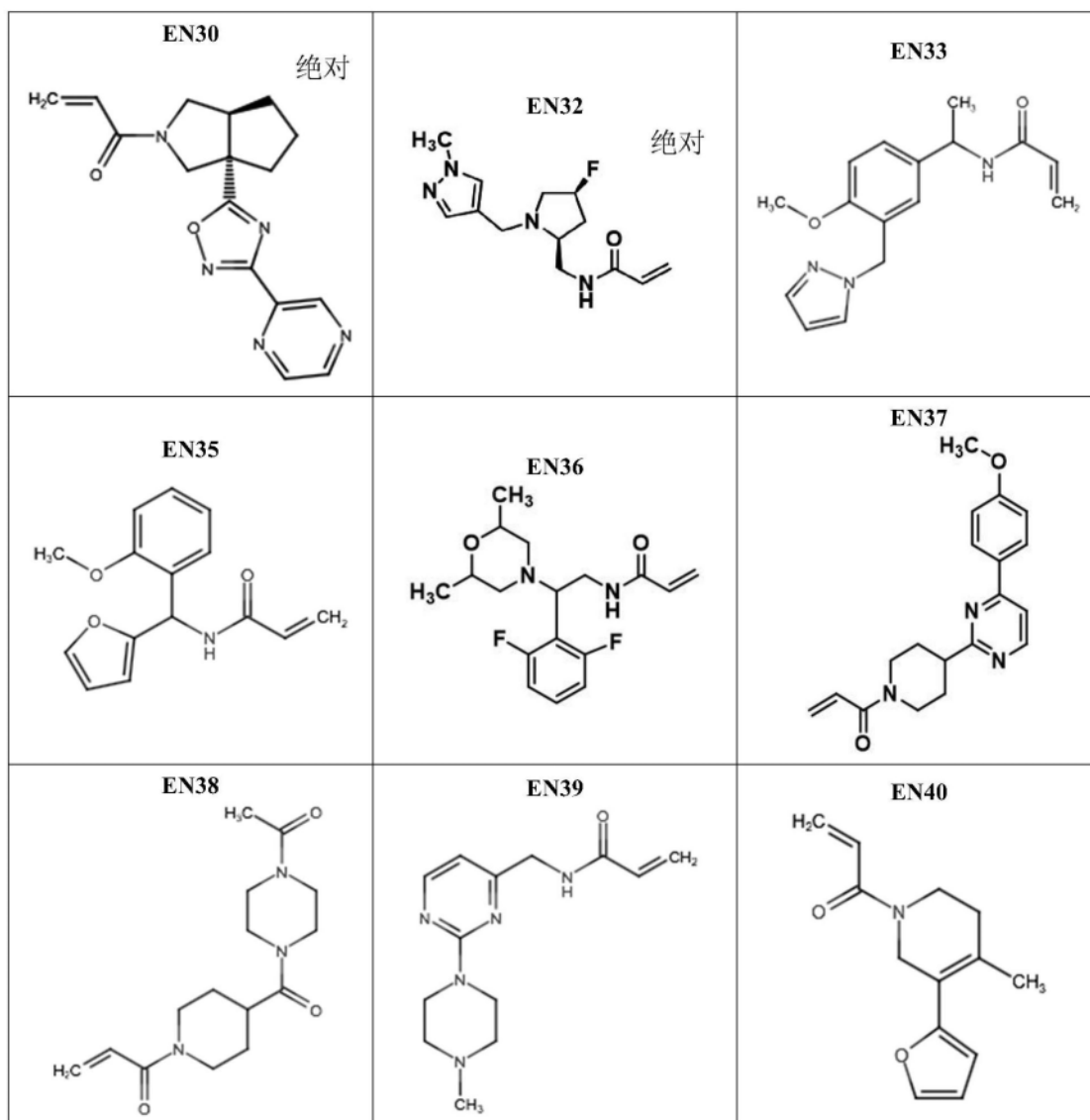
[1161]



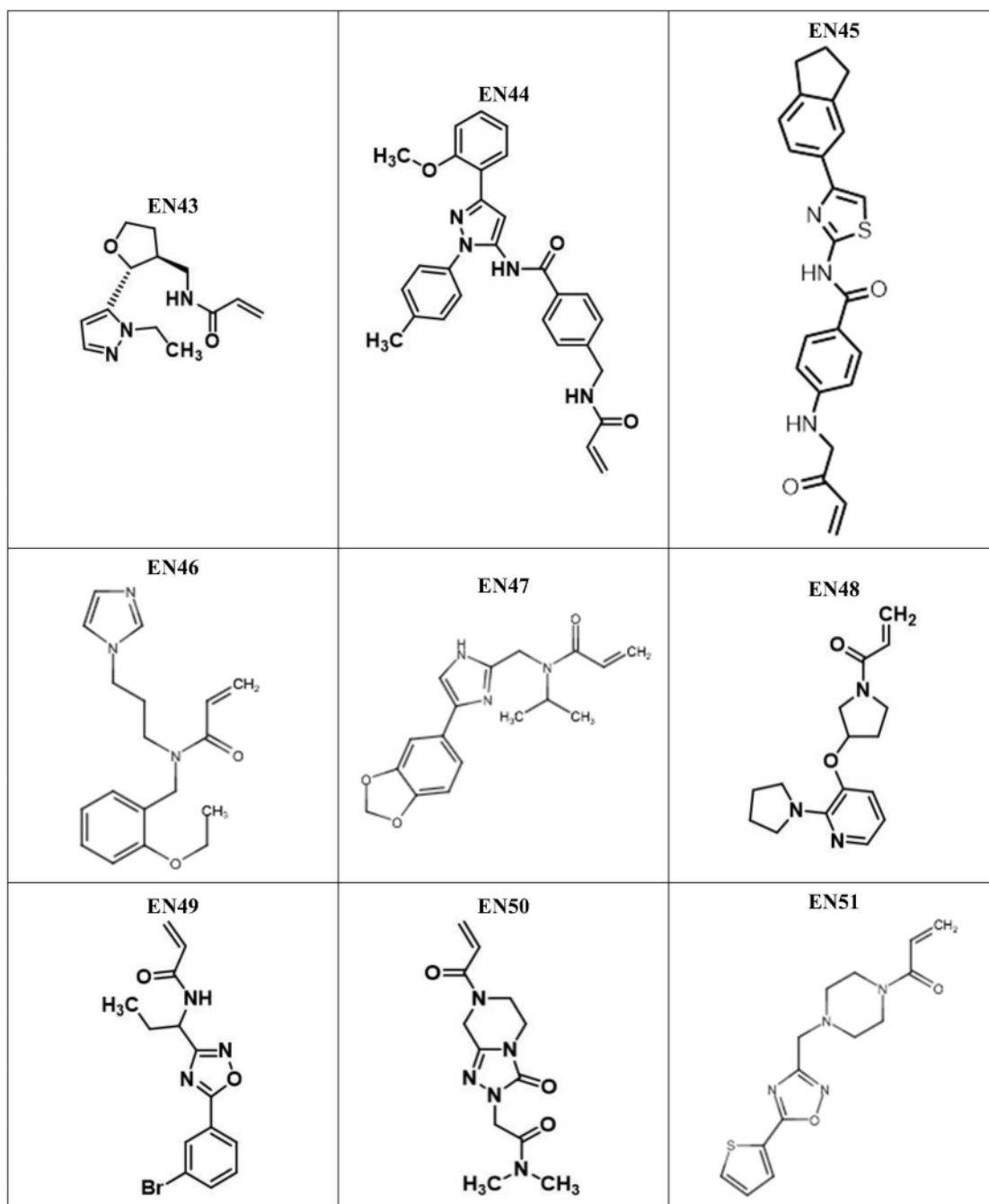
[1162]

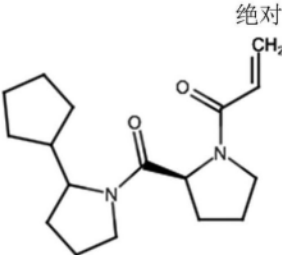
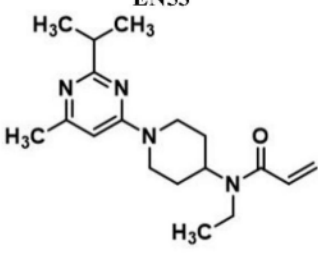
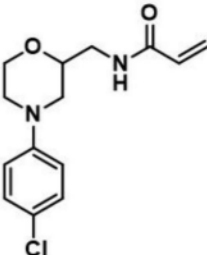
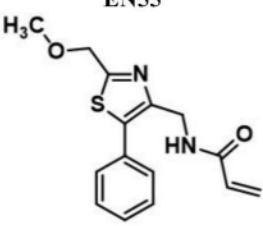
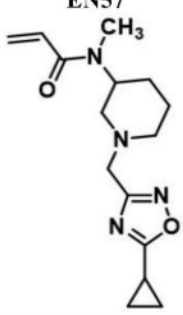
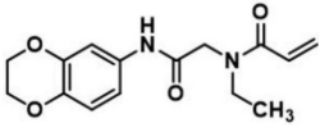
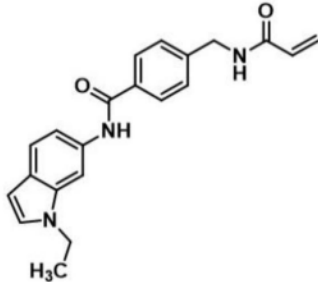
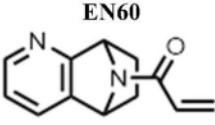
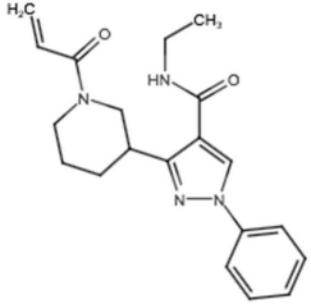
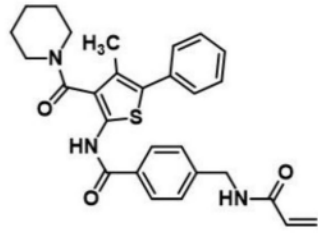
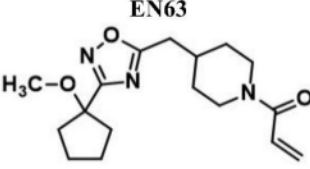
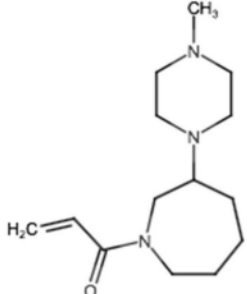


[1163]



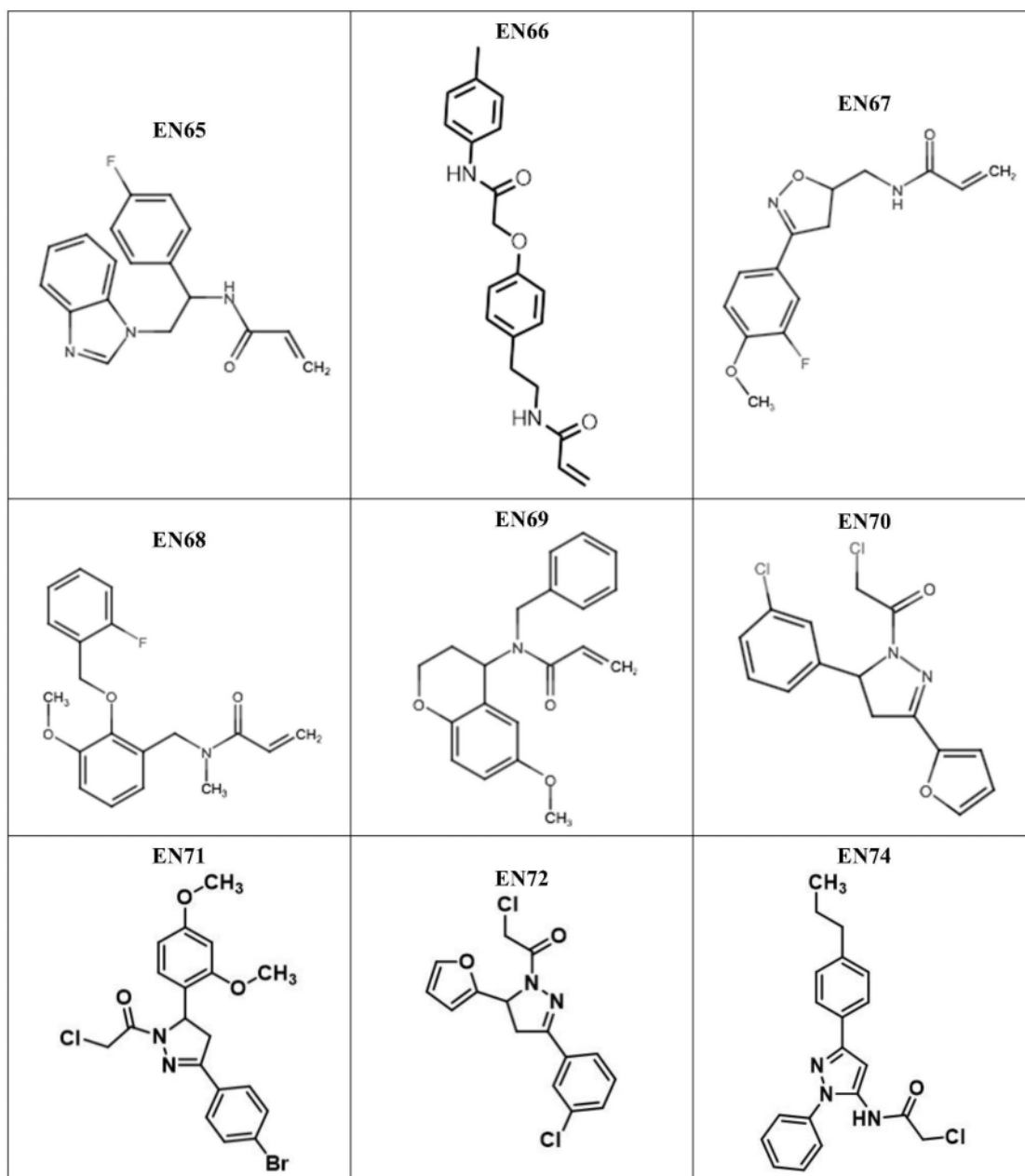
[1164]



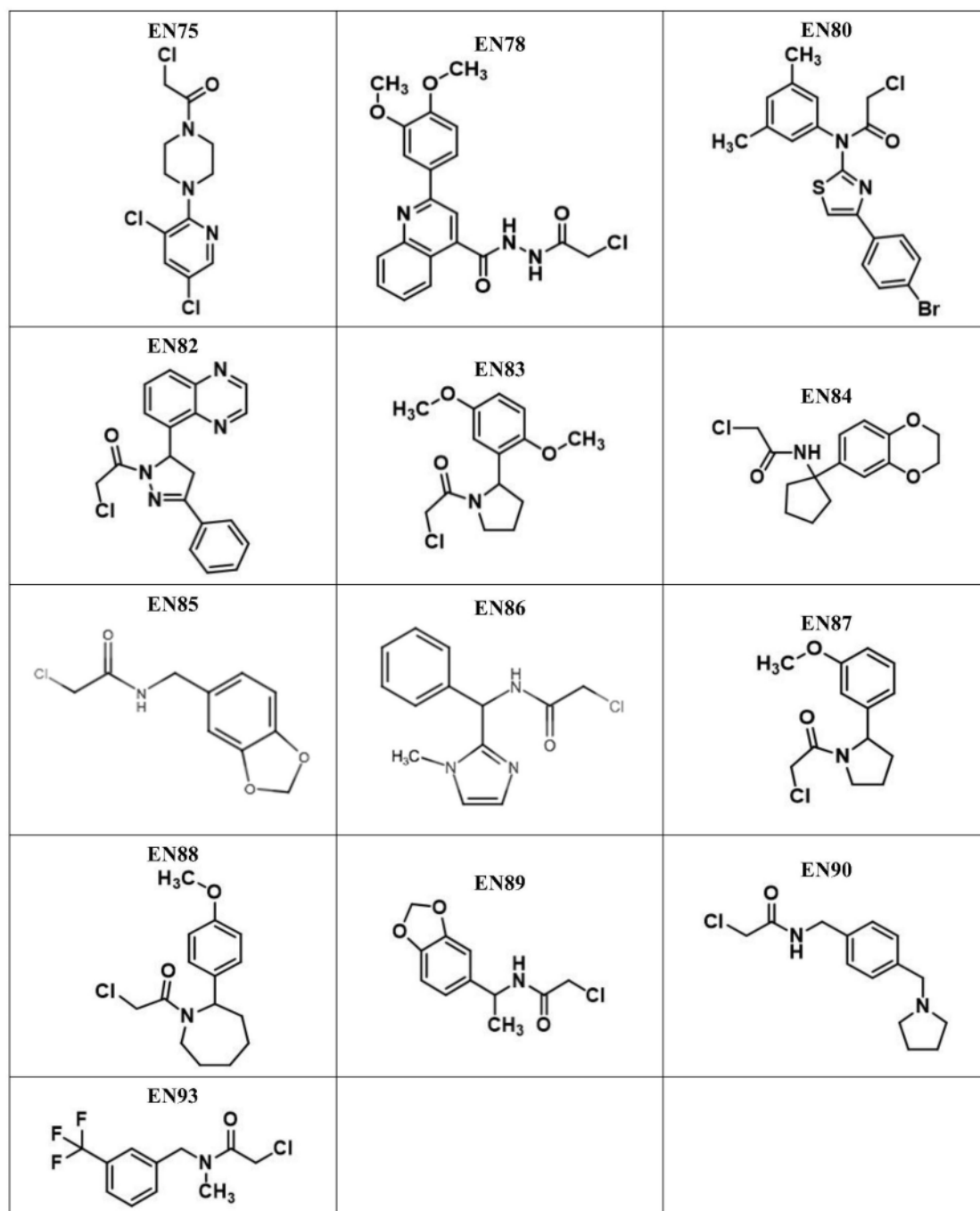
EN52 绝对 	EN53 	EN54 
EN55 	EN57 	EN58 
EN59 	EN60 	EN61 
EN62 	EN63 	EN64 

[1165]

[1166]



[1167]



[1168] 与实例4-6相关的参考文献

[1169] 1.Laraia,L.,Robke,L.&Waldmann,H.“生物活性化合物集合:从设计到靶标鉴定(Bioactive Compound Collections:From Design to Target Identification.)”《化学(Chem)》4,705-730(2018)。2.Koehn,F.E.&Carter,G.T.“天然产物在药物发现中的不断演变的作用(The evolving role of natural products in drug discovery.)”《自然综述:药物发现》4,206-220(2005)。3.Kingston,D.G.I.“现代天然产物药物发现及其与生物多样性保护的关系(Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation.)”《天然产物杂志(J.Nat.Prod.)》74,496-511(2011)。4.Harvey,A.L.,Edrada-Ebel,R.&Quinn,R.J.“在基因组学时代,用于药物发现的天然产物的重新出现(The re-emergence of natural products for drug discovery in the

genomics era.)”《自然综述:药物发现》14,111-129(2015)。5.Nomura,D.K.&Maimone,T.J. “具有生物共价作用的天然产物的靶标鉴定(Target Identification of Bioactive Covalently Acting Natural Products.)”《微生物学和免疫学的最新课题》420,351-374 (2019)。6.Wright,M.H.&Sieber,S.A. “用于鉴定天然产物的细胞靶标的化学蛋白质组学方法(Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products.)”《天然产物报告(Nat.Prod.Rep.)》33,681-708(2016)。7.Drahl,C., Cravatt,B.F.&Sorensen,E.J. “蛋白质反应性天然产物(Protein-reactive natural products.)”《德国应用化学国际版(英语)(Angew.Chem.Int.Ed Engl.)》44,5788-5809 (2005)。8.Liu,J.等人“钙调神经磷酸酶是亲环蛋白-环孢菌素A和FKBP-FK506复合物的常见靶标(Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes.)”《细胞(Cell)》66,807-815(1991)。9.Cohen,E.,Quistad,G.B.& Casida,J.E. “来自印楝杀虫剂的印楝内酯、环氧氮杂二酮和其它柠檬苦素的细胞毒性(Cytotoxicity of nimbolide,epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide.)”《生命科学(Life Sci.)》58,1075-1081(1996)。10.Bodduluru,L.N., Kasala,E.R.,Thota,N.,Barua,C.C.&Sistla,R. “印楝内酯在癌症中的化学预防和治疗作用:潜在的机制(Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer:the underlying mechanisms.)”《英国工业生物学研究协会国际杂志-体外毒理学(Toxicol.Vitro Int.J.Publ.Assoc.BIBRA)》28,1026-1035(2014)。11.Subramani,R.等人 “印楝内酯通过ROS介导的细胞凋亡和抑制上皮向间充质转化来抑制胰腺癌的生长和转移(Nimbolide inhibits pancreatic cancer growth and metastasis through ROS-mediated apoptosis and inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition.)”《科学报告(Sci.Rep.)》6,19819(2016)。12.Hao,F.,Kumar,S.,Yadav,N.&Chandra,D. “印楝成分可作为预防和治疗癌症的潜在药物(Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment.)”《生物化学与生物物理学报》1846,247-257(2014)。13.Chien,S.-Y.等人 “印楝内酯诱导人鼻咽癌细胞凋亡(Nimbolide induces apoptosis in human nasopharyngeal cancer cells.)”《环境毒理学(Environ.Toxicol.)》32,2085-2092(2017)。14.Elumalai,P.等人 “印楝内酯在两种乳腺癌细胞系中抑制入侵和迁移,并下调uPAR趋化因子的基因表达(Nimbolide inhibits invasion and migration,and down-regulates uPAR chemokine gene expression,in two breast cancer cell lines.)”《细胞增殖(Cell Prolif.)》47,540-552(2014)。15.Elumalai,P.,Arunkumar,R., Benson,C.S.,Sharmila,G.&Arunakaran,J. “印楝内酯抑制人乳腺癌细胞系(MCF-7和MDA-MB-231)中IGF-I介导的PI3K/Akt和MAPK信号传导(Nimbolide inhibits IGF-I-mediated PI3K/Akt and MAPK signalling in human breast cancer cell lines(MCF-7 and MDA-MB-231).)”《细胞生物化学与功能(Cell Biochem.Funct.)》32,476-484(2014)。16.Kavitha,K.等人 “印楝内酯(一种印楝柠檬苦素类化合物)消除了典型的NF- κ B和Wnt信号传导,从而诱导人肝癌(HepG2)细胞中的半胱天冬酶依赖性凋亡(Nimbolide,a neem limonoid abrogates canonical NF- κ B and Wnt signaling to induce caspase-dependent apoptosis in human hepatocarcinoma(HepG2) cells.)”《欧洲药理学杂志(Eur.J.Pharmacol.)》681,6-14(2012)。17.Pooladanda,V.,Bandi,S.,Mondi,S.R.,

Gottumukkala, K.M. & Godugu, C. “印苦楝内酯表观遗传调控乳腺癌的自噬和细胞凋亡 (Nimbolide epigenetically regulates autophagy and apoptosis in breast cancer.)”《英国工业生物学研究协会国际杂志-体外毒理学》51, 114-128 (2018)。

18. Gupta, S.C. 等人 “印苦楝内酯 (柠檬苦素类三萜) 通过抑制促炎性微环境来抑制人结肠直肠癌异种移植物的生长 (Nimbolide, a limonoid triterpene, inhibits growth of human colorectal cancer xenografts by suppressing the proinflammatory microenvironment.)”《美国癌症研究协会期刊-临床癌症研究 (Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.)》19, 4465-4476 (2013)。

19. Lin, H., Qiu, S., Xie, L., Liu, C. & Sun, S. “印苦楝内酯通过操纵DUSP4表达和ERK1/2信号传导来抑制非小细胞肺癌细胞的侵袭和迁移 (Nimbolide suppresses non-small cell lung cancer cell invasion and migration via manipulation of DUSP4 expression and ERK 1/2 signaling.)”《生物医药疗法/生物医学与药物治疗 (Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.)》92, 340-346 (2017)。

20. Babykutty, S. 等人 “印苦楝内酯通过抑制ERK1/2并降低结肠癌细胞中NF- κ B的DNA结合活性而下调MMP-2/9表达, 从而延迟肿瘤细胞的迁移、侵袭和血管生成 (Nimbolide retards tumor cell migration, invasion, and angiogenesis by downregulating MMP-2/9 expression via inhibiting ERK1/2 and reducing DNA-binding activity of NF- κ B in colon cancer cells.)”《分子致癌杂志 (Mol. Carcinog.)》51, 475-490 (2012)。

21. Nagini, S. “印楝柠檬苦素类作为抗癌剂: 癌症标志和致癌信号的调节 (Neem Limonoids as Anticancer Agents: Modulation of Cancer Hallmarks and Oncogenic Signaling.)”《酶 (The Enzymes)》36, 131-147 (2014)。

22. Alshammari, G.M., Balakrishnan, A. & Chinnasamy, T. “印苦楝内酯可减弱原代肝细胞中的脂质蓄积、氧化应激和抗氧化剂 (Nimbolide attenuate the lipid accumulation, oxidative stress and antioxidant in primary hepatocytes.)”《分子生物学报告 (Mol. Biol. Rep.)》44, 463-474 (2017)。

23. Leslie, B.J. & Hergenrother, P.J. “使用亲和试剂鉴定生物活性有机小分子的细胞靶标 (Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents.)”《化学学会评论 (Chem. Soc. Rev.)》37, 1347-1360 (2008)。

24. Pan, S., Zhang, H., Wang, C., Yao, S.C.L. & Yao, S.Q. “使用基于亲和力的探针对天然产物和生物活性化合物进行靶标鉴定 (Target identification of natural products and bioactive compounds using affinity-based probes.)”《天然产物报告》33, 612-620 (2016)。

25. Ursu, A. & Waldmann, H. “捉迷藏: 鉴定和确认小分子蛋白质靶标 (Hide and seek: Identification and confirmation of small molecule protein targets.)”《生物有机化学与医药化学通讯》25, 3079-3086 (2015)。

26. Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E. & Gianni, L. “三阴性乳腺癌: 异质性疾病的挑战和机遇 (Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease.)”《自然综述: 临床肿瘤学 (Nat. Rev. Clin. Oncol.)》13, 674-690 (2016)。

27. Zeichner, S.B., Terawaki, H. & Gogineni, K.A. “转移性三阴性乳腺癌的全身治疗综述 (Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer.)”《乳腺癌的基础与临床研究 (Breast Cancer Basic Clin. Res.)》10, 25-36 (2016)。

28. Weerapana, E. 等人 “定量反应谱分析预测

蛋白质组中的功能性半胱氨酸(Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes.)”《自然》468,790-795(2010)。29.Evans,M.J.& Cravatt,B.F.“基于机制的酶家族的谱分析(Mechanism-based profiling of enzyme families.)”《化学评论(Chem.Rev.)》106,3279-3301(2006)。30.Roberts,A.M.,Ward,C.C.&Nomura,D.K.“基于活性的蛋白质谱分析,用于定位和药理学上蛋白质组范围内的可配位热点(Activity-based protein profiling for mapping and pharmacologically interrogating proteome-wide ligandable hotspots.)”《生物技术的最新观点(Curr.Opin.Biotechnol.)》43,25-33(2017)。31.Grossman,E.A.等人“针对抗癌天然产物靶向的有药可用性热点的共价配体发现”《细胞化学生物学(Cell Chem.Biol.)》24,1368-1376.e4(2017)。32.Roberts,A.M.等人“对共价配体的化学蛋白质组学筛查揭示了UBA5作为新型胰腺癌靶标”《美国化学学会化学生物学杂志》12,899-904(2017)。33.Anderson,K.E.,To,M.,Olzmann,J.A.&Nomura,D.K.“化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了削弱乳腺癌致病性的硫氧还蛋白-胱天蛋白酶3相互作用破坏者”《美国化学学会化学生物学杂志》12,2522-2528(2017)。34.Counihan,J.L.,Wiggenhorn,A.L.,Anderson,K.E.&Nomura,D.K.“化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了ALDH3A1作为肺癌的治疗靶标”《美国化学学会化学生物学杂志》13,1970-1977(2018)。35.Backus,K.M.等人“天然生物系统中蛋白质组范围内的共价配体发现(Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems.)”《自然》534,570-574(2016)。36.Wang,C.,Weerapana,E.,Blewett,M.M.&Cravatt,B.F.“一种定量映射脂质衍生的亲电体的靶标的化学计量学平台”《自然方法》11,79-85(2014)。37.Hacker,S.M.等人“人类蛋白质组中赖氨酸反应性和可配体性的全球概况”《自然化学》9,1181-1190(2017)。38.Ward,C.C.,Kleinman,J.I.&Nomura,D.K.“NHS-酯作为基于多功能反应性的探针,用于定位蛋白质组范围内的可配位热点(NHS-Esters As Versatile Reactivity-Based Probes for Mapping Proteome-Wide Ligandable Hotspots.)”《美国化学学会化学生物学杂志》12,1478-1483(2017)。39.Han,J.等人“ZNF313是一种新型的细胞周期活化剂,具有E3连接酶活性,可通过破坏p21(WAF1)的稳定性来抑制细胞衰老(ZNF313 is a novel cell cycle activator with an E3 ligase activity inhibiting cellular senescence by destabilizing p21(WAF1).)”《细胞死亡分化(Cell Death Differ.)》20,1055-1067(2013)。40.Ma,Y.-X.等人“新型人类锌指蛋白基因ZNF313的鉴定(Identification of a novel human zinc finger protein gene ZNF313.)”《生物化学与生物物理学报(Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochim.Biophys.Sin.)》35,230-237(2003)。41.Lee,M.-G.等人“XAF1通过活化HIPK2和ZNF313指导p53信号传导的凋亡(XAF1 directs apoptotic switch of p53 signaling through activation of HIPK2 and ZNF313.)”《美国国家科学院院刊》111,15532-15537(2014)。42.Huang,S.等人“UbL-UBA Ubiquilin4蛋白通过对p21的p53依赖性和p53非依赖性调控而在胃癌中发挥抑癌作用(The UbL-UBA Ubiquilin4 protein functions as a tumor suppressor in gastric cancer by p53-dependent and p53-independent regulation of p21.)”《细胞死亡分化》26,516-530(2018)。Burslem,G.M.& Crews,C.M.“蛋白质稳态的小分子调节”《化学评论》117,11269-11301(2017)。44.Zengerle,M.,Chan,K.-H.&Ciulli,A.“选择性小分子诱导的BET溴结构域蛋白BRD4降

解”《美国化学学会化学生物学杂志》10,1770-1777(2015)。45.Lai,A.C.&Crews,C.M.“经诱导的蛋白质降解:新兴的药物发现范例”《自然综述:药物发现》16,101-114(2017)。

46.Neklesa,T.K.,Winkler,J.D.&Crews,C.M.“通过PROTAC进行靶蛋白降解(Targeted protein degradation by PROTACs.)”《药理学和治疗学(Pharmacol.Ther)》174,138-144(2017)。

47.Winter,G.E.等人“药物开发:邻苯二甲酰亚胺缀合作为体内靶蛋白降解的策略(DRUG DEVELOPMENT.Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation.)”《科学》348,1376-1381(2015)。

48.Shortt,J.,Ott,C.J.,Johnstone,R.W.&Bradner,J.E.“一种用于解剖癌症表观基因组的化学探针工具箱(A chemical probe toolbox for dissecting the cancer epigenome.)”《自然综述:癌症(Nat.Rev.Cancer)》17,160-183(2017)。

49.Sakamoto,K.M.等人“Protacs:将蛋白质靶向Skp1-Cullin-F box复合体的嵌合分子,用于泛素化和降解(Protacs:chimeric molecules that target proteins to the Skp 1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation.)”《美国国家科学院院刊》98,8554-8559(2001)。

50.Schneekloth,J.S.等人“蛋白质水平的化学遗传控制:选择性体内靶向降解(Chemical genetic control of protein levels:selective in vivo targeted degradation.)”《美国化学学会期刊(J.Am.Chem.Soc.)》126,3748-3754(2004)。

51.Lu,J.等人Hijacking the E3“泛素连接酶Cereblon可有效靶向BRD4(Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4.)”《化学生物学》22,755-763(2015)。

52.Havens,C.G.&Walter,J.C.Mechanism of CRL4(Cdr2),“一种PCNA依赖性E3泛素连接酶(a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase.)”《基因与发育(Genes Dev.)》25,1568-1582(2011)。

53.Kitagawa,K.,Kotake,Y.&Kitagawa,M.“泛素介导的癌基因和抑癌基因产物的控制(Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products.)”《癌症科学(Cancer Sci.)》100,1374-1381(2009)。

54.Biswas,K.等人“E3连接酶CHIP介导p21的降解以维持抗辐射性(The E3 Ligase CHIP Mediates p21 Degradation to Maintain Radioresistance.)”《分子癌症研究(Mol.Cancer Res.)》MCR 15,651-659(2017)。

55.Rodriguez,M.S.等人“RING泛素E3RNF114与A20相互作用并调节NF- κ B活性和T细胞活化(The RING ubiquitin E3 RNF114 interacts with A20 and modulates NF- κ B activity and T-cell activation.)”《细胞死亡与疾病(Cell Death Dis.)》5,e1399(2014)。

56.Yang,Y.等人“E3泛素连接酶RNF114和TAB1降解是母体向合子过渡所必需的(The E3 ubiquitin ligase RNF114 and TAB1 degradation are required for maternal-to-zygotic transition.)”《欧洲分子生物学组织报告(EMBO Rep.)》18,205-216(2017)。

57.Rape,M.“泛素化处于发展与疾病的十字路口”《自然综述:分子细胞生物学》19,59-70(2018)。

58.Hughes,S.J.&Ciulli,A.“三元复合物的分子识别:化学降解剂的结构导向设计的新维度(Molecular recognition of ternary complexes:a new dimension in the structure-guided design of chemical degraders.)”《生物化学论文(Essays Biochem.)》61,505-516(2017)。

59.Chamberlain,P.P.等人“人Cereblon-DDB1-来那度胺复合物的结构揭示了对沙利度胺类似物响应的基础(Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs.)”《自然结构分子生物学(Nat.Struct.Mol.Biol.)》21,803-809(2014)。

60.Krönke,J.等人“来那度胺诱导del(5q)

MDS中CK1 α 的泛素化和降解(Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q)MDS.)”《自然》523,183-188(2015)。61.Jessani,N.等人“与体内乳腺肿瘤生长相关的癌和基质酶活性谱”《美国国家科学院院刊》101,13756-13761(2004)。62.Louie,S.M.等人“GSTP1是三阴性乳腺癌细胞代谢和致病性的驱动器”《细胞化学生物学》23,567-578(2016)。63.Bateman,L.A.等人“化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了削弱ER形态和癌症致病性的网状蛋白4中的半胱氨酸热点”《英国剑桥化学通讯》53,7234-7237(2017)。64.Smith,P.K.等人“使用二金鸡宁酸测量蛋白质(Measurement of protein using bicinchoninic acid.)”《分析生物化学》150,76-85(1985)。65.Xu,T.等人“ProLuCID:一种改进的类似于SEQUEST的算法,具有增强的灵敏度和特异性”《蛋白质组学杂志(J.Proteomics)》129,16-24(2015)。66.Benjamin,D.I.等人“产生醚脂质的酶AGPS改变了结构脂质和信号脂质的平衡,从而助长了癌症的致病性(Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity.)”《美国国家科学院院刊》110,14912-14917(2013)。67.Medina-Cleghorn,D.等人“使用基于反应性的化学计量学平台对环境化学物质的蛋白质组范围内的靶标进行定位”《化学生物学》22,1394-1405(2015)。68.Longo,P.A.,Kavran,J.M.,Kim,M.-S.&Leahy,D.J.“用聚乙烯亚胺(PEI)进行的瞬时哺乳动物细胞转染(Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine(PEI).)”《酶学方法(Methods Enzymol)》529,227-240(2013)。69.Nomura,D.K.等人“单酰基甘油脂肪酶调节促进癌症发病机理的脂肪酸网络(Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis.)”《细胞》140,49-61(2010)。

[1170] 实例7.利用抗癌天然产物印苦楝内酯进行靶蛋白降解

[1171] 来自如植物和微生物等生物的天然产物是治疗性先导化合物的丰富来源¹。其生物学活性的表征导致了针对各种病理(包含癌症、细菌和真菌感染、炎症和糖尿病)的多种药物¹。在天然产物中,存在共价作用的分子的子集,这些分子带有亲电部分,能够与蛋白质中的亲核氨基酸进行基本上不可逆的反应,从而发挥其治疗活性。这些天然产物实例包含青霉素,其不可逆地抑制诱导抗菌活性的丝氨酸转氨酶,或渥曼青霉素,其共价修饰PI3激酶上的功能性赖氨酸以抑制其活性^{1,2}。发现抗癌和共价作用的天然产物靶向的有药可用性热点不仅可以产生新的抗癌药物和治疗靶标,还可以揭示蛋白质靶标中天然产物获得的药征的独特见解,所述蛋白质靶标通常被认为无药可用性或难以通过标准药物发现工作来解决。难以预测先验的有药可用性药征的一个实例是FK506或他克莫司(Tacrolimus),其通过结合FKBP12从而创建FKBP12-FK506复合物来抑制肽基脯氨酰异构酶活性,所述复合物通过抑制钙调神经磷酸酶来调节T细胞信号传导³。因此,深入了解自然界用于参与蛋白质靶标的策略可以获得有关哪些可能被认为是具有药可用性的新观点。

[1172] 在这项研究中,我们研究了天然产物苦楝内酯(1)作用的机制,所述印苦楝内酯是源自印度楝树(印楝(*Azadirachta indica*))的柠檬苦素类天然产物(图8A)⁴。印苦楝内酯已显示出多种治疗作用,并具有能够与半胱氨酸反应的环状烯酮⁵⁻⁷。在癌症的背景下,已证明印苦楝内酯可以抑制多种癌症的肿瘤发生和转移,而不会引起任何毒性或不良副作用⁸。尽管先前的研究表明,印苦楝内酯可以通过调节与存活、生长、侵袭、血管生成、炎症和氧化应激相关的信号传导路径和转录因子来削弱癌症的致病性,但印苦楝内酯的直接靶标仍然

难以表征⁸。

[1173] 鉴定复杂天然产物的直接蛋白质靶标仍然具有挑战性,并且经常需要合成带有光亲和性和富集柄的这些化合物的类似物,这是在合成上具有挑战性的任务,并且可能改变分子的活性¹。即使生成了这种探针,鉴定天然产物靶向的特定氨基酸位点也是具有挑战性的。在这项研究中,我们利用基于活性的蛋白质谱分析(ABPP)的化学蛋白质组学方法来定位乳腺癌细胞蛋白质组中印苦楝内酯的蛋白质组范围内的靶标。使用ABPP平台,我们揭示了乳腺癌细胞中印苦楝内酯的主要靶标之一是E3泛素连接酶RNF114的半胱氨酸-8(C8)。印苦楝内酯对RNF114进行共价修饰会导致其底物(肿瘤抑制物CDKN1A(p21))的泛素化和降解受损从而使其快速稳定。有趣的是,我们显示出这种对RNF114活性的明显抑制是通过受损的底物识别而引起的,从而产生了将印苦楝内酯用作针对靶蛋白降解的E3连接酶募集模块的可能性。对细胞中所关注的靶标进行化学诱导降解的策略在药物发现中迅速引起人们的兴趣,包含开发由蛋白质靶向性配体组成的被称为“蛋白水解靶向嵌合体”(PROTAC)或“异双功能降解剂”的双功能分子,所述蛋白质靶向性配体与E3连接酶募集剂连接以将E3连接酶带到所关注的蛋白质上,从而泛素化并以蛋白酶体依赖性方式标记降解靶标^{9,10}。我们证明了印苦楝内酯可用于将RNF114募集到其它蛋白质底物上,以用于靶蛋白降解应用。使用化学蛋白质组学启用的共价配体筛选平台,我们还鉴定了可以与RNF114的C8类似地反应并表现出印苦楝内酯作用的更易于合成处理的化合物。

[1174] 印苦楝内酯对乳腺癌表型的影响。尽管已证明印苦楝内酯可削弱许多不同类型人类癌症的致癌性,但我们选择集中精力阐明印苦楝内酯在三阴性乳腺癌(TNBC)中的作用。TNBC不含雌激素、孕酮和HER2受体,并且是最具侵袭性的癌症,其临床预后最差¹¹。目前,针对TNBC患者的靶向治疗很少。因此,在TNBC中发现新的治疗方式将可能显著有助于减少与乳腺癌相关的死亡率。与先前的报告一致,该报告显示了在乳腺癌细胞中的抗癌活性,印苦楝内酯削弱了231MFP细胞和HCC38TNBC细胞中的细胞增殖或无血清细胞存活(图17A-17B,图18A-18B)⁸。我们还显示了这些对231MFP和HCC38活力的影响是由于用印苦楝内酯处理会导致凋亡细胞的显著增加,这是通过流式细胞术分析评估的(图17C,图18C-18E)。

[1175] ABPP用于定位乳腺癌细胞中的印苦楝内酯靶标。为了查询印苦楝内酯削弱乳腺癌的致病性的机制,我们应用了一种化学同位素平台,其被称为同位素串联正交蛋白水解启用的基于活性的蛋白质谱分析(isoTOP-ABPP),以确定印苦楝内酯的特定蛋白质靶标。isoTOP-ABPP由Cravatt和Weerapana率先开发,其使用基于反应性的化学探针直接在复杂的蛋白质组中定位反应性、功能性和可配位的热点^{12,13}。当以竞争方式使用时,共价作用的小分子可以与基于广泛反应性的探针的结合竞争,从而促进快速发现共价作用化合物所靶向的蛋白质和可配位点¹⁴⁻¹⁶(图9A)。在这项研究中,我们用媒剂或印苦楝内酯在原位治疗乳腺癌细胞,然后用半胱氨酸反应性炔烃官能化的碘乙酰胺探针(IA-炔烃)(2)对蛋白质组进行竞争性标记,之后,将同位素轻或重的可裂解的富集柄连接到经探针标记的蛋白质上,以进行isoTOP-ABPP分析。通过液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)分析经探针修饰的胰蛋白酶肽,并定量轻与重胰蛋白酶探针修饰的肽的比率,其代表对照对比经处理的IA-炔烃标记的位点。在231MFP TNBC细胞中通过原位印苦楝内酯处理靶向的可配位热点的IsoTOP-ABPP分析显示出一个同位素比>4的主要靶标,所述主要靶标明显被印苦楝内酯(E3泛素连接酶RNF114)结合(图19A)。重要的是,使用三个独立的小干扰RNA(siRNA)的RNF114敲低类似于

印苦楝内酯在231MFP细胞中的抗增殖作用(图19B-19C,图20A-20B)。进一步证明了RNF114有助于印苦楝内酯的抗增殖作用,RNF114的敲低导致对印苦楝内酯介导的抗增殖作用的显著抗性(图19D,图20C)。尽管印苦楝内酯可能拥有RNF114以外的许多其它靶标(isoTOP-ABPP方法无法达到这些靶标),但我们的结果表明RNF114是印苦楝内酯的新型靶标,并且RNF114部分地负责这种天然产物的抗增殖作用。因此,我们选择将进一步的表征工作集中在印苦楝内酯和RNF114之间的相互作用上。

[1176] 印苦楝内酯与RNF114相互作用的表征。RNF114是RING家族的E3泛素连接酶¹⁷。被isoTOP-ABPP鉴定为印苦楝内酯的靶标C8的RNF114上的位点落入蛋白质的N端区域内(所述蛋白质据预测是本质上无序的),并且位于两个带注释的锌指结构域之外(图21A)。天然产物对蛋白质的内在无序区域的明显靶向引起了我们的兴趣,我们试图研究印苦楝内酯和RNF114之间的相互作用。

[1177] 因为isoTOP-ABPP是共价作用的分子与更广泛的反应性探针之间的竞争性测定方法,所以其是潜在的印苦楝内酯靶向性热点的间接读数。为了确认印苦楝内酯直接靶向RNF114,我们由印苦楝内酯合成了三步中所示的炔基官能化的探针(图21B)。呋喃部分在C2处的选择性溴化以及随后的与4-甲酰基苯基硼酸的Suzuki偶联提供了芳基-醛(3),其通过Pinnick氧化转化为相应的羧酸(4)。最后,将(4)与炔丙基胺(HATU,DIPEA)偶联,得到目标印苦楝内酯-炔烃探针(5)。我们证实了该印苦楝内酯探针与纯人RNF114蛋白反应,如变性SDS/PAGE凝胶上的蛋白质标记所示。该标记事件也被印苦楝内酯竞争,并且在C8A RNF114突变体中被废除(图21C)。由于印苦楝内酯-炔烃探针是一种合成繁琐的探针,需要相当昂贵的印苦楝内酯作为起始材料,因此,我们也试图开发一种可以标记RNF114C8的更简单的探针。在试图验证RNF114与印苦楝内酯的相互作用的初步研究中,我们使印苦楝内酯与RNF114的IA-炔烃标记竞争,未观察到对标记的完全抑制作用,这可能是由于IA-炔烃进行的多个半胱氨酸的烷基化超过了C8(图21D)。因此,我们合成了更定制的炔烃官能化的环状烯酮探针JNS27(6),其显示了RNF114上的C8的选择性标记,如通过C8ARNF114突变蛋白的标记缺乏所证明的(图21E)。使用JNS27,我们能够证明印苦楝内酯对JNS27标记的完全竞争,其中50%的抑制浓度(IC₅₀)为0.73 μ M(图21E)。为了证明印苦楝内酯与RNF114的相互作用并非完全由反应性驱动,而是也通过与蛋白质的另外的相互作用驱动,我们证明了印苦楝内酯与若丹明功能化的碘乙酰胺探针(IA-若丹明)竞争性地与RNF114的标记竞争,与IC₅₀分别为0.55、22且>100 μ M的简单JNS27探针或碘乙酰胺相比,所述若丹明功能化的碘乙酰胺探针的浓度要低得多(图20D)。此外,在将纯蛋白与天然产物一起孵育后,通过LC-MS/MS在RNF114上的含有C8的胰蛋白酶肽上检测到了印苦楝内酯的直接质量加合物。所有这些实验加在一起提供了证据,表明印苦楝内酯通过共价键形成而修饰C8处RNF114的固有无序区。

[1178] 接下来,我们进行了两个补充实验,以证明印苦楝内酯与231MFP乳腺癌细胞中的RNF114直接结合。首先,我们通过用探针处理带有Flag标记的RNF114表达细胞,然后富集Flag标记的RNF114并通过CuAAC将若丹明-叠氮化物附加到经探针标记的蛋白质上并通过基于凝胶的ABPP方法进行可视化,示出了RNF114的原位剂量响应性印苦楝内酯-炔烃标记(图21F)。我们观察到了用10 μ M探针进行的稳健的原位印苦楝内酯-炔烃标记,但还观察到了较低但显著的探针标记,甚至低至100nM(图21F)。其次,通过用探针处理细胞,然后通过

CuAAC将生物素叠氮化物附加到经探针标记的蛋白质上,并通过蛋白质印迹观察将RNF114下拉可视化,我们还显示了用印苦楝内酯-炔烃探针对内源性RNF114进行的原位标记(图21G)。在这种情况下,在50 μ M印苦楝内酯-炔烃探针的情况下观察到了显著的下拉,但没有更低的浓度。在该实验中,我们显示,无关紧要的蛋白质(如GAPDH)没有被印苦楝内酯-炔烃探针所富集(图21G)。使用这些后条件,我们还进行了互补的定量蛋白质组分析研究,以鉴定可通过使用印苦楝内酯-炔烃探针原位标记231MFP细胞而富集的任何其它蛋白质。由于急性细胞毒性问题,我们无法使用高浓度的印苦楝内酯本身进行原位竞争研究。在这项研究中,我们显示RNF114是被印苦楝内酯-炔烃探针富集的蛋白质之一,与无探针对照相比,其被富集>10倍。我们还鉴定了被探针富集的114种另外的蛋白质,与无探针对照相比,这些蛋白质被富集>10倍。这些蛋白质代表可能有助于印苦楝内酯的抗增殖作用的另外的潜在共价或非共价靶标。这些富集的靶标也可能代表与印苦楝内酯结合程度低至部分的蛋白质,而isoTOP-ABPP实验旨在鉴定更高的结合靶标。另外,这些蛋白质可以包含探针特异性靶标或可以通过与直接经印苦楝内酯标记的蛋白质相互作用而间接富集的蛋白质。尽管如此,我们显示,印苦楝内酯-炔探针在乳腺癌细胞中与RNF114结合(甚至低至100nM),并且印苦楝内酯的抗增殖作用至少部分地由RNF114介导。

[1179] 印苦楝内酯对RNF114功能的影响。先前已显示,在其它底物中,RNF114泛素化并降解肿瘤抑制物p21¹⁷⁻¹⁹。在体外重构系统中,印苦楝内酯抑制RNF114自体泛素化和p21泛素化活性两者(图22A-22B)。RNF114 C8A突变不影响基础RNF114自体泛素化活性,但是减弱了用印苦楝内酯治疗所观察到的抑制作用(图22C)。先前对RNF114的表征表明N端可能参与底物识别¹⁷。与此相一致,我们发现印苦楝内酯降低了与RNF114共同免疫沉淀的p21的量,这表明RNF114的明显抑制可能是由于底物识别受损,而不是其催化活性的抑制(图22D)。我们进一步证明,在231MFP细胞中进行印苦楝内酯处理可在1小时内以剂量响应方式稳定CDKN1A(p21)蛋白表达,而TP53(p53)水平无明显变化(图22E)。观察到的CDKN1A的水平升高不是由于mRNA水平的转录下调,因为在印苦楝内酯治疗下p21 mRNA的水平保持不变。为了鉴定RNF114的其它潜在底物,我们还对用印苦楝内酯处理的231MFP细胞进行了基于串联质量标记(TMT)的定量蛋白质组学实验。与我们的蛋白质印迹数据一致,我们观察到CDKN1A(p21)是通过印苦楝内酯处理显著升高>2倍的蛋白质之一(图22F)。我们还观察到了通过印苦楝内酯治疗提高的其它几个靶标的水平,包含CDKN1C(p57)、PEG10和CTGF。除了先前已报道为潜在RNF114底物的CDKN1A(p21)和CDKN1C(p57)以外¹⁷,我们推测PEG10和CTGF也可能代表RNF114的另外的新型底物(图22F)。与此前提相符,我们在体外RNF114泛素化试验中证实了RNF114泛素化PEG10和CTGF,并且该泛素化被印苦楝内酯抑制(图22G)。由于p21和p57均为肿瘤抑制物,其在升高时会促进细胞周期停滞和细胞凋亡^{20,21},因此我们推测这两种肿瘤抑制物的稳定作用可能导致印苦楝内酯的抗增殖作用。我们证明了CDKN1A(p21)和CDKN1C(p57)的双重敲低导致在231MFP乳腺癌细胞中印苦楝内酯介导的抗增殖作用显著减弱(图22H-22I)。总的来说,这些数据表明印苦楝内酯与乳腺癌细胞中RNF114的内在无序的C8反应,以破坏RNF114-底物的识别,从而导致对其底物(如CDKN1A和CDKN1C)的泛素化的抑制、导致其稳定化并削弱乳腺癌细胞中的细胞增殖。

[1180] 印苦楝内酯作为RNF114募集剂。由于印苦楝内酯靶向潜在的底物识别位点,所以我们推测,通过使用印苦楝内酯作为RNF114募集剂开发异双功能降解剂,印苦楝内酯可用

于将RNF114募集到其它蛋白质底物上,以进行蛋白酶体降解。为了证明可行性,合成了通过将印苦楝内酯与溴结构域和末端外结构域(BET)家族抑制剂JQ1连接而形成的两个降解剂(图23A)。先前的研究表明,与CRBN(cereblon)募集剂沙利度胺或VHL募集剂连接的基于JQ1的降解剂有效地以蛋白酶体依赖性方式降解BET家族成员(具体地说,BRD 4)^{22,23}。将先前制备的酸(4)与含有较长(PEG类)(7)和较短(烷基类)(8)间隔子单元的JQ1功能化的胺偶联,从而到达降解剂XH1(9)和XH2(10)(图23A)。我们显示,XH2仍以0.24 μ M的IC₅₀结合RNF114(图23B)。尽管XH1没有显示出明显的BRD4降解,但是在12小时的处理后,在231MFP细胞中进行XH2处理导致了BRD4降解(图23C)。有趣的是,与0.1和0.01 μ M相比,XH2在1 μ M下显示出的降解更少,并且与10、1和0.1 μ M相比,MZ1在20 μ M下的降解更少,我们将其归因于先前与其它降解剂(包含先前报道的利用VHL募集剂的基于JQ1的降解剂MZ1)一起报道的“钩效应”^{9,22}(图23C-23D)。为了证实蛋白酶体对BRD4降解的依赖性,我们显示,通过用蛋白酶体抑制剂硼替佐米(BTZ)对细胞进行预处理而减弱了XH2介导的BRD4的降解(图23E)。通过用E1泛素活化的酶抑制剂(TAK-243)预处理或用BRD4抑制剂JQ1预竞争,XH2介导的BRD4降解也被阻止(图23F)。然而,用翻译抑制剂(依米丁)处理对观察到的BRD4降解没有影响。为了进一步证明XH2对BRD4的降解是通过RNF114的特异性募集,我们表明,与野生型(WT)HAP1细胞对应物相比,在RNF114敲除(KO)HAP1细胞中未观察到XH2(而非MZ1)对BRD4的降解。(图23G-23H)。我们进一步表明,在HAP1RNF114基因敲除细胞中野生型RNF114的重新表达导致恢复XH2对BRD4的降解。已使用基于TMT的定量蛋白质组谱分析实验证明了XH2介导的蛋白质降解的选择性,以评估蛋白质表达的变化。我们显示,XH2在231MFP乳腺癌细胞中选择性地降解BRD4,同时保留了其它已鉴定的BET家族成员BRD2和BRD3(图23I)。值得注意的是,我们还观察到几种蛋白质在XH2处理后显示出增加的水平,包含CDKN1A、CDKN1C、PEG10和CTGF,这些蛋白质在单独用印苦楝内酯处理时观察到水平升高(图23I)。还存在另外被上调的蛋白质,如DSG1、FN1、FLG2和CASP14(图23I)。这些上调的蛋白质可能是RNF114的潜在底物,具有源自XH2的印苦楝内酯部分的稳定作用,就像CDKN1A、CDKN1C、PEG10和CTGF的情况一样。其它靶标可能是源于JQ1介导的BRD4抑制和降解的下游转录效应。我们的结果表明,可以利用印苦楝内酯与RNF114的反应性来将该E3连接酶募集到其它蛋白质底物(如BRD4)上,以泛素化并选择性地降解所述蛋白质底物。

[1181] 针对RNF114的共价配体。通过了解RNF114的C8有可能被用于癌症治疗和靶蛋白降解应用,我们寻找了类似地靶向RNF114的更易于合成处理的共价配体。为实现此目标,我们使用中通量基于凝胶的ABPP方法筛选了针对RNF114的半胱氨酸反应性共价配体库,其中共价配体与RNF114的JNS27标记竞争,随后添加若丹明-叠氮化物并通过SDS/PAGE和凝胶内荧光进行分析。在针对RNF114筛选的约200个半胱氨酸反应性共价配体中,丙烯酰胺EN62(11)作为有前景的命中出现。EN62以C8依赖性方式抑制RNF114自体泛素化活性。尽管EN62是一种早期命中化合物,需要对细胞通透性、效力和选择性进行实质性改进,但该共价配体代表了靶向RNF114的C8以用于靶蛋白降解应用的更易于合成处理的共价配体支架的起点。

[1182] 我们示出了令人信服的证据,表明印苦楝内酯通过靶向RNF114内C8处的底物识别结构域来抑制p21泛素化和降解,从而部分地削弱了乳腺癌的致病性,从而使其稳定。我们证明了Rn114上C8的印苦楝内酯靶向可用于募集RNF114用于靶蛋白降解应用,并且用印苦楝内酯-JQ1降解剂XH2降解BRD4是可能的。

[1183] 我们在此报告了印苦楝内酯破坏RNF114与其内源性底物之一p21的相互作用,并且我们还显示p21水平在乳腺癌细胞中以p53独立性方式迅速稳定。据报道,在细胞周期或外源性胁迫的不同条件下,其它几种E3连接酶也可以降解p21,包含SCF^{SKP2}、CRL4^{CDT2}和CHIP²⁴⁻²⁶。先前的研究表明,RNF114的表达在G1期后期升高,从而调节p21和p57的水平,并且对于G1到S期的过渡至关重要¹⁷。已报道的其它RNF114底物包含参与母体到合子转变的TAB1和参与NF- κ B活性和T细胞活化的A20^{27,28}。因此,在癌症或其它细胞和组织类型中,印苦楝内酯可以通过调节其它RNF114蛋白底物的水平而具有额外的活性。有趣的是,我们显示CTGF和PEG10可能代表RNF114的其它底物,如通过其印苦楝内酯诱导的原位稳定和RNF114的体外多聚泛素化所证明的。需要进一步的研究以建立这些另外的蛋白质作为RNF114的直接和内源性底物。此外,虽然我们显示了RNF114是印苦楝内酯的一个靶标,其至少部分地介导印苦楝内酯对增殖和靶蛋白降解的作用,但我们还使用印苦楝内酯-炔烃探针显示了印苦楝内酯可能拥有许多另外的蛋白质靶标。这些另外的靶标可能包含与在isoTOP-ABPP实验中未被IA-炔半胱氨酸反应探针标记的半胱氨酸的其它共价相互作用、可能代表与其它氨基酸的共价相互作用、可能代表与其它蛋白质靶标的可逆相互作用或可能包含通过与直接经印苦楝内酯标记的蛋白质相互作用而间接富集的蛋白质。尽管印苦楝内酯具有多个潜在的靶标,但我们证明了RNF114是印苦楝内酯在乳腺癌细胞中的重要功能靶标,其可用于靶蛋白降解应用。我们也令人信服地表明,使用基于印苦楝内酯的降解剂观察到的BRD4降解是通过RNF114驱动的。

[1184] 我们的结果还表明,印苦楝内酯在功能上靶向RNF114内的内在无序区域。因此,迄今为止,解决与印苦楝内酯共价修饰的RNF114的结构仍具有挑战性,但是研究印苦楝内酯是否在N端诱导有序性的未来研究将为深入了解内在无序且无药可用性的蛋白质靶标的可配体性以及潜在地靶向其它E3连接酶的策略提供参考。

[1185] 靶蛋白降解已成为用于靶向蛋白质以通过蛋白酶体进行消除的强大且有效的药物发现范例^{9,10}。然而,挑战之一是,在人类基因组中大约600种E3连接酶中,只有少数E3连接酶募集剂得到开发²⁹。这些E3连接酶募集剂包含募集cereblon的沙利度胺型免疫调节药物(IMiD)、募集VHL的配体、募集MDM2的nutlin和募集BIRC2(cIAP)的配体^{9,10}。在这里,我们报告了印苦楝内酯可以用作用于靶蛋白降解应用的新型RNF114募集剂。通过进一步的接头修饰,应该可以优化此类降解剂的性能,该分子的面积已被确定为是重要的。也可以利用能够靶向RNF114的C8的更易于合成处理的共价配体(如EN62)作为RNF114募集剂。由于印苦楝内酯靶向RNF114内的底物识别结构域,因此如针对ImiD所报道的那样,确定印苦楝内酯否可作为分子胶来募集和降解新底物也将具有未来的意义³⁰。

[1186] 有趣的是,在导致BRD4水平显著降低的条件下,我们并未观察到BRD2和BRD3的降解,尽管其各自的BET溴结构域具有高度同源性。对于具有Cereblon和VHL募集模块的基于JQ1的降解剂,已经报道了BET家族成员中各种水平的选择性及其结构基础^{22,23,31,32}。尽管对XH2的选择性及其结构基础的更详细的研究不在本研究的范围之内,但其可以作为另一个实例,阐明对于给定的底物识别模块,另外的E3-部分的可用性如何,从而有助于调整靶向给定的所关注蛋白质的降解剂的功效和选择性。

[1187] 总的来说,我们的研究进一步证明了使用基于ABPP的化学蛋白质组学平台来鉴定天然产物所采用的独特有药可用性药征的实用性。有趣的是,我们表明天然产物可以功能

性地访问E3连接酶蛋白质-蛋白质相互作用位点,以用于潜在的癌症治疗和靶蛋白降解应用,并且在蛋白质的内在无序区域中确实如此。我们的研究还展示了如何利用共价配体筛选方法来鉴定更易于合成处理的小分子,这些小分子的作用类似于更复杂的天然产物,并且所述小分子可能能够利用其它E3连接酶来扩大E3连接酶募集剂的范围。

[1188] 实例8.方法和测定

[1189] 细胞培养。231MFP细胞获得自本杰明·克拉瓦特(Benjamin Cravatt)教授,并从MDA-MB-231细胞的异种肿瘤移植物中产生,如先前所述³³。HCC38细胞和HEK293T细胞获自美国典型培养物保藏中心。在含有10% (v/v) 胎牛血清(FBS)的DMEM中培养HEK293T细胞,并将其维持在37℃下(5%CO₂)。在含有10%FBS的L15培养基中培养231MFP,并将其维持在37℃下(0%CO₂)。在含有10%FBS的RPMI培养基中培养HCC38细胞,并将其维持在37℃下(5%CO₂)。HAP1 RNF114野生型和基因敲除细胞系购自Horizon Discovery。通过CRISPR/Cas9生成RNF 114敲除细胞系,以在RNF 114的编码外显子中含有移码突变。在存在10%FBS和青霉素/链霉素的情况下,在Iscove改良的Dulbecco培养基(IMDM)中生长HAP1细胞。

[1190] 存活和增殖测定。根据制造商的方案并如先前所述,使用Hoechst 33342染料(Invitrogen)如先前所述进行细胞存活和增殖测定¹⁴。将231MFP细胞以150μl的体积接种到96孔板中(40,000个用于存活,20,000个用于增殖),并使其粘附过夜。用另外的50μL培养基处理细胞,所述培养基含有1:250稀释的DMSO中的1000x化合物储备液。适当的孵育期后,从每个孔中移出培养基,并向每个孔中添加含有10%福尔马林和Hoechst 33342染料的100μl染色溶液,并在黑暗中于室温下孵育15分钟。孵育后,除去染色溶液,并在成像前用PBS洗涤孔。还如上所述进行了关于HCC38细胞的研究,但是接种了20,000个细胞用于存活,并接种了10,000个细胞用于增殖。

[1191] 评估乳腺癌细胞的凋亡。使用流式细胞仪分析用DMSO媒剂或含无血清培养基的化合物处理24小时或48小时的细胞中的凋亡细胞。如前所述,我们测量了膜联蛋白V阳性和碘化丙啶阴性的早期凋亡细胞以及膜联蛋白V阳性和碘化丙啶阳性的晚期凋亡细胞的百分比³⁴。使用FlowJo软件进行数据分析。

[1192] IsoTOP-ABPP的化学蛋白质组学研究。如先前所报道的完成IsoTOP-ABPP研究^{12,14,15}。通过在PBS中进行探针超声处理裂解细胞,并通过BCA分析测定蛋白质浓度³⁵。对于原位实验,在细胞收集和裂解之前,先用DMSO媒剂或共价作用的小分子(来自1000X DMSO储备液)将细胞处理90分钟。随后在室温下用IA-炔烃标记(100μM)标记蛋白质组,持续1小时。通过依次添加三(2-羧乙基)膦(1mM, Sigma)、三[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(34μM, Sigma)、硫酸铜(II) (1mM, Sigma)和生物素-接头-叠氮化物(用TEV蛋白酶识别序列以及同位素轻或重缬氨酸功能化的接头)来使用CuAAC,以分别处理对照蛋白质组或经处理的蛋白质组。CuAAC后,通过以6500x g离心将蛋白质组沉淀,在冰冷的甲醇中洗涤,以1:1的对照/经处理比率合并,再次洗涤,然后变性,并通过在1.2% SDS/PBS中加热至80℃持续5分钟进行溶解。通过以6500x g离心沉淀不溶性组分,并将可溶性蛋白质组稀释于5ml 0.2% SDS/PBS中。将标记的蛋白质与抗生物素蛋白-琼脂糖珠(170μl重悬的珠/样品, Thermo Pierce)结合,同时在4℃下旋转过夜。通过分别在PBS和水中洗涤三次来富集与珠连接的蛋白质,然后将其重悬于6M尿素/PBS (Sigma)中,并在TCEP (1mM, Sigma)中还原,用碘乙酰胺(IA) (18mM, Sigma)烷基化,然后洗涤并重悬于2M尿素中,并用0.5μg/μl测序级胰蛋白酶

(Promega) 过夜进行胰蛋白酶消化。将胰蛋白酶肽洗脱掉。将珠分别在PBS和水中洗涤三次,在TEV缓冲溶液(水,TEV缓冲液,100 μ M二硫苏糖醇)中洗涤,并重悬于带有Ac-TEV蛋白酶的缓冲液中,并孵育过夜。将肽在水中稀释并用甲酸(1.2M,Spectrum)酸化,并准备进行分析。

[1193] 质谱分析。将来自所有化学蛋白质组学实验的肽通过压力上样到装有4cm Aqua C18反相树脂(Phenomenex#04A-4299)的250 μ m内径熔融石英毛细管上,所述反相树脂事先在10分钟内使用100%缓冲液A到100%缓冲液B的梯度在Agilent 600系列HPLC上进行平衡,然后用100%缓冲液B洗涤5分钟并用100%缓冲液A洗涤5分钟。然后使用MicroTee PEEK 360 μ m配件(Thermo Fisher Scientific#p-888)将样品连接到装有10cm Aqua C18反相树脂和3cm强阳离子交换树脂的13cm激光拉管柱上,以进行isoTOP-ABPP研究。使用Q Exactive Plus质谱仪(Thermo Fisher Scientific)使用5步多维蛋白质鉴定技术(MudPIT)程序,使用500mM醋酸铵水溶液的0%、25%、50%、80%、和100%盐块,并使用缓冲液A中5-55%缓冲液B的梯度(缓冲液A:95:5的水:乙腈,0.1%的甲酸;缓冲液B:80:20的乙腈:水,0.1%的甲酸),分析样品。在启用动态排除的情况下,以数据依赖性采集模式收集数据(60秒)。进行一次完整的MS(MS1)扫描(400-1800m/z),然后对第n个最丰富离子进行15次MS2扫描(ITMS)。将加热的毛细管温度设定为200 $^{\circ}$ C,并且将纳米喷雾电压设定为2.75kV。

[1194] 使用Raw Extractor 1.9.9.2(Scripps研究院)以MS1和MS2文件的形式提取数据,并使用IP2 v.3(Integrated Proteomics Applications,Inc)中的ProLuCID搜索方法在Uniprot人类数据库中进行搜索³⁶。搜索半胱氨酸残基,其中对羧基氨基甲基化进行静态修饰(+57.02146),对甲硫氨酸氧化和轻度或重度TEV标签进行至多两个差异修饰(分别为+464.28596或+470.29977)。要求肽是完整的胰蛋白酶肽,并且含有TEV修饰。通过DTASelect过滤ProLuCID数据,以使肽假阳性率低于5%。仅对在三个生物学重复中的两个生物学重复中明显可见的那些经探针修饰的肽解释其同位素轻重比。对于比率>2的那些经探针修饰的肽,我们仅解释了所有三个生物学重复中存在的、具有统计学意义并且在所有三个生物学重复中均显示出高质量的MS1峰形的那些靶标。通过取与肽相关的所有肽光谱匹配(PSM)的每个重复配对的轻对重前体丰度之比的平均值,计算轻对重同位素探针修饰的肽之比。配对的丰度还用于计算配对的样品t检验p值,以估算配对的丰度内的恒定性以及治疗与对照之间变化的显著性。使用Benjamini/Hochberg方法校正了P值。

[1195] 通过RNA干扰(RNAi)在231MFP细胞中抑制RNF114、CDKN1A(p21)和CDKN1C(p57)的敲低。通过使用购自Dharmacon的特异于RNF114或p21和p57的siRNA进行RNAi双重敲低。简而言之,以96孔格式以每毫升全培养基 5×10^4 个细胞的密度接种231MFP细胞。在第0天,使用Dharmafect 1(Dharmacon)作为转染试剂,将231MFP细胞与对应的小干扰RNA(siRNA)对比非靶向阴性对照(Dharmacon,ON-TARGETplus非靶向PoolID-001810-10-05)双链体(50nM)一起转染48小时。此后(第2天),在转染培养基中补充新鲜的DMSO或含完全L15培养基的化合物,并再培养24到48小时,然后再进行如上所述的细胞活力测试。在处理时(第2天),提取RNA进行qRT-PCR分析,并获得裂解物对敲低进行蛋白质印迹确认。

[1196] 靶向序列:

[1197] siRNF114-1:GUGUGAAGGCCACCAUUA(SEQ ID NO:10)(Dharmacon J-007024-08-0002)

[1198] siRNF114-2:GCUUAGAGGUGUACGAGAA(SEQ ID NO:11)(Dharmacon J-007024-05-

0002)

[1199] siRNF114-3:GCACGGAUACCAAAUCUGU (SEQ ID NO:12) (Dharmacon J-007024-06-0002)

[1200] siCDKN1A:AGACCAGCAUGACAGAUUU (SEQ ID NO:13) (Dharmacon J-003471-12-0002)

[1201] siCDKN1C:CUGAGAAGUCGUCGGGCGA (SEQ ID NO:14) (Dharmacon J-003244-13-0002)

[1202] 通过qPCR进行基因表达。使用Trizol (Thermo Fisher Scientific) 从细胞中提取总RNA。使用MaximaRT (Thermo Fisher Scientific) 合成cDNA, 并使用CFX Connect实时PCR检测系统 (BioRad) 上的Fisher Maxima SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) 的制造商方案通过qPCR确认基因表达。Fisher Maxima SYBR Green的引物序列来自引物库 (Primer Bank)。引物的序列如下:

[1203] RNF114正向:AAT GTT CCA AAC CG (SEQ ID NO:6)

[1204] RNF114反向:TTG CAG TGT TCC AC (SEQ ID NO:7)

[1205] CDKN1A正向:TGT CCG TCA GAA CCC ATG C (SEQ ID NO:15)

[1206] CDKN1A反向:AAA GTC GAA GTT CCA TCG CTC (SEQ ID NO:16)

[1207] PPIA (亲环素) 正向:CCC ACC GTG TTC TTC GAC ATT (SEQ ID NO:8)

[1208] PPIA (亲环素) 反向:GGA CCC GTA TGC TTT AGG ATG A (SEQ ID NO:9)

[1209] 通过qPCR进行基因表达。使用制造商的Fisher Maxima SYBR Green方案通过qPCR确认基因表达。Fisher Maxima SYBR Green的引物序列来自引物库 (Primer Bank)。引物的序列如下:

[1210] RNF114正向:AAT GTT CCA AAC CG (SEQ ID NO:6)

[1211] RNF114反向:TTG CAG TGT TCC AC (SEQ ID NO:7)

[1212] PPIA (亲环素) 正向:CCC ACC GTG TTC TTC GAC ATT (SEQ ID NO:8)

[1213] PPIA (亲环素) 反向:GGA CCC GTA TGC TTT AGG ATG A (SEQ ID NO:9)

[1214] 基于凝胶的ABPP。如前所述执行基于凝胶的ABPP方法¹⁴。重组纯人蛋白质购自Origene。将纯蛋白 (0.1 μ g) 在室温下以50 μ L PBS的孵育体积用DMSO媒剂或共价作用的小分子预处理30分钟, 然后用JNS-1-27 (50 μ M最终浓度) 在室温下处理1小时。进行CuAAC以将若丹明-叠氮化物 (1 μ M最终浓度) 附加到炔烃探针标记的蛋白上。然后将样品用20 μ L的4x还原Laemmli SDS样品上样缓冲液 (Alfa Aesar) 稀释, 并在90 $^{\circ}$ C下加热5分钟。在预制的4-20% TGX凝胶 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 上分离样品。在通过ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc) 扫描之前, 将凝胶固定在10%乙酸、30%乙醇的溶液中2小时。使用ImageJ通过光密度测定法评估靶标标记的抑制作用。

[1215] 共价配体库。先前已经报道了针对RNF114筛选的大多数共价配体的合成和表征^{14,37-39}。先前已经报道了TRH 1-156、TRH 1-160、TRH 1-167、YP 1-16、YP 1-22、YP 1-26、YP 1-31、YP 1-44的合成⁴⁰⁻⁴⁷。以“EN”开头的化合物购自Enamine LLC。实例9中描述了先前未报道的其它共价配体的合成和表征。

[1216] 蛋白质印迹。RNF114 (Millipore Sigma, HPA021184)、p21 (Cell Signaling Technology, 12D1)、GAPDH (Proteintech Group Inc., 60004-1-Ig)、BRD4 (Abcam plc,

Ab128874)、DYKDDDDK标签(Cell Signaling Technology,D6W5B)和 β -肌动蛋白(Proteintech Group Inc.,6609-1-Ig)可从各种商业渠道获得,并按照推荐的制造商程序制备稀释液。通过SDS/PAGE解析蛋白质,并使用iBlot系统(Invitrogen)将其转移到硝酸纤维素膜上。在室温下,将印迹用含Tween 20(TBST)溶液的Tris缓冲盐水中的5%BSA封闭1小时,在TBST中洗涤,然后用在每个制造商的推荐稀释剂中稀释的一抗在4℃下过夜探测。用TBST洗涤后,将印迹与购自Ly-Cor的二抗在黑暗中一起孵育,并在室温下在含5%BSA的TBST中以1:10,000的稀释度使用。额外清洗后,使用Odyssey Li-Cor扫描仪将印迹可视化。如果需要额外的一抗孵育,则使用ReBlot Plus强抗体剥离液(EMD Millipore,2504)剥离膜,清洗并再次封闭,然后再与一抗一起重新孵育。

[1217] 野生型和C8A突变体RNF114蛋白的表达和纯化。使用几种方法表达和纯化RNF114。在每种情况下,都证实了RNF114活性和对印苦楝内酯的敏感性。对于第一种方法,我们从Origene(Origene Technologies Inc.,RC209752)购买了具有C端FLAG标签的野生型哺乳动物表达质粒。根据制造商的说明(New England Biolabs,E0554S),使用Q5定点诱变试剂盒产生了RNF114 C8A突变体。如前所述优化了表达和纯化条件⁴⁸。将HEK293T细胞在补充有10%FBS(Corning)和2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies)的DMEM(Corning)中生长至60%融合,并保持在37℃,5%CO₂下。转染前,立即用含有5%FBS的DMEM替换培养基。用20 μ g具有100 μ g PEI(Sigma)的过表达质粒转染每个板。48小时后,将细胞收集在TBS中,通过超声处理裂解,并与抗DYKDDDDK树脂(GenScript,L00432)分批结合,持续90分钟。将裂解液和树脂上样至重力流柱并洗涤,然后用250ng/ μ L 3 x FLAG肽(ApexBio,A6001)洗脱。通过PAGE、UV/光谱和BCA分析验证纯度和浓度。

[1218] 对于第二种方法,对编码RNF114的完整人类同工型的DNA(Uniprot id:Q9Y508)进行密码子优化以在大肠杆菌中表达,并通过整合DNA技术进行合成。使用含有与pET24a质粒(Novagen)同源的20个碱基对的引物,对含有完整RNF114序列的构建体进行扩增,所述质粒还含有NdeI和BamHI限制性酶切位点之间的His8-MBP-TEV序列。使用1%琼脂糖凝胶(Invitrogen)评估PCR产物,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)纯化正确长度的PCR产物。使用吉布森组装(Gibson Assembly)(NEB Gibson Assembly 2x Master Mix)将纯化的PCR产物装配到线性化的载体中。然后将该载体转化到化学感受态大肠杆菌10G细胞(Lucigen,Middleton,WI)中。将卡那霉素(Kan)抗性菌落在LB培养基中生长,并使用Miniprep(Qiagen)试剂盒分离质粒,然后使用适当的引物进行序列验证。

[1219] 将含有期望的RNF114构建体的pET24a His₈-MBP质粒(100ng)转化到化学感受态大肠杆菌BL21(DE3)细胞(NEB产品编号C2530H)中。第二天,使用单个转化菌落接种50mL含有卡那霉素(50 μ g/mL)的富含营养的LB培养基,并在搅拌下(250rpm)于37℃下孵育过夜。第二天早晨,在含有50mM 3-(N-吗啉代)丙烷磺酸(MOPS)pH 7.5、1mM氯化锌和Kan(50 μ g/mL)的超级肉汤(TB)(1L)中,将过夜的发酵剂培养物接种至在500nm处的初始光密度(OD₆₀₀)为0.1。在250rpm搅拌下于37℃下生长细胞,直至达到OD₆₀₀为0.8。在这一阶段,用1mM异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导RNF114融合蛋白的表达,并将孵育箱的温度降至18℃。在18℃下生长18小时后,通过离心收集细胞。随后将细胞用1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲液洗涤,并保存在-20℃下。

[1220] 将含有过量表达的RNF114融合蛋白的大肠杆菌细胞(10g)重悬于80mL裂解缓冲液

(50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 2个罗氏 (Roche) 蛋白酶抑制剂片剂[无EDTA], 200mM ZnCl_2 , 1mM DTT) 中并在冰上进行超声处理, 循环时间为打开60秒, 关闭60秒, 整个超声处理时间为三分钟。将细胞裂解液以18,000rpm离心20分钟, 然后将可溶性蛋白与2mL已用洗涤缓冲液(50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 200mM ZnCl_2 , 1mM DTT, 25mM咪唑) 预先平衡的Ni-NTA树脂一起在4℃下搅拌下孵育四小时。将细胞裂解物/Ni-NTA树脂混合物放入一次性柱中, 并收集未结合树脂的所有未标记的可溶性蛋白质, 以进行第二轮纯化。用25mL洗涤缓冲液洗涤树脂, 然后用25mL洗脱缓冲液(50mM tris, pH 7.5, 500mM咪唑, 200mM ZnCl_2 , 150mM NaCl, 1mM DTT) 从Ni-NTA树脂中洗脱His-MBP-RNF114蛋白。重复该过程, 用另外的2mL预平衡的Ni-NTA树脂彻底孵育所收集的液流。

[1221] 将His-MBP-RNF114蛋白在4℃下用TEV蛋白酶(100单位/mg MBP-RNF114) 同时消化, 并在透析缓冲液(50mM tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 200mM ZnCl_2 , 1mM DTT) 中透析过夜。第二天早晨, 将两个串联组装的5mL His Trap Excel色谱柱放在ÄktaAvant上, 并用五个柱体积的洗涤缓冲液平衡。将TEV裂解的样品以2毫升/分钟的速率上样到色谱柱上, 并用另外五个柱体积的洗涤缓冲液洗涤树脂。将含有裂解的RNF114的所有级分浓缩至5ml体积。然后将样品上样到预先平衡的HiLoad 16/60 Superdex 75凝胶过滤柱(GE Healthcare) 上。用25mM Tris, pH 7.5, 137mM NaCl或20mM磷酸钠pH 6.8, 150mM NaCl预平衡色谱柱。使用0.25毫升/分钟的流速运行凝胶过滤柱, 并收集2mL级分。使用SDS-PAGE分析与从凝胶过滤柱洗脱出的峰相对应的级分, 并将含有RNF114的所有级分浓缩至最终浓度为10mg/mL, 在液氮中速冻, 并保存在-80℃下, 直至需要。

[1222] 通过慢病毒转导产生稳定表达的FLAG-RNF114 231 MFP细胞系。将具有C端FLAG标签的人RNF114通过FastCloning插入pLenti载体中⁴⁹。通过使用Lipfectamine 2000转染试剂(ThermoFischer) 将FLAG-RNF114、VSV.G和psPAX2共转染到HEK 293T细胞中, 可以生成FLAG-RNF114慢病毒。转染后24小时, 将培养基换成具有10%热灭活的血清(HIS) 的DMEM, 并且在另外24小时后, 收集含病毒的培养基, 并在存在10μg/mL聚乙烯(Santa Cruz) 的情况下, 用0.45μm滤膜过滤到具有等体积HIS L15培养基的231MFP细胞上。转导后24小时, 将嘌呤霉素(2μg/mL) 添加至细胞, 并在选择嘌呤霉素72小时后获得稳定表达的FLAG-RNF114。平行产生稳定表达FLAG-eGFP的231MFP细胞作为对照。

[1223] 原位印苦楝内酯-炔烃探针标记和FLAG-RNF114下拉。将稳定表达FLAG-RNF114的231MFP细胞用媒剂(DMSO) 或100nM到10μM的印苦楝内酯炔烃探针处理2-4小时。在PBS中收获细胞, 并通过超声裂解。通过BCA测定法将裂解物的总蛋白浓度归一化, 并将标准化的裂解物在4℃下与50μL或FLAG-琼脂糖浆一起孵育1.5小时。孵育后, 将样品转移至离心柱中, 并用500μL PBS洗涤3次。使用补充有250ng/μL 3 x FLAG肽(ApexBio A6001) 的2 50μL PBS洗涤液洗脱蛋白质。进行CuAAC以将若丹明-叠氮化物附加到经炔烃探针标记的蛋白质上, 并在添加上样缓冲液后, 在预制的4-20%TGX凝胶(Bio-Rad Laboratories, Inc.) 上分离样品, 并在ChemiDoc MP(Bio-Rad Laboratories, Inc) 上成像。

[1224] RNF114的LC-MS/MS分析。将50μL PBS中的纯化的RNF114(10μg) 与DMSO媒剂或共价作用的化合物(100μM) 一起在室温下孵育30分钟。然后, 分别在室温下将DMSO对照用轻质IA处理, 同时将经化合物处理的样品用重质IA孵育1小时(200μM最终浓度, Sigma-Aldrich, 721328)。通过再加入12.5μL 100% (w/v) TCA来沉淀样品, 并将治疗组和对照组成对合并,

然后冷却至-80℃,持续1小时然后将合并的样品在4℃下以最大速度离心10分钟,小心地除去上清液,并用冰冷的0.01M HCl/90%丙酮溶液洗涤样品。将沉淀物重悬于含有0.1% Protease Max(Promega Corp.V2071)的4M尿素中,并在40mM碳酸氢铵缓冲液中稀释。将样品在60℃下用10mM TCEP还原30分钟。然后将样品用PBS稀释50%,然后加入测序级胰蛋白酶(每个样品1μg,Promega Corp,V5111),在37℃下过夜孵育。第二天,将样品以13200rpm离心30分钟。将上清液转移至新试管中,酸化至最终浓度为5%的甲酸,并保存在-80℃下,直至进行MS分析。

[1225] RNF114泛素化测定。如上所述,从HEK292T细胞纯化重组Myc-Flag-RNF114蛋白,或从Origene(Origene Technologies Inc.,TP309752)购买。对于体外自体泛素化测定,将25μL TBS中的0.2μg RNF114与DMSO媒剂或共价作用的化合物一起在室温下预孵育30分钟。随后,加入0.1μg UBE1(Boston Biochem.Inc,E-305)、0.1μg UBE2D1(Boston Bichem.Inc,e2-615)、5μg的Flag-泛素(Boston Bichem.Inc,u-120)(于含2mM ATP、10mM DTT和10mM MgCl₂的25μL Tris缓冲液中),以达到50μL的最终体积。对于底物蛋白泛素化测定,在此阶段添加了0.1μg的适当底物蛋白(购自商业渠道)(p21和PEG10:Origene,CTGF:R&D Systems)。将混合物在37℃下搅拌孵育1.5小时。加入20μL的Laemmli缓冲液以淬灭反应,并通过蛋白质印迹测定法对蛋白质进行分析。

[1226] RNF114/p21的共同免疫沉淀。使用抗Flag琼脂糖珠(GenScript Biotech Corp.,L00432),将带有Flag标签的重组RNF114用作诱饵,以沉淀纯的重组p21(Origene Technologies Inc.,TP309752和TP720567)。将一微克的Flag-RNF114添加到50μL的TBS中,然后添加印苦楝内酯(100μM最终浓度,Cayman Chemical Co.,19230)或等体积的DMSO。将样品在室温下孵育30分钟。向每个样品中加入一微克纯p21,并将样品在室温下搅拌孵育30分钟。将十微升的Flag琼脂糖珠粒添加到每个样品中,并将样品在室温下搅拌30分钟。进行洗涤(3次,1mL TBS),然后使用补充有250ng/μL 3 x FLAG肽(ApexBio A6001)的50μL TBS洗脱蛋白质。收集上清液(30μL),在加入Laemmli还原剂(10μL)后,将样品在95℃下煮沸5分钟,然后冷却。如上所述,通过蛋白质印迹分析样品。

[1227] 原位印苦楝内酯-炔烃探针标记和生物素叠氮化物下拉。遵循先前描述的方案进行实验⁵⁰。将231MFP细胞用媒剂(DMSO)或50μM的印苦楝内酯炔烃探针处理90分钟。在PBS中收获细胞,并通过超声裂解。为了制备蛋白质印迹样品,将每个样品等分195μL裂解液,在其中加入25μL的10%SDS、5μL的5mM生物素吡啶甲基叠氮化物(900912 Sigma-Aldrich)和25μL单击反应混合物(3份TBTA(5mM TBTA,丁醇:DMSO(4:1,v/v)中)、1份50mM的Cu(II)SO₄溶液和1份50mM TCEP)。将样品在37℃下温和搅拌孵育2小时,然后加入1.2mL冰冷的丙酮。在-20℃下过夜沉淀后,将样品在1250g的预冷离心机中离心10分钟,以吸出过量的丙酮,随后通过探针超声处理将蛋白质沉淀物重新溶解在含有1%SDS的200μL PBS中。在这一阶段,通过BCA分析确定总蛋白浓度,并将样品归一化为230μL的总体积,其中保留30μL作为输入。向每个样品中加入20μL预洗的50%链霉亲和素琼脂糖珠浆,并在室温下轻轻搅拌将样品孵育过夜。在室温下以90g旋转2分钟后,从每个样品中吸出上清液。将珠转移到旋转柱上,并用PBS洗涤3次。为了洗脱,将珠在50μL LDS样品缓冲液中煮沸5分钟。通过离心收集洗脱液,并通过免疫印迹进行分析。如下所述,在基于TMT的定量蛋白质组分析中对所得样品进行分析。

[1228] 基于TMT的定量蛋白质组分析。

[1229] 细胞裂解、蛋白水解和同量异序标记。按照制造商的说明,使用市售的用于培养细胞的Pierce™质谱样品制备试剂盒(Thermo Fisher Scientific,P/N 84840)裂解并消化经处理的细胞团。简而言之,使用内切蛋白酶Lys-C和胰蛋白酶的组,将每个样品中的100μg蛋白还原、烷基化并消化过夜。然后根据制造商的方案,使用市售的串联质量标签™ 6-plex (TMTsixplex™) (Thermo Fisher Scientific,P/N 90061) 或TMT11plex (TMT11plex™) 同量异序标记试剂(Thermo Fisher Scientific,P/N 23275) 试剂盒,用同量异序标签标记单个样品。

[1230] 高pH反相分离。然后合并串联质量标签标记(TMT)的样品,并使用高pH反相色谱(RP-10)进行分离,并如前所述收集级分⁵⁰。将级分快速真空干燥,然后重构以产生24个级分,用于随后的在线nanoLC-MS/MS分析。

[1231] 通过nanoLC-MS/MS进行蛋白质鉴定和定量。在偶联至EasyLC 1200 HPLC系统(Thermo Fisher Scientific)的Thermo Orbitrap Fusion Lumos质谱仪(Xcalibur 4.1, Tune Application 3.0.2041)上分析了重构的RP-10级分。EasyLC 1200配备有20μL环,可用于96孔板。将装有ReproSil-Pur 120 C18-AQ、5μm材料(床长15mm)的Kasil陷井捕集柱(内径75μm)和160mm长,内径为75μm的喷涂毛细管一起使用,使用P-2000毛细管拉拔器(Sutter Instruments,诺瓦托,加利福尼亚州)将所述喷涂毛细管拉至尖端直径约8-10μm。在160mm分离柱中装填ReproSil-Pur 120 C18-AQ,3μm材料(德国Ammerbuch-Entringen的Maisch GmbH博士)。流动相由A=0.1%甲酸/2%乙腈(v/v)和流动相B=0.1%甲酸/98%乙腈(v/v)组成。使用流动相A以2.5微升/分钟的流速将样品(18μL)注入到捕集柱上。然后使用80分钟的梯度(2%流动相B洗脱5分钟,第5-65分钟为2%-40%的B,然后第65-70分钟为70%的B,然后第70-80分钟返回到2%的B)在毛细管分离柱上以300标准升/分钟的流速通过直接喷入质谱仪中来洗脱肽。使用同步前体扫描MS³模式(SPS-MS3)在Orbitrap Fusion Lumos质谱仪上以数据依赖性模式获取数据,其中MS²触发在完整的MS调查扫描事件中发现的300-1500质荷比(m/z)范围内的12种最强前体离子。以m/z 400,60,000质量分辨率(R)获得MS扫描,目标值为4x10⁵个离子,最大填充时间为50毫秒。以CID离子阱(IT)快速类型扫描的形式获得MS²扫描,目标值为1x10⁴个离子,最大填充时间为50毫秒,隔离窗口为2Da。使用前10个MS²子选择,通过Orbitrap(OT)扫描获得数据相关的MS³光谱,自动增益控制(AGC)目标为5x10⁴个离子的,扫描范围为m/z 100-500。MS³的最大进样时间为86毫秒,HCD碰撞能量设置为65%。对于TMT6plex实验,MS³质量分辨率(R)在m/z 400下设置为15,000,对于TMT11-plex实验,在m/z 400下设置为50,000。设置动态排除以将选定的前体排除60秒,重复计数为1。纳米喷雾电压设置为2.2kV,加热的毛细管温度设置为300℃,S透镜RF电平等于30%。不施加护套或辅助气流。

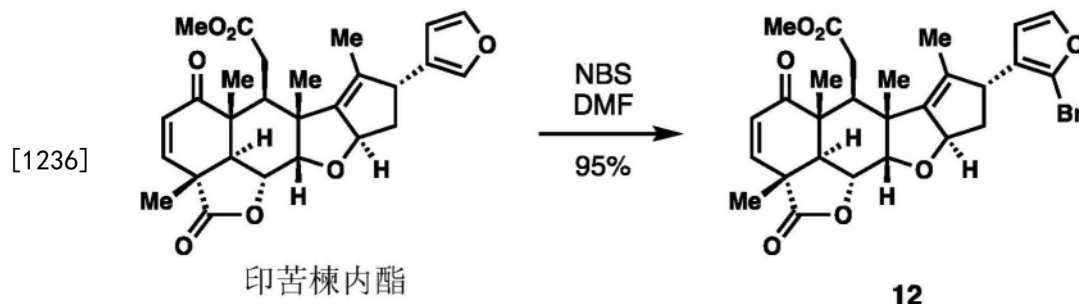
[1232] 数据处理和分析。使用Proteome Discoverer v处理获取的MS数据。2.2.0.388软件(Thermo)利用Mascot v 2.5.1搜索引擎(Matrix Science,伦敦,英国)以及用于肽谱匹配过滤的Percolator验证节点⁵¹。在Uniprot蛋白数据库(人和小鼠的规范序列,EBI,英国剑桥)上搜索数据,并补充常见污染物的序列。对于前体,肽搜索耐受性设置为10ppm,对于片段,则为0.8Da。胰蛋白酶的切割特异性(除非后面是P,否则在K、R处进行切割)最多允许2次错位切割。半胱氨酸的氨基甲酰甲基化设置为固定修饰,N端和赖氨酸残基的蛋氨酸氧化和TMT修饰设置为可变修饰。肽和蛋白质鉴定的数据验证是通过蛋白质组发现器中的

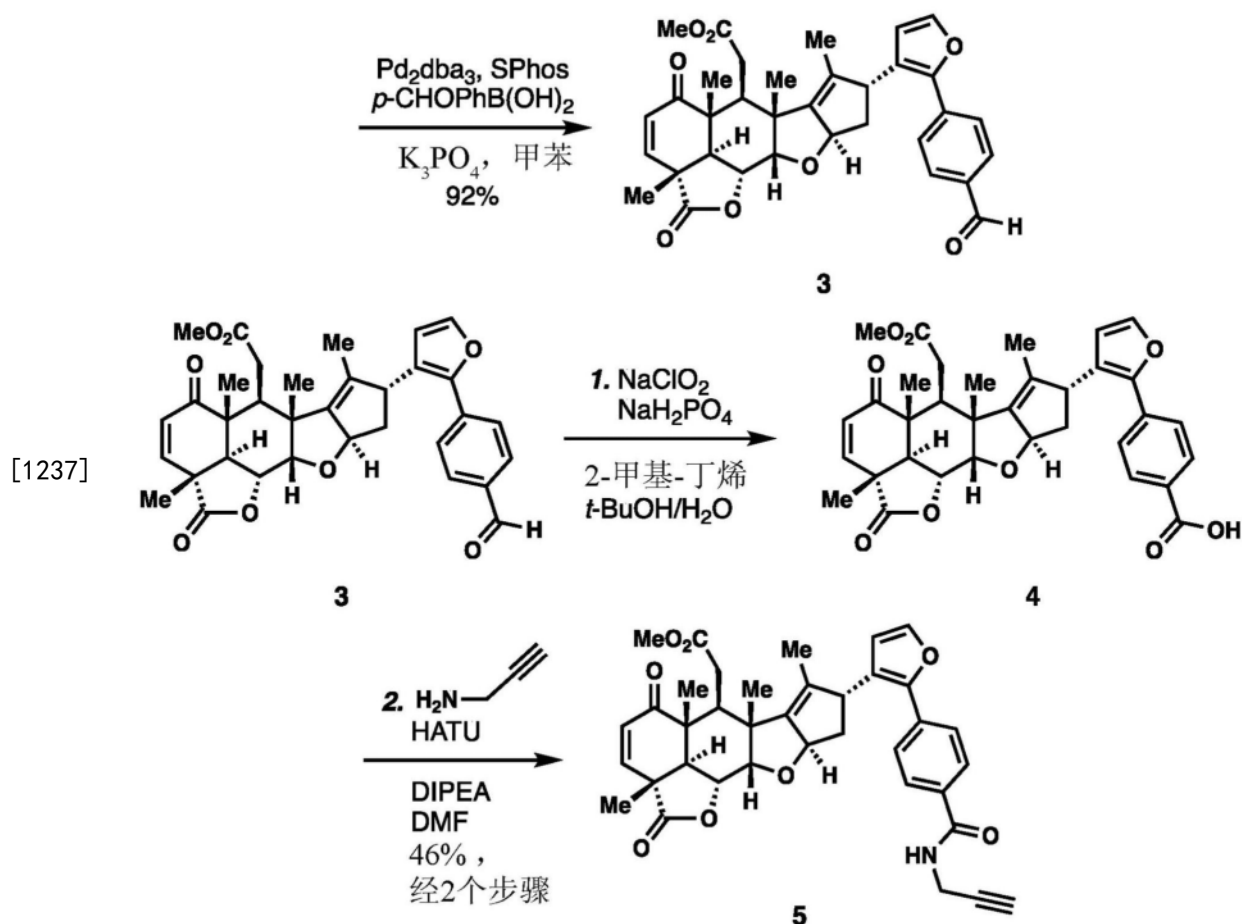
Percolator验证节点,在每个实验的所有单独样品的组合Mascot搜索结果组成的完整数据集级别上进行的。使用从20ppm窗口中选择的最可靠质心的总和进行丰度,从而进行报告离子比率的计算。仅对总数据集中给定已鉴定蛋白质的唯一分配(即肽与谱的匹配)才被考虑用于蛋白质定量。使用Percolator估计的<1%错误发现率(FDR)临界值报告了高可信度蛋白质鉴定。使用具有Benjamini-Hochberg校正的基于背景的ANOVA来估算差异丰度的显著性,以确定调整后的p值。

[1233] 实例9. 另外的合成和表征数据

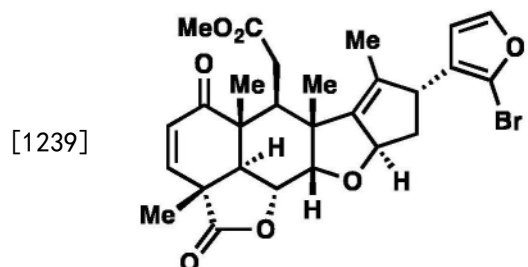
[1234] 印苦楝内酯-炔烃探针(5)和降解剂XH1(9)和XH2(10)的合成和表征

[1235] 通用程序。除非另有说明,否则所有反应均在干燥的氮气气氛下,在带有黑色酚醛螺帽(13-425)的烤箱干燥或火焰干燥的Fisherbrand®硼硅酸盐玻璃管(Fisher Scientific, 1495925A, 13×100mm)中进行。使这些预先脱气的溶剂通过活性氧化铝柱,即可得到干燥的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、甲苯和乙腈。印苦楝内酯购自Sigma-Aldrich或Cayman Chemical,并且无需进一步纯化即可直接使用。炔丙基胺和N-甲基炔丙基胺购自Fisher Scientific,并且无需进一步纯化即可直接使用。通过薄层色谱法(TLC)在TLC硅胶60 F254玻璃板(EMD Millipore)上监测反应,并通过UV辐射可视化并用对甲氧基苯甲醛、磷钼酸或高锰酸钾进行染色。使用旋转蒸发仪在减压下除去挥发性溶剂。使用Silicycle F60硅胶(60Å, 230-400目, 40-63μm)进行快速柱色谱法。乙酸乙酯和己烷购自Fisher Chemical,并且无需进一步纯化即可用于色谱法。将质子核磁共振(^1H NMR)和碳核磁共振(^{13}C NMR)光谱记录在Bruker AV-600和AV-700光谱仪上,对于 ^1H ,所述光谱仪分别在600和700MHz下工作,而对于 ^{13}C ,则在150和175MHz下工作。相对于残留的溶剂信号 CDCl_3 (^1H NMR: $\delta=7.26$; ^{13}C NMR: $\delta=77.16$)、 CD_2Cl_2 (^1H NMR: $\delta=5.32$; ^{13}C NMR: $\delta=53.84$),以百万分之一(ppm)报告化学位移。峰多重性报告如下:s=单峰,d=二重峰,t=三重峰,dd=双二重峰,tt=三个三重峰,m=多重峰,br=宽信号,app=表观。在Nicolet 380 FT-IR光谱仪上记录IR光谱。通过加利福尼亚大学伯克利分校的QB3/化学质谱仪设施获得高分辨率质谱(HRMS)。在Perkin-Elmer 241旋光仪上测量旋光度。



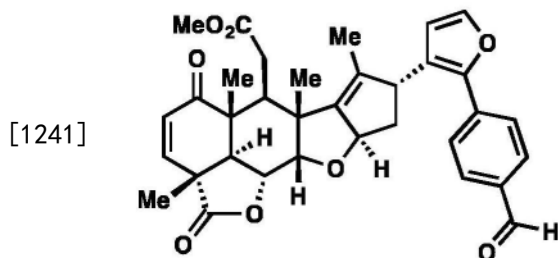


[1238] 方案S1. 印苦楝内酯-炔烃探针 (5) 的合成。



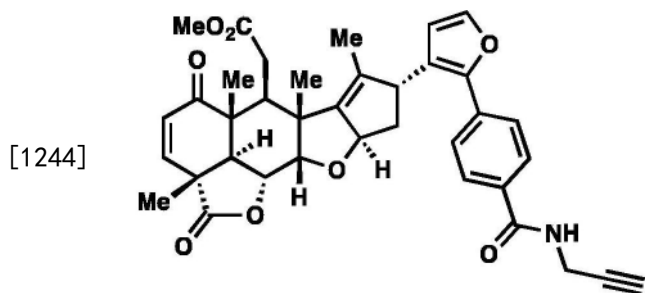
[1240] 溴印苦楝内酯 (12): 将印苦楝内酯 (100mg, 0.214mmol) 均匀分成四个反应管 (Fisher Scientific, 13×100mm), 每个反应管装有搅拌棒。将试管抽真空并用氮气回填, 加入干燥的DMF (各0.25mL), 然后将所得溶液在冰浴中冷却至0℃。将重结晶的N-溴琥珀酰亚胺 (40.0mg, 0.225mmol) 溶解在干燥DMF (4mL) 中, 并将溶液缓慢添加到每个反应管中 (各1mL)。将反应混合物在0℃下搅拌1小时, 然后通过加入饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (各5mL) 进行淬灭。将所得混合物合并, 并用EtOAc (3×20mL) 萃取。将合并的有机层用 H_2O (50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。将粗混合物通过柱色谱法纯化 (EtOAc: 己烷=1:3 到1:1), 从而得到呈白色泡沫的 (12) (111mg, 95%); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +190.3^\circ$ (c 0.010 g/mL, CHCl_3); ^1H NMR (700MHz, CDCl_3) δ 7.34 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 7.28 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 6.29 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 5.92 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 5.56 (app. tt, $J=7.4, 1.8\text{Hz}$, 1H), 4.62 (dd, $J=12.5, 3.7\text{Hz}$, 1H), 4.27 (d, $J=3.7\text{Hz}$, 1H), 3.67 (brd, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.24 (dd, $J=16.3, 5.5\text{Hz}$, 1H), 3.18 (d, $J=12.5\text{Hz}$, 1H), 2.75 (dd, $J=5.5, 5.5\text{Hz}$, 1H), 2.36 (dd, $J=16.3,$

5.5Hz, 1H), 2.18-2.13 (m, 2H), 1.66 (d, $J=1.4$ Hz, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H); ^{13}C NMR (175MHz, CDCl_3) δ 200.9, 175.0, 173.2, 149.8, 145.4, 144.2, 136.1, 131.2, 125.2, 120.3, 112.1, 88.5, 83.1, 73.5, 52.0, 50.5, 50.0, 47.9, 45.4, 43.8, 41.2, 40.4, 32.2, 18.7, 17.3, 15.3, 13.0; IR (薄膜, cm^{-1}) 2974, 2929, 2875, 1783, 1734, 1678, 1594, 1438, 1394, 1373; HRMS (ESI) 计算得出 $[\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{BrNa}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$: m/z 567.0989, 实测值567.0990。



[1242] 醛(3):向反应管(Fisher Scientific, 13×100mm)中装入搅拌棒、(12) (12mg, 0.022mmol, 1当量)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (10mg, 0.011mmol, 0.5当量)、SPhos (10mg, 0.024mmol, 1当量)、无水 K_3PO_4 (35mg, 0.17mmol, 7.5当量)和4-甲酰基苯基硼酸(16mg, 0.11mmol, 5当量)。将管抽空,并用氮气回填,并加入干燥的甲苯(0.5mL)。将所得混合物在60℃下加热48小时,冷却至室温,并通过Celite®塞。将滤液真空浓缩并通过柱色谱法纯化(EtOAc:己烷=1:3到1:1),从而得到呈淡黄色油状物的醛(3) (11.5mg, 92%): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.8^\circ$ (c 0.005 g/mL, CHCl_3); ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 10.01 (s, 1H), 7.92 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=9.7$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.60 (app. tt, $J=7.3, 1.7$ Hz, 1H), 4.64 (dd, $J=12.5, 3.6$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (dd, $J=16.4, 5.5$ Hz, 1H), 3.20 (d, $J=12.5$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J=5.5, 5.5$ Hz, 1H), 2.41 (dd, $J=16.4, 5.5$ Hz, 1H), 2.31-2.27 (m, 2H), 1.69 (d, $J=1.7$ Hz, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.25 (s, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 200.8, 191.7, 175.0, 173.2, 149.8, 147.9, 146.3, 143.1, 137.0, 136.1, 134.8, 131.1, 130.3, 126.1, 126.0, 112.6, 88.4, 83.3, 73.4, 52.1, 50.8, 50.0, 47.9, 45.5, 43.8, 41.3, 32.5, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4; IR (薄膜, cm^{-1}) 2977, 2935, 2873, 1782, 1733, 1702, 1677, 1608, 1438, 1393, 1372; HRMS (ESI) 计算得出 $[\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_8\text{Na}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$: m/z 593.2146, 实测值593.2154。

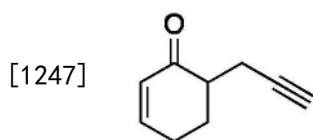
[1243] [注意:醛(3)在制备型TLC条件下不稳定]



[1245] 印苦楝内酯炔烃探针(5):i.向反应管(Fisher Scientific, 13×100mm)中装入搅拌棒、醛(3) (7.0mg, 0.012mmol, 1当量)以及t-BuOH和2-甲基-2-丁烯的混合物(0.6mL, 3:5 v/v)。一份地添加 NaClO_2 (3.3mg, 3当量)和 NaH_2PO_4 (13.2mg, 9当量)于 H_2O (0.2mL)中的溶液,并将所得混合物在室温下搅拌6小时。通过TLC判断反应完成后(EtOAc:己烷=2:1),将混合

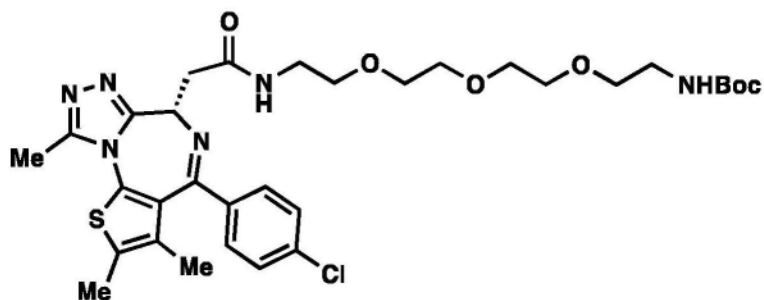
物用EtOAc (10mL) 和饱和NH₄Cl水溶液 (10mL) 稀释,并通过EtOAc (10mL×2) 萃取水相。将合并有机层用盐水 (20mL) 洗涤,经MgSO₄干燥,并真空浓缩。所得粗羧酸 (4) 无需进一步纯化即可直接使用。

[1246] ii.向装有搅拌棒、粗酸 (4) (假定0.012mmol) 和HATU (13.7mg, 0.036mmol, 3当量) 的反应管 (Fisher Scientific, 13×100mm) 中加入DIPEA (6.4μL, 0.036mmol, 3当量) DMF (0.1mL) 中的溶液。将所得混合物冷却至0℃, 并搅拌10分钟。然后加入炔丙胺 (1.6μL, 0.024mmol, 2当量) 于DMF (0.2mL) 中的溶液, 并将反应混合物在0-4℃下进一步搅拌12小时。通过TLC判断反应完成后 (EtOAc:己烷=2:1), 将混合物用EtOAc (10mL) 和饱和NH₄Cl水溶液 (10mL) 稀释, 并通过EtOAc (10mL×2) 萃取水相。将合并的有机层用H₂O (20mL)、盐水 (20mL) 洗涤, 经MgSO₄干燥, 并真空浓缩。将所得粗品通过制备型TLC纯化 (EtOAc:己烷=2:1), 从而得到呈白色固体的酰胺 (5) (3.5mg, 46%, 经2个步骤): $[\alpha]_D^{20} = +21.5^\circ$ (c 0.002 g/mL, CHCl₃); ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.83 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.61 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.39 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.29 (d, J=9.7Hz, 1H), 6.36 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.27 (t, J=5.2Hz, 1H), 5.93 (d, J=9.7Hz, 1H), 5.60 (app. t, J=7.6Hz, 1H), 4.64 (dd, J=12.6, 3.7Hz, 1H), 4.31 (d, J=3.7Hz, 1H), 4.28 (dd, J=5.2, 2.6Hz, 2H), 4.11 (brd, J=7.6Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.78 (dd, J=5.5, 5.5Hz, 1H), 2.40 (dd, J=16.4, 5.5Hz, 1H), 2.32-2.24 (m, 3H), 1.67 (brs, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.24 (s, 3H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 200.8, 175.0, 173.2, 166.6, 149.8, 148.2, 146.1, 142.5, 136.3, 134.7, 132.1, 131.2, 127.6, 126.1, 124.8, 112.3, 88.5, 83.2, 79.6, 73.5, 72.2, 52.1, 50.8, 50.0, 48.0, 45.5, 43.8, 41.3, 41.3, 32.5, 30.0, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4; IR (薄膜, cm⁻¹) 3337, 2954, 2921, 2852, 1781, 1734, 1663, 1609; HRMS (ESI) 计算得出 [C₃₇H₃₇NO_aNa]⁺ (M+Na)⁺: m/z 646.2417, 实测值646.2417。



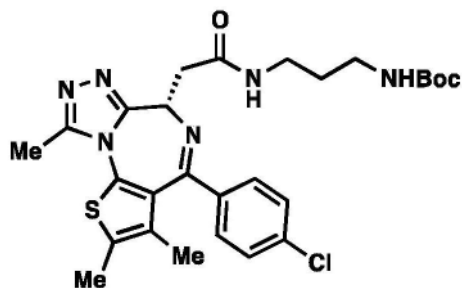
[1248] JNS27 (6)。i.在氮气气氛下,于-78℃下,向二异丙基氨基化锂 (6.0mL, 1.2当重) 的搅拌溶液中逐滴加入环己烯酮 (0.48mL, 1当量) 于THF (5.0mL) 中的溶液。45分钟后,逐渐加入3-溴-1-(三甲基甲硅烷基)-丙炔 (0.85mL, 2.4当量) 于THF (5.0mL) 中的溶液,然后使反应升至室温过夜。将反应用饱和的NH₄Cl (20mL) 淬灭,并用EtOAc (20mL×3) 萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并真空浓缩。将粗残余物在硅胶上进行快速色谱法 (含10-20% EtOAc的己烷), 从而以25%的产率得到TMS保护的炔烃 (261mg)。ii.在N₂下,向该材料 (261mg, 1当量) 于THF (5.0mL) 中的溶液中加入TBAF (0.44mL, 1当量) 溶液。在室温下搅拌4小时后,通过加入饱和NH₄Cl (15mL) 淬灭反应。用EtOAc (3×15mL) 萃取混合物。将合并的有机层用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并真空浓缩。将残余物在硅胶上进行快速色谱法 (含0-20% EtOAc的己烷), 从而以81%的产率得到呈浅黄色蜡状固体的JNS-27 (168mg, 21%, 经2个步骤)。 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 6.99 (m, 1H), 6.03 (dt, J=10.02, 1.97Hz, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.48 (m, 3H), 2.33 (m, 2H), 1.98 (t, J=2.68, 1H), 1.88 (m, 1H); ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃) δ 150.30, 129.34, 45.74, 27.68, 25.78, 20.27; HRMS (ESI) 计算得出 [C₉H₁₀ONa]⁺ (M+Na)⁺: m/z 134.0732, 实测值134.0728。

[1249]



[1250] 根据Bradner及其同事报道的条件制备该化合物 (7) (《PCT国际申请》2017, W0 2017091673 A2)。

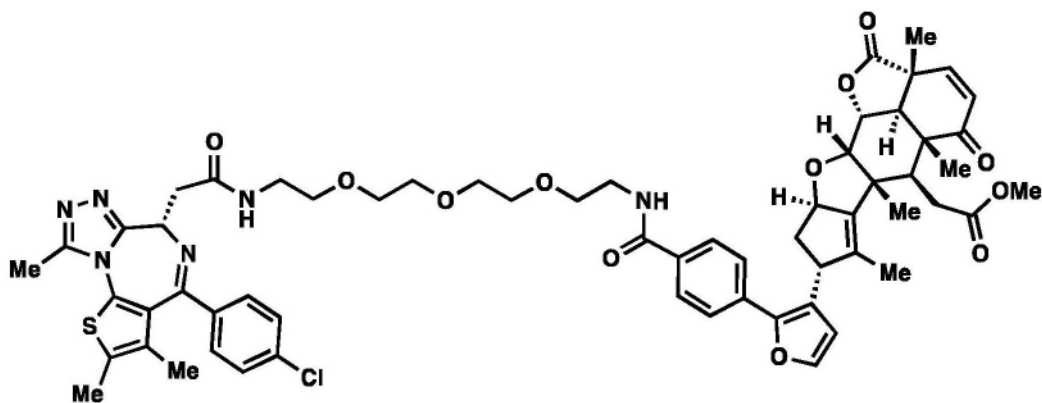
[1251]



[1252] 根据Waring及其同事报道的条件制备该化合物 (8) (《药物化学杂志》, 2016, 59, 7801)。

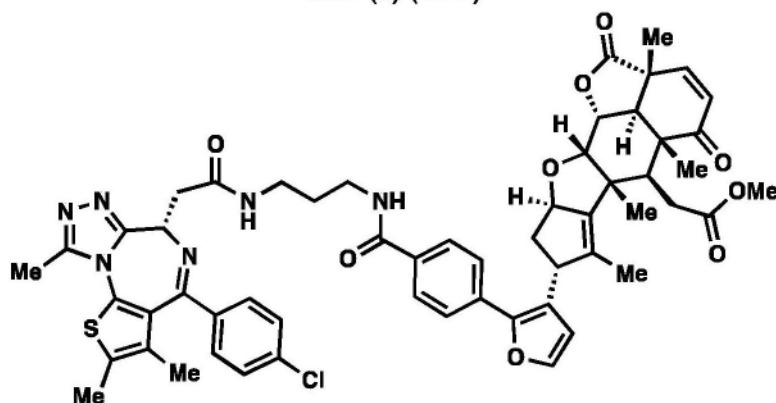
[1253]





XH1 (9) (45%)

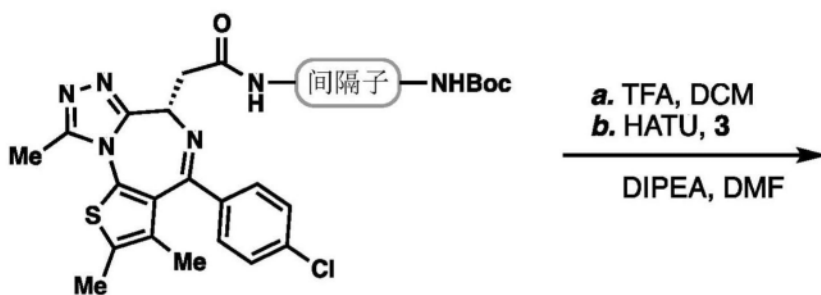
[1254]



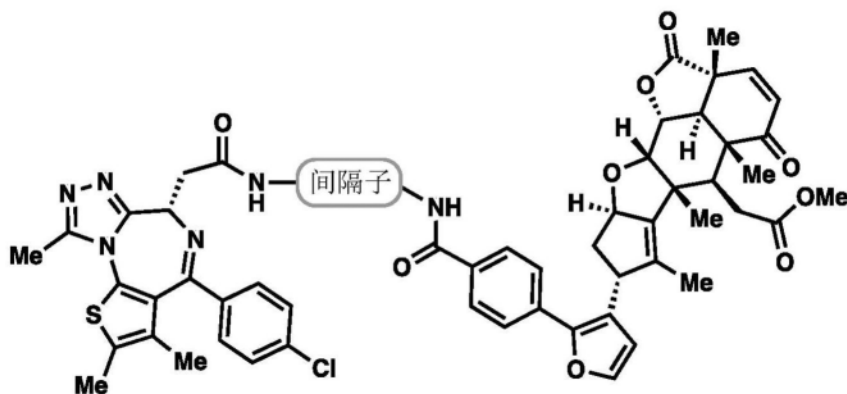
XH2 (10) (42%)

[1255] 方案S2. 印苦楝内酯来源的双功能降解剂XH1 (9) 和XH2 (10) 的合成。

[1256] 用于合成双功能降解剂XH1 (9) 和XH2 (10) 的通用程序:



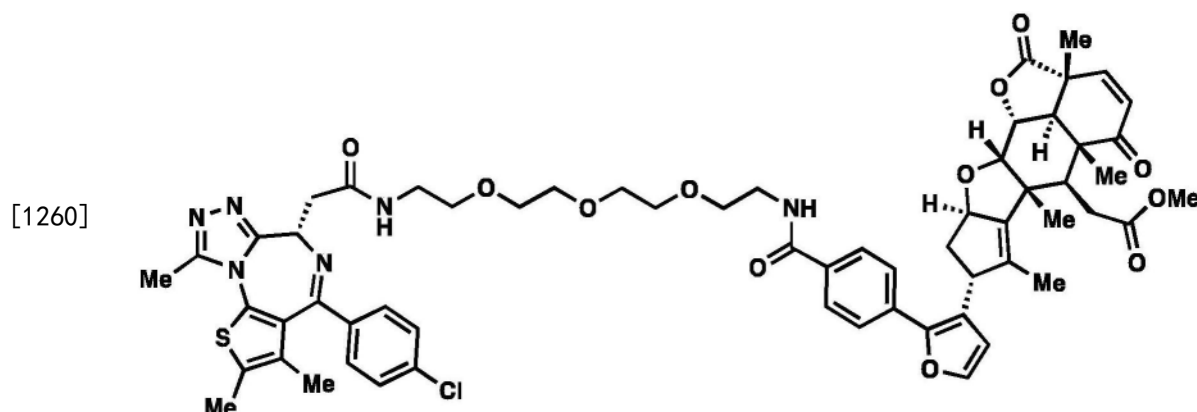
[1257]



[1258] i. 向反应管 (Fisher Scientific, 13×100mm) 中装入搅拌棒、Boc保护的胺 (7) 或 (8) (0.04mmol)、三乙基硅烷 (12μL, 0.075mmol) 和DCM (0.4mL)。将所得混合物冷却至0℃, 然

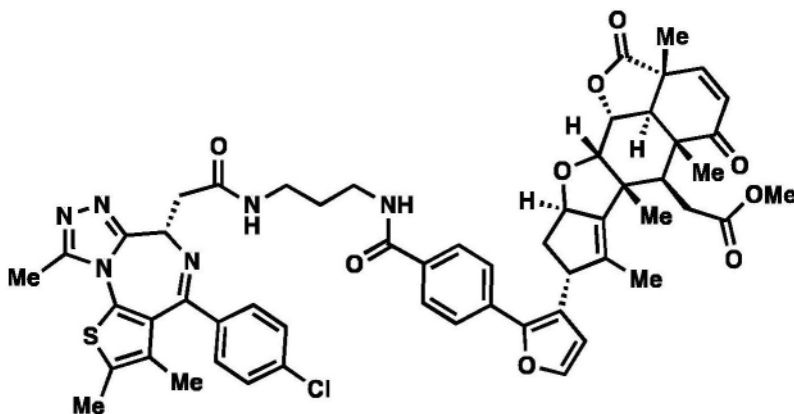
后逐滴加入TFA(0.12mL)。使反应混合物温热至室温,并进一步搅拌2小时。通过TLC判断反应完成后(MeOH:DCM=1:10),将混合物用甲苯(2mL)稀释,并真空浓缩。将所得粗品在高真空下干燥30分钟,并且无需进一步纯化即可直接用于下一步骤。根据上述程序,由醛(3)制备羧酸(4),其无需进一步纯化即可使用。

[1259] ii.向反应管(Fisher Scientific,13×100mm)中装入搅拌棒、粗胺(假定0.04mmol)、未纯化的酸(4)(假定0.02mmol)和DMF(0.6mL)。将所得混合物在冰浴中冷却至0℃,然后加入HATU(23.0mg,0.06mmol)和DIPEA(11μL,0.06mmol)。将反应混合物在4℃下搅拌16小时。通过TLC判断反应完成后(MeOH:DCM=1:10),将混合物用EtOAc(10mL)和饱和NH₄Cl水溶液(10mL)稀释,并用EtOAc(2×10mL)萃取水相。将合并的有机层用H₂O(20mL)、盐水(20mL)洗涤,经MgSO₄干燥,并真空浓缩。将所得粗物质通过制备型TLC纯化(MeOH:DCM=1:15,展开两次),从而得到双功能降解剂XH1或XH2。



[1261] 呈白色泡沫的XH1 (9) (45%产率,来自(3)): $[\alpha]_D^{20} = +48.7^\circ$ (c 0.0052 g/mL, CHCl₃); ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.87 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.53 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.40 (d, J=8.2Hz, 3H), 7.36 (d, J=1.9Hz, 1H), 7.34-7.29 (m, 2H), 7.28 (d, J=9.7Hz, 1H), 6.33 (d, J=1.9Hz, 1H), 5.93 (d, J=9.7Hz, 1H), 5.61-5.55 (m, 1H), 4.73 (app. t, J=7.1Hz, 1H), 4.64 (dd, J=12.5, 3.7Hz, 1H), 4.30 (d, J=3.6Hz, 1H), 4.12-4.08 (m, 1H), 3.75-3.64 (m, 15H), 3.64-3.53 (m, 3H), 3.51-3.40 (m, 3H), 3.25-3.16 (m, 2H), 2.77 (app. t, J=5.5Hz, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.42-2.36 (m, 4H), 2.26-2.20 (m, 2H), 1.68-1.65 (m, 3H), 1.65 (d, J=1.8Hz, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.24 (s, 3H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 200.6, 174.8, 173.0, 170.1, 167.0, 164.4, 155.3, 149.9, 149.6, 148.3, 146.1, 145.6, 142.1, 137.2, 136.3, 135.8, 133.8, 133.0, 131.6, 131.2, 131.0, 130.6, 130.0, 130.0, 128.7, 128.7, 127.6, 127.6, 125.7, 125.7, 124.1, 112.0, 88.3, 83.0, 73.3, 70.5, 70.5, 70.3, 70.2, 69.7, 69.6, 54.1, 51.9, 50.5, 49.7, 47.8, 45.3, 43.6, 41.1, 41.1, 39.7, 39.4, 38.5, 32.3, 18.6, 17.3, 15.1, 14.4, 13.1, 13.1, 11.6; IR (薄膜, cm⁻¹) 3339, 2923, 2866, 1781, 1734, 1659, 1540, 1487, 1437, 1419, 1300; HRMS (ESI) 计算得出 [C₆₁H₆₇N₆O₁₂Cl₁S₁Na]⁺ (M+Na)⁺: m/z 1165.4118, 实测值1165.4142。

[1262]



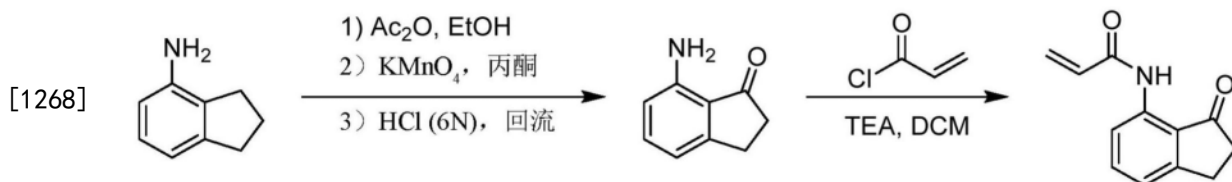
[1263] 呈白色泡沫的XH2 (10) (42%产率, 来自 (3)) : $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +18.6^\circ$ (c 0.004 g/mL, CHCl_3); ^1H NMR (600MHz, CD_2Cl_2) δ 7.90 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 7.65-7.57 (m, 3H), 7.44-7.39 (m, 3H), 7.33 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 7.25 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 7.07 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 6.36 (d, $J=1.9\text{Hz}$, 1H), 5.89 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 5.52 (app. t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.66-4.59 (m, 2H), 4.26 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 4.12 (brd, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.52-3.45 (m, 2H), 3.44-3.34 (m, 4H), 3.20 (dd, $J=16.4, 5.5\text{Hz}$, 1H), 3.15 (d, $J=12.5\text{Hz}$, 1H), 2.74 (app. t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.45-2.37 (m, 4H), 2.25-2.21 (m, 2H), 1.75-1.70 (m, 2H), 1.65 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, CD_2Cl_2) δ 201.2, 175.6, 173.5, 171.9, 166.7, 164.5, 156.1, 150.5, 149.9, 148.8, 146.3, 142.5, 137.1, 137.0, 136.6, 134.2, 133.7, 132.7, 131.6, 131.3, 131.2, 130.8, 130.3, 130.3, 129.0, 129.0, 127.8, 127.8, 126.2, 126.2, 124.8, 112.6, 88.6, 83.4, 73.9, 54.9, 52.1, 51.0, 50.2, 48.2, 45.8, 44.1, 41.6, 41.5, 39.7, 36.5, 36.2, 32.7, 29.9, 18.8, 17.5, 15.4, 14.6, 13.4, 13.3, 12.0; IR (薄膜, cm^{-1}) 3308, 3023, 2930, 2867, 1782, 1734, 1654, 1540, 1488, 1437, 1301; HRMS (ESI) 计算得出 $[\text{C}_{56}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_9\text{S}]^+ (\text{M}+\text{H})^+$: m/z 1025.3669, 实测值 1025.3669。

[1264] 先前未报道的半胱氨酸反应性共价配体的合成和表征

[1265] 通用的合成方法。化学品和试剂购自主要的商业供应商, 无需进一步纯化即可使用。除非另有说明, 否则在氮气气氛下进行反应。使用EMD或Sigma Aldrich硅胶60 (230-400目) 进行硅胶快速柱色谱法。在加利福尼亚大学伯克利分校的Bruker AVB 400、AVQ 400或AV 600光谱仪上获得质子和碳核磁共振 (^1H NMR和 ^{13}C NMR) 数据。使用正或负电喷雾电离 (+ESI或-ESI) 从加利福尼亚大学伯克利分校的QB3质谱仪设施获得高分辨率质谱图。产量报告为单次运行。

[1266] 通用程序A。将胺 (1当量) 溶解在DCM (5mL/mmol) 中, 并冷却至 0°C 。向溶液中加入丙烯酰氯 (1.2当量), 然后加入三乙胺 (1.2当量)。将溶液温热至室温, 并搅拌过夜。然后将溶液用盐水洗涤, 并将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (并且如果需要的话, 进行重结晶), 从而得到相应的丙烯酰胺。

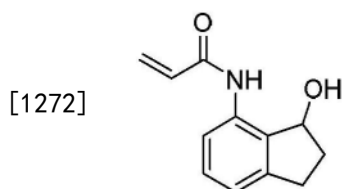
[1267] 通用程序B。将胺 (1当量) 溶解在DCM (5mL/mmol) 中, 并冷却至 0°C 。向溶液中加入氯乙酰氯 (1.2当量), 然后加入三乙胺 (1.2当量)。将溶液温热至室温, 并搅拌过夜。然后将溶液用盐水洗涤, 并将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (并且如果需要的话, 进行重结晶), 从而得到相应的氯乙酰胺。



[1269] N-(3-氧代-2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-129) (13)。i. 在0℃下向4-氨基茛满 (1.0g, 7.5mmol) 于乙醇 (20mL) 中的溶液加入乙酸酐 (1.4mL, 15.0mmol)。然后将溶液温热至室温并搅拌过夜, 此时将溶剂真空蒸发。然后将残余物溶解在丙酮 (50mL) 中, 并加入 15% 硫酸镁水溶液 (1.2g, 于6.75mL水中), 然后加入高锰酸钾 (3.4g, 17.0mmol)。将所得溶液搅拌24小时, 然后通过硅藻土垫过滤, 先后用氯仿和水洗脱。分离洗脱液, 并将水层用另外的氯仿萃取几次。将合并的有机物经硫酸镁干燥, 过滤并真空蒸发。然后将残余物溶解在 6N HCl (20mL) 中, 并加热至90℃。搅拌5小时后, 将溶液冷却, 用少量碳酸钾中和, 并用乙酸乙酯萃取。将合并的有机物用硫酸镁干燥, 过滤并真空蒸发, 从而得到粗制的7-氨基茛满-1-酮 (610mg, 55%, 经3个步骤), 其无需进一步纯化即可使用。

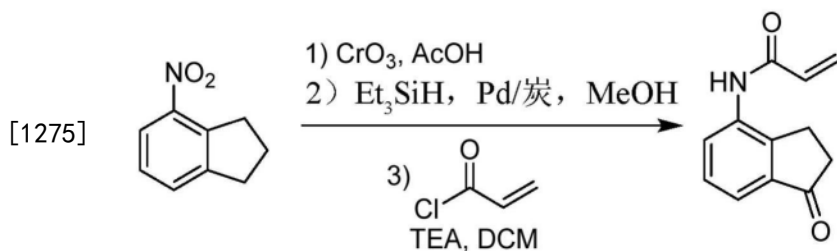
[1270] ii. 在N₂气氛下, 在0℃下向粗制的7-氨基茛满-1-酮于二氯甲烷 (15mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.39mL, 4.8mmol), 然后加入三乙胺 (0.67mL, 4.8mmol)。将反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。然后将反应混合物用1M HCl溶液、盐水洗涤两次, 并真空浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含10%到20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈白色固体的产物 (13) (390mg, 47%产率, 26%合并产率, 经4个步骤)。

[1271] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 10.64 (s, 1H), 8.45 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.55 (t, J=7.9Hz, 1H), 7.12 (d, J=7.6Hz, 1H), 6.45 (dd, J=1.0, 17.0Hz, 1H), 6.33 (dd, J=10.1, 17.0Hz, 1H), 5.82 (dd, J=1.0, 10.1Hz, 1H), 3.11 (t, J=11.5Hz, 2H), 2.74-2.71 (m, 2H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 209.3, 164.4, 155.9, 138.7, 137.0, 131.7, 128.0, 123.1, 120.8, 116.9, 36.5, 25.5. HRMS (+ESI): 计算值: 202.0863 (C₁₂H₁₂NO₂)。观察值: 202.0860。



[1273] N-(3-羟基-2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-133) (14)。在氮气气氛下, 向 (13) (201mg, 1.0mmol) 于无水甲醇 (7mL) 中的溶液中加入硼氢化钠 (46.1mg, 1.2mmol)。搅拌30分钟后, 将反应用饱和碳酸氢钠溶液淬灭, 并用DCM萃取三次。将合并的有机层用硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含30到50%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈白色固体的 (14) (190mg, 94%产率)。

[1274] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.93 (s, 1H), 7.98 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.19 (t, J=7.9Hz, 1H), 6.95 (d, J=7.4Hz, 1H), 6.29 (d, J=16.8Hz, 1H), 6.15 (dd, J=10.2, 16.9Hz, 1H), 5.66 (d, J=10.2Hz, 1H), 5.32 (q, J=6.9Hz, 1H), 3.60 (d, J=6.7Hz, 1H), 2.96 (ddd, J=2.4, 9.0, 15.7Hz), 2.73 (quint, J=8.1Hz, 1H), 2.56-2.48 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 1H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 164.1, 143.7, 135.6, 132.8, 131.6, 129.5, 127.3, 121.0, 118.5, 76.2, 36.0, 29.8. HRMS (-ESI): 计算值: 202.0874 (C₁₂H₁₂NO₂)。观察值: 202.0874。

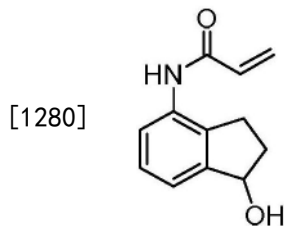


[1276] N-(1-氧代-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-134) (15)。i. 向4-硝基茚满 (5.38g, 33mmol) 于乙酸 (250mL) 中的溶液中缓慢加入三氧化铬 (8.95g, 90mmol)。搅拌24小时后, 将反应用2M NaOH中和, 并用乙酸乙酯萃取五次。将合并的有机物用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤, 经硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含10-20% 乙酸乙酯的己烷), 从而得到1.26g (约7.1mmol) 呈白色固体的4-硝基茚满酮。

[1277] ii. 然后在氮气气球的气氛下, 将该中间体与溶于无水甲醇 (21mL) 中的钯/活性炭 (125mg, 10wt%) 合并。在室温水浴中, 在10分钟的过程中, 通过加料漏斗将三乙基硅烷 (11.3mL, 71mmol) 缓慢加入到反应中。再搅拌20分钟后, 将反应混合物通过硅藻土垫过滤, 并真空浓缩, 从而得到4-氨基茚满酮, 其无需进一步纯化即可使用。

[1278] iii. 在氮气气氛下, 将上述粗制的氨基茚满酮溶解在DCM (21mL) 中, 并冷却至0℃, 此时缓慢地逐滴加入丙烯酰氯 (0.77mL, 9.5mmol) 和三乙胺 (1.19mL, 8.5mmol)。将反应混合物温热至室温, 搅拌过夜, 用盐水洗涤两次, 经硫酸镁干燥, 过滤, 并真空浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含30-50% 乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈白色固体的 (15) (989mg, 15% 产率, 经3个步骤)。

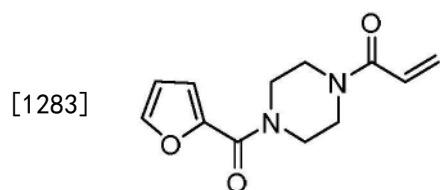
[1279] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.20 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.39 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 6.48 (d, $J=16.7\text{Hz}$, 1H), 6.37 (dd, $J=10.0\text{Hz}$, 16.8Hz, 1H), 5.83 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 3.04 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 2.70 (t, $J=5.7\text{Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 206.3, 163.9, 146.0, 138.0, 135.4, 130.7, 128.8, 128.7, 127.6, 120.4, 36.1, 23.4. HRMS (-ESI): 计算值: 200.0717 ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_2$)。观察值: 200.0715。



[1281] N-(1-羟基-2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-135) (16)。在氮气气氛下, 向 (15) (1.26g, 6.25mmol) 于无水甲醇 (50mL) 中的溶液中加入硼氢化钠 (292.7mg, 7.7mmol)。搅拌30分钟后, 将反应用水淬灭, 并真空除去甲醇。将残余物用NaCl饱和, 并用2:1氯仿: 甲醇溶液萃取五次。将合并的有机层经3Å分子筛干燥, 过滤并真空浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含40到70% 乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈白色固体的 (16) (1.05g, 83% 产率)。

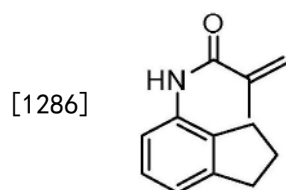
[1282] ^1H NMR (400MHz, MeOD): δ 7.50 (dd, $J=2.3, 6.3\text{Hz}$, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 6.51 (dd, $J=10.2, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.35 (dd, $J=1.7, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.77 (dd, $J=1.7, 10.2\text{Hz}$, 1H), 5.17 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 2.97 (ddd, $J=4.5, 8.6, 16.2$, 1H), 2.74 (quint, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 2.47-2.39 (m, 1H), 1.95-1.86 (m, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, MeOD): δ 166.3, 148.0, 137.8, 134.8,

132.1, 128.3, 127.9, 124.0, 122.7, 76.9, 36.1, 28.6. HRMS (-ESI): 计算值: 202.0874 ($C_{12}H_{12}NO_2$)。观察值: 202.0872。



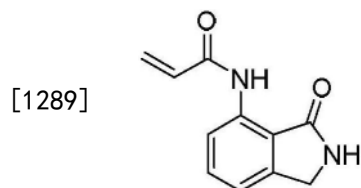
[1284] 1-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (TRH 1-145) (17)。在氮气气氛下, 在0℃下向1-(2-呋喃基)哌嗪 (362mg, 2.0mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 将反应混合物温热至室温, 并搅拌另外24小时。将反应混合物用盐水洗涤两次, 经硫酸镁干燥, 并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含70%到100%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈黄色固体的 (17) (446mg, 95%)。

[1285] ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.53 (m, 1H), 7.06 (dd, $J=0.7, 3.5$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J=10.5, 16.8$ Hz, 1H), 6.52 (dd, $J=1.8, 3.5$ Hz, 1H), 6.33 (dd, $J=1.9, 16.8$ Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=1.9, 10.5$ Hz, 1H), 3.84-3.67 (m, 8H). ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 165.5, 159.1, 147.5, 144.0, 128.5, 127.1, 117.0, 111.5, 45.6, 41.9. HRMS (+ESI): 计算值: 235.1077 ($C_{12}H_{15}N_2O_3$)。观察值: 235.1075。



[1287] N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)甲基丙烯酰胺 (TRH 1-149) (18)。在氮气气氛下, 在0℃下向4-氨基茛满 (0.24mL, 2.0mmol) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中加入甲基丙烯酰氯 (0.23mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺 (0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 将反应混合物温热至室温, 并搅拌另外3.5小时。然后将反应混合物用盐水洗涤两次, 经硫酸镁干燥, 并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含35%到40%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈灰白色固体的 (18) (378mg, 94%)。

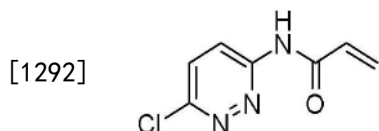
[1288] ^1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.72 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 2.93 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.12-2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 166.3, 145.1, 140.6, 134.5, 133.7, 127.0, 120.7, 119.8, 118.9, 33.1, 29.9, 24.7, 18.6. HRMS (+ESI): 计算值: 202.1226 ($C_{13}H_{16}NO$)。观察值: 202.1224。



[1290] N-(3-氧代异吲哚啉-4-基)丙烯酰胺 (TRH 1-152) (19)。在 N_2 气氛下, 在0℃下向7-氨基异吲哚啉-1-酮 (99mg, 0.67mmol) 于二氯甲烷 (4mL) 中的溶液中加入丙烯酰氯 (0.07mL,

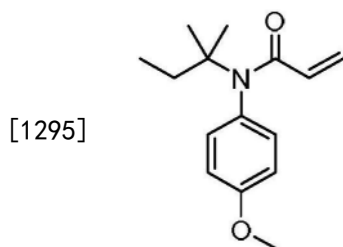
0.8mmol), 然后加入三乙胺(0.11mL, 0.8mmol)。搅拌20分钟后, 将反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将反应混合物用盐水洗涤两次, 经硫酸镁干燥, 并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化(含50到60%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈白色固体的标题化合物(58mg, 43%)。

[1291] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 10.50 (s, 1H), 8.58 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.55 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.46 (dd, $J=1.3, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.36 (dd, $J=10.0, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.81 (dd, $J=1.3, 10.0\text{Hz}$, 1H), 4.46 (s, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 172.9, 164.2, 143.9, 138.2, 133.8, 131.8, 127.8, 118.0, 117.7, 117.6, 45.6. HRMS (+ESI): 计算值: 203.0815 ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$)。观察值: 203.0814。



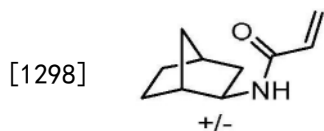
[1293] N-(6-氯吡啶-3-基)丙烯酰胺 (TRH 1-155) (20)。在氮气气氛下, 在0℃下向3-氨基-6-氯吡啶(261mg, 2.0mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL, 2.4mmol), 然后加入三乙胺(0.34mL, 2.4mmol)。搅拌20分钟后, 将反应混合物温热至室温, 并搅拌过夜。将溶液用盐水洗涤两次, 经硫酸镁干燥, 并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化(含40%到50%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈浅黄色固体的(20) (23mg, 6%)。

[1294] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 10.06 (s, 1H), 8.70 (d, $J=9.4\text{Hz}$, 1H), 7.57 (d, $J=9.4\text{Hz}$, 1H), 6.73 (dd, $J=10.2, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.56 (dd, $J=1.2, 16.8, 1\text{H}$), 5.94 (dd, $J=1.2, 10.2\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 164.8, 155.2, 152.3, 130.7, 130.4, 130.3, 122.0. HRMS (+ESI): 计算值: 182.0127 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{OCl}$)。观察值: 182.0126



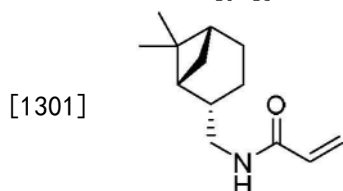
[1296] N-(4-甲氧基苯基)-N-(叔戊基)丙烯酰胺 (TRH 1-170) (21)。在氮气气氛下, 在0℃下向4-甲氧基-N-(叔戊基)苯胺(94mg, 0.49mmol)于二氯甲烷(5mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.05mL, 0.6mmol), 然后加入三乙胺(0.09mL, 0.6mmol)。搅拌15分钟后, 将反应混合物温热至室温, 并搅拌另外18小时。然后将反应混合物用饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤, 经硫酸镁干燥, 并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化(含0%到20%乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈浅黄色油状物的标题化合物(82mg, 68%)。

[1297] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.99 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.85 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.17 (dd, $J=1.9, 16.7\text{Hz}$, 1H), 5.76 (dd, $J=10.3, 16.7\text{Hz}$, 1H), 5.28 (dd, $J=1.9, 10.3\text{Hz}$, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 1.20 (s, 6H), 0.91 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.3, 159.0, 134.3, 131.49, 131.45, 125.6, 114.1, 61.7, 55.5, 32.0, 27.4, 9.4. HRMS (+ESI): 计算值: 247.1572 ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2$)。观察值: 247.1577。



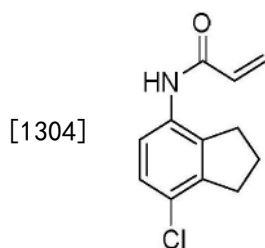
[1299] N-(外-降冰片-2-基)丙烯酰胺 (TRH 1-176) (22)。在氮气气氛下,在0℃下向外-2-氨基降冰片烷(0.24mL,2mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.33mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,将反应混合物温热至室温,并搅拌另外18小时。然后将反应混合物用饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,经硫酸镁干燥,并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷),从而得到呈白色固体的标题化合物(271mg,82%)。

[1300] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.42 (s, 1H), 6.25 (dd, $J=2.3, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.18 (dd, $J=9.5, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.58 (dd, $J=2.3, 9.5\text{Hz}$, 1H), 3.8-3.77 (m, 1H), 2.27-2.24 (m, 2H), 1.78 (ddd, $J=2.1, 8.1, 13.0\text{Hz}$, 1H), 1.55-1.38 (m, 3H), 1.30-1.10 (m, 4H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 165.0, 131.4, 125.8, 52.9, 42.4, 40.0, 35.7, 35.6, 28.2, 26.6. HRMS (+EI): 计算值: 165.1154 ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$)。观察值: 165.1155。



[1302] N-(((1R,2S,5R)-6,6-二甲基双环[3.1.1]庚-2-基)甲基)丙烯酰胺 (TRH 1-178) (23)。在氮气气氛下,在0℃下向(-)-顺式-甲基乙胺(0.34mL,2mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液中加入丙烯酰氯(0.20mL,2.4mmol),然后加入三乙胺(0.33mL,2.4mmol)。搅拌20分钟后,将反应混合物温热至室温,并搅拌另外21小时。然后将反应混合物用饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,经硫酸镁干燥,并真空浓缩。将所得粗物质通过硅胶色谱法纯化(含20到30%乙酸乙酯的己烷),从而得到呈白色固体的标题化合物(369mg,89%)。

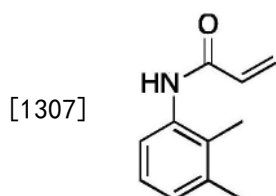
[1303] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 6.26 (dd, $J=1.5, 17.0\text{Hz}$, 1H), 6.11 (dd, $J=10.3, 17.0\text{Hz}$, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.61 (dd, $J=1.5, 10.3\text{Hz}$, 1H), 3.39-3.29 (m, 2H), 2.38-2.34 (m, 1H), 2.26-2.21 (m, 1H), 1.98-1.90 (m, 4H), 1.88-1.83 (m, 1H), 1.53-1.47 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.89 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3): δ 165.7, 131.2, 126.2, 45.3, 43.9, 41.5, 38.8, 33.3, 28.1, 26.1, 23.3, 19.9. HRMS (-ESI): 计算值: 206.1550 ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$)。观察值: 206.1551。



[1305] N-(7-氯-2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺 (YP 1-1) (24)。将N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺(187mg,1.0mmol)于PEG 400(5.2mL)中的溶液冷却至0℃,并加入N-氯琥珀酰亚胺(140mg,1.0mmol)。30分钟后,将混合物温热至室温,并搅拌过夜。将反应混合物用乙

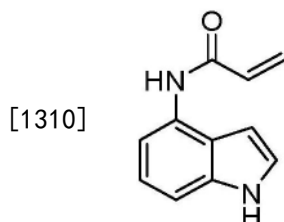
酸乙酯稀释,用盐水洗涤两次,并用硫酸镁干燥。真空除去挥发物,并将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含30%乙酸乙酯的己烷)。将获得的异构体混合物重结晶,从而得到呈白色固体的标题化合物(47mg,22%产率)。

[1306] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.78 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.15-7.11 (m, 2H), 6.42 (dd, $J=1.4, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.26 (dd, $J=10.2, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.77 (dd, $J=1.4, 10.2\text{Hz}$, 1H), 2.98 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.87 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.12 (quint, $J=7.5\text{Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 163.4, 143.1, 136.1, 132.2, 131.0, 128.0, 127.2, 126.7, 120.9, 32.7, 31.1, 24.0. HRMS (+ESI): 计算值: 220.0535 ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}$)。观察值: 220.0533。



[1308] N-(2,3-二甲基苯基)丙烯酰胺 (YP 1-18) (25)。将2,3-二甲基苯胺(121mg, 1.0mmol)于DCM(10mL)中的溶液冷却至0℃,并依次加入丙烯酰氯(109mg, 1.2mmol)和三乙胺(121mg, 1.2mmol)。将反应混合物在此温度下保持30分钟,然后温热至室温并搅拌过夜。将反应混合物用盐水洗涤两次,并经硫酸镁干燥。真空除去挥发物,并将粗物质通过硅胶色谱法纯化(含30%到40%乙酸乙酯的己烷),从而得到呈白色固体的产物(154mg, 88%)。

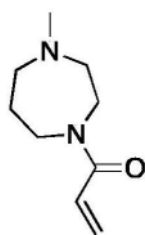
[1309] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.49 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.11-7.07 (m, 1H), 7.01 (d, $J=7.7$, 1H), 6.40 (d, $J=17.1$, 1H), 6.30 (dd, $J=7.3, 17.1\text{Hz}$, 1H), 5.74 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.13 (s, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 135.1, 131.2, 127.6, 127.3, 125.9, 122.3, 20.6, 13.9. HRMS (+ESI): 计算值: 176.1070 ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}$)。观察值: 176.1068。



[1311] N-(1H-吡啶-4-基)丙烯酰胺 (YP 1-19) (26)。将4-氨基吡啶(132mg, 1mmol)于DCM/DMF (1:1 v:v, 10mL)中的溶液冷却至0℃,并依次加入丙烯酰氯(109mg, 1.2mmol)和三乙胺(121mg, 1.2mmol)。将反应混合物在此温度下搅拌26分钟,然后温热至室温并搅拌过夜。将反应混合物用盐水洗涤两次,并经硫酸镁干燥。真空除去挥发物,并将粗产物通过碱性氧化铝色谱法纯化(含60%到75%乙酸乙酯的己烷),从而得到呈白灰色固体的标题化合物(56mg, 30%)。

[1312] ^1H NMR (600MHz, MeOD): δ 7.51 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.24-7.22 (m, 2H), 7.08 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.64 (dd, $J=10.1, 16.7\text{Hz}$, 2H), 6.38 (dd, $J=1.7, 16.9\text{Hz}$, 1H), 5.78 (dd, $J=1.7, 10.3\text{Hz}$, 1H), 4.6 (s, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, MeOD): δ 165.0, 137.2, 131.1, 129.2, 126.0, 123.8, 121.5, 120.9, 112.2, 108.4, 98.5. HRMS (+ESI): 计算值: 187.0866 ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$)。观察值: 187.0865。

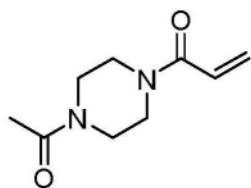
[1313]



[1314] 1-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-23) (27)。将1-甲基高哌嗪 (114mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃, 并依次加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol) 和三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。将溶液在此温度下保持30分钟, 然后温热至室温并搅拌过夜。将反应混合物用盐水洗涤两次, 并经硫酸镁干燥。真空除去挥发物后, 将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含1%到10%甲醇的DCM), 从而得到呈黄色油状物的标题化合物 (58mg, 51%) (旋转异构体的混合物)。

[1315] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.61-6.53 (m, 1H), 6.35-6.29 (m, 1H), 5.70-5.66 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.69 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 3.65-3.61 (m, 2H), 2.66-2.63 (m, 2H), 2.59-2.54 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.94 (quint, $J=6.2\text{Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.4, 166.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 59.1, 58.0, 57.1, 56.8, 47.4, 47.1, 46.7, 46.6, 45.3, 44.8, 28.1, 26.9. HRMS (+ESI): 计算值: 169.1335 ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$)。观察值: 169.1333。

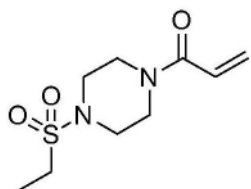
[1316]



[1317] 1-(4-乙酰基哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-24) (28)。将1-乙酰基哌嗪 (128mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃, 并依次加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol) 和三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。将溶液在此温度下搅拌23分钟, 然后温热至室温并搅拌另外两小时。将反应混合物用盐水洗涤两次, 经硫酸镁干燥, 并真空除去挥发物。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含0%到10%甲醇的DCM), 从而得到呈黄色油状物的标题化合物 (40mg, 18%)。

[1318] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.57 (dd, $J=10.5, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.33 (dd, $J=1.8, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.75 (dd, $J=1.9, 10.5\text{Hz}$, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.66-3.64 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.51-3.49 (m, 2H), 2.13 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 169.0, 165.6, 128.7, 127.0, 41.9, 41.4, 21.4. HRMS (+ESI): 计算值: 183.1128 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$)。观察值: 183.1126。

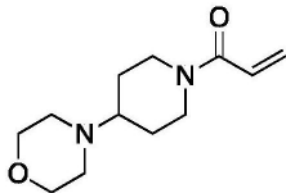
[1319]



[1320] 1-(4-(乙基磺酰基)哌嗪-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-25) (29)。将1-(乙磺酰基)哌嗪 (178mg, 1.0mmol) 于DCM (10mL) 中的溶液冷却至0℃, 并依次加入丙烯酰氯 (109mg, 1.2mmol) 和三乙胺 (121mg, 1.2mmol)。将溶液在此温度下搅拌27分钟, 然后温热至室温并搅拌另外两小时。将溶液用盐水洗涤两次, 并经硫酸镁干燥。将粗物质通过硅胶色谱法纯化 (含1%到10%甲醇的DCM), 从而得到呈白黄色固体的标题化合物 (163mg, 70%)。

[1321] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 6.57 (dd, $J=10.5, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.32 (dd, $J=1.9, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.76 (dd, $J=1.8, 10.5\text{Hz}$, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.32 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 4H), 2.98 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 1.37 (t, $J=7.4$, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) : δ 165.5, 128.8, 127.0, 77.4, 45.9, 45.6, 44.2, 41.9, 7.8. HRMS (+ESI) : 计算值: 233.0954 ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_1$)。观察值: 233.0953。

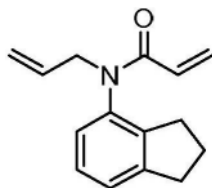
[1322]



[1323] 1-(4-吗啉代哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮 (YP 1-42) (30)。按照通用程序A, 使用4-吗啉代哌啶 (336mg, 2.0mmol), 在硅胶色谱法 (含1% 甲醇和80% 乙酸乙酯的己烷) 后获得呈无色油状物的产物 (259mg, 58%)。

[1324] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 6.42 (dd, $J=10.6, 16.8\text{Hz}$, 1H), 6.06 (dd, $J=2.0, 16.8\text{Hz}$, 1H), 5.49 (dd, $J=2.0, 10.6\text{Hz}$, 1H), 4.45 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 3.86 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 3.52 (t, $J=4.7\text{Hz}$, 4H), 2.90 (t, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 2.55-2.48 (m, 1H), 2.37-2.35 (m, 4H), 2.26 (tt, $J=3.7, 11.0\text{Hz}$, 1H), 1.72 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 2H), 1.30-1.20 (m, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) : δ 165.0, 127.7, 127.3, 67.1, 61.6, 49.6, 44.9, 41.1, 28.9, 27.8. HRMS (+ESI) : 计算值: 225.1598 ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$)。观察值: 225.1595。

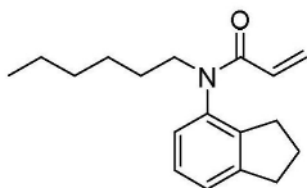
[1325]



[1326] N-烯丙基-N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (IGA 1-12) (31)。在氮气气氛, 向氢化钠 (96mg, 4.0mmol) 于四氢呋喃 (8mL) 中的溶液中加入N-(2,3-二氢-1H-茚-4-基)丙烯酰胺 (187mg, 1.0mmol) 于四氢呋喃 (2mL) 中的溶液。将反应混合物冷却至0℃, 并加入3-溴丙-1-烯 (484mg, 4.0mmol), 并将混合物温热至室温, 并搅拌过夜。通过加入水淬灭反应, 并将反应用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (含20% 乙酸乙酯的己烷), 从而得到呈黄色结晶固体的产物 (151mg, 67%)。

[1327] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 7.06-7.18 (m, 2H), 6.80-6.88 (m, 1H), 6.26-6.37 (dd, $J=16.8, 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.76-5.96 (m, 2H), 5.38-5.48 (dd, $J=10.3, 2.1\text{Hz}$, 1H), 4.98-5.08 (m, 2H), 4.40-4.52 (ddt, $J=14.5, 6.3, 1.3\text{Hz}$, 1H), 4.00-4.11 (ddt, $J=14.5, 6.8, 1.2\text{Hz}$, 1H), 2.82-2.98 (m, 2H), 2.59-2.79 (m, 2H), 1.92-2.07 (m, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) : δ 165.1, 146.5, 142.4, 137.9, 133.0, 128.4, 127.8, 127.48, 126.1, 124.3, 118.1, 51.6, 33.3, 30.9, 25.0. HRMS (+ESI) : 计算值: 228.13 ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}$)。观察值: 228.1381。

[1328]



[1329] N-烯丙基-N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺(IGA 1-15)(32)。在氮气气氛,向氢化钠(96mg,4.0mmol)于四氢呋喃(8mL)中的溶液中加入N-(2,3-二氢-1H-茛-4-基)丙烯酰胺(187mg,1.0mmol)于四氢呋喃(2mL)中的溶液。将溶液冷却至0℃,并加入1-溴己烷(660mg,4.0mmol),在此之后将溶液温热至室温,并搅拌过夜。将溶液用水淬灭,并用乙酸乙酯萃取。将粗产物通过硅胶色谱法纯化(含20%乙酸乙酯的己烷),从而以34%的产率得到呈黄色油状物的产物(92mg)。

[1330] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.11-7.25(m, 2H), 6.86-6.96(dd, $J=7.5, 1.2\text{Hz}$, 1H), 6.30-6.40(dd, $J=16.8, 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.86-6.00(m, 1H), 5.41-5.51(dd, $J=10.3, 2.1\text{Hz}$, 1H), 3.82-3.96(m, 1H), 3.42-3.56(m, 1H), 2.90-3.04(m, 2H), 2.65-2.85(m, 2H), 1.98-2.16(m, 2H), 1.47-1.63(m, 2H), 1.20-1.36(m, 6H), 0.80-0.90(m, 3H). ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3): δ 165.2, 146.5, 142.4, 138.2, 128.6, 127.5, 127.4, 126.1, 124.1, 48.7, 33.3, 31.6, 30.9, 27.9, 26.7, 25.0, 22.6, 14.1. HRMS(+ESI):计算值:272.19($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}$)。观察值:272.2007。

[1331] 与实例7-9相关的参考文献

[1332] 1.Nomura,D.K.&Maimone,T.J.“具有生物共价作用的天然产物的靶标鉴定”《生物技术的最新观点》420,351-374(2018)。2.Drahl,C.,Cravatt,B.F.&Sorensen,E.J.“蛋白质反应性天然产物”《德国应用化学国际版(英语)》44,5788-5809(2005)。3.Liu,J.等人“钙调神经磷酸酶是亲环蛋白-环孢菌素A和FKBP-FK506复合物的常见靶标”《细胞》66,807-815(1991)。4.Cohen,E.,Quistad,G.B.&Casida,J.E.“来自印楝杀虫剂的印楝内酯、环氧氮杂二酮和其它柠檬苦素的细胞毒性”《生命科学》58,1075-1081(1996)。5.Bodduluru,L.N.,Kasala,E.R.,Thota,N.,Barua,C.C.&Sistla,R.“印楝内酯在癌症中的化学预防和治疗作用:潜在的机制”《英国工业生物学研究协会国际杂志-体外毒理学》28,1026-1035(2014)。6.Subramani,R.等人“印楝内酯通过ROS介导的细胞凋亡和抑制上皮向间充质转化来抑制胰腺癌的生长和转移”《科学报告》6,19819(2016)。7.Hao,F.,Kumar,S.,Yadav,N.&Chandra,D.“印楝成分可作为预防和治疗癌症的潜在药物”《生物化学与生物物理学报》1846,247-257(2014)。8.Gupta,S.C.,Prasad,S.,Tyagi,A.K.,Kunnumakkara,A.B.&Aggarwal,B.B.“印度楝树(印楝):具有现代分子基础的印度传统灵丹妙药(Neem(Azadirachta indica):An indian traditional panacea with modern molecular basis.)”《植物药与植物药理学国际杂志(Phytomedicine Int.J.Phytother.Phytopharm.)》34,14-20(2017)。9.Burslem,G.M.&Crews,C.M.“蛋白质稳态的小分子调节”《化学评论》117,11269-11301(2017)。10.Lai,A.C.&Crews,C.M.“经诱导的蛋白质降解:新兴的药物发现范例”《自然综述:药物发现》16,101-114(2017)。11.Bianchini,G.,Balko,J.M.,Mayer,I.A.,Sanders,M.E.&Gianni,L.“三阴性乳腺癌:异质性疾病的挑战和机遇”《自然综述:临床肿瘤学(Nat.Rev.Clin.Oncol.)》13,674-690(2016)。12.Weerapana,E.等人“定量反应谱分析预测蛋白质组中的功能性半胱氨酸”《自然》468,790-795(2010)。13.Roberts,A.M.,Ward,C.C.&Nomura,D.K.“基于活性的蛋白质谱分析,用于定位和药理学上蛋白质组范围内的可配位热点”《生物技术的最新观点》43,25-33(2017)。14.Grossman,E.A.等人“针对抗癌天然产物靶向的有药可用性热点的共价配体发现”《细胞化学生物学》24,1368-1376.e4(2017)。15.Backus,K.M.等人“天然生物系统中蛋白质组范围内的共价配体发现”《自然》534,570-574(2016)。16.Wang,C.,Weerapana,E.,

Blewett, M.M. & Cravatt, B.F. “一种定量映射脂质衍生的亲电体的靶标的化学计量学平台”《自然方法》11, 79-85 (2014)。

17. Han, J. 等人 “ZNF313 是一种新型的细胞周期活化剂, 具有 E3 连接酶活性, 可通过破坏 p21 (WAF1) 的稳定性来抑制细胞衰老”《细胞死亡分化》20, 1055-1067 (2013)。

18. Lee, M.-G. 等人 “XAF1 通过活化 HIPK2 和 ZNF313 指导 p53 信号传导的凋亡”《美国国家科学院院刊》111, 15532-15537 (2014)。

19. Huang, S. 等人 “UbL-UBA Ubiquitin4 蛋白通过对 p21 的依赖于 p53 和 p53 的调控而在胃癌中发挥抑癌作用”《细胞死亡分化》26, 516-530 (2019)。

20. Abbas, T. & Dutta, A. “p21 在癌症中: 错综复杂的网络和多项活动 (p21 in cancer: intricate networks and multiple activities.)”《自然综述: 癌症》9, 400-414 (2009)。

21. Guo, H., Tian, T., Nan, K. & Wang, W. “p57: 癌症中的一种多功能蛋白质 (综述) (p57: A multifunctional protein in cancer (Review).)”《国际肿瘤学杂志 (Int. J. Oncol.)》36, 1321-1329 (2010)。

22. Zengerle, M., Chan, K.-H. & Ciulli, A. “选择性小分子诱导的 BET 溴结构域蛋白 BRD4 降解”《美国化学学会化学生物学杂志》10, 1770-1777 (2015)。

23. Winter, G.E. 等人 “药物开发: 邻苯二甲酰亚胺缀合作为体内靶蛋白降解的策略”《科学》348, 1376-1381 (2015)。

24. Havens, C.G. & Walter, J.C. Mechanism of CRL4 (Cdt2), “一种 PCNA 依赖性 E3 泛素连接酶”《基因与发育》25, 1568-1582 (2011)。

25. Kitagawa, K., Kotake, Y. & Kitagawa, M. “泛素介导的癌基因和抑癌基因产物的控制”《癌症科学》100, 1374-1381 (2009)。

26. Biswas, K. 等人 “E3 连接酶 CHIP 介导 p21 的降解以维持抗辐射性”《分子癌症研究》MCR 15, 651-659 (2017)。

27. Rodriguez, M.S. 等人 “RING 泛素 E3 RNF114 与 A20 相互作用并调节 NF- κ B 活性和 T 细胞活化”《细胞死亡与疾病》5, e1399 (2014)。

28. Yang, Y. 等人 “E3 泛素连接酶 RNF114 和 TAB1 降解是母体向合子过渡所必需的”《欧洲分子生物学组织报告》18, 205-216 (2017)。

29. Rape, M. “泛素化处于发展与疾病的十字路口”《自然综述: 分子细胞生物学》19, 59-70 (2018)。

30. Hughes, S.J. & Ciulli, A. “三元复合物的分子识别: 化学降解剂的结构导向设计的新维度”《生物化学论文 (Essays Biochem.)》61, 505-516 (2017)。

31. Gadd, M.S. 等人 “PROTAC 协同识别选择性蛋白质降解的结构基础 (Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation.)”《自然化学》13, 514-521 (2017)。

32. Nowak, R.P. 等人 “结合中的可塑性赋予配体诱导的蛋白质降解选择性 (Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation.)”《自然化学》14, 706-714 (2018)。

33. Jessani, N. 等人 “与体内乳腺肿瘤生长相关的癌和基质酶活性谱”《美国国家科学院院刊》101, 13756-13761 (2004)。

34. Anderson, K.E., To, M., Olzmann, J.A. & Nomura, D.K. “化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了削弱乳腺癌致病性的硫氧还蛋白-胱天蛋白酶 3 相互作用破坏者”《美国化学学会化学生物学杂志》12, 2522-2528 (2017)。

35. Smith, P.K. 等人 “使用二金鸡宁酸测量蛋白质”《分析生物化学》150, 76-85 (1985)。

36. Xu, T. 等人 “ProLuCID: 一种改进的类似于 SEQUEST 的算法, 具有增强的灵敏度和特异性”《蛋白质组学杂志》129, 16-24 (2015)。

37. Bateman, L.A. 等人 “化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了削弱 ER 形态和癌症致病性的网状蛋白 4 中的半胱氨酸热点”《英国剑桥化学通讯》53, 7234-7237 (2017)。

38. Counihan, J.L., Wiggernhorn, A.L., Anderson, K.E. & Nomura, D.K. “化学蛋白质组学启用的共价配体筛选揭示了 ALDH3A1 作为肺癌的治疗靶标”《美国化学学会化学生物学杂志》13 (8), 1970-1977 (2018)。

39. Roberts, A.M. 等人 “对共价配体的化学蛋白质组学筛查揭示了

UBA5作为新型胰腺癌靶标”《美国化学学会化学生物学杂志》12,899-904(2017)。

40.Kokosza,K.,Balzarini,J.&Piotrowska,D.G.“作为核苷酸类似物的新型5-芳基氨基甲酰基-2-甲基异噁唑烷-3-基-3-膦酸酯(Novel 5-Arylcarbamoyl-2-methylisoxazolidin-3-yl-3-phosphonates as Nucleotide Analogues.)”《核苷、核苷酸和核酸(Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids)》33,552-582(2014)。

41.Talaty,E.R.,Young,S.M.,Dain,R.P.&Stipdonk,M.J.V.“通过串联质谱研究某些酰化氨基酸的质子化酰胺的断裂:观察到不常见的硝酸根离子(A study of fragmentation of protonated amides of some acylated amino acids by tandem mass spectrometry:observation of an unusual nitrilium ion.)”《质谱学快报(Rapid Commun.Mass Spectrom.)》25,1119-1129(2011)。

42.Timokhin,V.I.,Gastaldi,S.,Bertrand,M.P.&Chatgililoglu,C.“用于从各种经取代的以碳为中心的自由基中 β 去除甲苯磺酰基自由基的速率常数(Rate Constants for the β -Elimination of Tosyl Radical from a Variety of Substituted Carbon-Centered Radicals.)”《有机化学杂志(J.Org.Chem.)》68,3532-3537(2003)。

43.Cee,V.J.等人“N-芳基丙烯酰胺的谷胱甘肽(GSH)反应性的系统研究:1.芳基取代的影响(Systematic Study of the Glutathione(GSH) Reactivity of N-Arylacrylamides:1.Effects of Aryl Substitution.)”《药物化学杂志》58,9171-9178(2015)。

44.Le Sann,C.,Huddleston,J.&Mann,J.“作为端粒G-四链体DNA的潜在稳定剂的喹啉新类似物的合成和初步评估(Synthesis and preliminary evaluation of novel analogues of quindolines as potential stabilisers of telomeric G-quadruplex DNA.)”《四面体(Tetrahedron)》63,12903-12911(2007)。

45.Ikoma,M.,Oikawa,M.&Sasaki,M.“官能化的7-氧杂降冰片烯类似物的合成和多米诺复分解反应(Synthesis and domino metathesis of functionalized 7-oxanorbomene analogs toward cis-fused heterocycles.)”《四面体》64,2740-2749(2008)。

46.Cho,S.-D.等人“吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2-酮的一锅合成(A One-Pot Synthesis of Pyrido[2,3-b][1,4]oxazin-2-ones.)”《有机化学杂志》68,7918-7920(2003)。

47.Magolan,J.,Carson,C.A.&Kerr,M.A.“(±)-美西卡平的全合成(Total Synthesis of(±)-Mersicarpine.)”《有机快报(Org.Lett.)》10,1437-1440(2008)。

48.Longo,P.A.,Kavran,J.M.,Kim,M.-S.&Leahy,D.J.“用聚乙烯亚胺(PEI)进行的瞬时哺乳动物细胞转染”《酶学方法》529,227-240(2013)。

49.Li,C.等人快速克隆:一种高度简化的、无需纯化、不依赖序列和连接的PCR克隆方法(FastCloning:a highly simplified,purification-free,sequence-and ligation-independent PCR cloning method.)”《BMC生物技术(BMC Biotechnol.)》11,92(2011)。

50.Thomas,J.R.等人“基于光亲和标记的化学蛋白质组学策略,用于小分子候选药物的无偏靶反卷积(A Photoaffinity Labeling-Based Chemoproteomics Strategy for Unbiased Target Deconvolution of Small Molecule Drug Candidates.)”《分子生物学方法》新泽西州克利夫顿1647,1-18(2017)。

51.Käll,L.,Canterbury,J.D.,Weston,J.,Noble,W.S.&MacCoss,M.J.“用于从鸟枪法蛋白质组学数据集中进行肽鉴定的半监督学习(Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets.)”《自然方法》4,923-925(2007)。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 加利福尼亚大学董事会
[0003]	诺瓦蒂什股份公司
[0004]	J·斯普拉德林
[0005]	C·C·沃德
[0006]	D·K·野村
[0007]	M·席尔勒
[0008]	J·A·塔拉里科
[0009]	J·麦肯纳
[0010]	T·J·马伊莫内
[0011]	胡曦睿
[0012]	<120> E3连接酶的共价靶向
[0013]	<130> 052103-517001W0
[0014]	<150> US 62/743,337
[0015]	<151> 2018-10-09
[0016]	<160> 16
[0017]	<170> PatentIn 3.5版
[0018]	<210> 1
[0019]	<211> 190
[0020]	<212> PRT
[0021]	<213> 人工序列
[0022]	<220>
[0023]	<223> 合成多肽
[0024]	<400> 1
[0025]	Met Ser Thr Arg Lys Arg Arg Gly Gly Ala Ile Asn Ser Arg Gln Ala
[0026]	1 5 10 15
[0027]	Gln Lys Arg Thr Arg Glu Ala Thr Ser Thr Pro Glu Ile Ser Leu Glu
[0028]	20 25 30
[0029]	Ala Glu Pro Ile Glu Leu Val Glu Thr Ala Gly Asp Glu Ile Val Asp
[0030]	35 40 45
[0031]	Leu Thr Cys Glu Ser Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu Thr His Asn
[0032]	50 55 60
[0033]	Asp Ser Val Val Ile Val Asp Glu Arg Arg Arg Pro Arg Arg Asn Ala
[0034]	65 70 75 80
[0035]	Arg Arg Leu Pro Gln Asp His Ala Asp Ser Cys Val Val Ser Ser Asp
[0036]	85 90 95
[0037]	Asp Glu Glu Leu Ser Arg Asp Arg Asp Val Tyr Val Thr Thr His Thr
[0038]	100 105 110

[0039]	Pro Arg Asn Ala Arg Asp Glu Gly Ala Thr Gly Leu Arg Pro Ser Gly
[0040]	115 120 125
[0041]	Thr Val Ser Cys Pro Ile Cys Met Asp Gly Tyr Ser Glu Ile Val Gln
[0042]	130 135 140
[0043]	Asn Gly Arg Leu Ile Val Ser Thr Glu Cys Gly His Val Phe Cys Ser
[0044]	145 150 155 160
[0045]	Gln Cys Leu Arg Asp Ser Leu Lys Asn Ala Asn Thr Cys Pro Thr Cys
[0046]	165 170 175
[0047]	Arg Lys Lys Ile Asn His Lys Arg Tyr His Pro Ile Tyr Ile
[0048]	180 185 190
[0049]	<210> 2
[0050]	<211> 228
[0051]	<212> PRT
[0052]	<213> 人工序列
[0053]	<220>
[0054]	<223> 合成多肽
[0055]	<400> 2
[0056]	Met Ala Ala Gln Gln Arg Asp Cys Gly Gly Ala Ala Gln Leu Ala Gly
[0057]	1 5 10 15
[0058]	Pro Ala Ala Glu Ala Asp Pro Leu Gly Arg Phe Thr Cys Pro Val Cys
[0059]	20 25 30
[0060]	Leu Glu Val Tyr Glu Lys Pro Val Gln Val Pro Cys Gly His Val Phe
[0061]	35 40 45
[0062]	Cys Ser Ala Cys Leu Gln Glu Cys Leu Lys Pro Lys Lys Pro Val Cys
[0063]	50 55 60
[0064]	Gly Val Cys Arg Ser Ala Leu Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Glu Leu
[0065]	65 70 75 80
[0066]	Glu Arg Gln Ile Glu Ser Thr Glu Thr Ser Cys His Gly Cys Arg Lys
[0067]	85 90 95
[0068]	Asn Phe Phe Leu Ser Lys Ile Arg Ser His Val Ala Thr Cys Ser Lys
[0069]	100 105 110
[0070]	Tyr Gln Asn Tyr Ile Met Glu Gly Val Lys Ala Thr Ile Lys Asp Ala
[0071]	115 120 125
[0072]	Ser Leu Gln Pro Arg Asn Val Pro Asn Arg Tyr Thr Phe Pro Cys Pro
[0073]	130 135 140
[0074]	Tyr Cys Pro Glu Lys Asn Phe Asp Gln Glu Gly Leu Val Glu His Cys
[0075]	145 150 155 160
[0076]	Lys Leu Phe His Ser Thr Asp Thr Lys Ser Val Val Cys Pro Ile Cys
[0077]	165 170 175

[0078]	Ala Ser Met Pro Trp Gly Asp Pro Asn Tyr Arg Ser Ala Asn Phe Arg
[0079]	180 185 190
[0080]	Glu His Ile Gln Arg Arg His Arg Phe Ser Tyr Asp Thr Phe Val Asp
[0081]	195 200 205
[0082]	Tyr Asp Val Asp Glu Glu Asp Met Met Asn Gln Val Leu Gln Arg Ser
[0083]	210 215 220
[0084]	Ile Ile Asp Gln
[0085]	225
[0086]	<210> 3
[0087]	<211> 1362
[0088]	<212> PRT
[0089]	<213> 人工序列
[0090]	<220>
[0091]	<223> 合成多肽
[0092]	<400> 3
[0093]	Met Ser Ala Glu Ser Gly Pro Gly Thr Arg Leu Arg Asn Leu Pro Val
[0094]	1 5 10 15
[0095]	Met Gly Asp Gly Leu Glu Thr Ser Gln Met Ser Thr Thr Gln Ala Gln
[0096]	20 25 30
[0097]	Ala Gln Pro Gln Pro Ala Asn Ala Ala Ser Thr Asn Pro Pro Pro Pro
[0098]	35 40 45
[0099]	Glu Thr Ser Asn Pro Asn Lys Pro Lys Arg Gln Thr Asn Gln Leu Gln
[0100]	50 55 60
[0101]	Tyr Leu Leu Arg Val Val Leu Lys Thr Leu Trp Lys His Gln Phe Ala
[0102]	65 70 75 80
[0103]	Trp Pro Phe Gln Gln Pro Val Asp Ala Val Lys Leu Asn Leu Pro Asp
[0104]	85 90 95
[0105]	Tyr Tyr Lys Ile Ile Lys Thr Pro Met Asp Met Gly Thr Ile Lys Lys
[0106]	100 105 110
[0107]	Arg Leu Glu Asn Asn Tyr Tyr Trp Asn Ala Gln Glu Cys Ile Gln Asp
[0108]	115 120 125
[0109]	Phe Asn Thr Met Phe Thr Asn Cys Tyr Ile Tyr Asn Lys Pro Gly Asp
[0110]	130 135 140
[0111]	Asp Ile Val Leu Met Ala Glu Ala Leu Glu Lys Leu Phe Leu Gln Lys
[0112]	145 150 155 160
[0113]	Ile Asn Glu Leu Pro Thr Glu Glu Thr Glu Ile Met Ile Val Gln Ala
[0114]	165 170 175
[0115]	Lys Gly Arg Gly Arg Gly Arg Lys Glu Thr Gly Thr Ala Lys Pro Gly
[0116]	180 185 190

[0117]	Val	Ser	Thr	Val	Pro	Asn	Thr	Thr	Gln	Ala	Ser	Thr	Pro	Pro	Gln	Thr
[0118]				195					200						205	
[0119]	Gln	Thr	Pro	Gln	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Pro	His	Pro
[0120]				210					215						220	
[0121]	Phe	Pro	Ala	Val	Thr	Pro	Asp	Leu	Ile	Val	Gln	Thr	Pro	Val	Met	Thr
[0122]	225						230					235				240
[0123]	Val	Val	Pro	Pro	Gln	Pro	Leu	Gln	Thr	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Gln
[0124]					245						250					255
[0125]	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Gln	Ser	His	Pro
[0126]					260					265					270	
[0127]	Pro	Ile	Ile	Ala	Ala	Thr	Pro	Gln	Pro	Val	Lys	Thr	Lys	Lys	Gly	Val
[0128]				275					280						285	
[0129]	Lys	Arg	Lys	Ala	Asp	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Thr	Ile	Asp	Pro	Ile	His
[0130]		290						295					300			
[0131]	Glu	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys	Thr	Thr	Lys	Leu	Gly	Gln
[0132]	305						310					315				320
[0133]	Arg	Arg	Glu	Ser	Ser	Arg	Pro	Val	Lys	Pro	Pro	Lys	Lys	Asp	Val	Pro
[0134]					325					330					335	
[0135]	Asp	Ser	Gln	Gln	His	Pro	Ala	Pro	Glu	Lys	Ser	Ser	Lys	Val	Ser	Glu
[0136]				340						345					350	
[0137]	Gln	Leu	Lys	Cys	Cys	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Glu	Met	Phe	Ala	Lys	Lys
[0138]			355						360					365		
[0139]	His	Ala	Ala	Tyr	Ala	Trp	Pro	Phe	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Val	Glu	Ala
[0140]		370						375					380			
[0141]	Leu	Gly	Leu	His	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Ile	Lys	His	Pro	Met	Asp	Met
[0142]	385						390					395				400
[0143]	Ser	Thr	Ile	Lys	Ser	Lys	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Tyr	Arg	Asp	Ala	Gln
[0144]					405					410					415	
[0145]	Glu	Phe	Gly	Ala	Asp	Val	Arg	Leu	Met	Phe	Ser	Asn	Cys	Tyr	Lys	Tyr
[0146]				420						425				430		
[0147]	Asn	Pro	Pro	Asp	His	Glu	Val	Val	Ala	Met	Ala	Arg	Lys	Leu	Gln	Asp
[0148]				435						440				445		
[0149]	Val	Phe	Glu	Met	Arg	Phe	Ala	Lys	Met	Pro	Asp	Glu	Pro	Glu	Glu	Pro
[0150]		450						455					460			
[0151]	Val	Val	Ala	Val	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Lys	Val	Val
[0152]	465						470					475				480
[0153]	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser
[0154]					485					490					495	
[0155]	Asp	Ser	Ser	Thr	Asp	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Arg	Ala	Gln	Arg	Leu	Ala

[0156]	500	505	510
[0157]	Glu Leu Gln Glu Gln Leu Lys Ala Val His Glu Gln Leu Ala Ala Leu		
[0158]	515	520	525
[0159]	Ser Gln Pro Gln Gln Asn Lys Pro Lys Lys Lys Glu Lys Asp Lys Lys		
[0160]	530	535	540
[0161]	Glu Lys Lys Lys Glu Lys His Lys Arg Lys Glu Glu Val Glu Glu Asn		
[0162]	545	550	555
[0163]	Lys Lys Ser Lys Ala Lys Glu Pro Pro Pro Lys Lys Thr Lys Lys Asn		
[0164]	565	570	575
[0165]	Asn Ser Ser Asn Ser Asn Val Ser Lys Lys Glu Pro Ala Pro Met Lys		
[0166]	580	585	590
[0167]	Ser Lys Pro Pro Pro Thr Tyr Glu Ser Glu Glu Glu Asp Lys Cys Lys		
[0168]	595	600	605
[0169]	Pro Met Ser Tyr Glu Glu Lys Arg Gln Leu Ser Leu Asp Ile Asn Lys		
[0170]	610	615	620
[0171]	Leu Pro Gly Glu Lys Leu Gly Arg Val Val His Ile Ile Gln Ser Arg		
[0172]	625	630	635
[0173]	Glu Pro Ser Leu Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Ile Glu Ile Asp Phe		
[0174]	645	650	655
[0175]	Glu Thr Leu Lys Pro Ser Thr Leu Arg Glu Leu Glu Arg Tyr Val Thr		
[0176]	660	665	670
[0177]	Ser Cys Leu Arg Lys Lys Arg Lys Pro Gln Ala Glu Lys Val Asp Val		
[0178]	675	680	685
[0179]	Ile Ala Gly Ser Ser Lys Met Lys Gly Phe Ser Ser Ser Glu Ser Glu		
[0180]	690	695	700
[0181]	Ser Ser Ser Glu Ser Ser Ser Ser Asp Ser Glu Asp Ser Glu Thr Glu		
[0182]	705	710	715
[0183]	Met Ala Pro Lys Ser Lys Lys Lys Gly His Pro Gly Arg Glu Gln Lys		
[0184]	725	730	735
[0185]	Lys His His His His His His Gln Gln Met Gln Gln Ala Pro Ala Pro		
[0186]	740	745	750
[0187]	Val Pro Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro		
[0188]	755	760	765
[0189]	Pro Pro Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser		
[0190]	770	775	780
[0191]	Met Pro Gln Gln Ala Ala Pro Ala Met Lys Ser Ser Pro Pro Pro Phe		
[0192]	785	790	795
[0193]	Ile Ala Thr Gln Val Pro Val Leu Glu Pro Gln Leu Pro Gly Ser Val		
[0194]	805	810	815

[0195]	Phe Asp Pro Ile Gly His Phe Thr Gln Pro Ile Leu His Leu Pro Gln		
[0196]	820	825	830
[0197]	Pro Glu Leu Pro Pro His Leu Pro Gln Pro Pro Glu His Ser Thr Pro		
[0198]	835	840	845
[0199]	Pro His Leu Asn Gln His Ala Val Val Ser Pro Pro Ala Leu His Asn		
[0200]	850	855	860
[0201]	Ala Leu Pro Gln Gln Pro Ser Arg Pro Ser Asn Arg Ala Ala Ala Leu		
[0202]	865	870	875 880
[0203]	Pro Pro Lys Pro Ala Arg Pro Pro Ala Val Ser Pro Ala Leu Thr Gln		
[0204]	885	890	895
[0205]	Thr Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Met Ala Gln Pro Pro Gln Val Leu		
[0206]	900	905	910
[0207]	Leu Glu Asp Glu Glu Pro Pro Ala Pro Pro Leu Thr Ser Met Gln Met		
[0208]	915	920	925
[0209]	Gln Leu Tyr Leu Gln Gln Leu Gln Lys Val Gln Pro Pro Thr Pro Leu		
[0210]	930	935	940
[0211]	Leu Pro Ser Val Lys Val Gln Ser Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro		
[0212]	945	950	955 960
[0213]	Pro Pro His Pro Ser Val Gln Gln Gln Leu Gln Gln Gln Pro Pro Pro		
[0214]	965	970	975
[0215]	Pro Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Pro Pro Gln Gln Gln His Gln Pro		
[0216]	980	985	990
[0217]	Pro Pro Arg Pro Val His Leu Gln Pro Met Gln Phe Ser Thr His Ile		
[0218]	995	1000	1005
[0219]	Gln Gln Pro Pro Pro Pro Gln Gly Gln Gln Pro Pro His Pro Pro		
[0220]	1010	1015	1020
[0221]	Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Gln Pro Ala Lys Pro Gln Gln		
[0222]	1025	1030	1035
[0223]	Val Ile Gln His His His Ser Pro Arg His His Lys Ser Asp Pro		
[0224]	1040	1045	1050
[0225]	Tyr Ser Thr Gly His Leu Arg Glu Ala Pro Ser Pro Leu Met Ile		
[0226]	1055	1060	1065
[0227]	His Ser Pro Gln Met Ser Gln Phe Gln Ser Leu Thr His Gln Ser		
[0228]	1070	1075	1080
[0229]	Pro Pro Gln Gln Asn Val Gln Pro Lys Lys Gln Glu Leu Arg Ala		
[0230]	1085	1090	1095
[0231]	Ala Ser Val Val Gln Pro Gln Pro Leu Val Val Val Lys Glu Glu		
[0232]	1100	1105	1110
[0233]	Lys Ile His Ser Pro Ile Ile Arg Ser Glu Pro Phe Ser Pro Ser		

[0234]	1115	1120	1125
[0235]	Leu Arg Pro Glu Pro Pro	Lys His Pro Glu Ser	Ile Lys Ala Pro
[0236]	1130	1135	1140
[0237]	Val His Leu Pro Gln Arg	Pro Glu Met Lys Pro	Val Asp Val Gly
[0238]	1145	1150	1155
[0239]	Arg Pro Val Ile Arg Pro	Pro Glu Gln Asn Ala	Pro Pro Pro Gly
[0240]	1160	1165	1170
[0241]	Ala Pro Asp Lys Asp Lys	Gln Lys Gln Glu Pro	Lys Thr Pro Val
[0242]	1175	1180	1185
[0243]	Ala Pro Lys Lys Asp Leu	Lys Ile Lys Asn Met	Gly Ser Trp Ala
[0244]	1190	1195	1200
[0245]	Ser Leu Val Gln Lys His	Pro Thr Thr Pro Ser	Ser Thr Ala Lys
[0246]	1205	1210	1215
[0247]	Ser Ser Ser Asp Ser Phe	Glu Gln Phe Arg Arg	Ala Ala Arg Glu
[0248]	1220	1225	1230
[0249]	Lys Glu Glu Arg Glu Lys	Ala Leu Lys Ala Gln	Ala Glu His Ala
[0250]	1235	1240	1245
[0251]	Glu Lys Glu Lys Glu Arg	Leu Arg Gln Glu Arg	Met Arg Ser Arg
[0252]	1250	1255	1260
[0253]	Glu Asp Glu Asp Ala Leu	Glu Gln Ala Arg Arg	Ala His Glu Glu
[0254]	1265	1270	1275
[0255]	Ala Arg Arg Arg Gln Glu	Gln Gln Gln Gln Gln	Arg Gln Glu Gln
[0256]	1280	1285	1290
[0257]	Gln Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Ala Ala Ala Val	Ala Ala Ala Ala
[0258]	1295	1300	1305
[0259]	Thr Pro Gln Ala Gln Ser	Ser Gln Pro Gln Ser	Met Leu Asp Gln
[0260]	1310	1315	1320
[0261]	Gln Arg Glu Leu Ala Arg	Lys Arg Glu Gln Glu	Arg Arg Arg Arg
[0262]	1325	1330	1335
[0263]	Glu Ala Met Ala Ala Thr	Ile Asp Met Asn Phe	Gln Ser Asp Leu
[0264]	1340	1345	1350
[0265]	Leu Ser Ile Phe Glu Glu	Asn Leu Phe	
[0266]	1355	1360	
[0267]	<210> 4		
[0268]	<211> 58		
[0269]	<212> DNA		
[0270]	<213> 人工序列		
[0271]	<220>		
[0272]	<223> 合成多核苷酸		

[0273]	<400> 4
[0274]	ccggccatgg ctgccgtaag aatttctcga gaaattctta cggcagccat ggtttttg 58
[0275]	<210> 5
[0276]	<211> 22
[0277]	<212> DNA
[0278]	<213> 人工序列
[0279]	<220>
[0280]	<223> 合成多核苷酸
[0281]	<400> 5
[0282]	gcaagctgac cctgaagttc at 22
[0283]	<210> 6
[0284]	<211> 14
[0285]	<212> DNA
[0286]	<213> 人工序列
[0287]	<220>
[0288]	<223> 合成多核苷酸
[0289]	<400> 6
[0290]	aatgttccaa accg 14
[0291]	<210> 7
[0292]	<211> 14
[0293]	<212> DNA
[0294]	<213> 人工序列
[0295]	<220>
[0296]	<223> 合成多核苷酸
[0297]	<400> 7
[0298]	ttgcagtgtt ccac 14
[0299]	<210> 8
[0300]	<211> 21
[0301]	<212> DNA
[0302]	<213> 人工序列
[0303]	<220>
[0304]	<223> 合成多核苷酸
[0305]	<400> 8
[0306]	cccaccgtgt tettegacat t 21
[0307]	<210> 9
[0308]	<211> 22
[0309]	<212> DNA
[0310]	<213> 人工序列
[0311]	<220>

- [0312] <223> 合成多核苷酸
[0313] <400> 9
[0314] ggacccgtat gctttaggat ga 22
[0315] <210> 10
[0316] <211> 19
[0317] <212> RNA
[0318] <213> 人工序列
[0319] <220>
[0320] <223> 合成多核苷酸
[0321] <400> 10
[0322] gugugaaggc caccauuaa 19
[0323] <210> 11
[0324] <211> 19
[0325] <212> RNA
[0326] <213> 人工序列
[0327] <220>
[0328] <223> 合成多核苷酸
[0329] <400> 11
[0330] gcuuagaggu guacgagaa 19
[0331] <210> 12
[0332] <211> 19
[0333] <212> RNA
[0334] <213> 人工序列
[0335] <220>
[0336] <223> 合成多核苷酸
[0337] <400> 12
[0338] gcacggauac caaaucugu 19
[0339] <210> 13
[0340] <211> 19
[0341] <212> RNA
[0342] <213> 人工序列
[0343] <220>
[0344] <223> 合成多核苷酸
[0345] <400> 13
[0346] agaccagcau gacagauuu 19
[0347] <210> 14
[0348] <211> 19
[0349] <212> RNA
[0350] <213> 人工序列

-
- [0351] <220>
[0352] <223> 合成多核苷酸
[0353] <400> 14
[0354] cugagaaguc gucgggcga 19
[0355] <210> 15
[0356] <211> 19
[0357] <212> DNA
[0358] <213> 人工序列
[0359] <220>
[0360] <223> 合成多核苷酸
[0361] <400> 15
[0362] tgtccgtcag aacccatgc 19
[0363] <210> 16
[0364] <211> 21
[0365] <212> DNA
[0366] <213> 人工序列
[0367] <220>
[0368] <223> 合成多核苷酸
[0369] <400> 16
[0370] aaagtcgaag ttccatcgct c 21

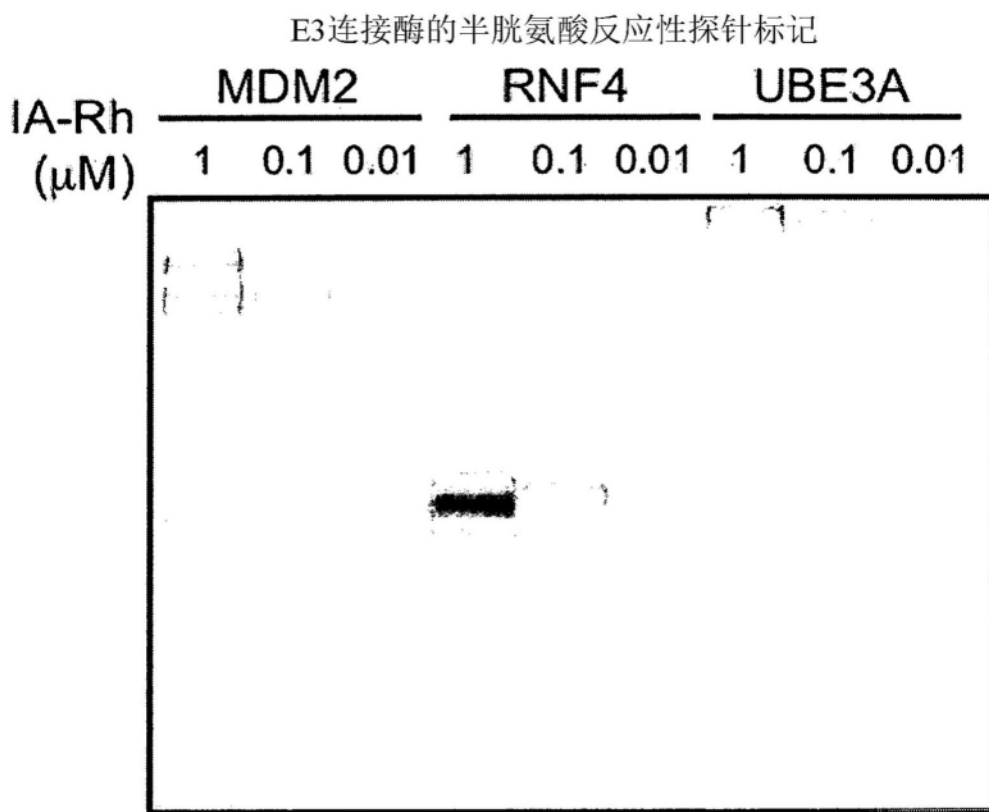


图1A

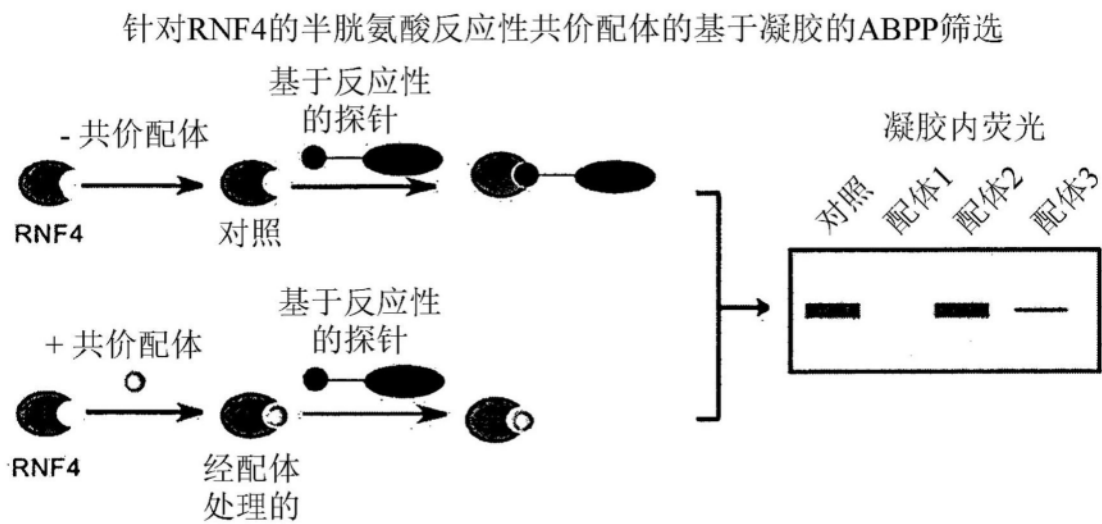


图1B

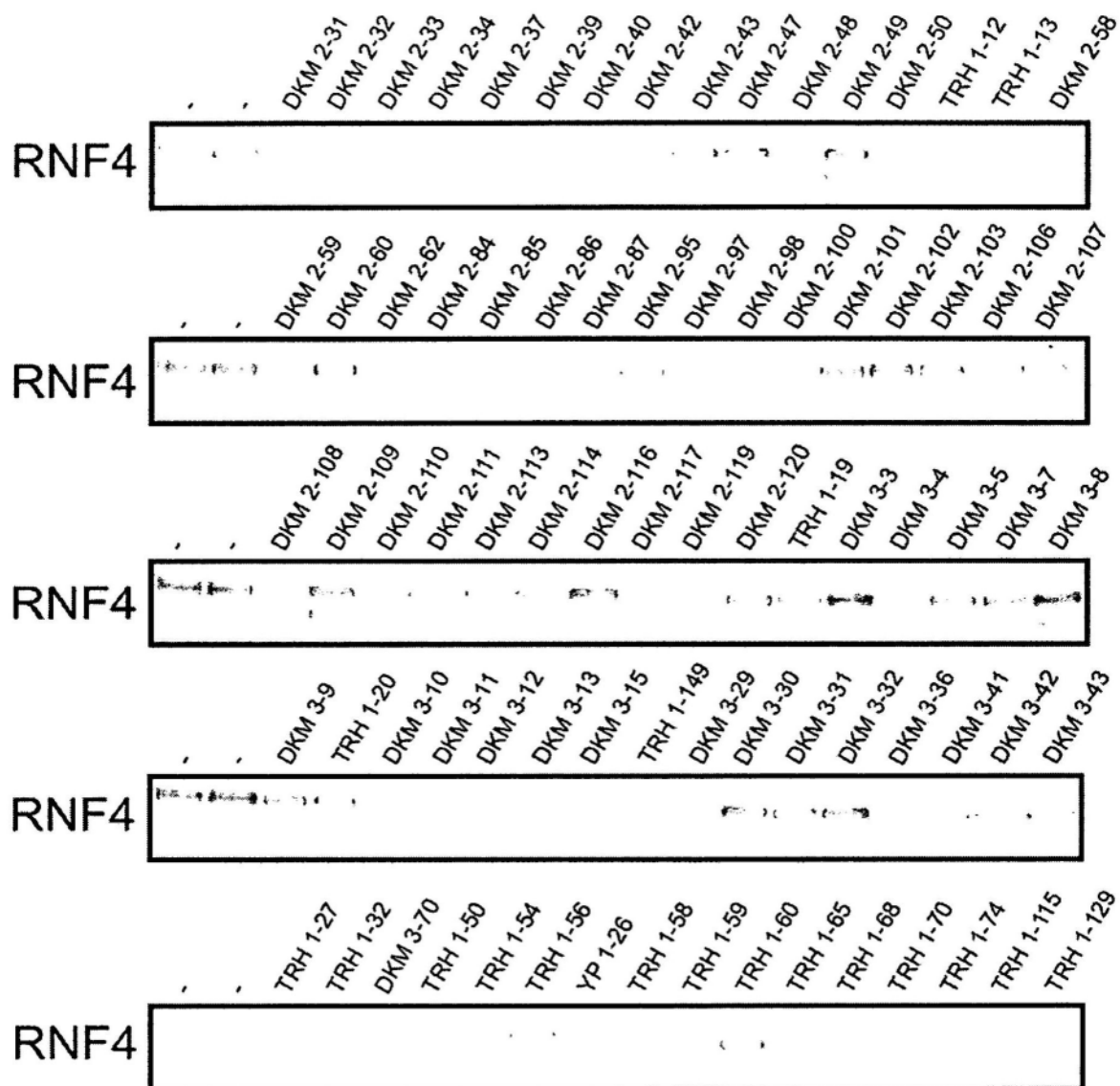


图1C

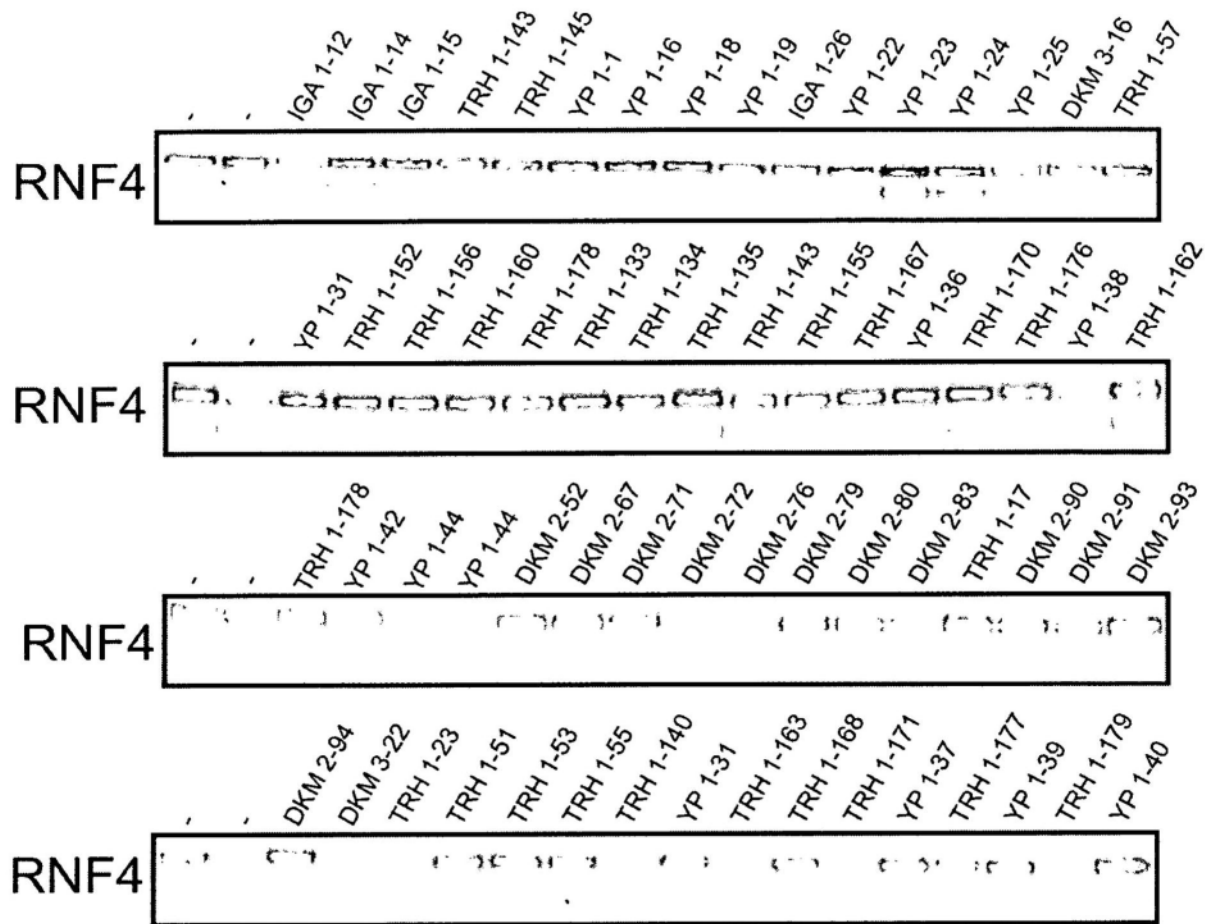


图1D

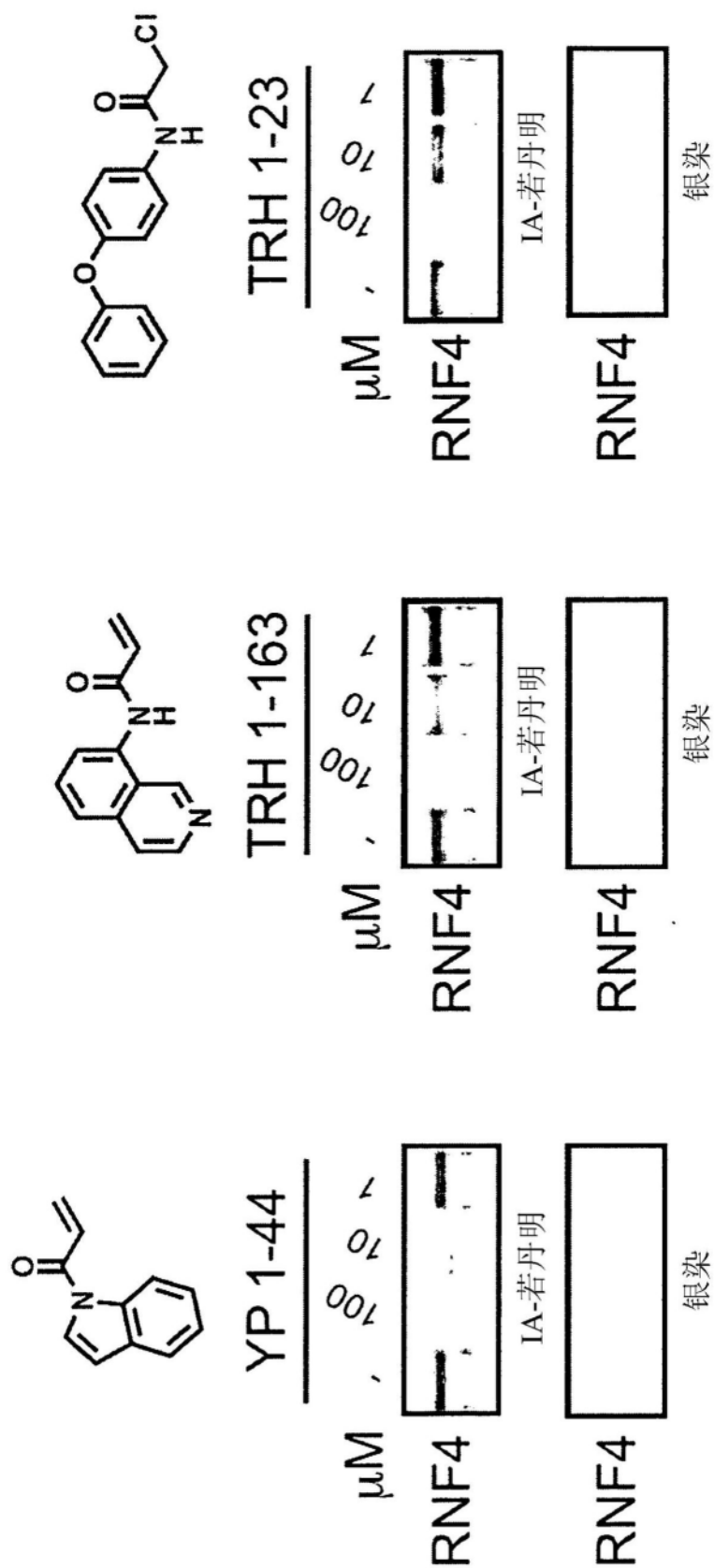
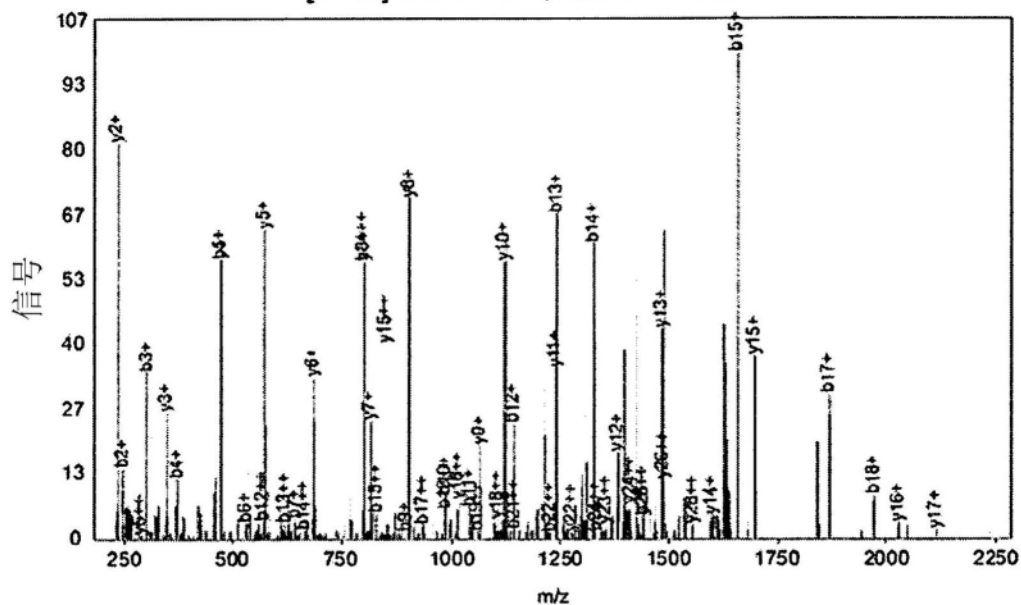


图1E

TRH 1-23与RNF4的C132和C135反应

RNF4 C132

D E ¹G ²A ³T ⁴I ⁵G ⁶L ⁷R ⁸P ⁹S ¹⁰G ¹¹T ¹²V ¹³S ¹⁴C ¹⁵P ¹⁶I ¹⁷C ¹⁸M ¹⁹D ²⁰G ²¹Y ²²S ²³E ²⁴I ²⁵M ²⁶Q ²⁷N ²⁸G ²⁹R[M+H]⁺ 3353.4871, m/z 1118.5006

RNF4 C135

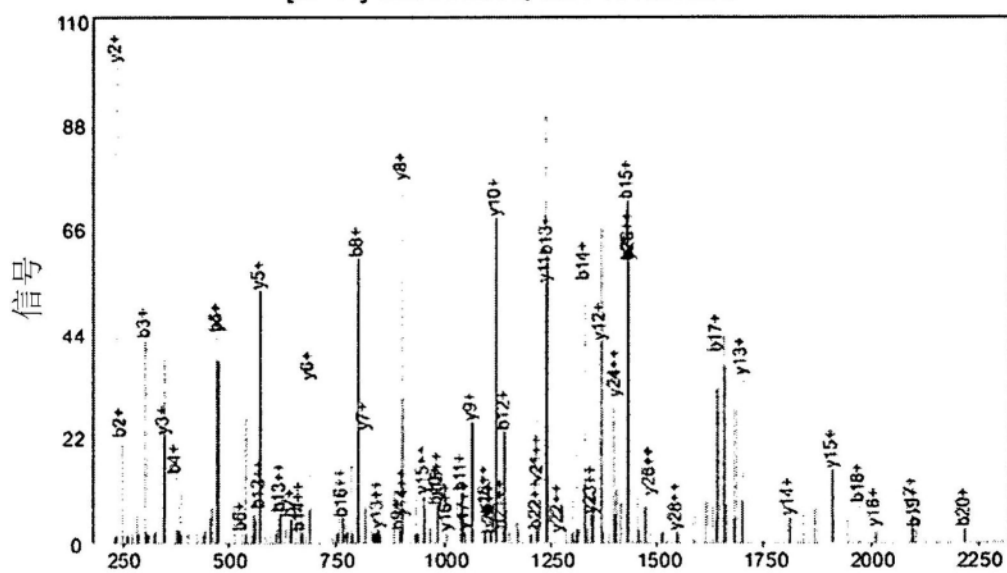
D E ¹G ²A ³T ⁴I ⁵G ⁶L ⁷R ⁸P ⁹S ¹⁰G ¹¹T ¹²V ¹³S ¹⁴C ¹⁵P ¹⁶I ¹⁷C ¹⁸M ¹⁹D ²⁰G ²¹Y ²²S ²³E ²⁴I ²⁵M ²⁶Q ²⁷N ²⁸G ²⁹R[M+H]⁺ 3337.4922, m/z 1113.1689

图2A

TRH 1-23与RNF4的C132/C135的反应性

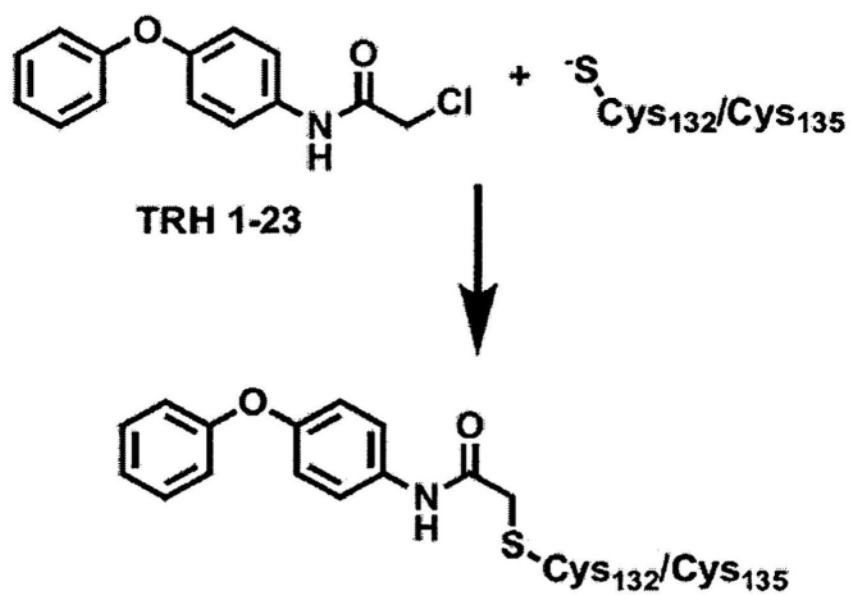


图2B

RNF4自体泛素化活性

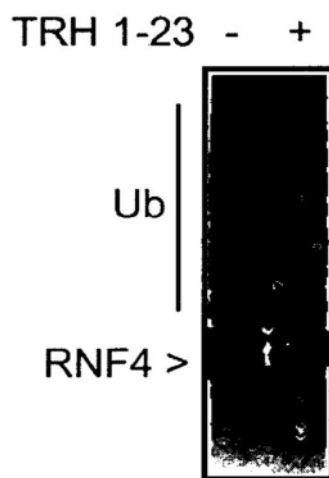


图2C

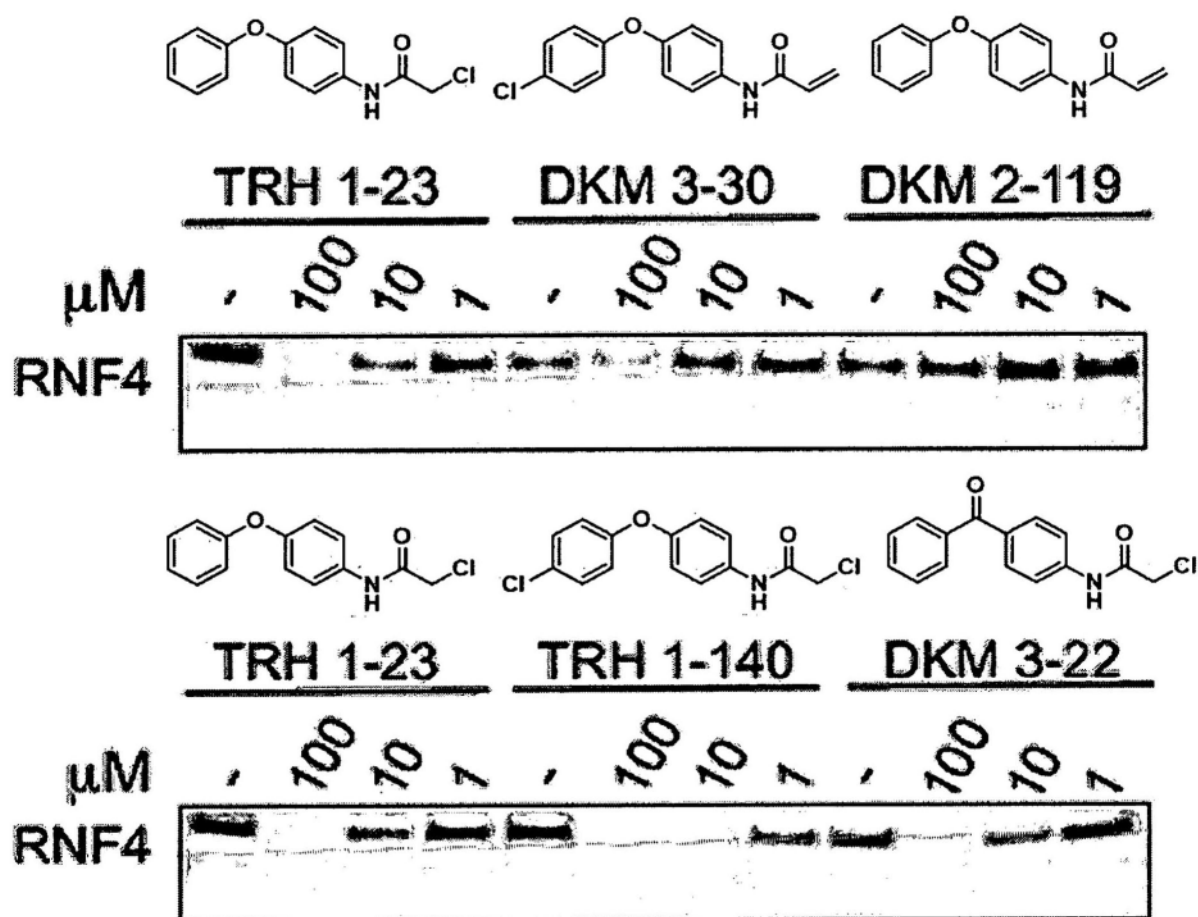


图3A

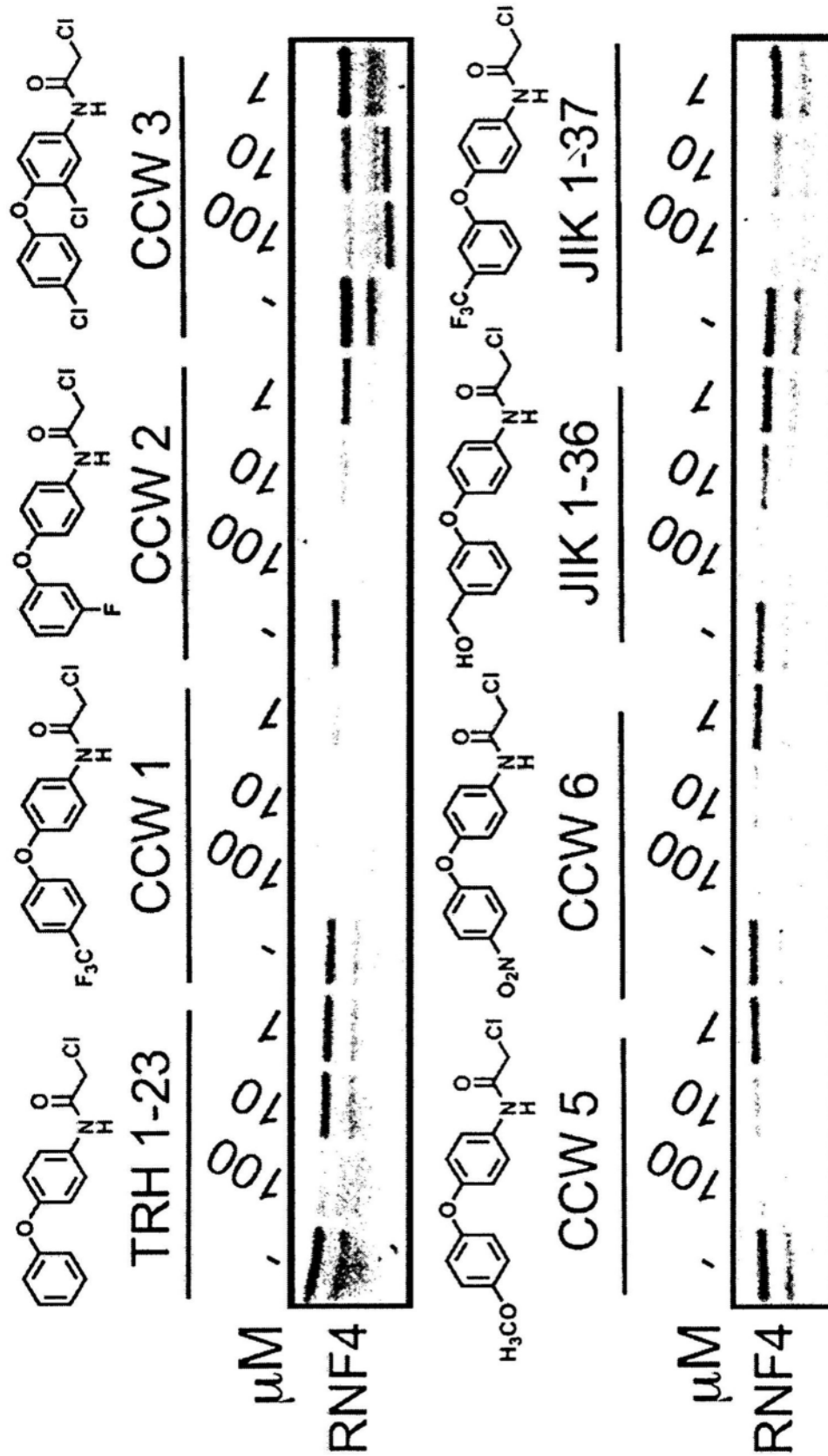


图3B

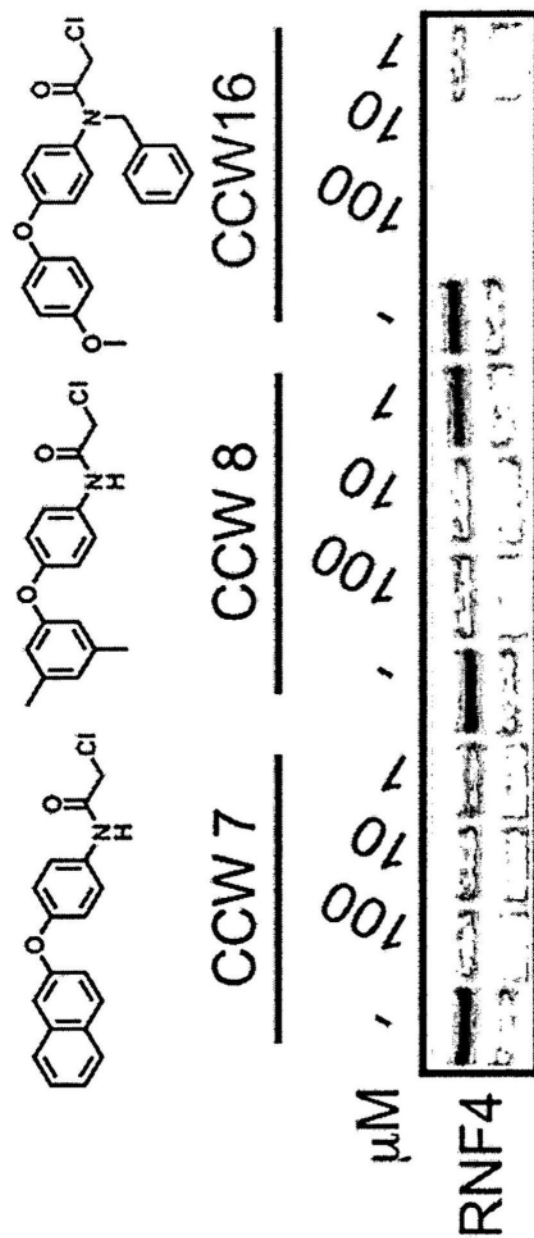


图3B(续)

CCW 16: 前导RNF4靶向性配体

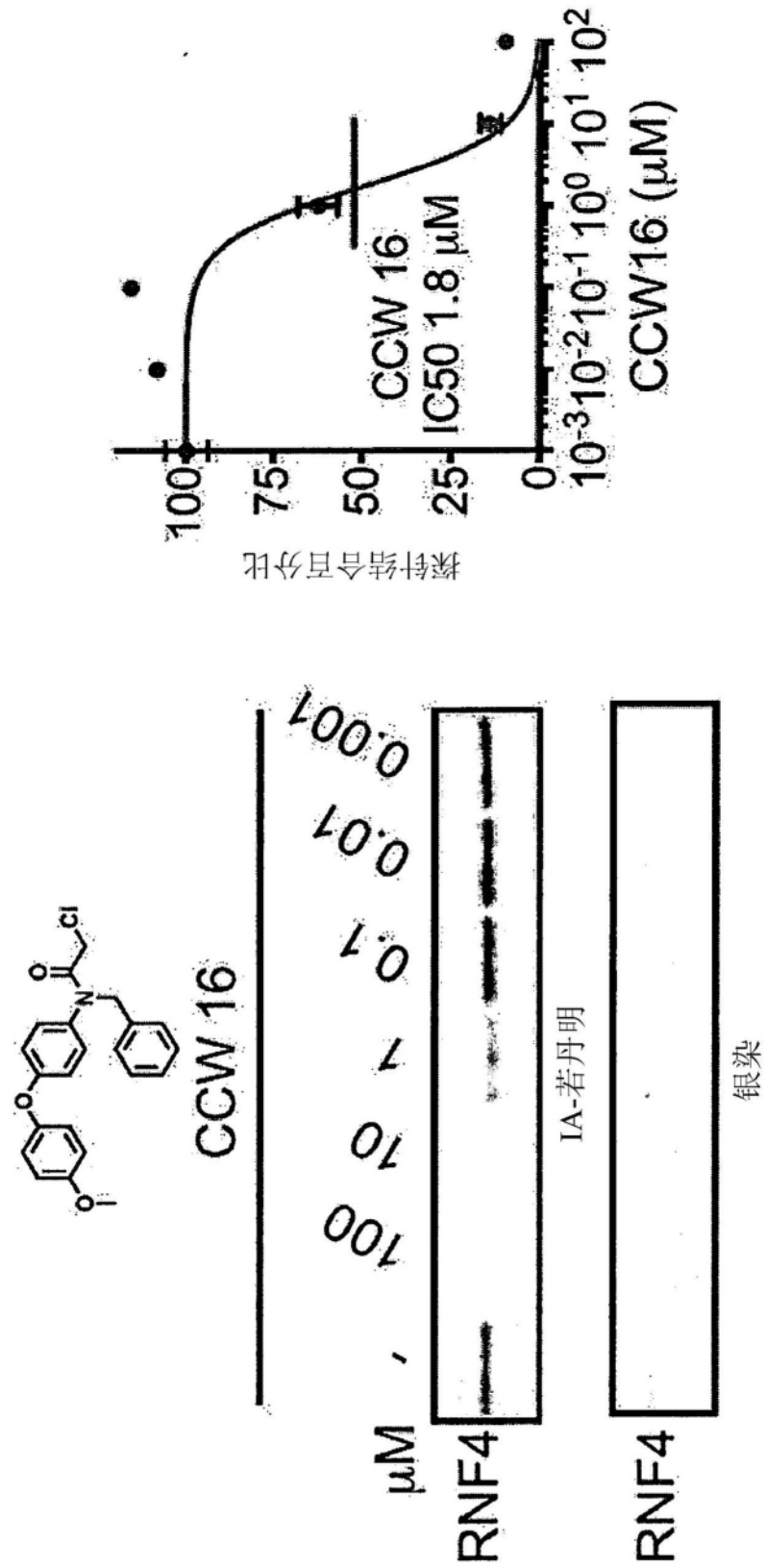


图3C

CCW 28-3: 基于RNF4募集剂的降解剂

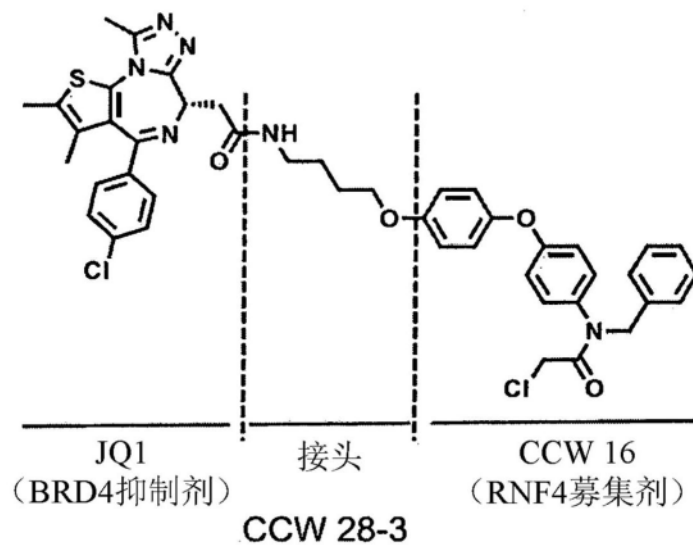


图4A

针对RNF4的CCW 28-3的基于凝胶的ABPP

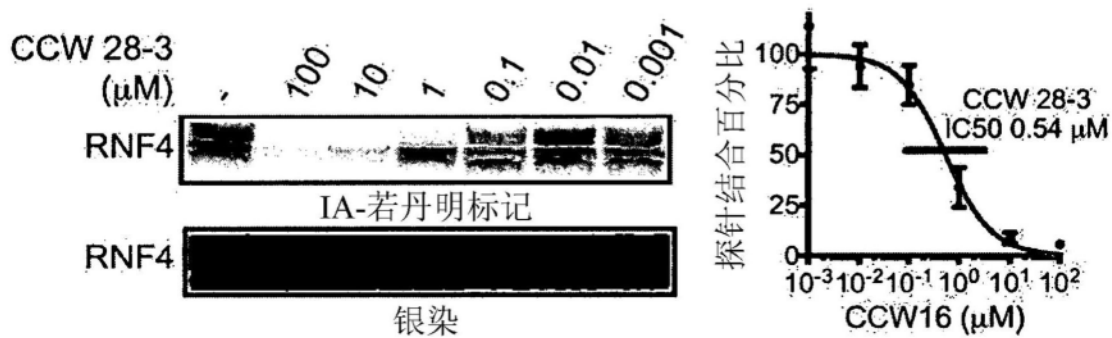


图4B

在231MFP乳腺癌细胞中, CCW 28-3降解BRD4

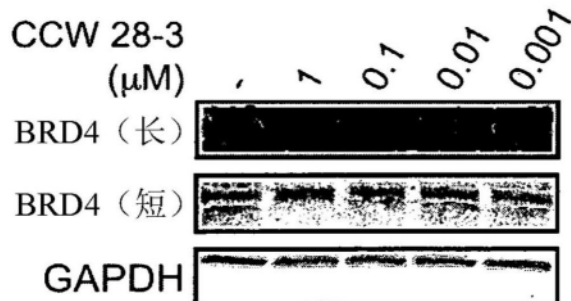


图4C

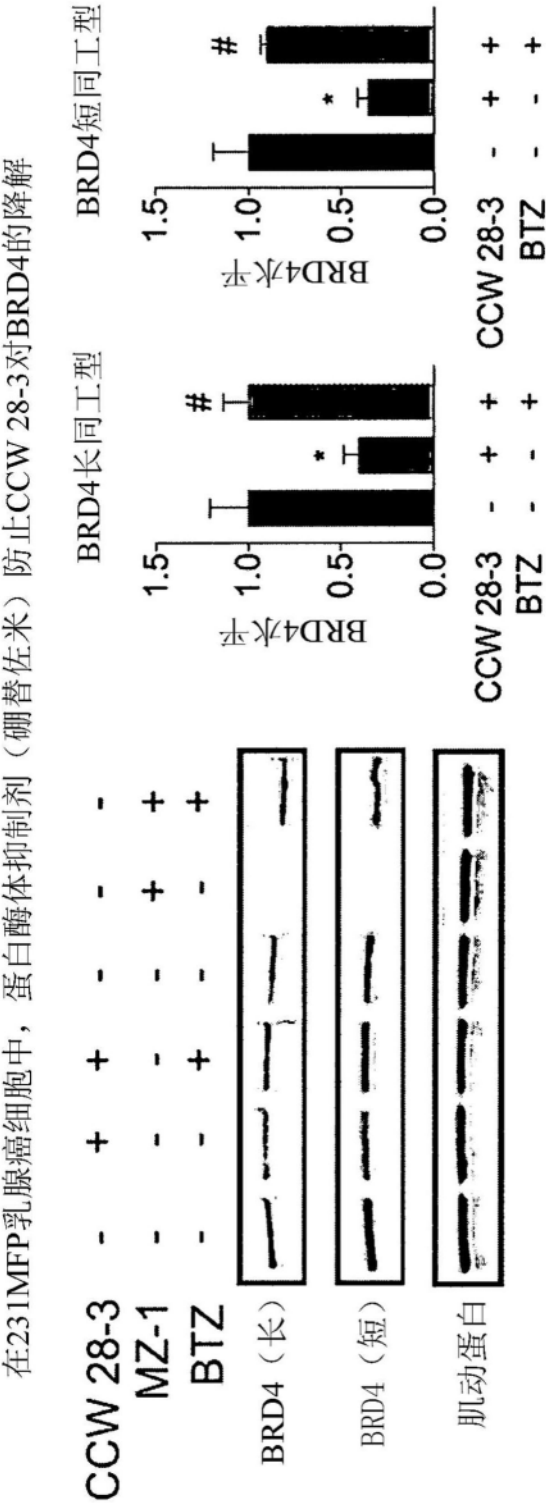


图4D

在231MFP乳腺癌细胞中，用BRD4抑制剂（JQ1）和E1抑制剂（TAK-243）进行
预处理防止CCW 28-3对BRD4的降解

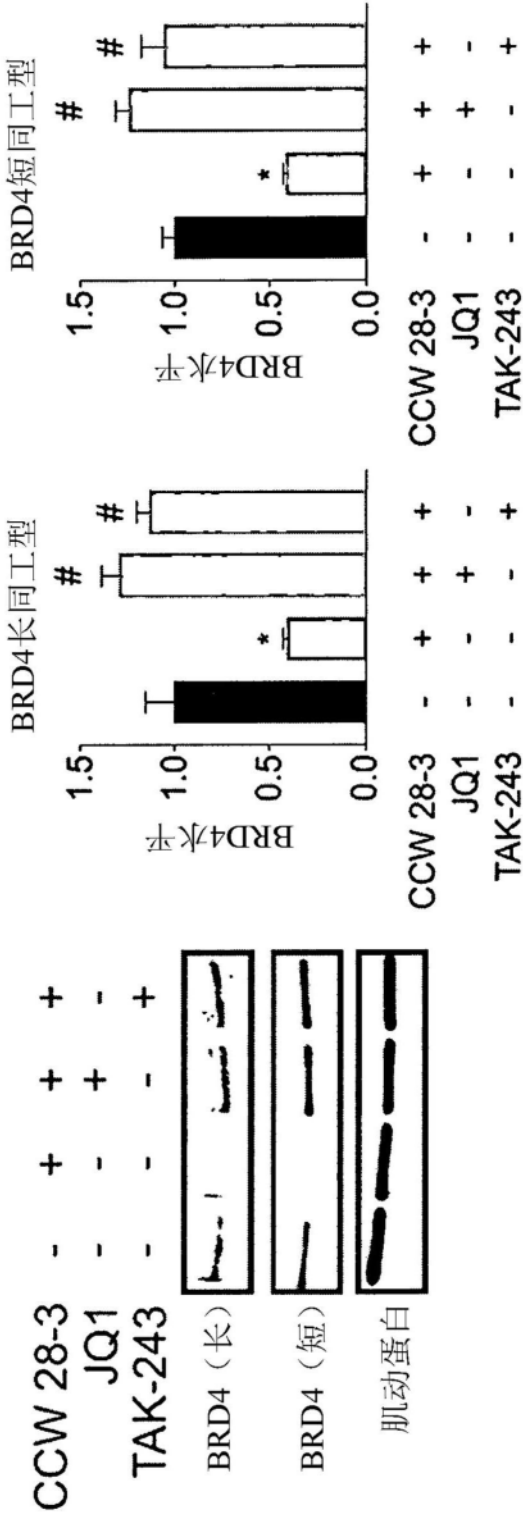


图4E

在RNF4敲除Hela细胞中，减弱了CCW 28-3对BRD4的降解

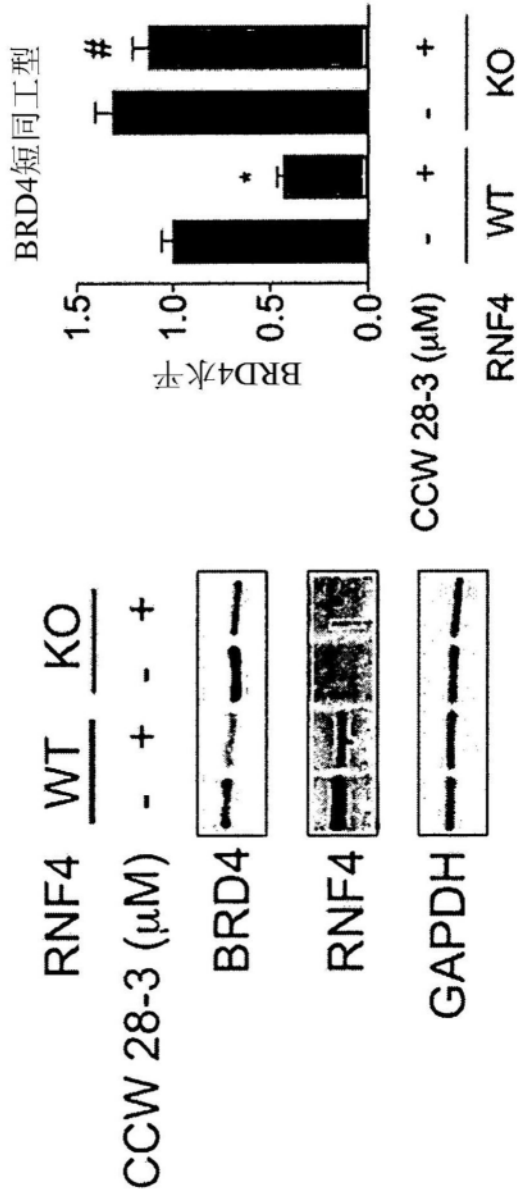


图4F

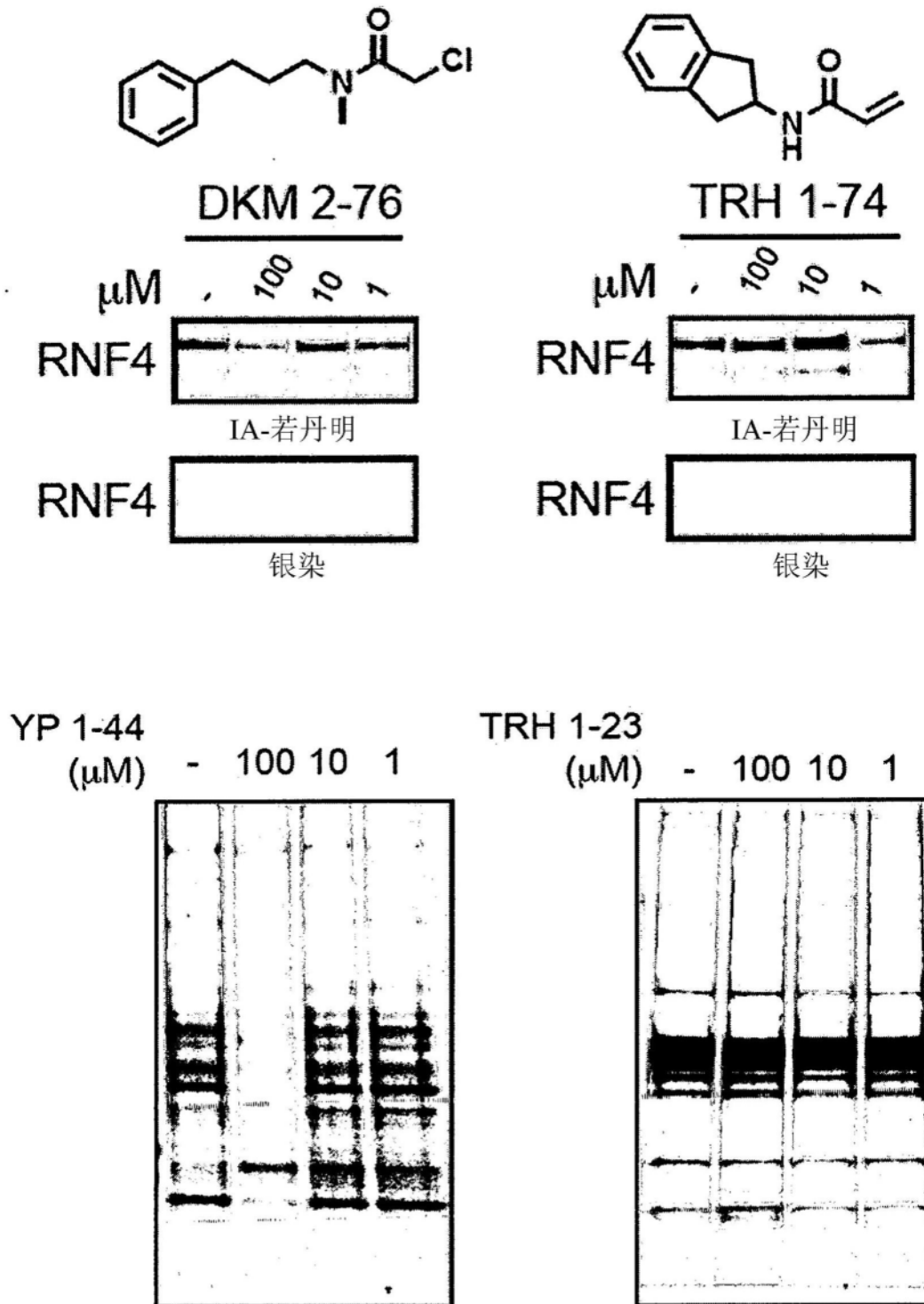


图5

印苦楝内酯对乳腺癌细胞增殖和存活的影响

231MFP乳腺癌细胞

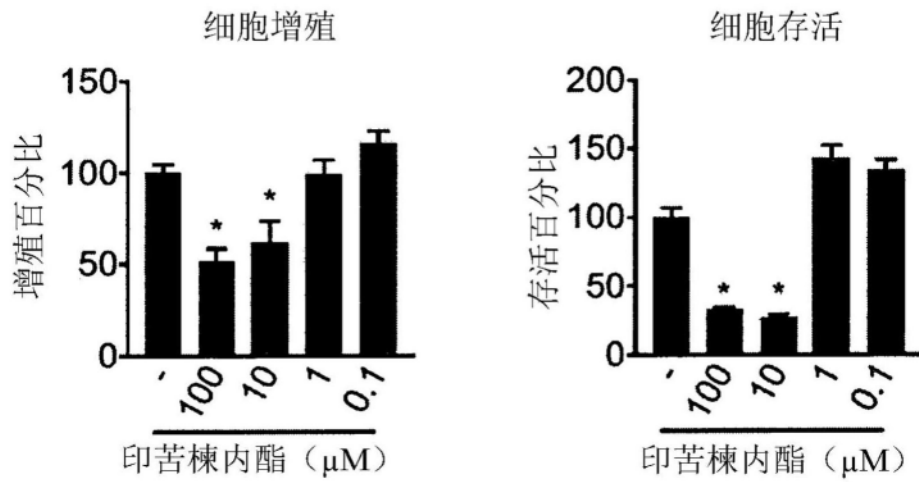


图8B

HCC38乳腺癌细胞

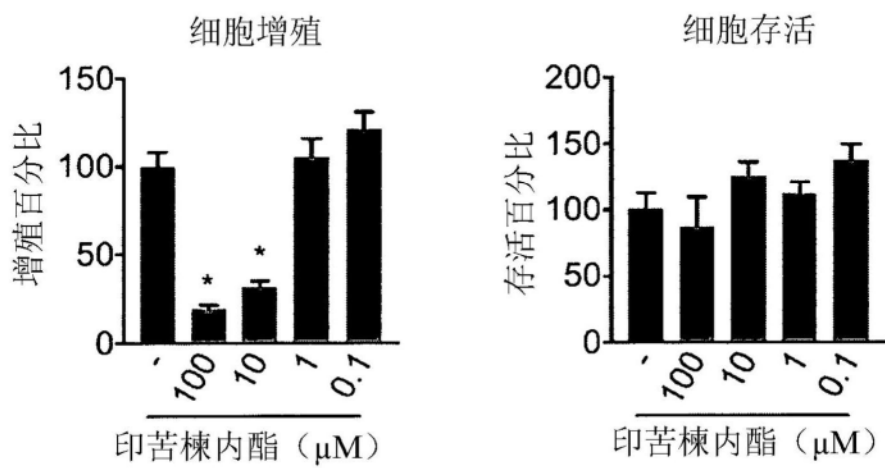


图8C

使用isoTOP-ABPP平台定位印苦楝内酯靶向的有药可用性热点

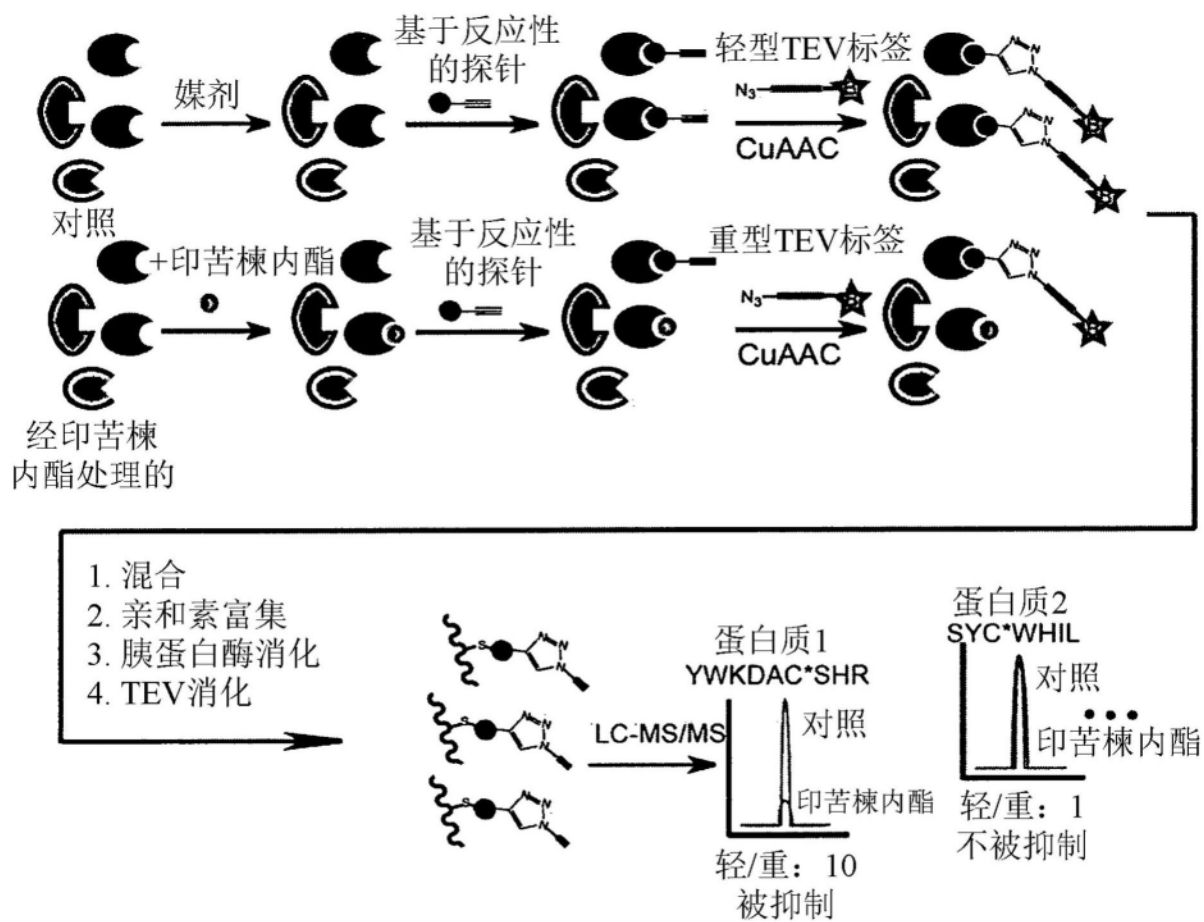


图9A

在231MFP乳腺癌细胞蛋白质组中对印苦楝内酯
进行isoTOP-ABPP体外分析

在231MFP细胞中对印苦楝内酯进行isoTOP-ABPP分析

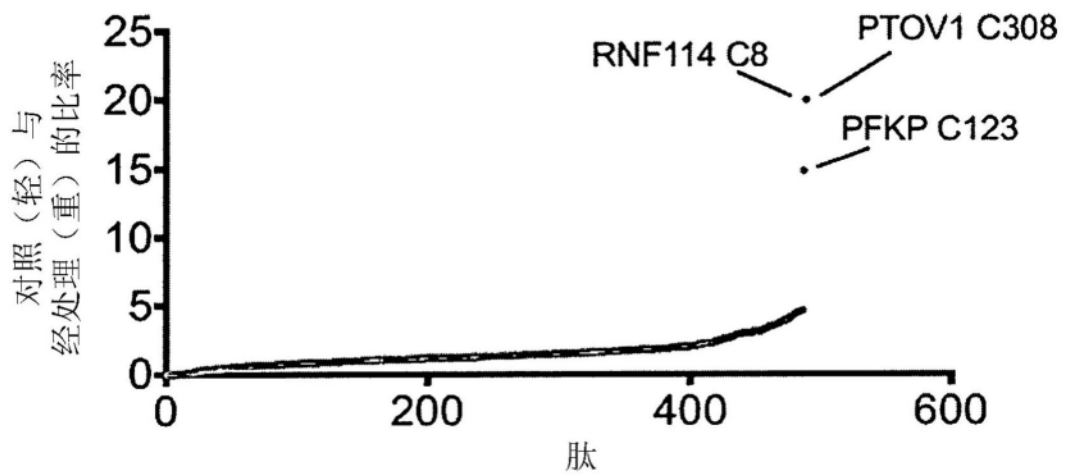


图9B

在231MFP乳腺癌细胞中对印苦楝内酯进行isoTOP-ABPP原位分析

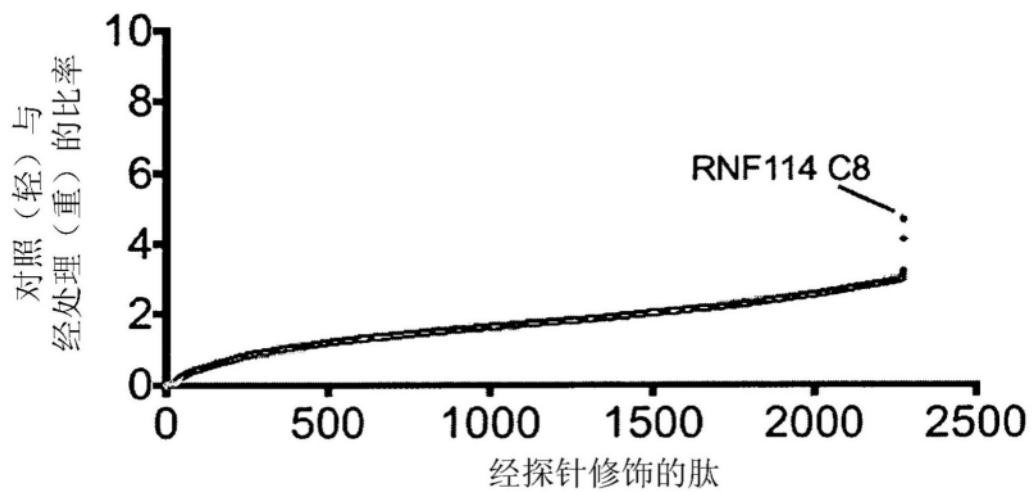


图9C

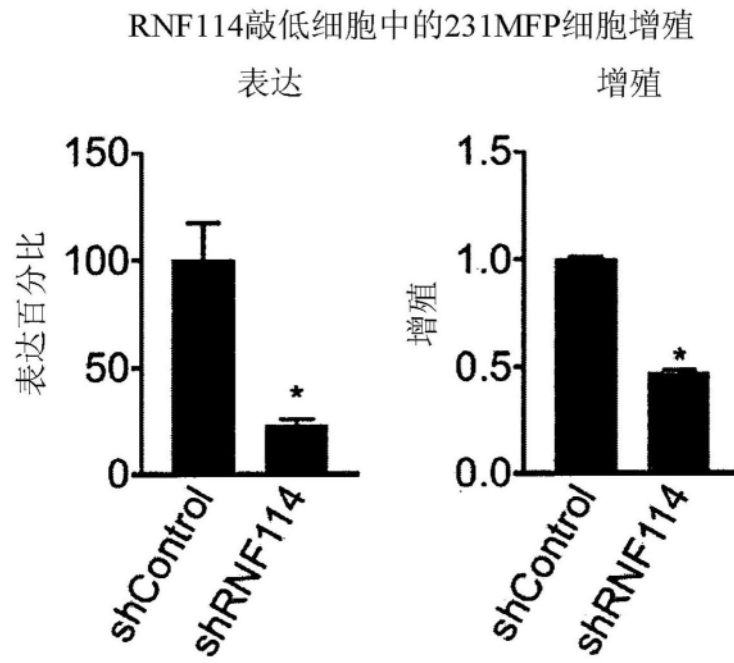


图9D

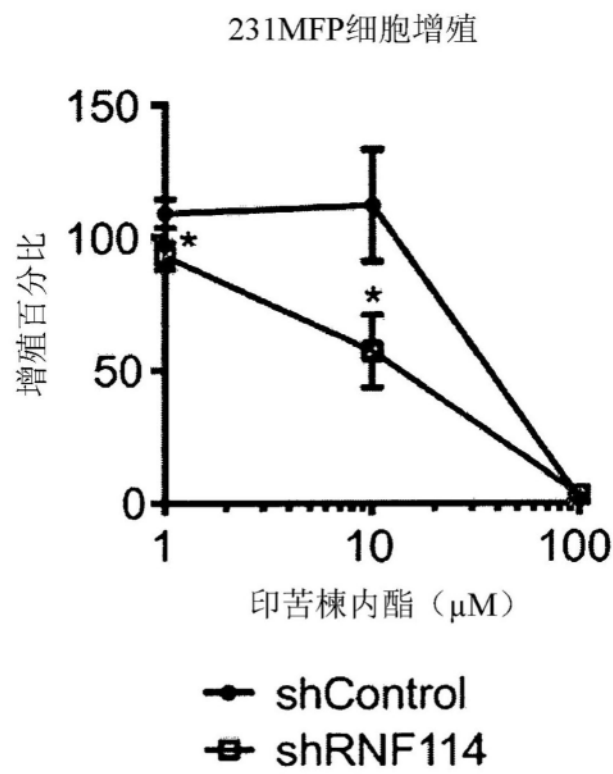


图9E

RNF114结构的无序/有序预测

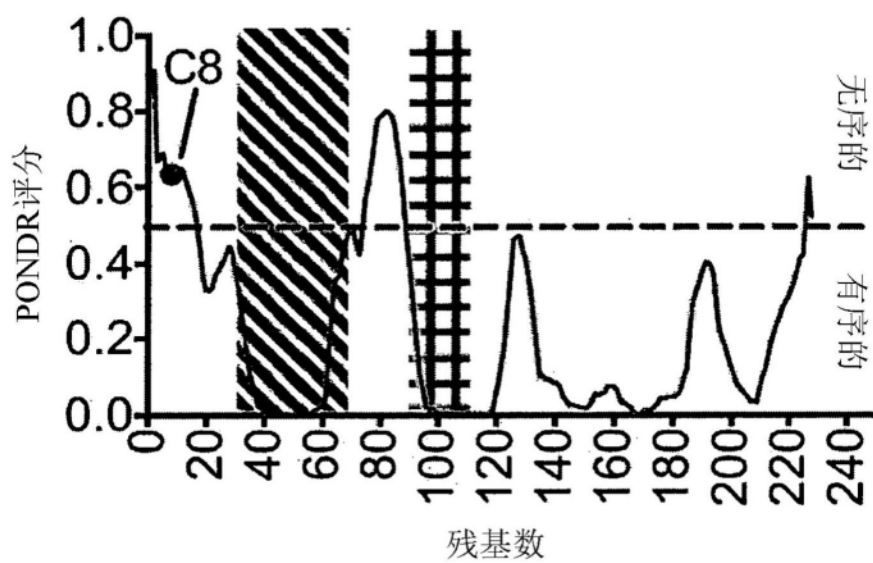


图10A

印苦楝内酯-炔烃探针的合成

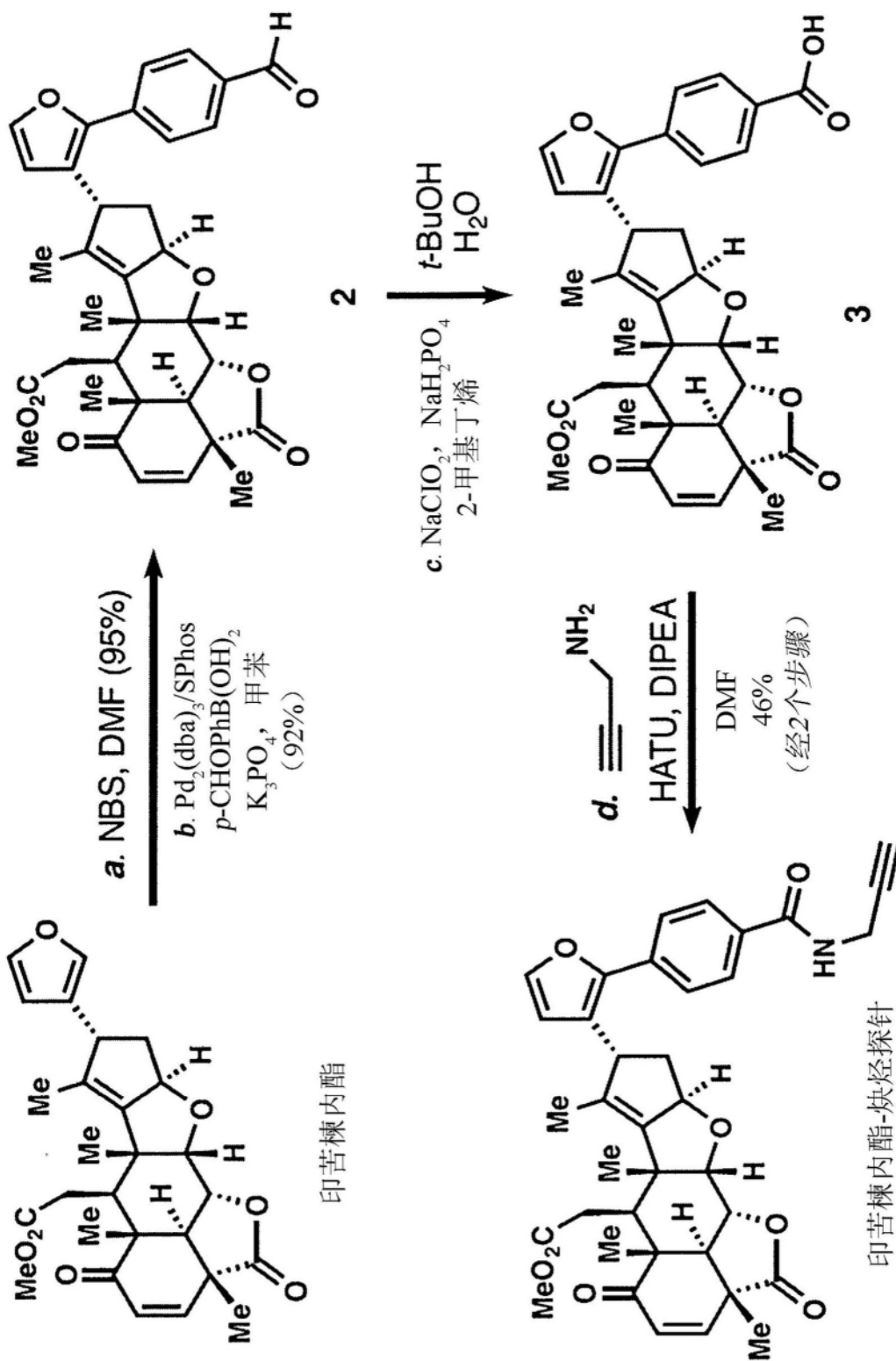


图10B

231MFP细胞蛋白质组的
印苦楝内酯-炔烃探针标记

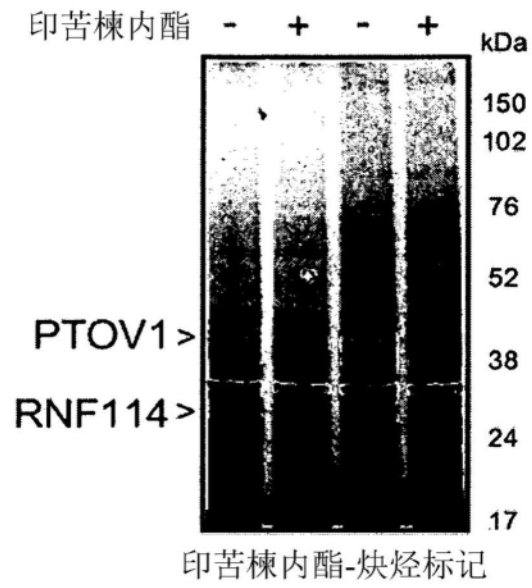


图10C

RNF114的印苦楝内酯-炔烃探针标记

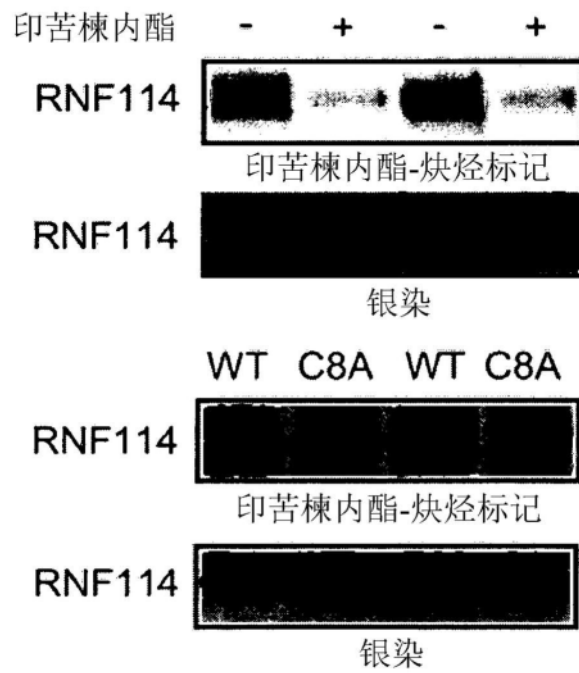


图10D

RNF114的C8上的印苦楝内酯加合物

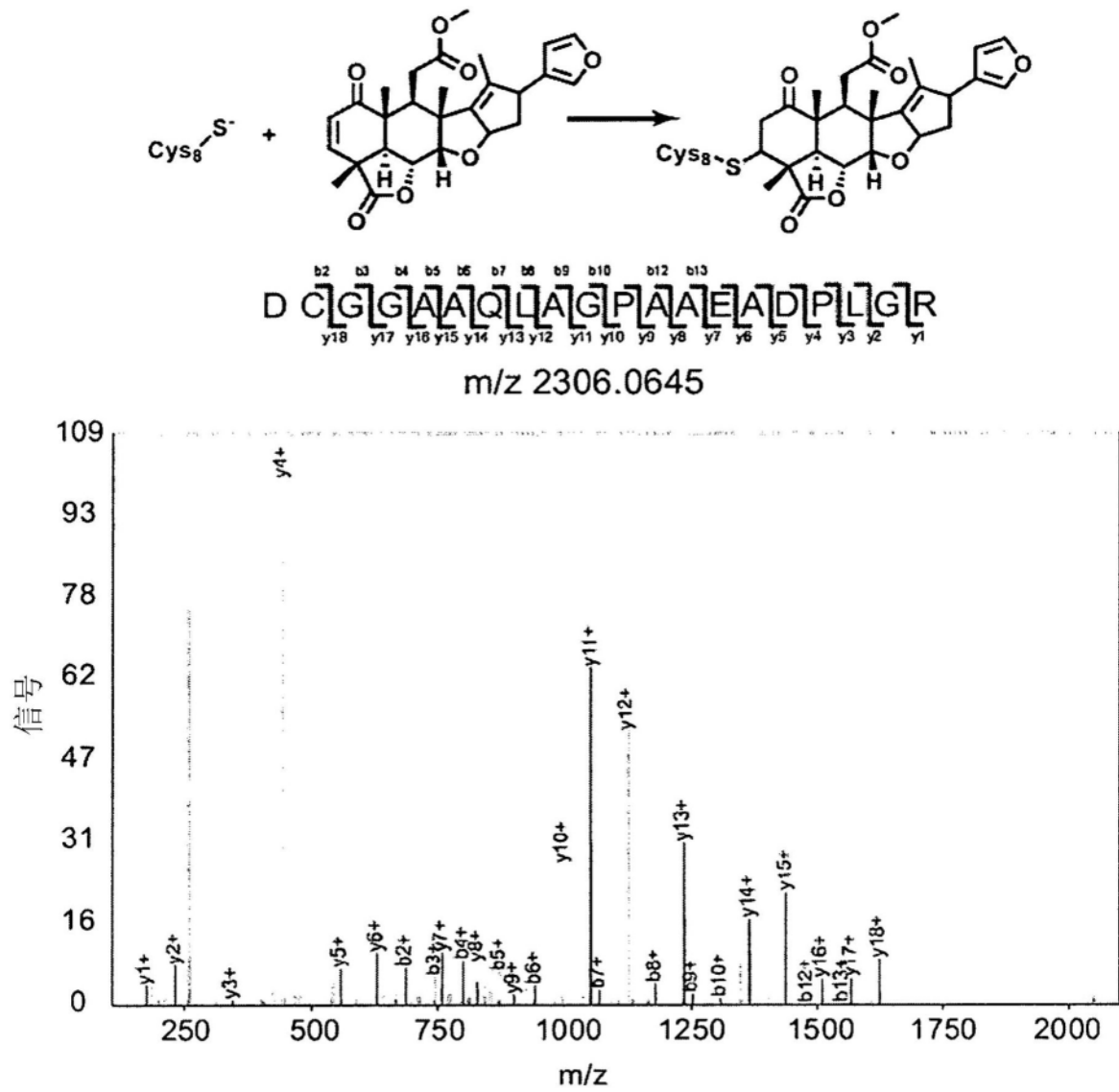


图10E

RNF114活性测定

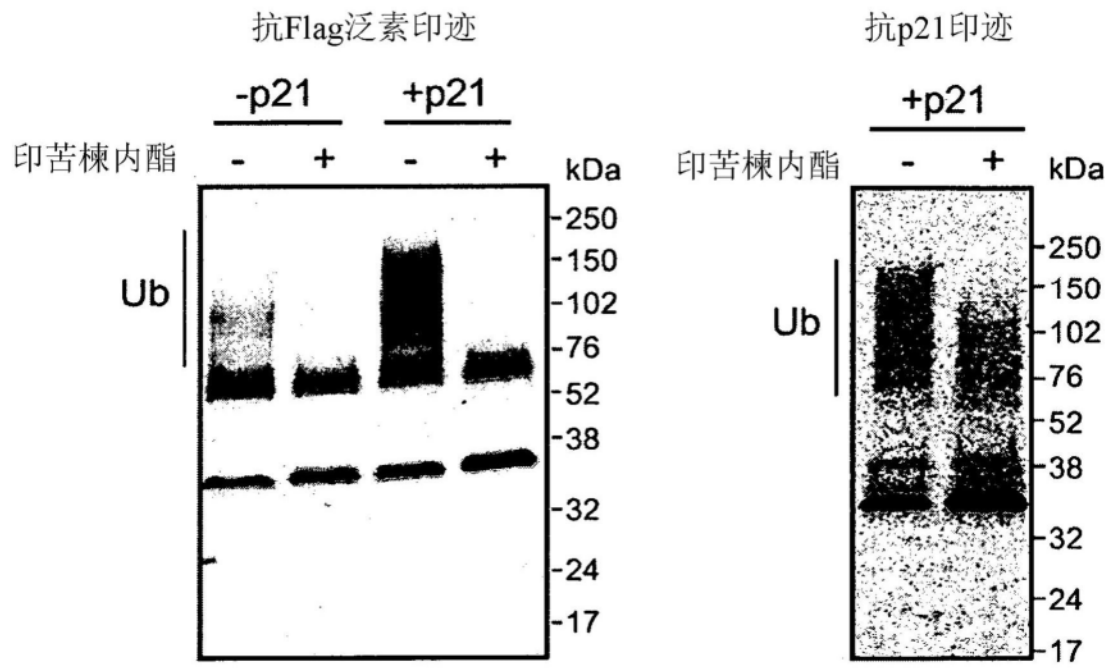


图11A

抗Flag泛素印迹

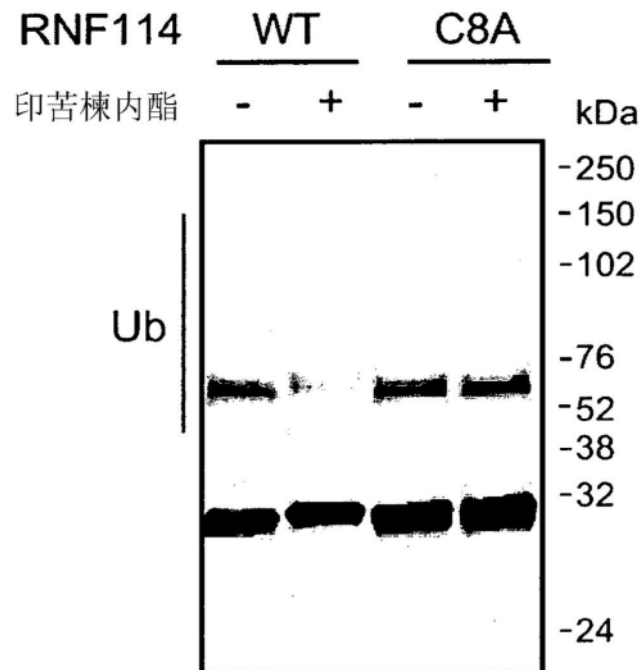


图11B

RNF114的抗Flag下拉

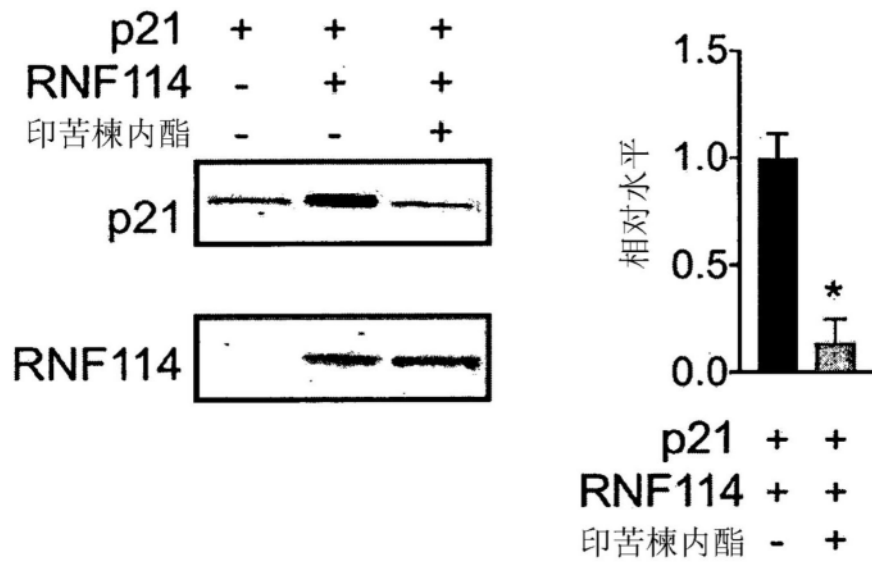


图11C

用印苦楝内酯处理后231MFP细胞中的p21水平

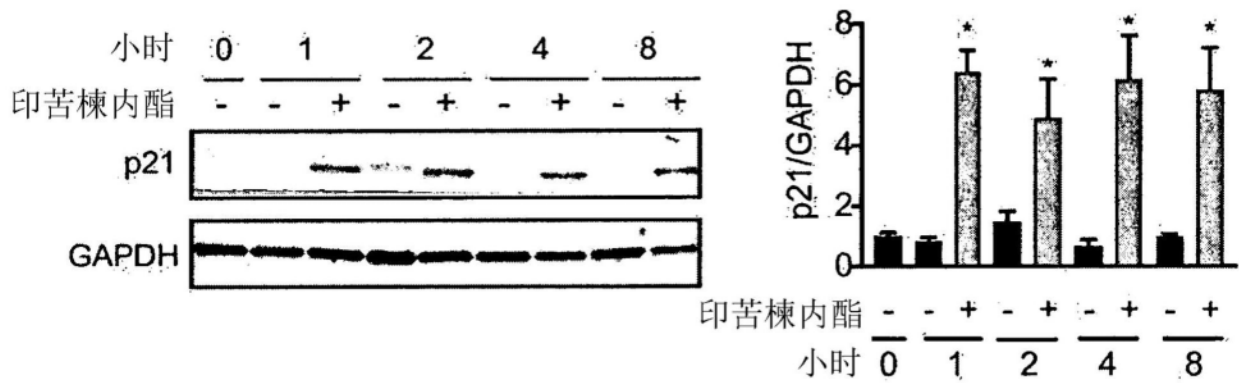
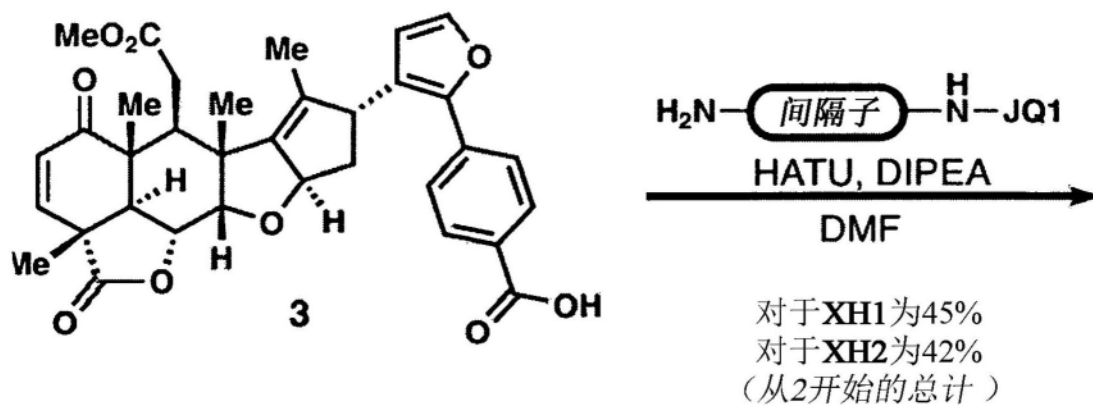


图11D



基于印苦楝内酯的降解剂

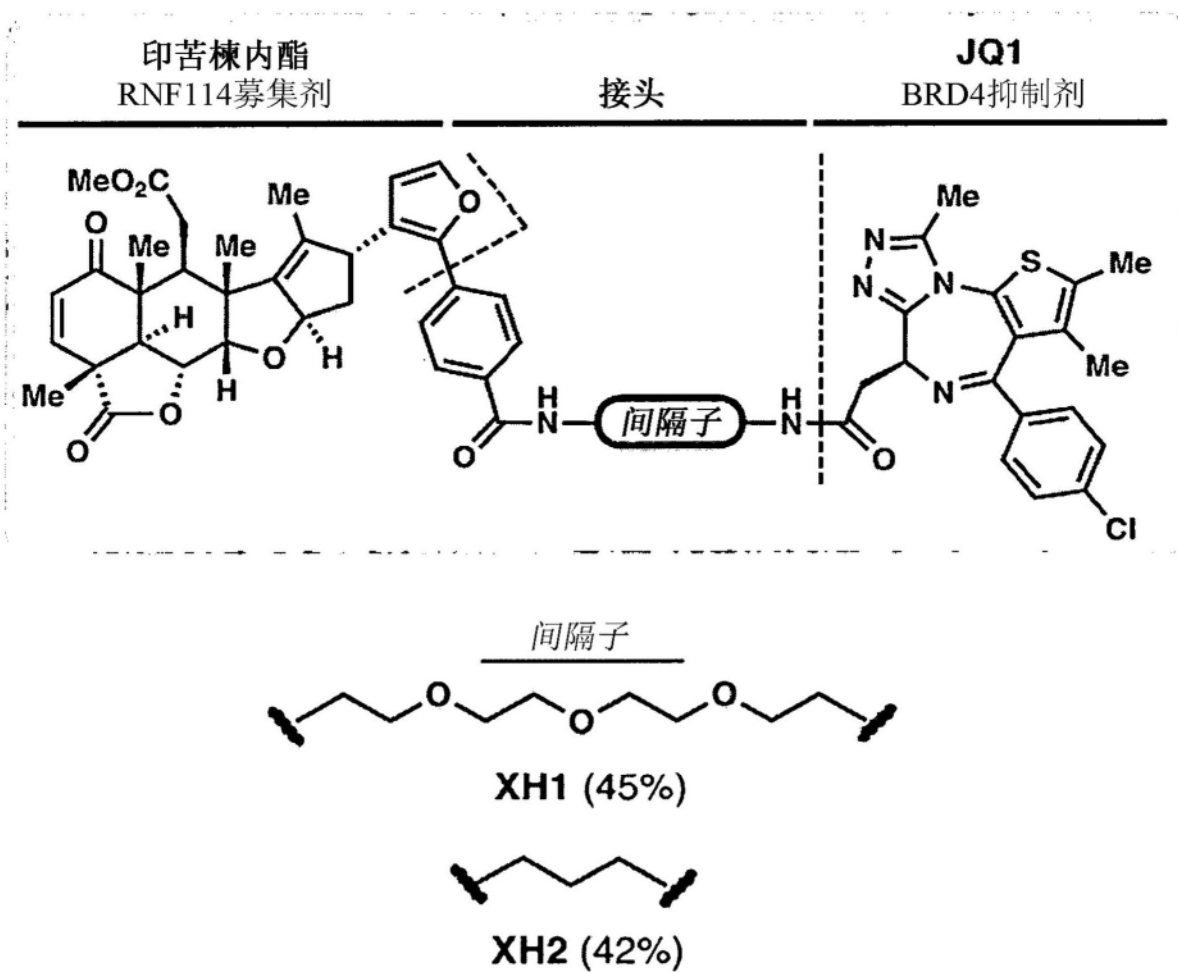


图12A

XH1不会影响BRD4的降解

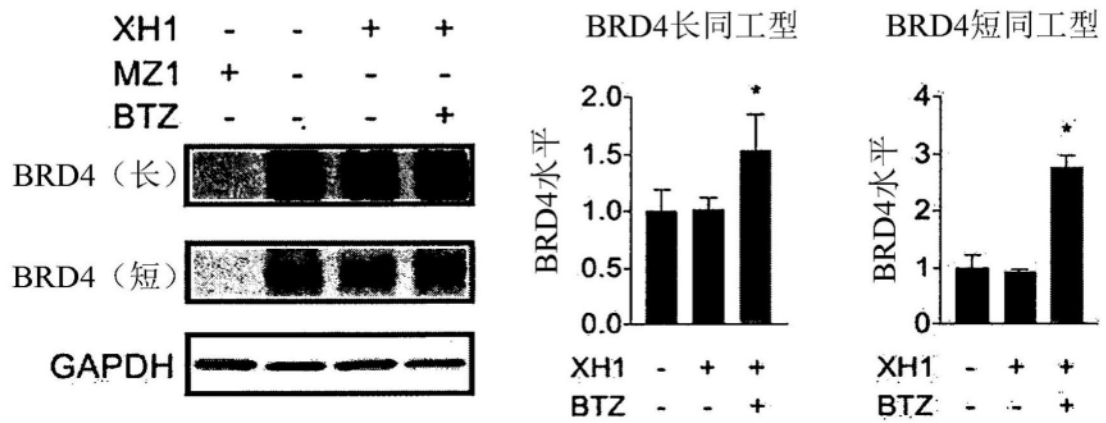


图12B

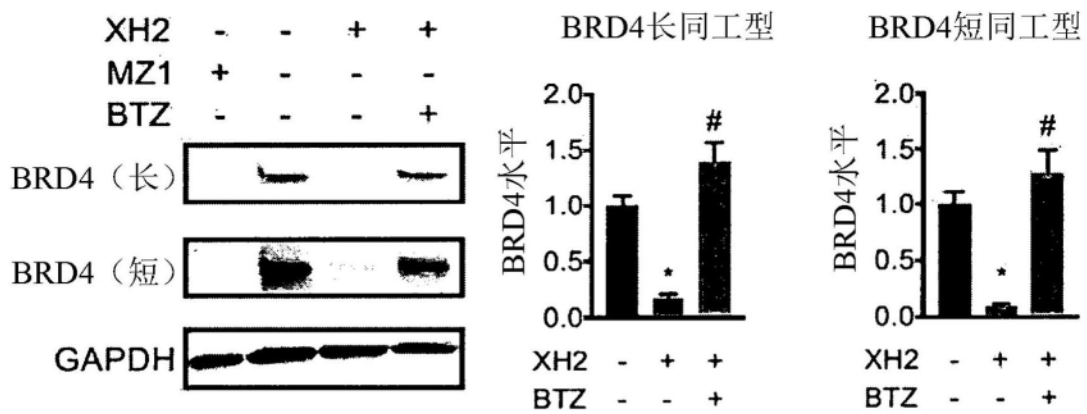
在231MFP乳腺癌细胞中，蛋白酶体抑制剂
挽救XH2介导的BRD4降解

图12C

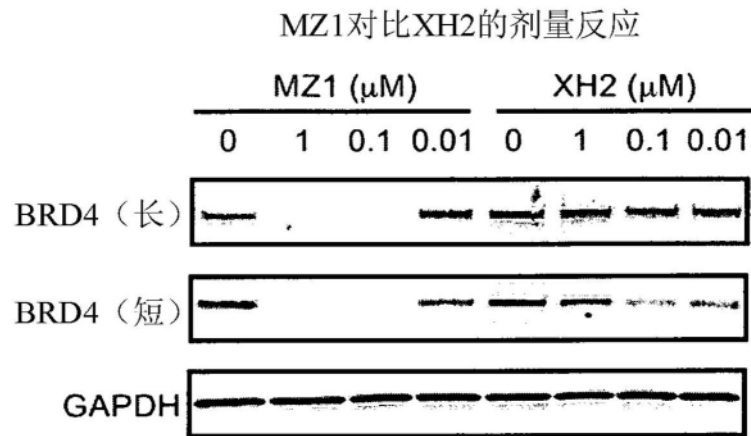


图12D

在231MFP乳腺癌细胞中，E1抑制剂挽救XH2介导的BRD4降解

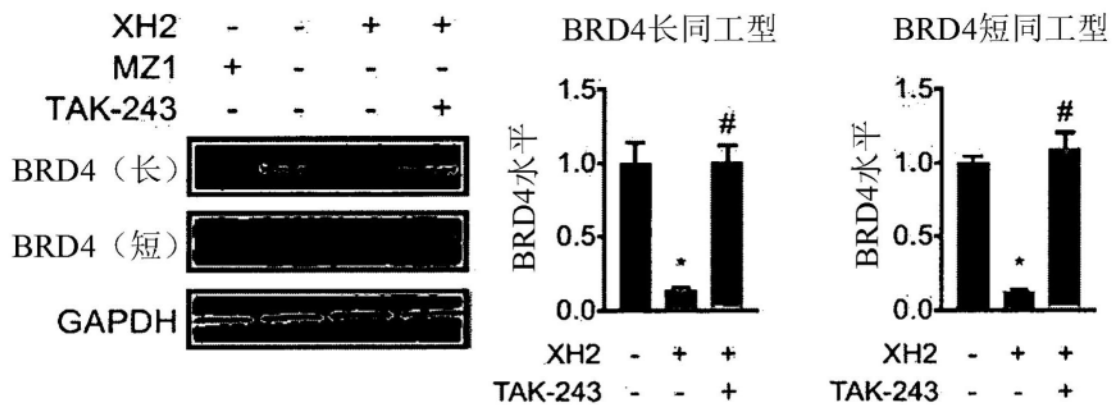


图12E

在231MFP乳腺癌细胞中，JQ1挽救XH2介导的BRD4降解

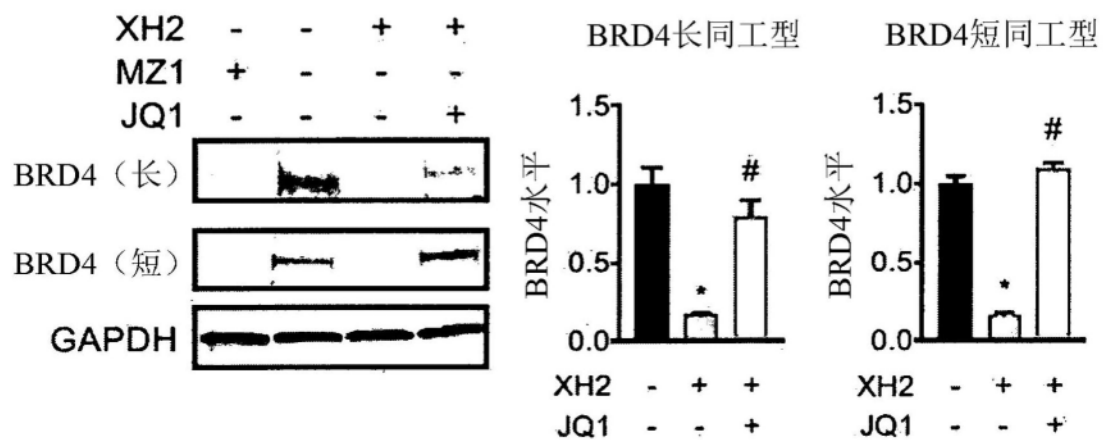


图12F

翻译抑制剂不会影响XH2介导的BRD4降解

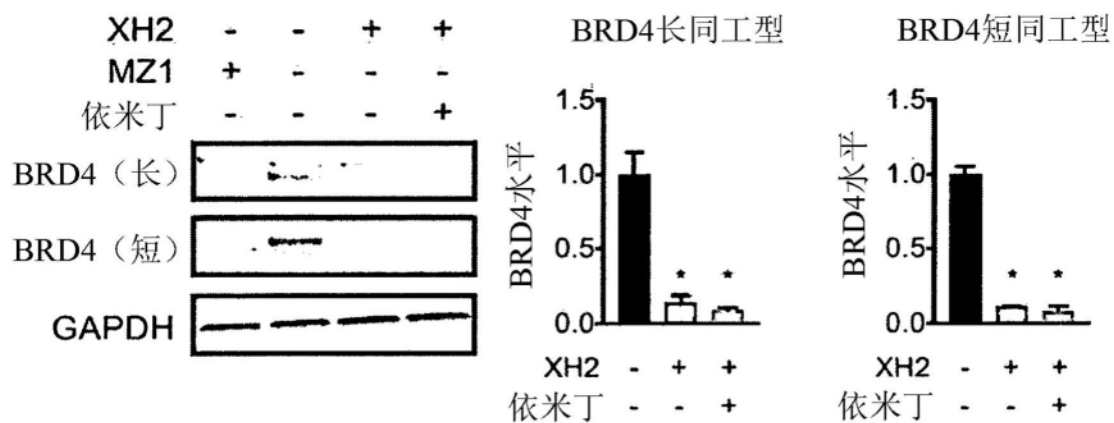


图12G

开发RNF114探针 JNS27

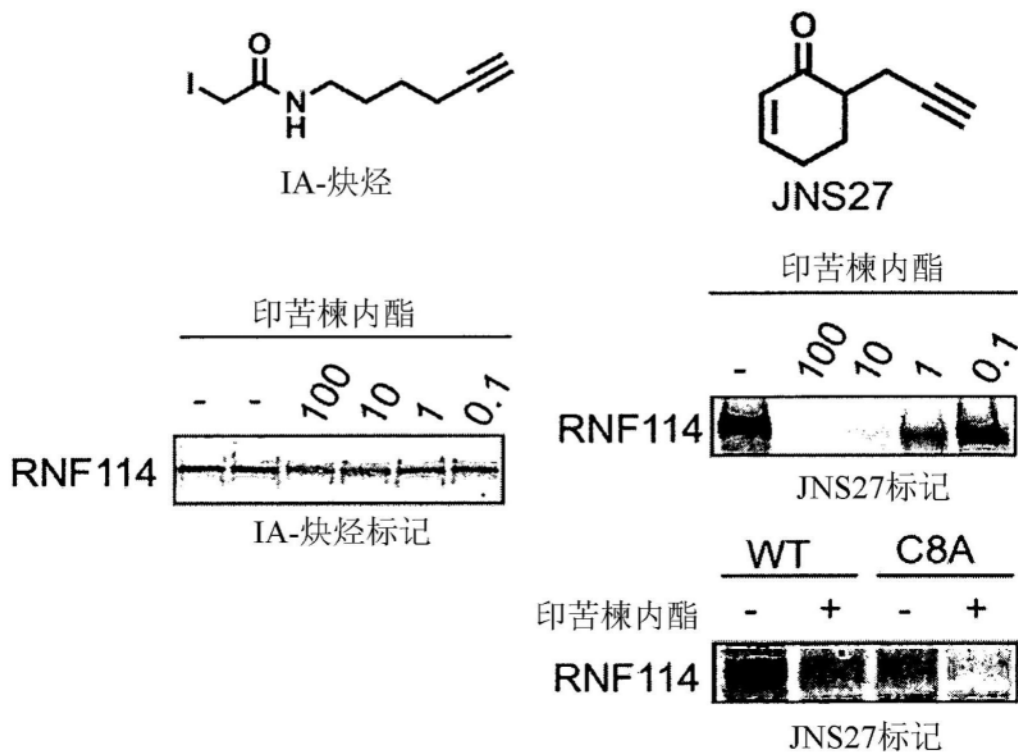


图13A

共价配体筛选命中

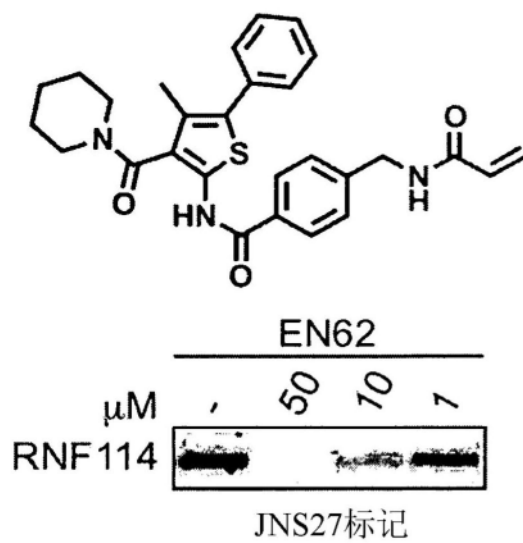


图13B

RNF114自体泛素化活性

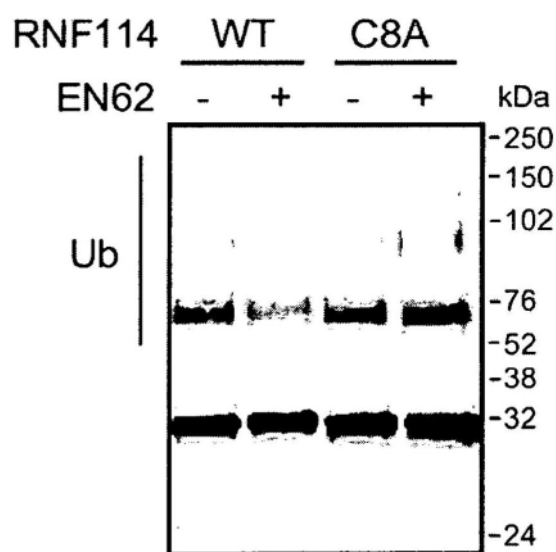


图13C

在231MFP乳腺癌蛋白质组中
对EN62进行iso-ABPP分析

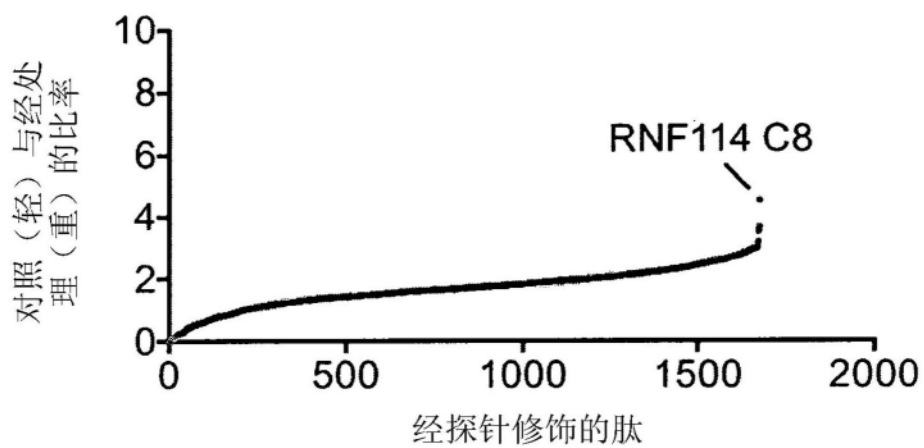


图13D

231MFP细胞存活率

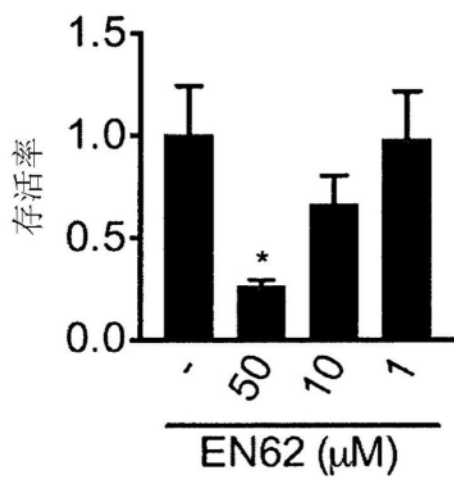


图13E

231MFP肿瘤异种移植物的生长

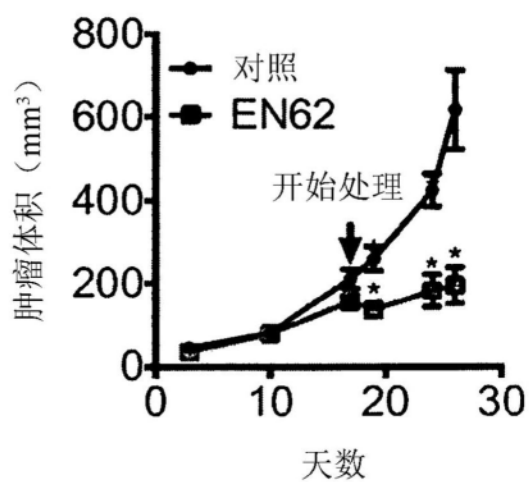


图13F

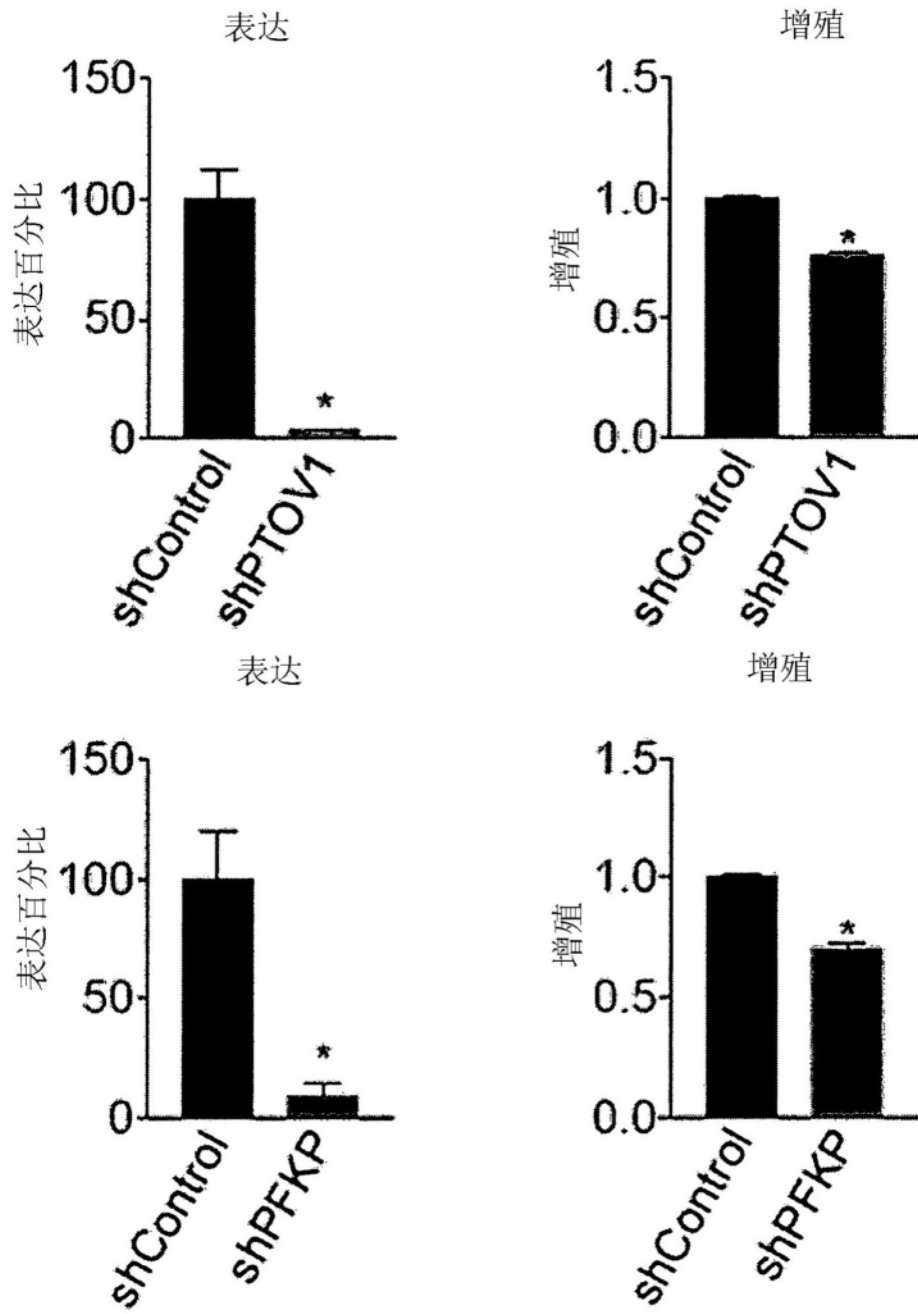


图14

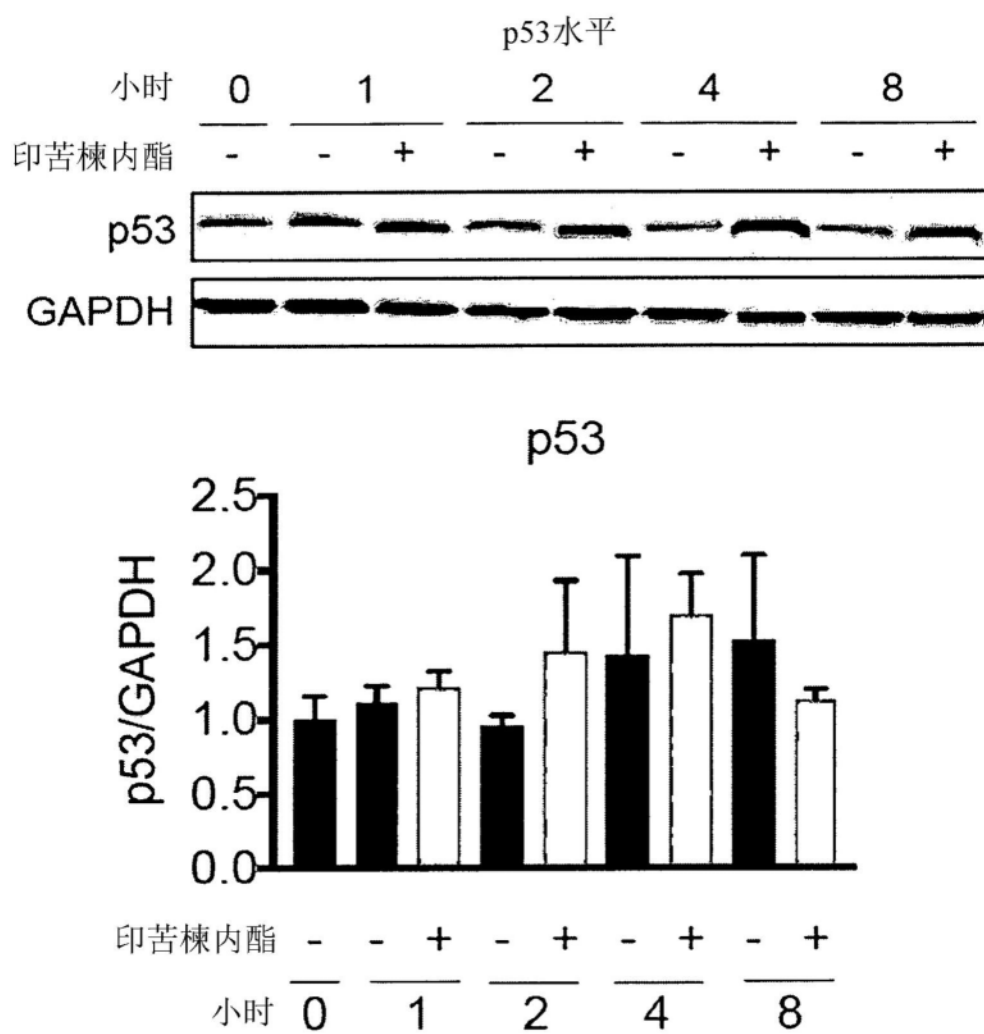


图15

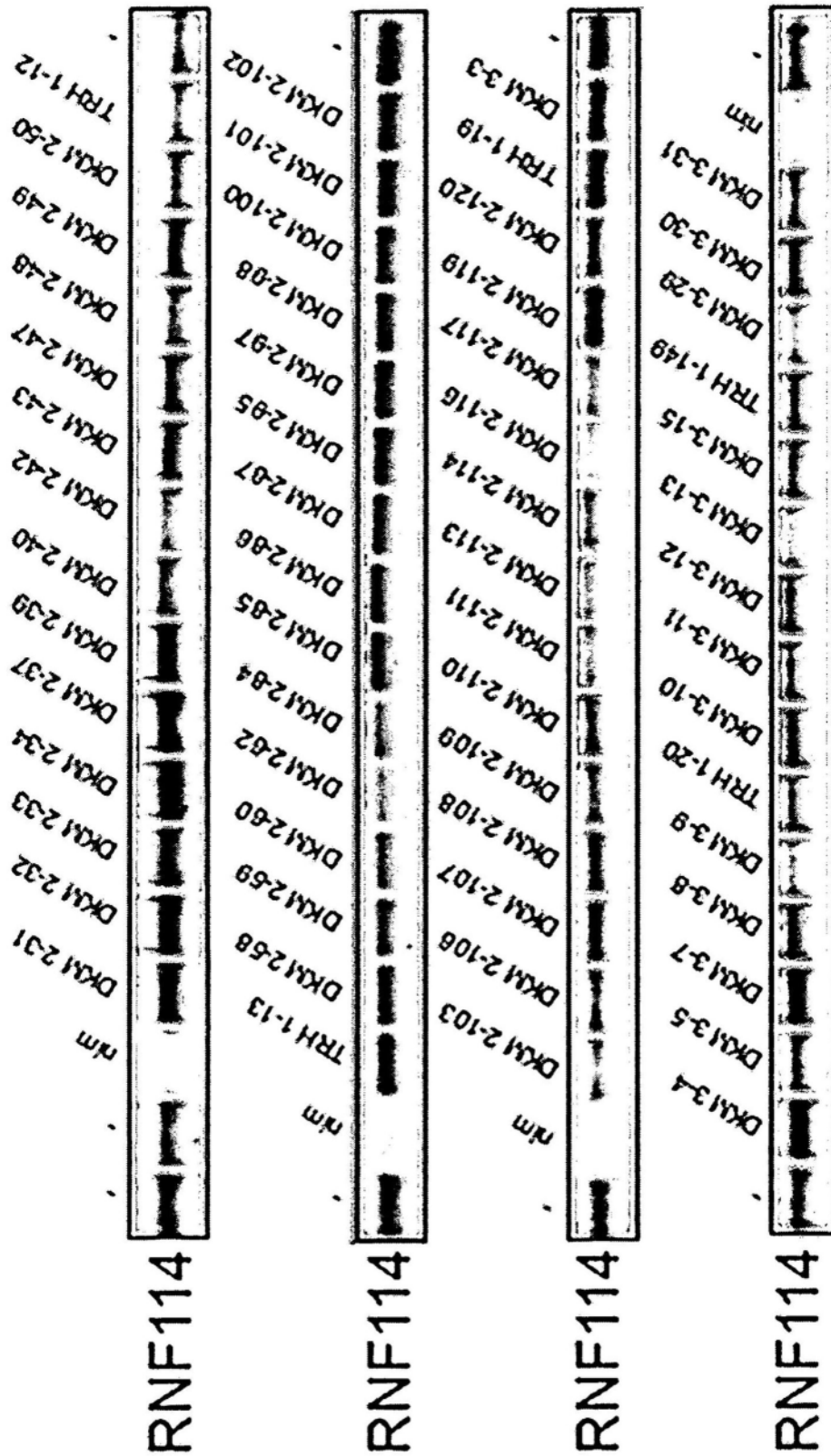


图16A

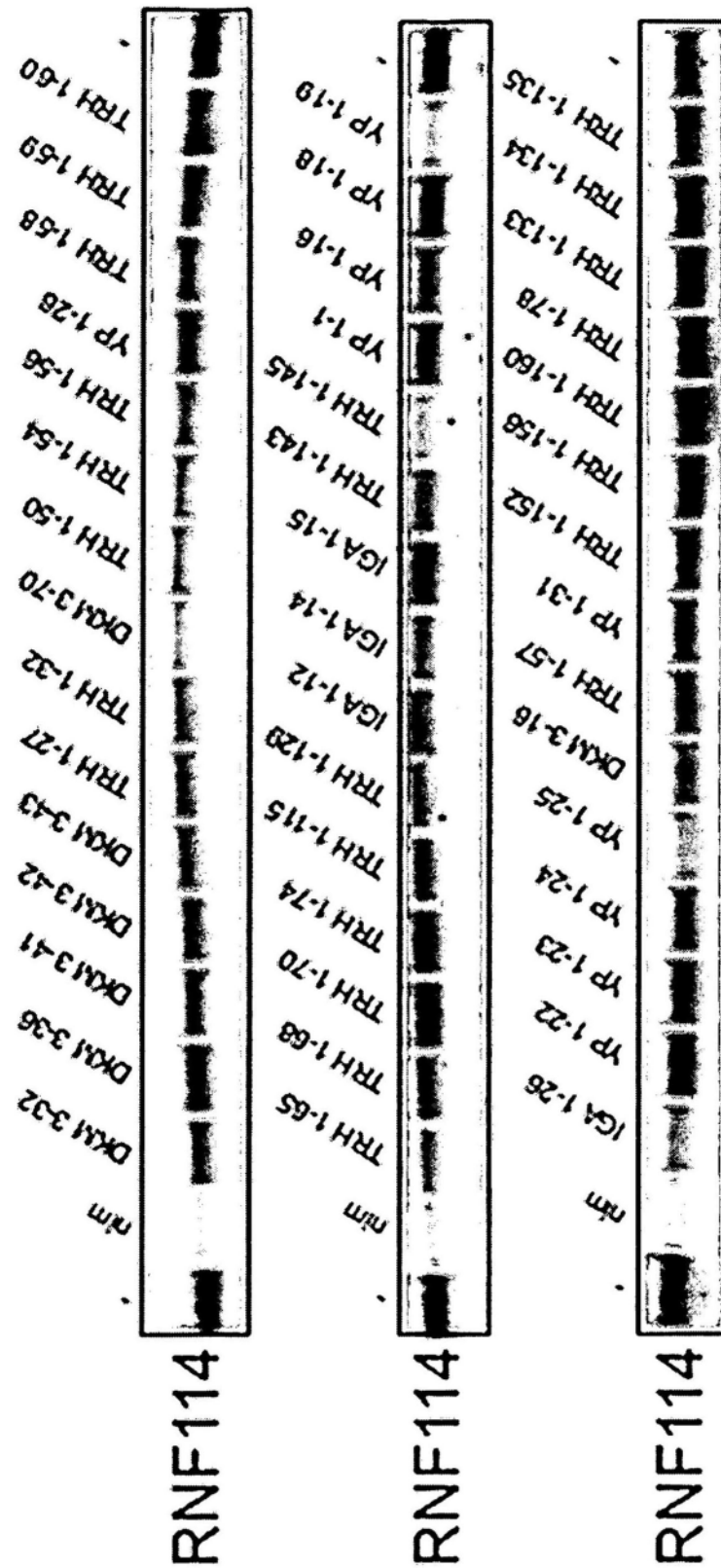


图16A (续)

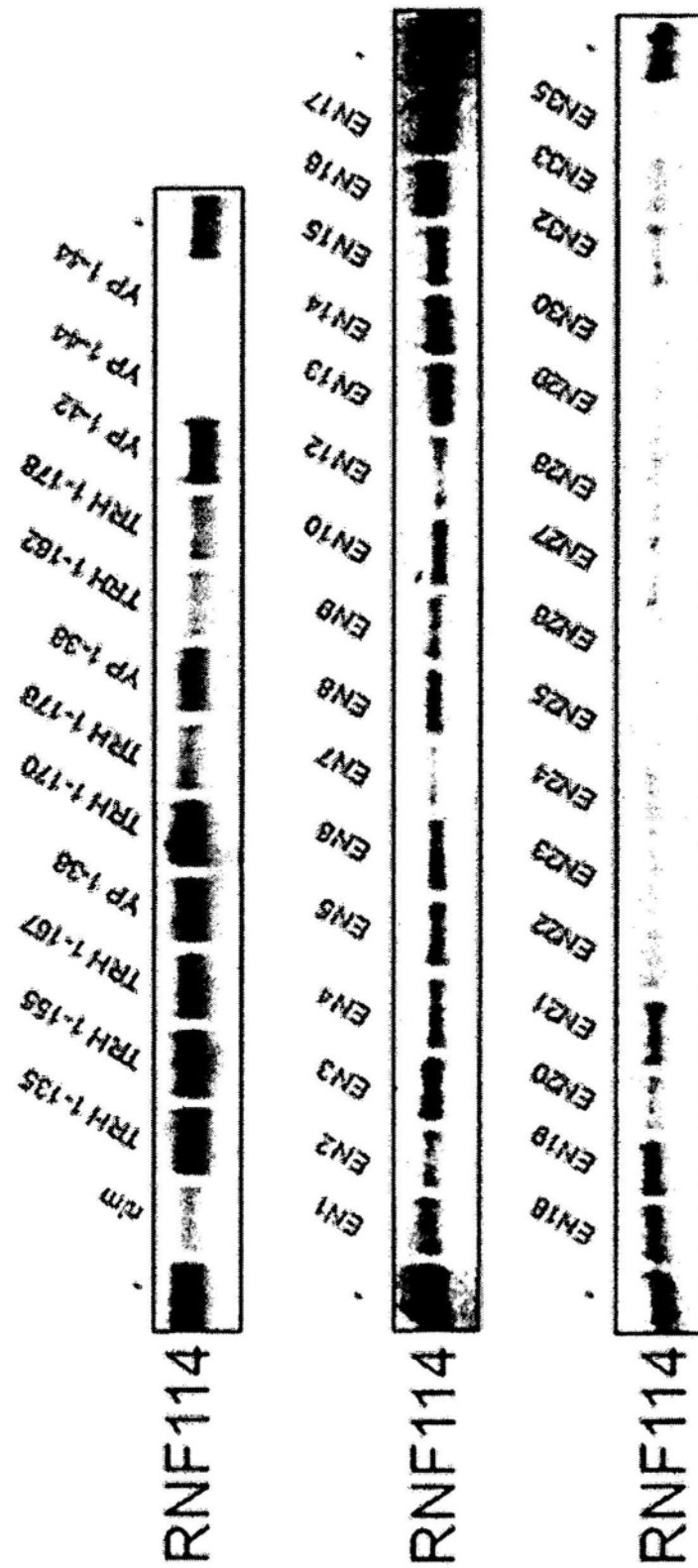


图16B

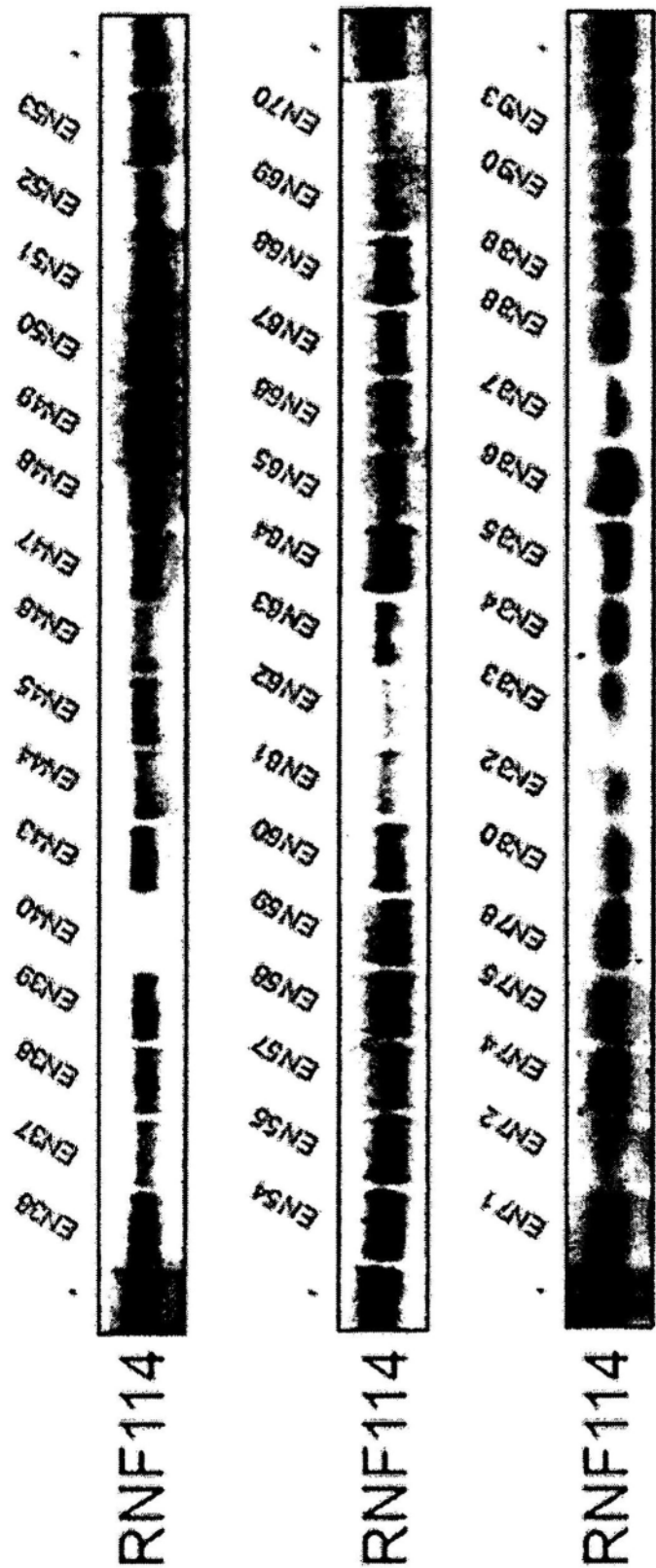


图16B(续)

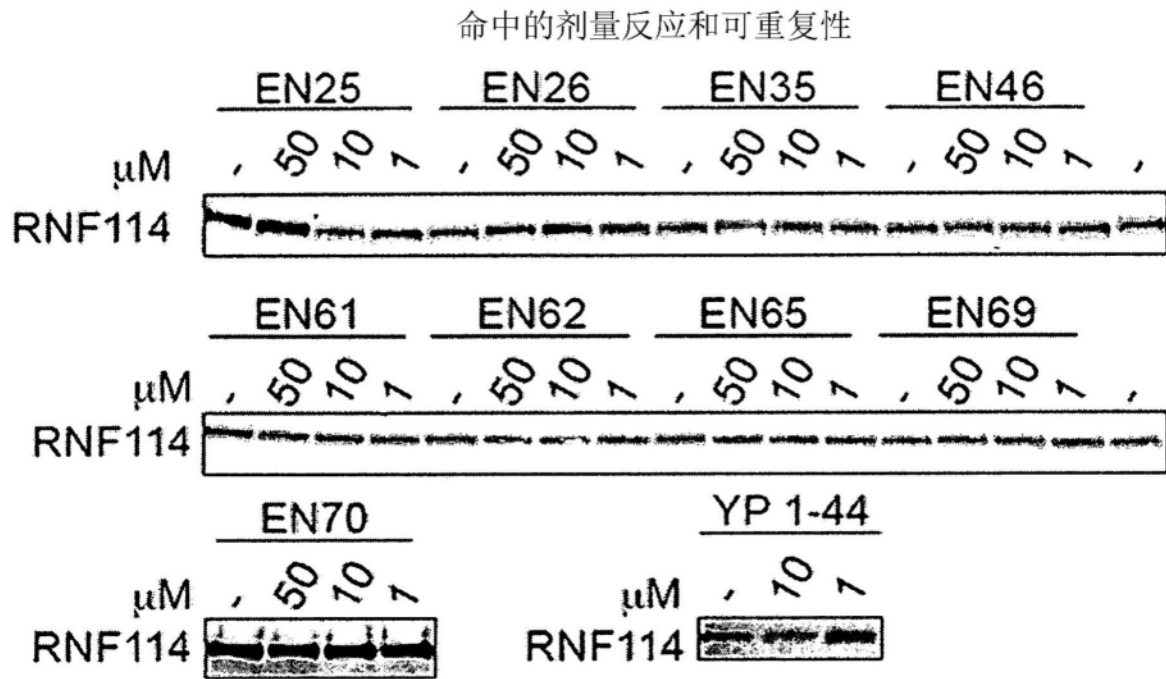


图16C

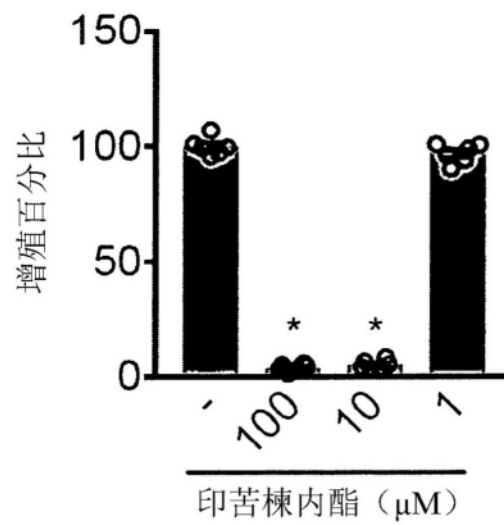


图17A

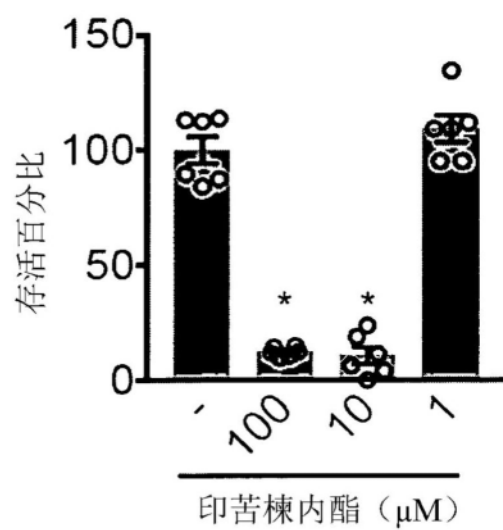


图17B

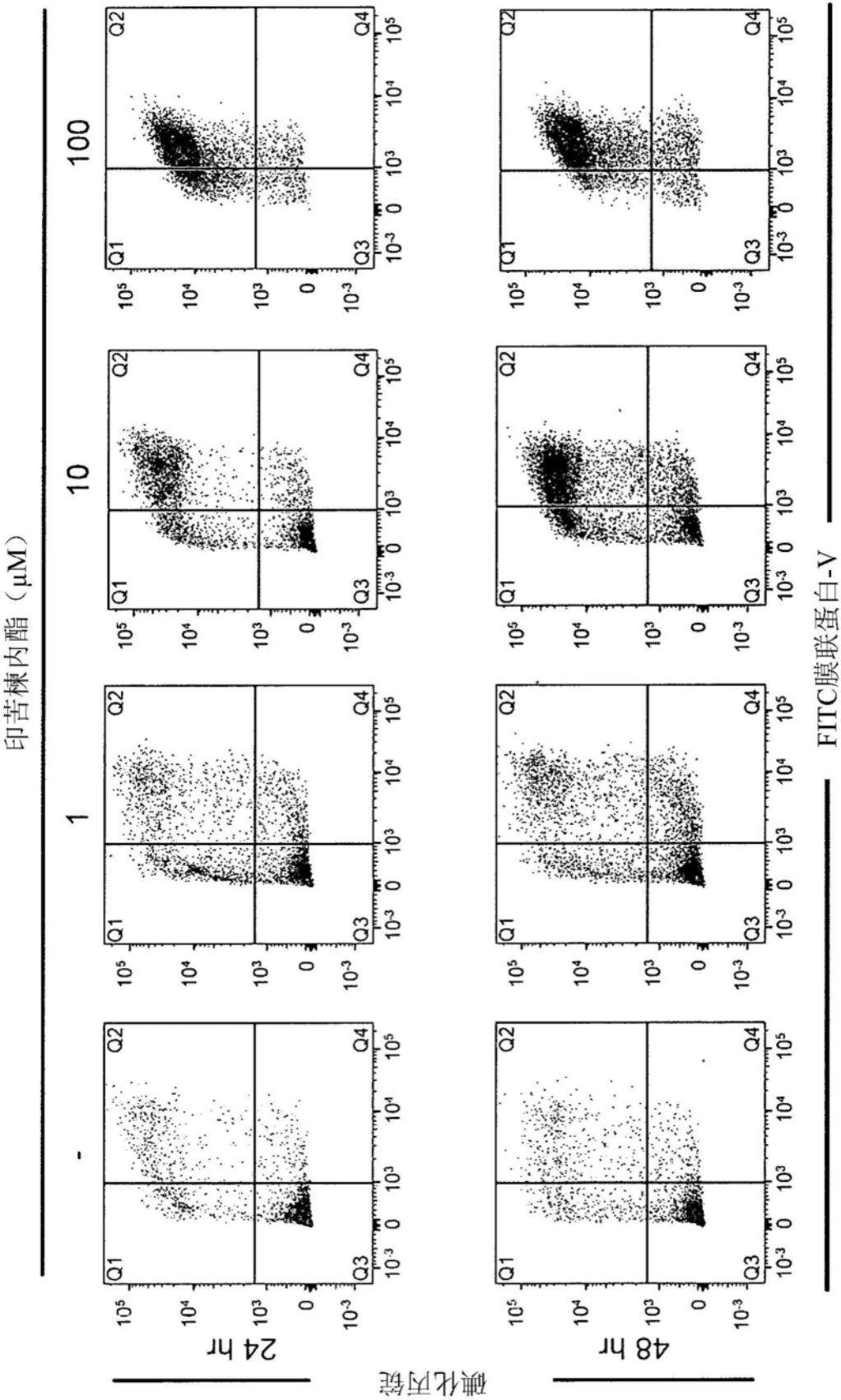


图17C

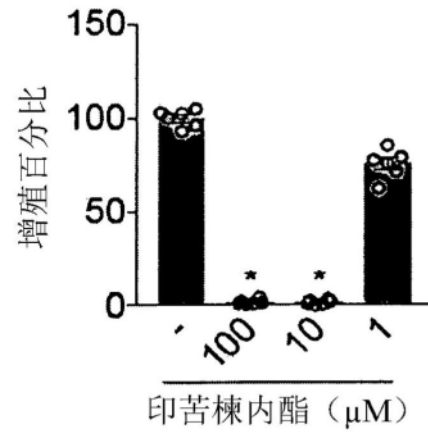


图18A

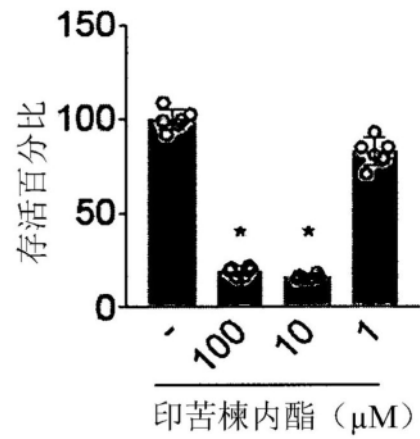


图18B

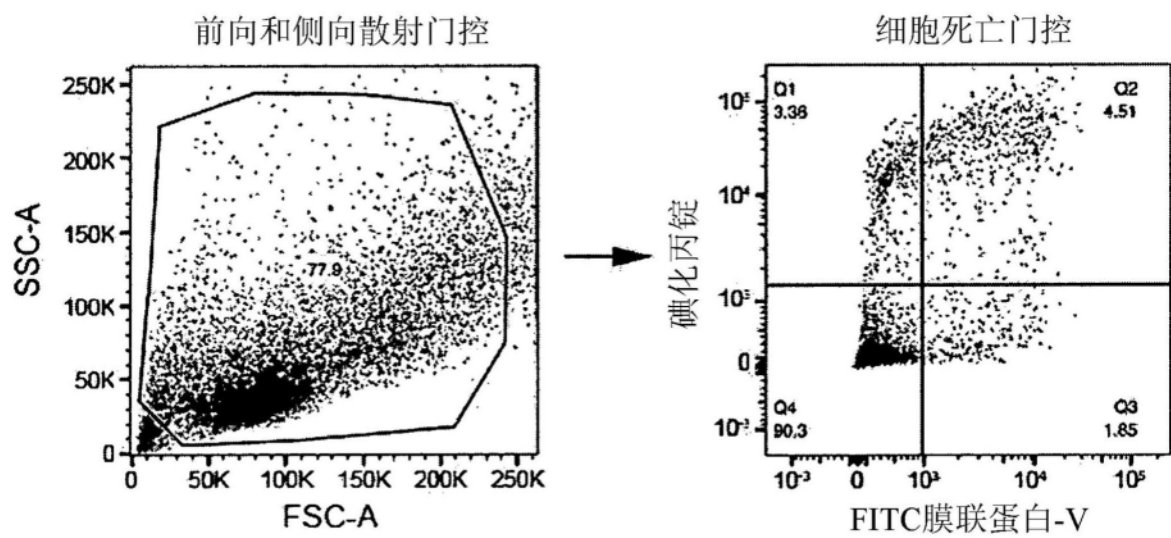


图18C

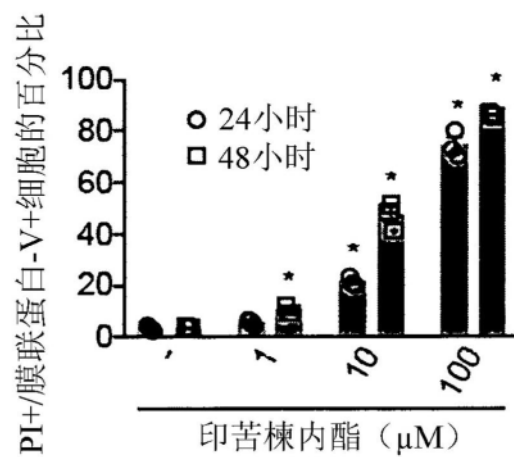


图18D

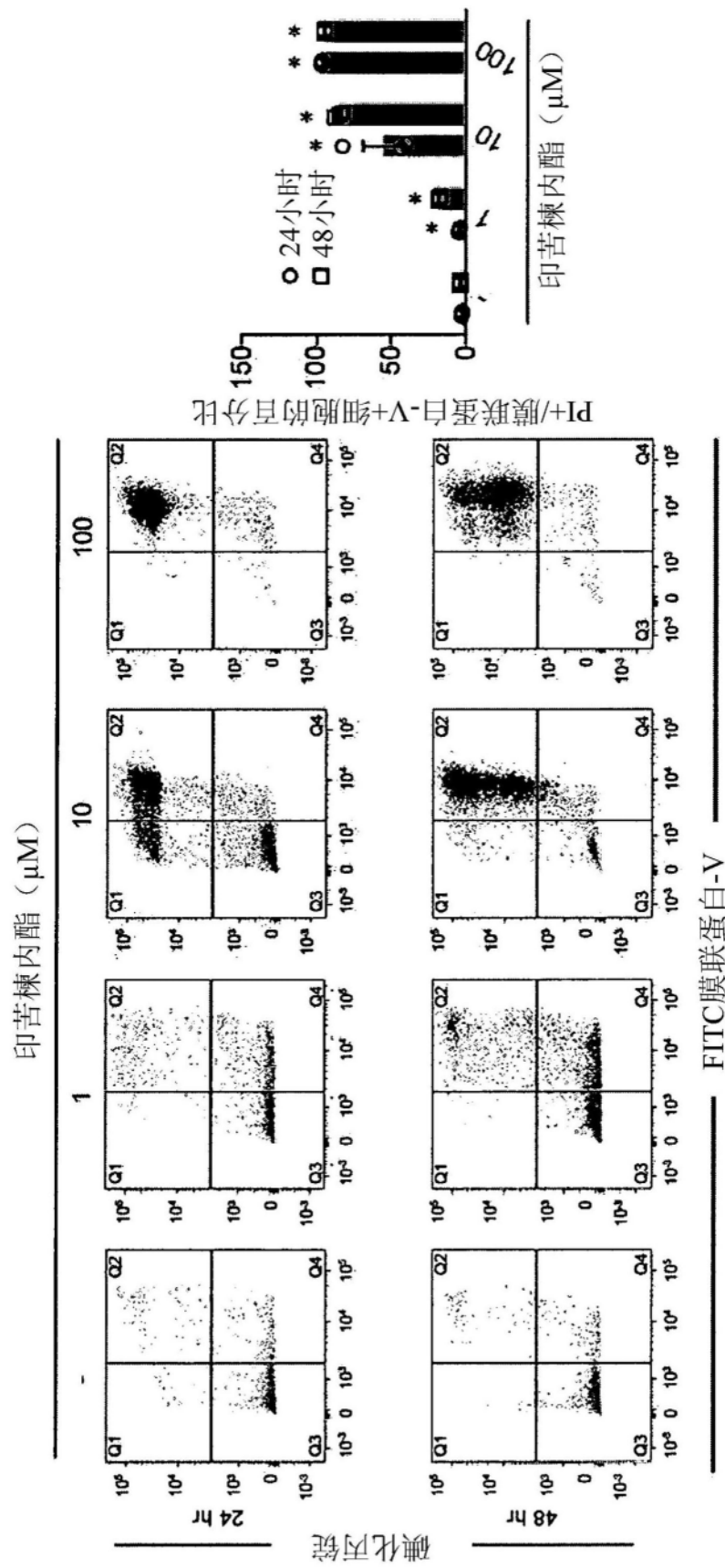


图18E

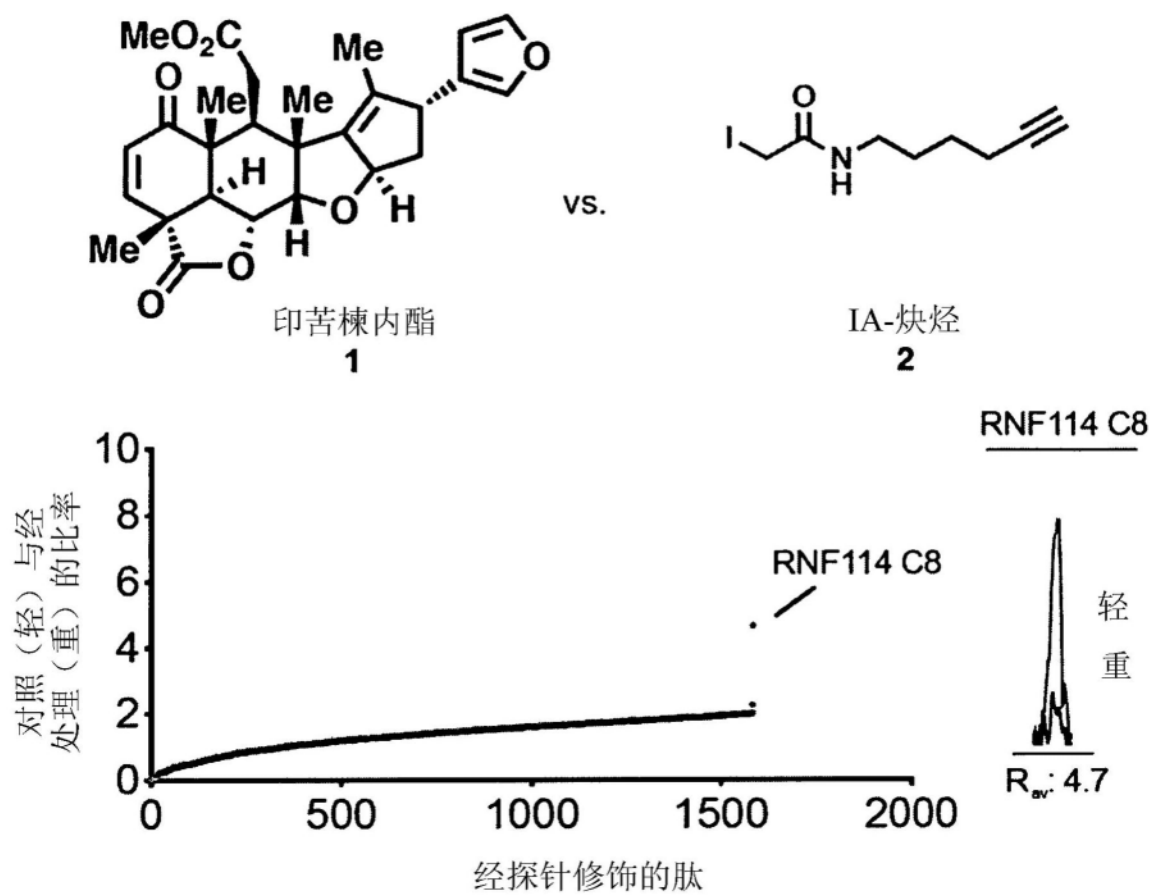


图19A

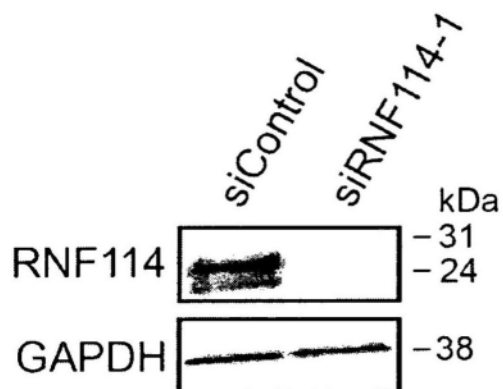


图19B

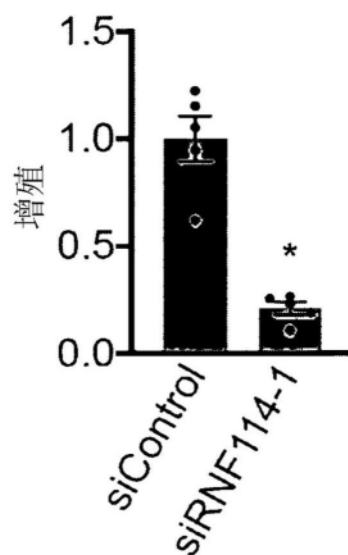


图19C

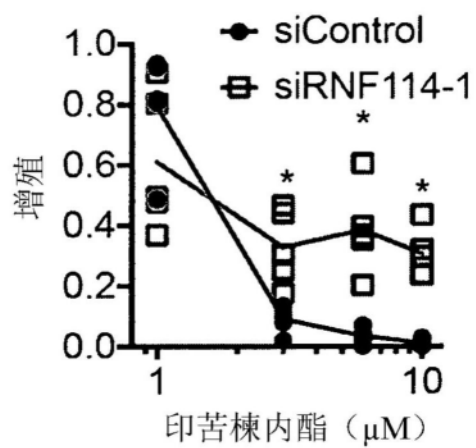


图19D

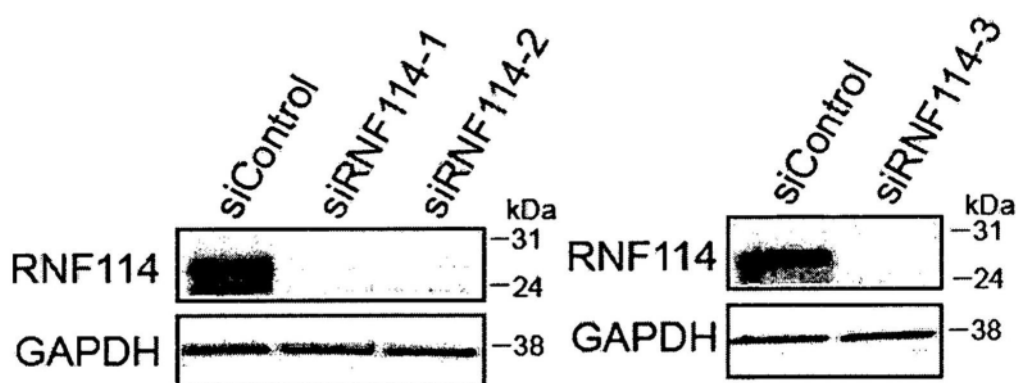


图20A

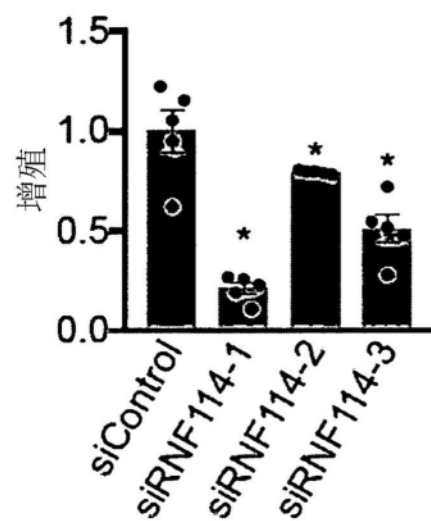


图20B

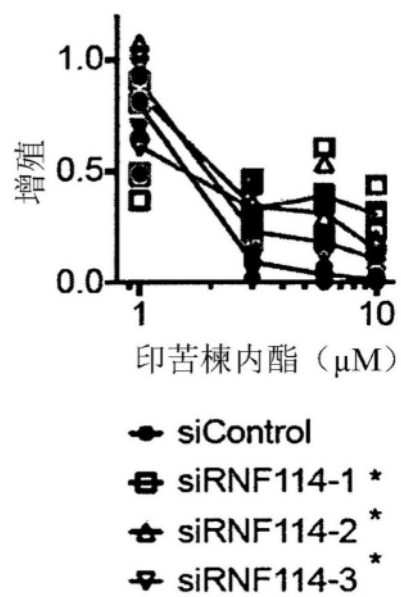


图20C

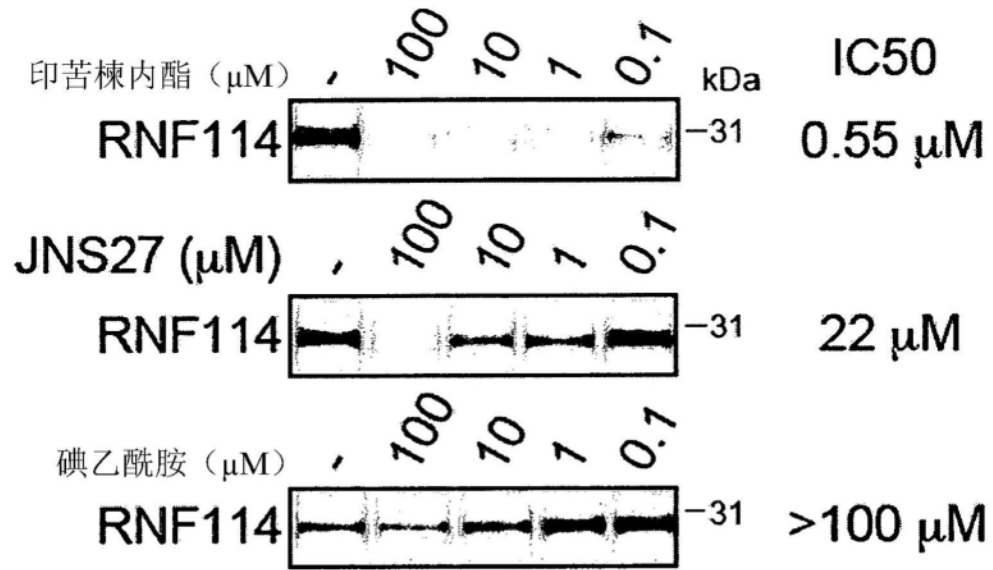


图20D

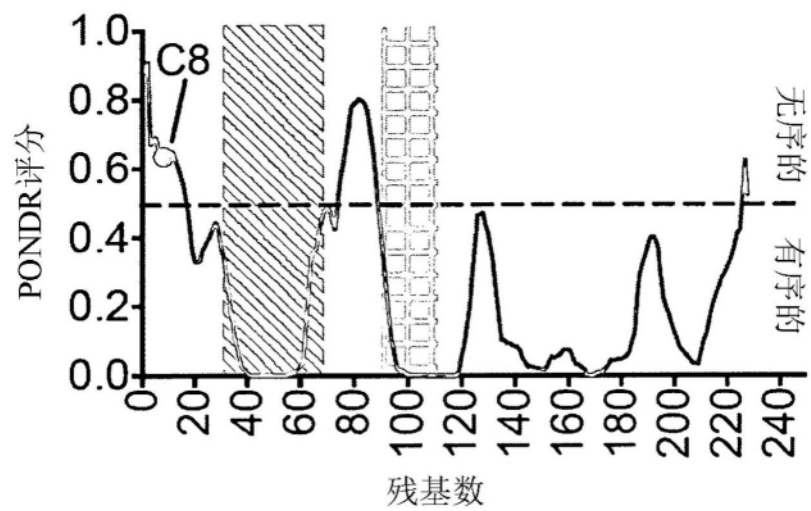


图21A

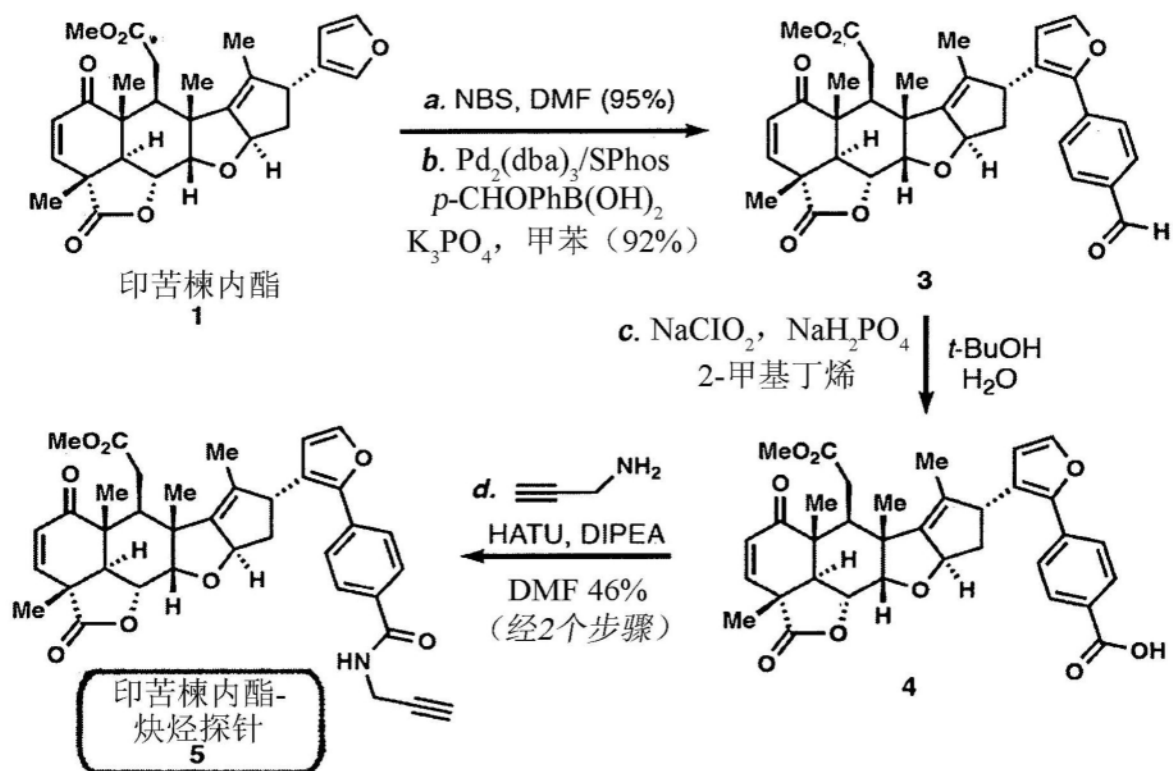


图21B

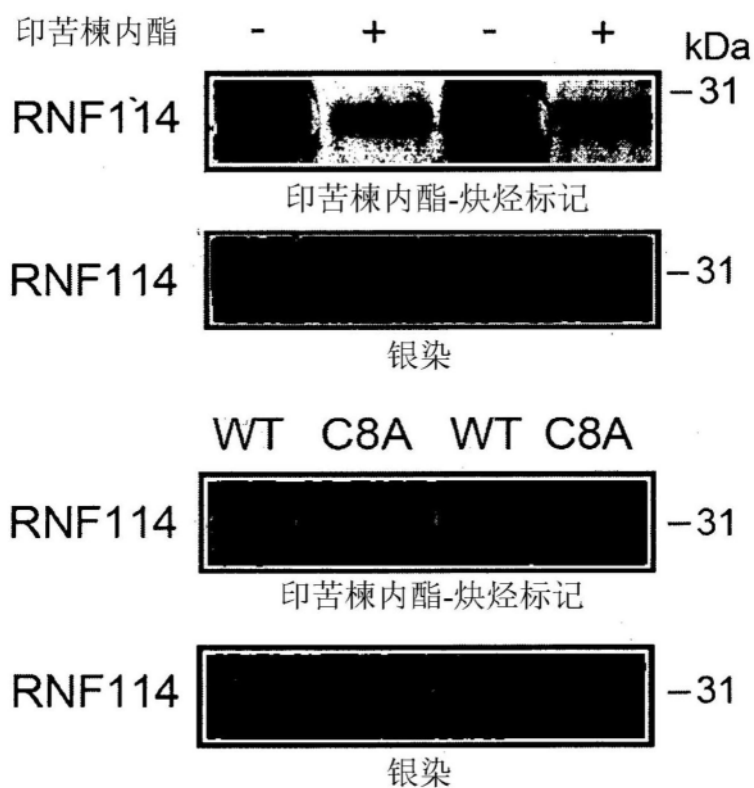
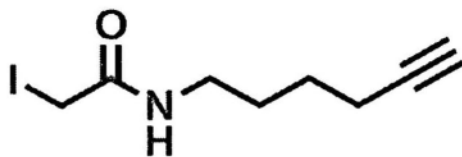


图21C



IA-炔烃

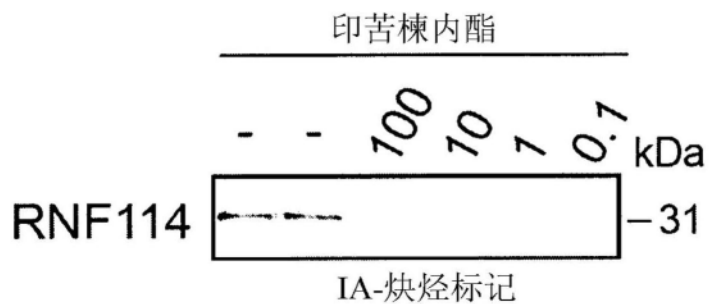
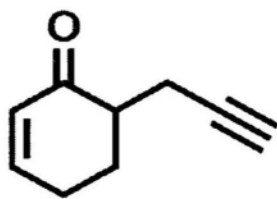
2

图21D



JNS27

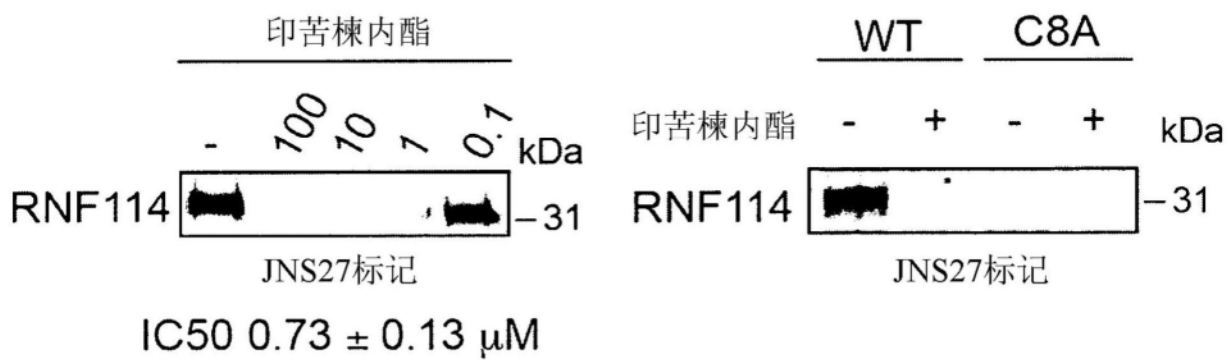
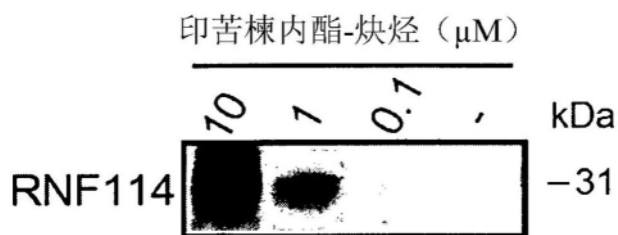
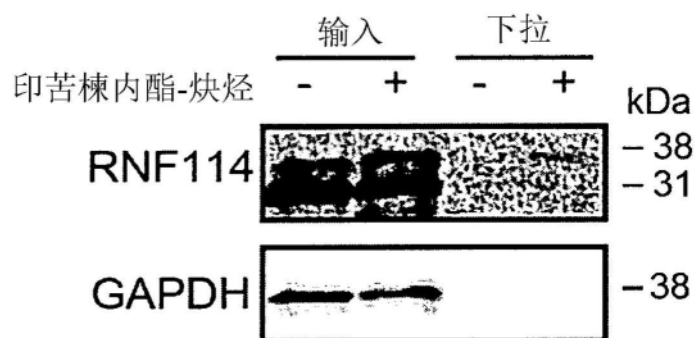
6

图21E



印苦楝内酯-炔烃原位标记，
RNF114-Flag细胞中的抗-Flag下拉，
用若丹明-叠氮化物进行CuAAC

图21F



印苦楝内酯-炔烃原位标记，
用生物素-叠氮化物进行CuAAC
亲和素下拉

图21G

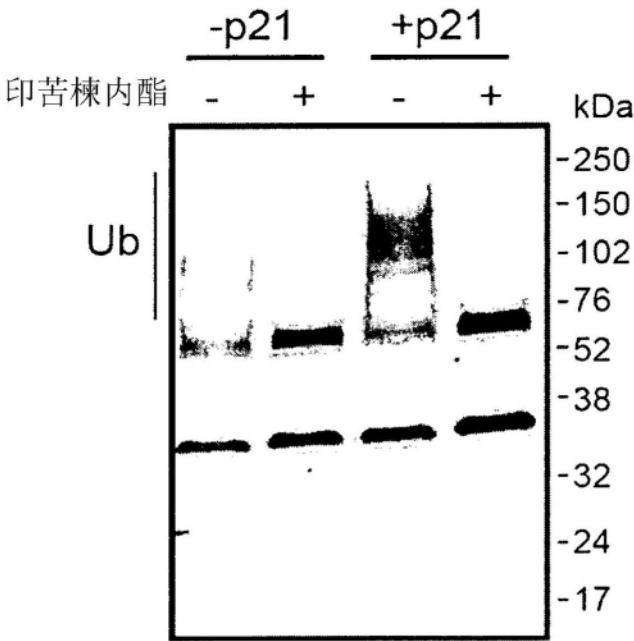


图22A

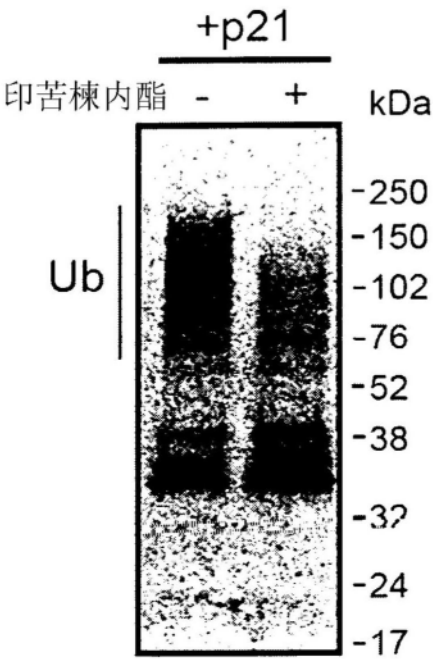


图22B

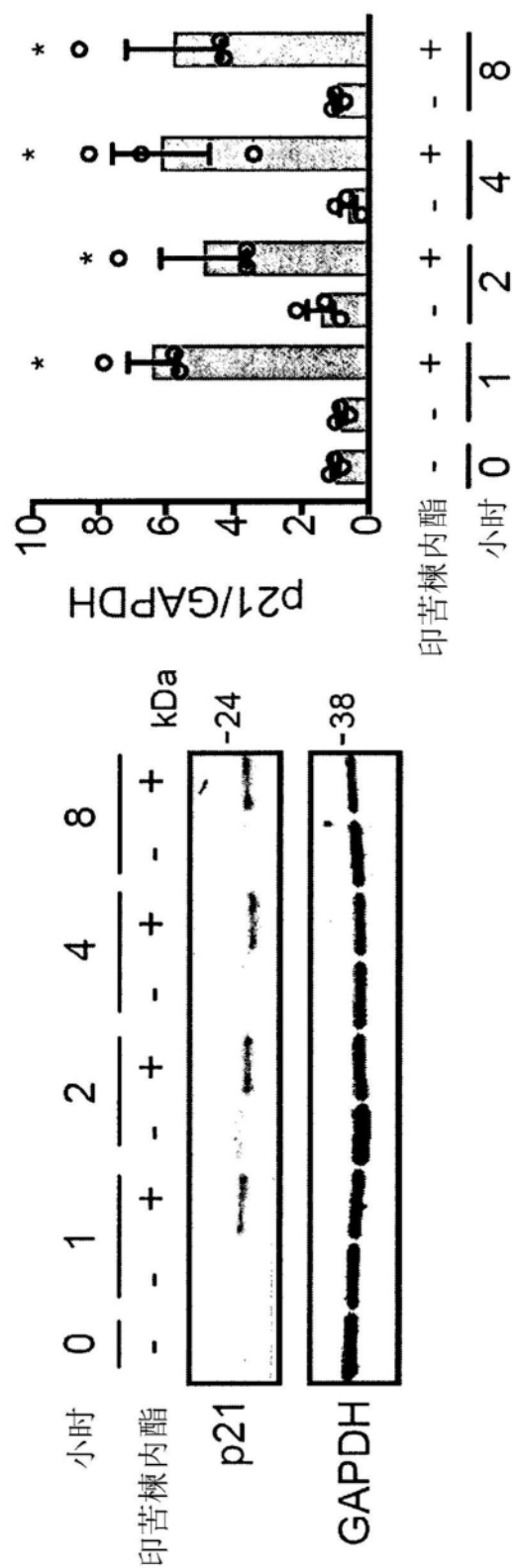


图22E

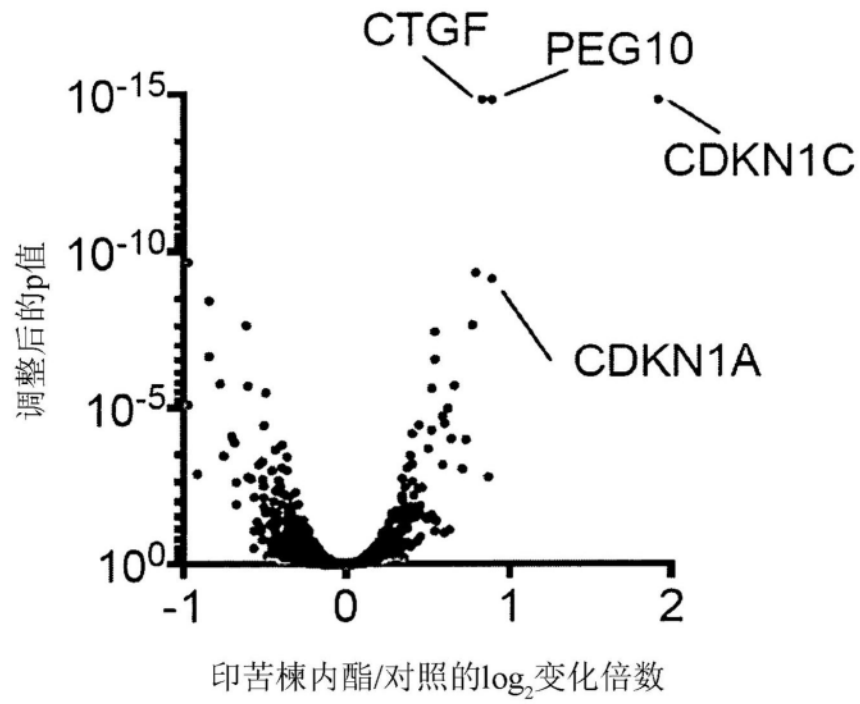


图22F

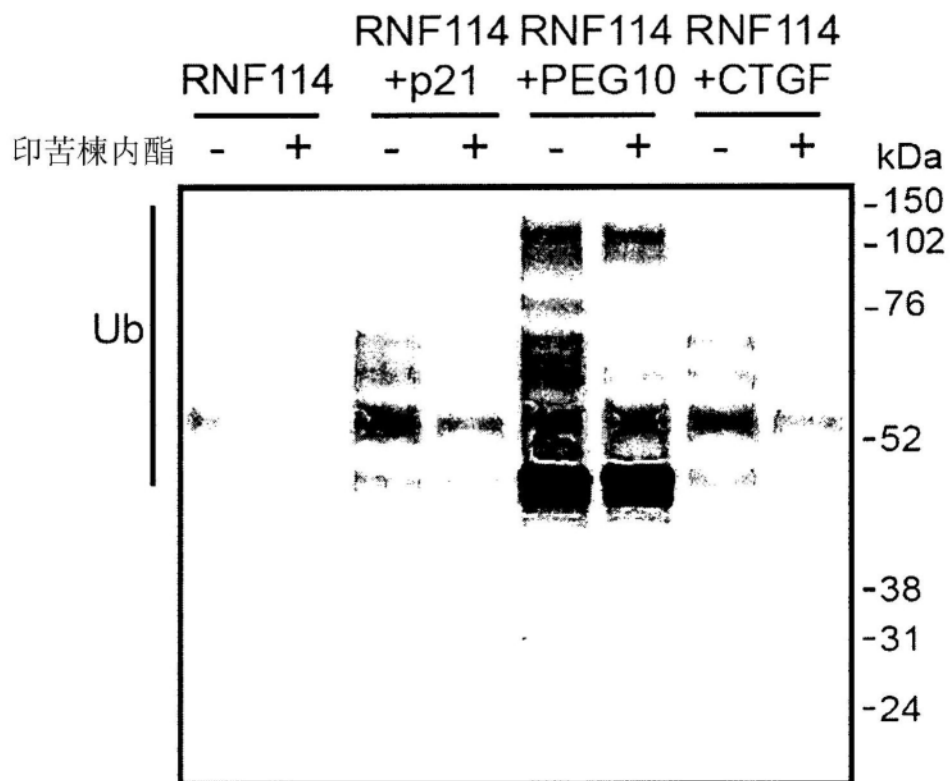


图22G

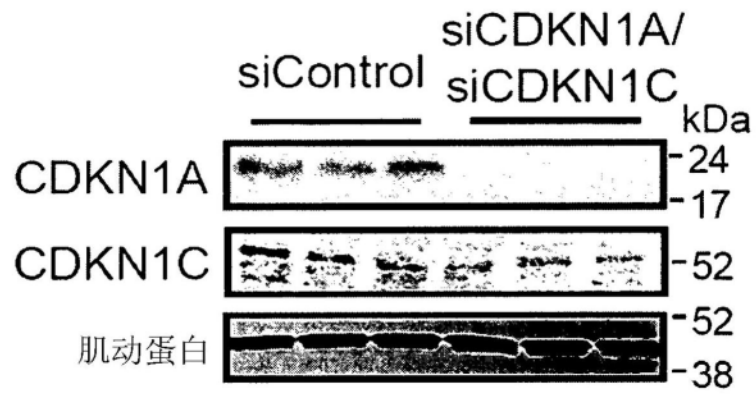


图22H

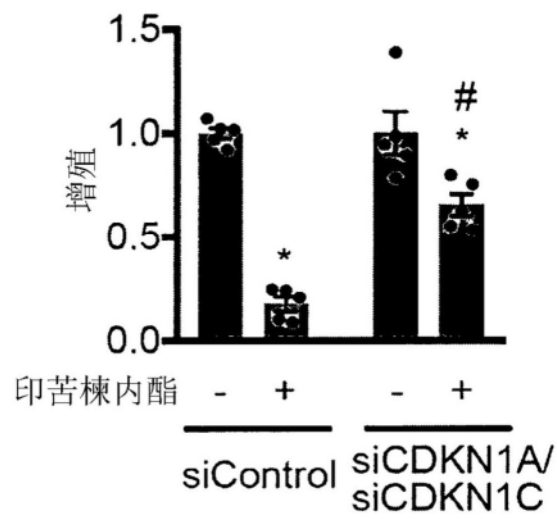


图22I

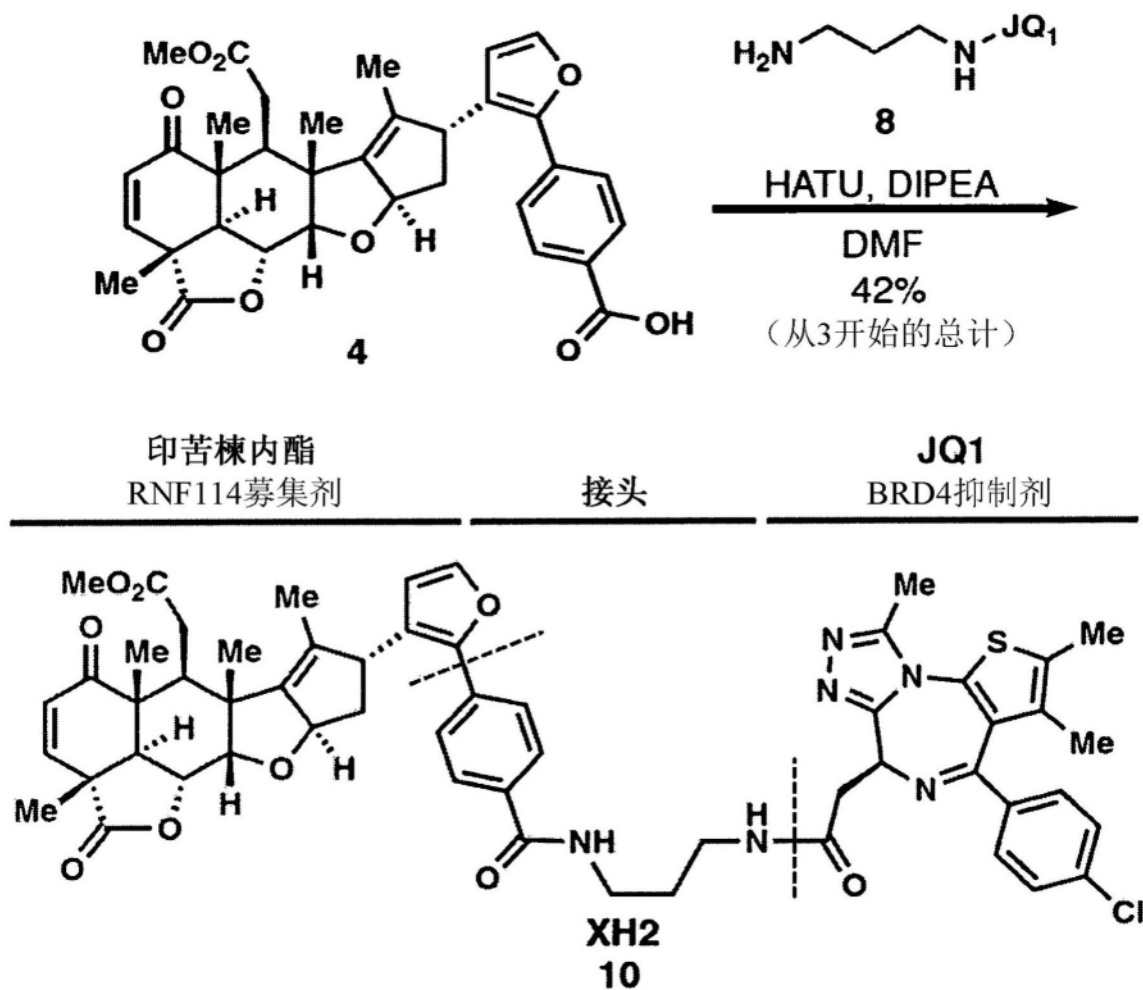
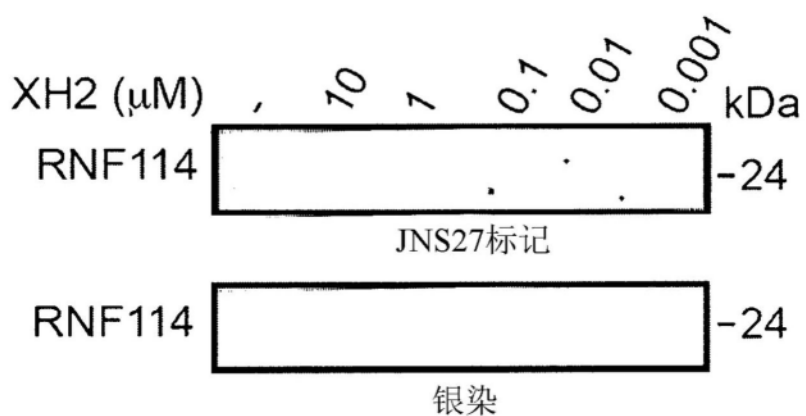


图23A



XH2针对RNF114的IC₅₀
 0.24 ± 0.12

图23B

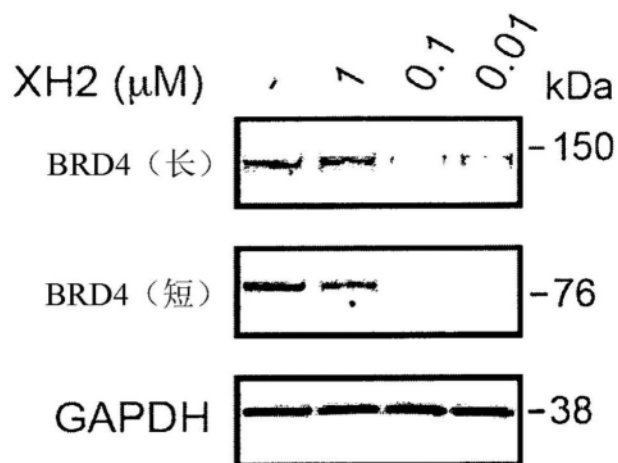


图23C

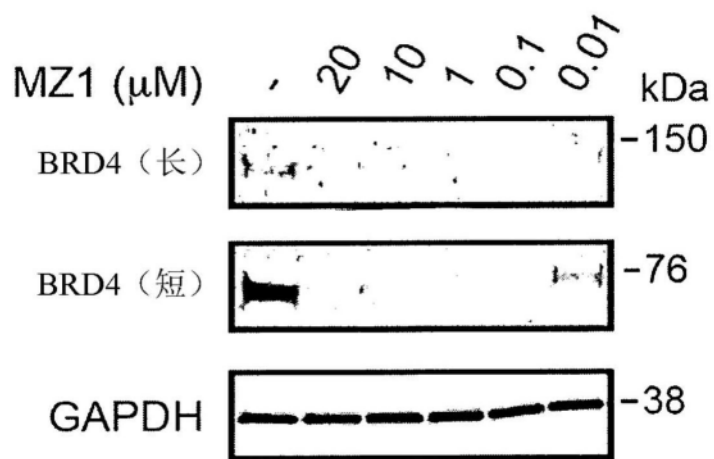


图23D

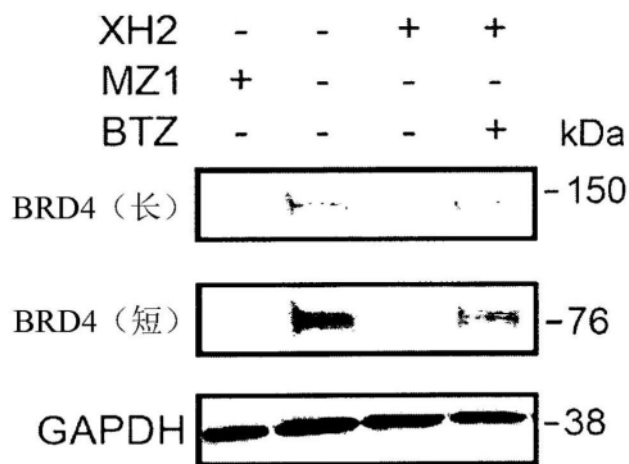


图23E

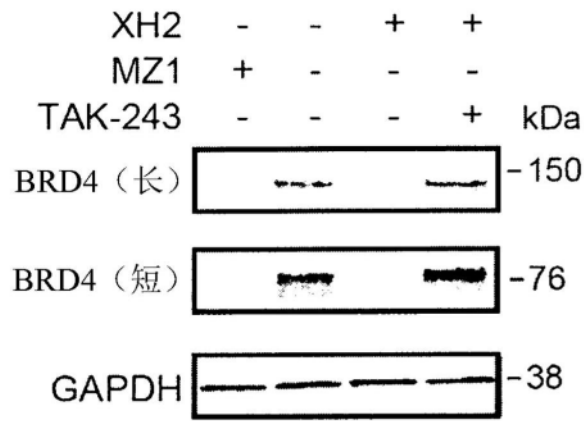


图23F

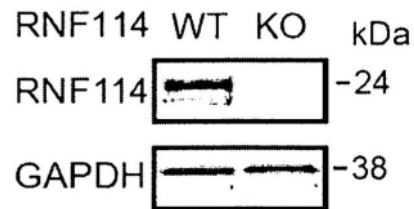


图23G

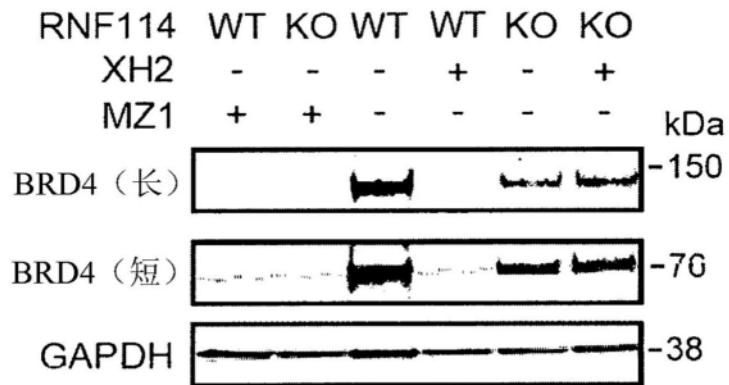


图23H

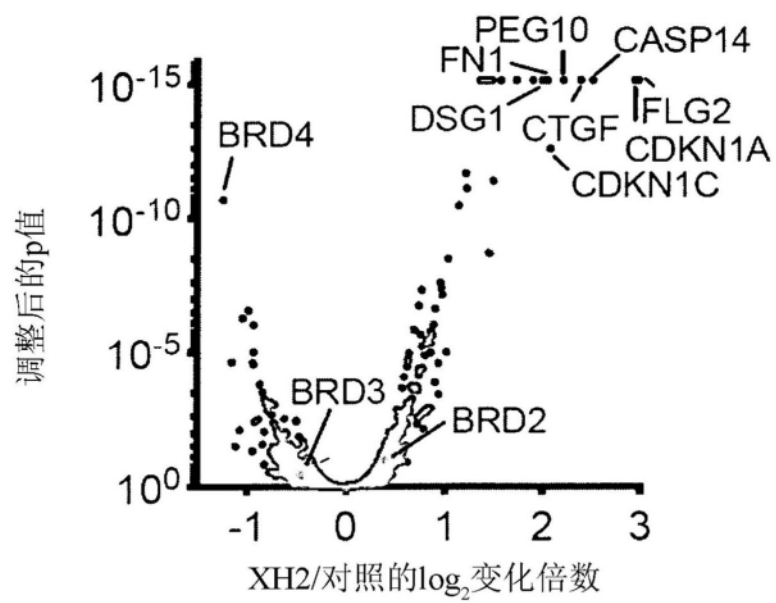


图23I