明　細　書

発明の名称 ： Ｒａｓタンパク質分解誘導分子及び医薬組成物

技術分野

[0001] 本開示は、Ｒａｓタンパク質分解誘導分子及び医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] Ｒａｓタンパク質は、低分子ＧＴＰ（Guanosine triphoshate）結合タンパク質の一種であり、Ｋ－Ｒａｓタンパク質、Ｈ－Ｒａｓタンパク質、Ｎ－Ｒａｓタンパク質等のアイソフォームが存在する。Ｒａｓタンパク質は、様々な細胞外刺激による細胞の増殖、分化、接着等のシグナルを上流の受容体型チロシンキナーゼから下流のエフェクターへと仲介する機能を司る。

[0003] Ｒａｓタンパク質は、ＧＴＰと結合した状態（Ｒａｓ／ＧＴＰ）が活性型、ＧＤＰ（Guanosine diphosphate）と結合した状態（Ｒａｓ／ＧＤＰ）が不活性型であり、活性型と不活性型との間を遷移することにより細胞増殖等を調節している。一方、ヒトの癌ではＲａｓタンパク質が高頻度に変異しており、この変異に起因し、Ｒａｓタンパク質が恒常的に活性型となっていることが知られている。例えば、膵臓癌の約９５％、大腸癌の約４５％、肺癌の約３５％において、Ｒａｓタンパク質の変異が確認されている。このため、Ｒａｓタンパク質は、抗癌剤の開発における最も有望な分子標的として注目されている。

[0004] しかし、Ｒａｓタンパク質とＧＴＰとの結合は極めて強固である上、Ｒａｓタンパク質の分子表面には阻害剤が入り込むポケットが殆ど存在しない。このため、Ｒａｓタンパク質は、依然として創薬困難な標的（undruggable targets）であると考えられている。Ｒａｓタンパク質自体を標的とするのではなく、Ｒａｓタンパク質の翻訳後修飾を標的とするファルネシル転移酵素阻害剤の開発も進められてきたが、不成功に終わっている。

[0005] そこで、近年になり、Ｒａｓタンパク質の機能を阻害するのではなく、Ｒａｓタンパク質の量（発現）を減少させる方法論が検討されている。

[0006] これまで、標的タンパク質の量をＲＮＡレベルで操作する技術として、ｓｉＲＮＡ（small interfering RNA）を用いて標的タンパク質のｍＲＮＡを分解するＲＮＡｉ（RNA interference）技術が知られている。

[0007] また、標的タンパク質の量をタンパク質レベルで操作する技術として、標的タンパク質に結合する分子とユビキチンリガーゼ（Ｅ３）に結合する分子とを連結した複合体を用いる技術が知られている（例えば、特許文献１～２、非特許文献１～３参照）。この技術は、上記複合体を介して標的タンパク質とユビキチンリガーゼとを結び付け、標的タンパク質を特異的にユビキチン化してプロテアソームによる分解へと導くものである。上記複合体は、ＳＮＩＰＥＲ（Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein ERaser）、ＰＲＯＴＡＣ（PROteolysis TArgeting Chimera）等と称されることもある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開２０１３－０５６８３７号公報

特許文献2：米国特許第７２０８１５７号明細書

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Itoh, Y. et al., "Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown.", Bioorg. Med. Chem., 2011, 19, 3229-3241

非特許文献2：Demizu, Y. et al., "Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy.", Bioorg. Med. Chem. Lett., 2012, 15, 1793-1796

非特許文献3：Hines, J. et al., "Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs.", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2013, 110(22), 8942-8947

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかし、ＲＮＡｉ技術は、オフターゲット効果の問題があり、標的タンパク質の量を特異的にコントロールすることは困難である。また、ＲＮＡｉ技術は、ｓｉＲＮＡのデリバリーが困難であり、医薬への応用には課題が多い。

[0011] 一方、標的タンパク質に結合する分子とユビキチンリガーゼに結合する分子とを連結した複合体を用いる技術は、ＲＮＡｉ技術に比べて医薬への応用が容易である。しかし、Ｒａｓタンパク質は、モノユビキチン化によりＧＴＰとの結合が亢進し、また、下流のエフェクターへの親和性が増大することが知られている（Sasaki, A.T. et al., 2011, Sci. Signal., 4, ra13）。このため、Ｒａｓタンパク質を特異的にユビキチン化してプロテアソームによる分解へと導く過程で、癌化が促進される懸念がある。

[0012] その他、標的タンパク質をユビキチン化する方法には、下記のような問題点がある。

（１）ユビキチンリガーゼには多数の種類があり、標的特異性がある。このため、特定の標的タンパク質をユビキチン化するためには、例えば、標的タンパク質に合わせて分子を設計するなど、個々に対応する必要がある。

（２）ユビキチン化シグナルのコントロールが困難である。例えば、タンパク質のユビキチン化は、タンパク質の分解以外に、分化、癌化等のシグナルに関連することが知られている。また、タンパク質のユビキチン化には、組織特異性及び時間特異性があることが知られている。このため、標的タンパク質のユビキチン化が、標的タンパク質の分解ではなく、その他のシグナルとなるケースがあると推定される。

（３）ユビキチン又はユビキチン化酵素に不具合があるケースがある。例えば、変異等により、ユビキチン又はユビキチン化酵素が正常に機能しない（マルファンクションとなっている）場合があり、それが疾患の原因である場合も多い。このため、標的タンパク質のユビキチン化が、標的タンパク質の分解を誘導しないケースがあると推定される。

[0013] 本開示は、上記のような事情に鑑み、Ｒａｓタンパク質の分解を誘導可能

なＲａｓタンパク質分解誘導分子、及びそのＲａｓタンパク質分解誘導分子を含む医薬組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 上記課題を解決するための具体的な手段には、以下の実施態様が含まれる。

＜１＞ Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有するＲａｓタンパク質親和性分子と、プロテアーゼに対して親和性を有し、且つ、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しないタンパク質分解誘導タグとのコンジュゲートであり、前記Ｒａｓタンパク質の分解を誘導可能なＲａｓタンパク質分解誘導分子。

[0015] ＜２＞ ユビキチン非依存的に前記Ｒａｓタンパク質の分解を誘導可能な＜１＞に記載のＲａｓタンパク質分解誘導分子。

[0016] ＜３＞ 前記タンパク質分解誘導タグが、プロテアーゼ阻害剤のプロテアーゼ阻害活性を失活させた構造を有する＜１＞又は＜２＞に記載のＲａｓタンパク質分解誘導分子。

[0017] ＜４＞ 前記プロテアーゼがプロテアソームである＜１＞～＜３＞のいずれか１項に記載のＲａｓタンパク質分解誘導分子。

[0018] ＜５＞ 前記タンパク質分解誘導タグが、プロテアソーム阻害剤のプロテアソーム阻害活性を失活させた構造を有する＜４＞に記載のＲａｓタンパク質分解誘導分子。

[0019] ＜６＞ 前記プロテアソーム阻害活性が、カスパーゼ様活性、トリプシン様活性、及びキモトリプシン様活性から選ばれる少なくとも１種に対する阻害活性である＜５＞に記載のＲａｓタンパク質分解誘導分子。

[0020] ＜７＞ ＜１＞～＜６＞のいずれか１項に記載のＲａｓタンパク質分解誘導分子を含む医薬組成物。

[0021] ＜８＞ Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状の予防又は治療に用いられる＜７＞に記載の医薬組成物。

[0022] ＜９＞ 前記Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状が、癌、免疫疾患、

感染症、神経疾患、ＲＡＳ／ＭＡＰＫ症候群、肝硬変、慢性肝炎、又は記憶障害である＜８＞に記載の医薬組成物。

[0023] ＜１０＞　前記Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状が癌である＜９＞に記載の医薬組成物。

発明の効果

[0024] 本開示によれば、Ｒａｓタンパク質の分解を誘導可能なＲａｓタンパク質分解誘導分子、及びそのＲａｓタンパク質分解誘導分子を含む医薬組成物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]ＨｅＬａ細胞において強制発現させた野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ（Fluorescence Activated Cell Sorting）解析により評価した結果を示す図である。

[図2]ＨｅＬａ細胞において強制発現させた野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した結果を示す図である。

[図3]ＨｅＬａ細胞において強制発現させたＧ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

[図4]ＨｅＬａ細胞において強制発現させたＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した結果を示す図である。

[図5]ＴＵＳ－００７を添加したＨｅＬａ細胞における内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した結果を示す図である。

[図6A]ＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した場合のアポトーシス誘導について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

[図6B]ＳＷ１９９０細胞にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－

ＳＯＳ－NH_2を添加した場合のアポトーシス誘導について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

[図7A]ＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2、又はエルロチニブを添加した場合のアポトーシス誘導について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

[図7B]ＳＷ１９９０細胞にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2、又はエルロチニブを添加した場合のアポトーシス誘導について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

[図8]マウス個体にＴＵＳ－００７を投与した場合の膵臓組織内及び大腸組織内における内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した結果を示す図である。

[図9A]ヒト膵臓癌細胞の皮下移植マウスにＴＵＳ－００７を投与した場合の経時的な腫瘍体積の変化を示す図である。

[図9B]ヒト膵臓癌細胞の皮下移植マウスにＴＵＳ－００７を投与した場合の経時的な体重の変化を示す図である。

[図10A]プロテアソームの触媒サブユニットβ１に対する、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴ及びＭＧ－１３２の阻害活性を示す図である。

[図10B]プロテアソームの触媒サブユニットβ２に対する、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴ及びＭＧ－１３２の阻害活性を示す図である。

[図10C]プロテアソームの触媒サブユニットβ５に対する、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴ及びＭＧ－１３２の阻害活性を示す図である。

[図11]ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

[図12A]ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した結果を示す図である。

[図12B]ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した結果を示す図である。

[図13A]プロテアソームの触媒サブユニットβ１に対する、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ及びＡＬＬＮの阻害活性を示す図である。

[図13B]プロテアソームの触媒サブユニットβ２に対する、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ及びＡＬＬＮの阻害活性を示す図である。

[図13C]プロテアソームの触媒サブユニットβ５に対する、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ及びＡＬＬＮの阻害活性を示す図である。

[図14]ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0026] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本明細書においてアミノ酸は、本技術分野で周知の一文字表記（例えば、グリシンであれば「Ｇ」）又は三文字表記（例えば、グリシンであれば「Ｇｌｙ」）で表記する。

[0027] ＜Ｒａｓタンパク質分解誘導分子＞

本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子は、Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有するＲａｓタンパク質親和性分子と、プロテアーゼに対して親和性を有し、且つ、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しないタンパク質分解誘導タグとのコンジュゲートであり、Ｒａｓタンパク質の分解を誘導可能である。本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子によれば、Ｒａｓタンパク質のユビキチン化を介することなく（すなわち、ユビキチン非依存的に）、Ｒａｓタンパク質をプロテアーゼ（例えば、プロテアソーム）による分

解（ノックダウン）へと導くことが可能となる。

[0028] なお、テトラユビキチン鎖（Ub_4）等のポリユビキチン鎖又はユビキチン様ドメイン（ＵｂＬ）は、タンパク質分解誘導タグとして機能する可能性があるが、ポリユビキチン鎖又はユビキチン様ドメインをタンパク質分解誘導タグとした場合、Ｒａｓタンパク質親和性分子を介してＲａｓタンパク質が間接的にユビキチン化されることになる。本明細書では、このようなＲａｓタンパク質の間接的なユビキチン化も、Ｒａｓタンパク質のユビキチン化に含まれるものとする。

[0029]（Ｒａｓタンパク質親和性分子）

本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子を構成するＲａｓタンパク質親和性分子は、Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有する分子である。

[0030] Ｒａｓタンパク質には、Ｋ－Ｒａｓタンパク質、Ｈ－Ｒａｓタンパク質、Ｎ－Ｒａｓタンパク質等のアイソフォームが存在し、いずれのアイソフォームであってもよい。また、Ｒａｓタンパク質は、野生型であっても変異型であってもよい。例えば、Ｋ－Ｒａｓタンパク質及びＮ－Ｒａｓタンパク質の変異型としては、Ｇ１２Ｄ変異型（Ｎ末端から１２番目のアミノ酸残基のグリシン（Ｇ）からアスパラギン酸（Ｄ）への変異。以下同様）、Ｇ１２Ｖ変異型、Ｇ１２Ｓ変異型、Ｇ１２Ｃ変異型、Ｇ１３Ｄ変異型、Ｇ１３Ｖ変異型、Ｇ１３Ｓ変異型、Ｇ１３Ｃ変異型、Ａ５９Ｔ変異型、Ａ５９Ｇ変異型、Ｑ６１Ｋ変異型、Ｑ６１Ｅ変異型、Ｑ６１Ｈ変異型、Ｋ１１７Ｎ変異型、Ａ１４６Ｔ変異型、Ａ１４６Ｐ変異型、Ａ１４６Ｖ変異型等が挙げられる。Ｈ－Ｒａｓタンパク質の変異型としては、Ｔ３５Ｓ変異型等が挙げられる。

[0031] Ｒａｓタンパク質は、ＧＴＰと結合した活性型と、ＧＤＰと結合した不活性型との間を遷移することにより細胞増殖等を調節している。一方、ヒトの癌ではＲａｓタンパク質が高頻度に変異しており、この変異に起因し、Ｒａｓタンパク質が恒常的に活性型となっていることが知られている。そこで、好ましいＲａｓタンパク質親和性分子の一例としては、活性型に変異した変異型Ｒａｓタンパク質に親和性を有するものが挙げられる。Ｒａｓタンパク

質親和性分子が活性型に変異した変異型Ｒａｓタンパク質に親和性を有することにより、この変異型Ｒａｓタンパク質をプロテアーゼ（例えば、プロテアソーム）による分解（ノックダウン）へと導くことが可能となる。

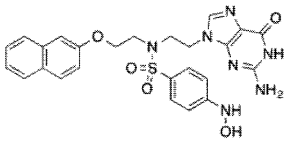
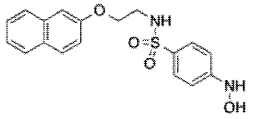
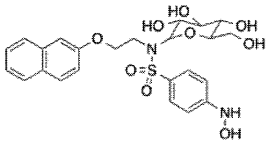
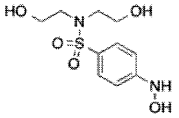
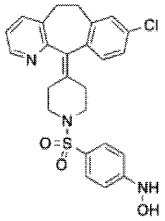
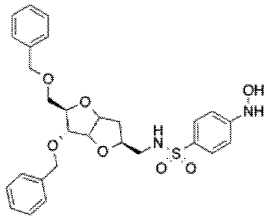
[0032] 本明細書において「Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有する」とは、例えば、Ｒａｓタンパク質に対して共有結合、水素結合、疎水結合、ファンデルワールス力等により結合可能であることを意味する。Ｒａｓタンパク質と相互作用することが知られている他の分子（タンパク質、ペプチド、抗体、ＤＮＡ、ＲＮＡ、代謝物、低分子化合物等）とＲａｓタンパク質との相互作用が、ある分子によって濃度依存的に影響を受ける場合、その分子は、Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有すると判断することができる。

[0033] Ｒａｓタンパク質親和性分子としては、低分子化合物、天然物、ペプチド、抗体等が挙げられる。なお、本開示において、抗体には、２本のＨ鎖と２本のＬ鎖とを含む、いわゆる免疫グロブリン（Ｉｇ）以外に、ＩｇのＦａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント等の抗体における可変部位を含むフラグメントなどが含まれる。Ｒａｓタンパク質親和性分子の分子量は、低分子化合物では、例えば、５０～５０００の範囲が好ましい。

[0034] Ｒａｓタンパク質親和性分子の構造は、Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有する限り、特に制限されない。Ｒａｓタンパク質親和性分子としては、例えば、Ｒａｓタンパク質に対して親和性を有するＲａｓ阻害剤を使用することができる。また、Ｒａｓタンパク質親和性分子は、候補分子の中からスクリーニングによって得ることもできる。

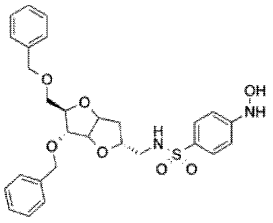
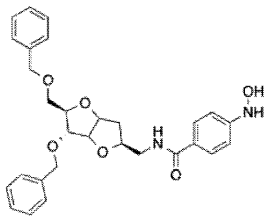
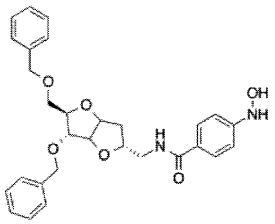
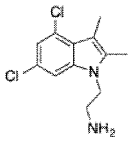
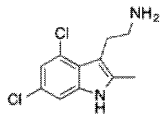
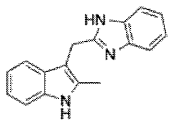
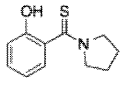
[0035] Ｒａｓタンパク質親和性分子の一例を以下の表１～表８に示す。ただし、本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子に使用可能なＲａｓタンパク質親和性分子がこれらの例に限定されるものではない。Ｒａｓタンパク質親和性分子については、必要に応じて、既存のデータベース（Binding DB（https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp）、PCI DB（http://www.tanpaku.org/pci/pci_home.html）、ProtChemSI（http://pcidb.russelllab.org/）等）の情報を参照することができる。

[0036] [表1]

No.	名称	構造式	分子量	標的	掲載論文
1	SCH-53239		535.58	・Ras/GDP	*Bioorg. Med. Chem.* **1997**, vol 5, pp 125-133.
2	SCH-53870		358.41	・Ras/GDP	*Bioorg. Med. Chem.* **1997**, vol 5, pp 125-133.
3	SCH-54292		520.55	・Ras/GDP	*Bioorg. Med. Chem.* **1997**, vol 5, pp 125-133.
4	SCH-54341		276.31	・Ras/GDP	*Biochemistry* **1998**, vol 37, pp 15631-15637.
5	SCH-56407		482.00	・Ras/GDP	*Biochemistry* **1998**, vol 37, pp 15631-15637.
6	Compound **1**		540.63	・Ras/GDP	*ChemBioChem* **2005**, vol 6, pp 1839-1848.

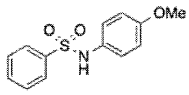
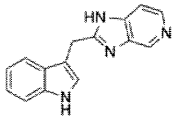
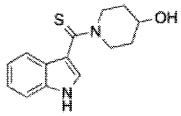
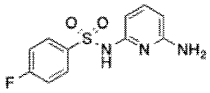
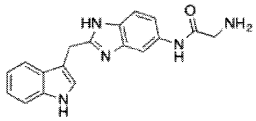
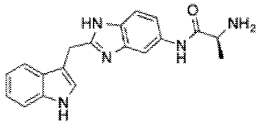
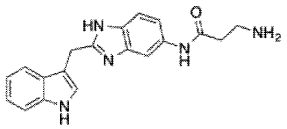
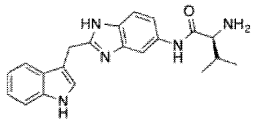
[0037]

[表2]

No.	名称	構造式	分子量	標的	掲載論文
7	Compound **2**		540.63	・Ras/GDP	*ChemBioChem* **2005**, vol 6, pp 1839-1848.
8	Compound **3**		504.58	・Ras/GDP	*ChemBioChem* **2005**, vol 6, pp 1839-1848.
9	Compound **4**		504.58	・Ras/GDP	*ChemBioChem* **2005**, vol 6, pp 1839-1848.
10	DCIE		257.16	・Wild-type Ras/GDP ・Ras-R41S/GDP ・Ras-G12D/GDP	*PNAS* **2012**, vol 109, pp 5299-5304.
11	DCAI		243.13	・Wild-type Ras/GDP ・Ras-R41S/GDP ・Ras-G12D/GDP	*PNAS* **2012**, vol 109, pp 5299-5304.
12	Compound **1**		261.33	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, vol 51, pp 6140-6143.
13	Compound **2**		207.29	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, vol 51, pp 6140-6143.

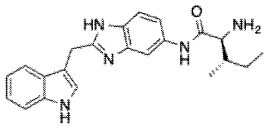
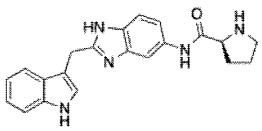
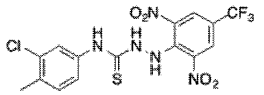
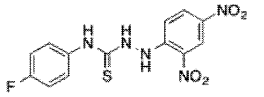
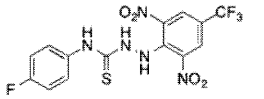
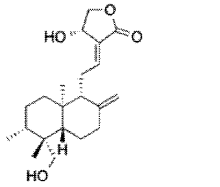
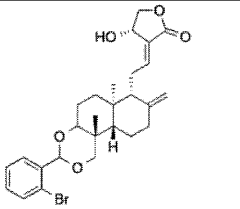
[0038]

[表3]

No.	名称	構造式	分子量	標的	掲載論文
14	Compound **3**		263.31	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
15	Compound **4**		248.29	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
16	Compound **5**		260.36	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
17	Compound **6**		267.28	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
18	Compound **8**		319.27	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
19	Compound **9**		333.40	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
20	Compound **10**		333.40	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.
21	Compound **11**		361.45	・Wild-type K-Ras/GDP ・Wild-type H-Ras/GDP ・K-Ras-G12V/GDP ・K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** vol 51, pp 6140-6143.

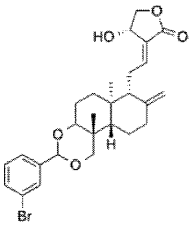
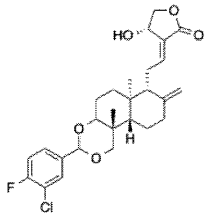
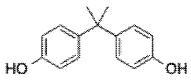
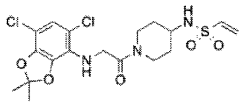
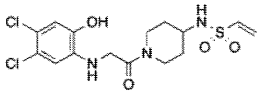
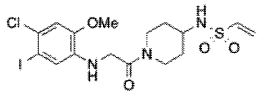
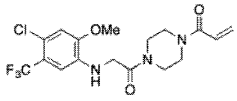
[0039]

[表4]

No.	名称	構造式	分子量	標的	掲載論文
22	Compound **12**		375.48	·Wild-type K-Ras/GDP ·Wild-type H-Ras/GDP ·K-Ras-G12V/GDP ·K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, vol 51, pp 6140-6143.
23	Compound **13**		359.43	·Wild-type K-Ras/GDP ·Wild-type H-Ras/GDP ·K-Ras-G12V/GDP ·K-Ras-G12D/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, vol 51, pp 6140-6143.
24	Kobe0065		449.79	·H-Ras-G12V ·H-Ras-T35S ·K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 8182-8187.
25	Kobe2601		351.31	·H-Ras-G12V ·H-Ras-T35S ·K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 8182-8187.
26	Kobe2602		419.31	·H-Ras-G12V ·H-Ras-T35S ·K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 8182-8187.
27	Andrographolide		348.48	·K-Ras-Q61H ·K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 10201-10206.
28	SJR09		517.46	·K-Ras-Q61H ·K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 10201-10206.

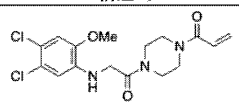
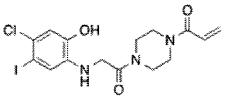
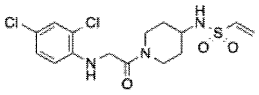
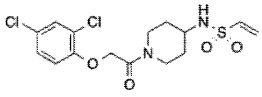
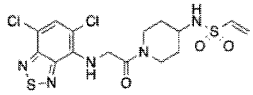
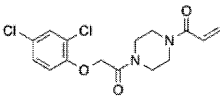
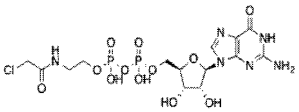
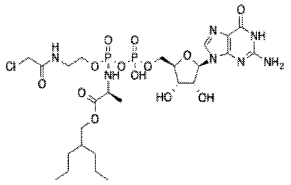
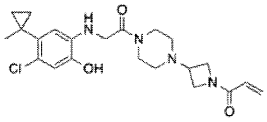
[0040]

[表5]

No.	名称	構造式	分子量	標的	掲載論文
29	SJR10		517.46	・K-Ras-Q61H ・K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 10201-10206.
30	SJR23		491.00	・K-Ras-Q61H ・K-Ras-G12V	*PNAS* **2013**, vol 110, pp 10201-10206.
31	Bisphenol A		228.29	・K-Ras/GDP	*J. Med. Chem.* **2013**, vol 56, pp 9664-9672.
32	VSA7		464.36	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
33	VSA8		408.29	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
34	VSA9		513.78	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
35	AA10		405.80	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.

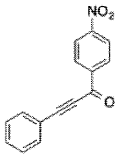
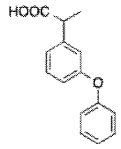
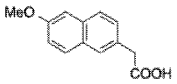
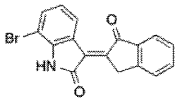
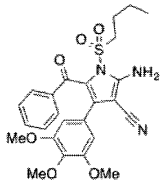
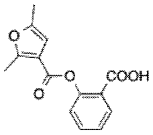
[0041]

[表6]

No.	名称	構造式	分子量	標的	掲載論文
36	AA11		372.25	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
37	AA12		449.67	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
38	VSA13		392.30	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
39	VSA14		393.28	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
40	VSA15		450.35	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
41	AA16		343.20	・K-Ras-G12C/GDP	*Nature* **2013**, vol 303, pp 548-551.
42	SML-8-73-1		562.75	・K-Ras-G12C/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, vol 53, pp 199-204.
43	SML-10-70-1		764.04	・K-Ras-G12C/GDP	*Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, vol 53, pp 199-204.
44	ARS853		432.95	・K-Ras-G12C/GDP	*Science* **2016**, vol 351, pp 604-608.

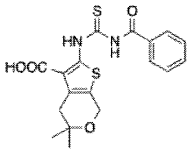
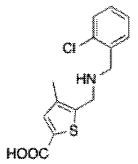
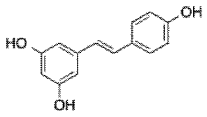
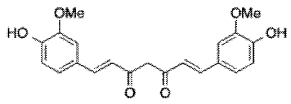
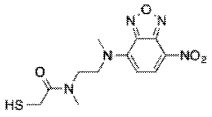
[0042]

[表7]

No.	名称	構造式	分子量	標的	データベース
45	BDBM 43263		251.24	·Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
46	BDBM 54705		242.27	·Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
47	BDBM 54706		216.24	·Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
48	BDBM 54678		340.18	·Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
49	BDBM 54687		497.57	·Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
50	BDBM 43246		260.24	·Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)

[0043]

[表8]

No.	名称	構造式	分子量	標的	データベース
51	BDBM 43221		390.47	・Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
52	BDBM 43251		295.78	・Wild-type Ras	Binding DB (https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)
53	Resveratol		228.25	・K-Ras ・H-Ras	PCI DB (http://www.tanpaku.org/pci/pci_home.html)
54	Curucmin		368.38	・K-Ras	PCI DB (http://www.tanpaku.org/pci/pci_home.html)
55	AC10A9UT		325.34	・H-Ras	ProtChemSI (http://pcidb.russelllab.org/)

[0044] （タンパク質分解誘導タグ）

本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子を構成するタンパク質分解誘導タグは、プロテアーゼに対して親和性を有し、且つ、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しない分子である。以下では、このタンパク質分解誘導タグをＣｉＫＤ（Chemical interactions and KnockDown）タグ又はＣＡＮＤＹ（Chemical AffiNities and Degradation DYnamics）タグとも称する。

[0045] プロテアーゼとしては特に制限されず、プロテアーゼ活性を有するあらゆる分子が挙げられる。例えば、プロテアソームのような複合体型プロテアーゼであってもよく、プロテアソーム以外のプロテアーゼであってもよい。また、プロテアーゼ活性を有する限り、プロテアソームの一部分であってもよい。

[0046] プロテアソームとしては、例えば、２６Ｓプロテアソーム、免疫プロテアソーム、及び胸腺プロテアソームが挙げられる。

２６Ｓプロテアソームは、２０Ｓプロテアソームに１９Ｓプロテアソームが２つ結合したものである。２０Ｓプロテアソームは、α１～α７の７つのサブユニットから構成されるαリングと、β１～β７の７つのサブユニットから構成されるβリングとが、αββαの順に積み重なった筒状構造をしており、β１、β２、及びβ５がそれぞれカスパーゼ様活性、トリプシン様活性、及びキモトリプシン様活性という触媒活性を発揮する。

免疫プロテアソームは、触媒サブユニットβ１、β２、及びβ５がそれぞれβ１ｉ、β２ｉ、及びβ５ｉに置き換わったものである（Science, 1994, 265, 1234-1237）。

胸腺プロテアソームは、β１ｉ及びβ２ｉとともに、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）特異的に発現するβ５ｔが組み込まれたものである（Science, 2007, 316, 1349-1353）。

[0047] また、プロテアソーム以外のプロテアーゼとしては、β－セクレターゼ、γ－セクレターゼ、アミノペプチダーゼ、アンジオテンシン変換酵素、ブロメライン、カルパインＩ、カルパインＩＩ、カルボキシペプチダーゼＡ、カルボキシペプチダーゼＢ、カルボキシペプチダーゼＰ、カルボキシペプチダーゼＹ、カスパーゼ１、カスパーゼ２、カスパーゼ３、カスパーゼ５、カスパーゼ６、カスパーゼ７、カスパーゼ８、カスパーゼ９、カスパーゼ１３、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＧ、カテプシンＬ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体Ｃ１ｒ、補体Ｃ１ｓ、補体Ｂ因子、補体Ｄ因子、ジペプチジルペプチダーゼＩ、ジペプチジルペプチダーゼＩＩ、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ、ディスパーゼ、エラスターゼ、エンドプロテイナーゼＡｒｇ－Ｃ、エンドプロテイナーゼＧｌｕ－Ｃ、エンドプロテイナーゼＬｙｓ－Ｃ、フィシン、グランザイムＢ、カリクレイン、ロイシンアミノペプチダーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、パパイン、ペプシン、プラスミン、プロカスパーゼ３、プロナーゼＥ、プロテイナーゼＫ、レニン、サーモリシン、トロンビン、トリプシン、細胞質アラニルアミノペプチダーゼ、エンケファリナーゼ、

ネプリライシン等が挙げられる。

[0048] 本明細書において「プロテアーゼに対して親和性を有する」とは、例えば、プロテアーゼに対して共有結合、水素結合、疎水結合、ファンデルワールス力等により結合可能であることを意味する。ある分子の存在下においてプロテアーゼの熱安定性が変化する場合、その分子は、プロテアーゼに対して親和性を有すると判断することができる。

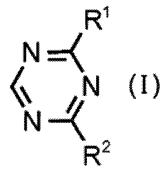
[0049] また、本明細書において「プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しない」とは、例えば、プロテアーゼの分解活性サイトに共有結合しないことを意味する。ある分子の存在下においてもプロテアーゼによってタンパク質が分解され、更にプロテアーゼ阻害剤を共存させるとタンパク質の分解が阻害される場合、その分子は、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しないと判断することができる。

[0050] タンパク質分解誘導タグとしては、低分子化合物、天然物、ペプチド、抗体等が挙げられる。タンパク質分解誘導タグの分子量は、例えば、５０～２０００００の範囲が好ましい。タンパク質分解誘導タグが低分子化合物である場合、タンパク質分解誘導タグの分子量は、例えば、５０～５０００の範囲が好ましい。

[0051] タンパク質分解誘導タグの構造は、プロテアーゼに対して親和性を有し、且つ、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しないものである限り、特に制限されない。タンパク質分解誘導タグは、例えば、候補分子の中からスクリーニングによって得ることができる。また、プロテアーゼ阻害剤（例えば、プロテアソーム阻害剤）のプロテアーゼ阻害活性（例えば、プロテアソーム阻害活性）を失活させることにより製造することもできる。

[0052] ある態様では、タンパク質分解誘導タグは、例えば、下記式（Ｉ）で表される構造とすることができる。下記式（Ｉ）で表される化合物は、プロテアーゼに対して親和性を有し、且つ、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害しないことが確認されている（例えば、後述する参考例１～４を参照）。

[0053] [化1]



[0054] 式（Ｉ）中、Ｒ[1]及びＲ[2]は、それぞれ独立に、炭素数１～２０の炭化水素基、炭素数１～２０のアルコキシ基、炭素数６～２０のアリールオキシ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、又はハロゲノ基を示す。

[0055] 炭化水素基としては、アルキル基、アルケニル基、アリール基、これらの組み合わせ等が挙げられる。具体的には、メチル基、エチル基等の炭素数１～２０のアルキル基；ビニル基、アリル基等の炭素数２～２０のアルケニル基；フェニル基、ナフチル基等の炭素数６～２０のアリール基；ベンジル基、フェネチル基等の炭素数７～２０のアリールアルキル基；トリル基、キシリル基等の炭素数７～２０のアルキルアリール基；等が挙げられる。

ハロゲノ基としては、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等が挙げられる。

[0056] 別の態様では、タンパク質分解誘導タグは、プロテアソーム阻害剤のプロテアソーム阻害活性を失活させた構造とすることができる。プロテアソーム阻害活性としては、より具体的には、カスパーゼ様活性、トリプシン様活性、及びキモトリプシン様活性から選ばれる少なくとも１種に対する阻害活性が挙げられる。

[0057] ここで、「プロテアソーム阻害活性を失活させた構造」には、プロテアソーム阻害活性を完全に消失させた構造に加え、プロテアソーム阻害活性を減弱させた構造も含まれる。ある態様では、タンパク質分解誘導タグは、カスパーゼ様活性、トリプシン様活性、及びキモトリプシン様活性から選ばれる少なくとも１種に対する５０％阻害濃度（IC_{50}）が、元のプロテアソーム阻害剤の５０％阻害濃度（IC_{50}）の２倍以上である。

[0058] プロテアソーム阻害剤としては、プロテアソーム阻害活性を有するあらゆる化合物を使用することができる。プロテアソーム阻害剤は、プロテアソー

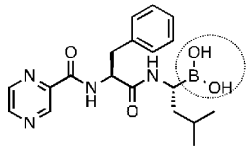
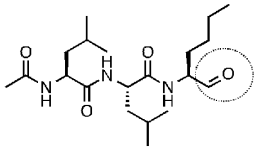
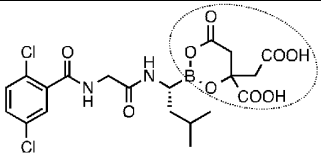
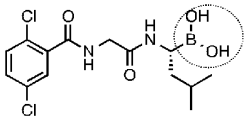
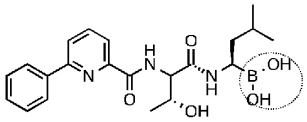
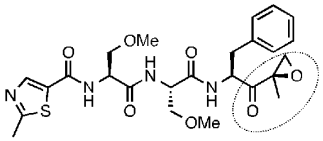
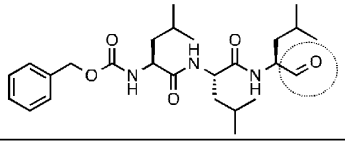
ム（複合体型プロテアーゼ）に対して親和性を有し、且つ、プロテアソームによるタンパク質の分解を阻害する化合物である。したがって、プロテアソーム阻害剤の活性部位を他の構造部分に置き換えてプロテアソーム阻害活性を失活させることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

プロテアソーム阻害剤は、抗癌剤等として研究が進んでおり、医薬品として認可済みの化合物及び臨床試験中の化合物が数多く存在する。また、プロテアソーム阻害剤は、分子量が比較的小さく、疎水性が低いものが多く、細胞膜透過性、細胞毒性等の問題も生じ難い。このため、プロテアソーム阻害剤を基にタンパク質分解誘導タグを合成することは、非常に合理的且つ効率的である。

[0059] プロテアソーム阻害剤の一例を以下の表９及び表１０に示す。表９及び表１０に示すプロテアソーム阻害剤は、いずれも２０Ｓプロテアソームの活性中心部に対して親和性を有する２０Ｓプロテアソーム阻害剤である。また、表９及び表１０に示すプロテアソーム阻害剤は、当然に２６Ｓプロテアソームに対しても親和性を有する。ただし、タンパク質分解誘導タグの製造に使用可能なプロテアソーム阻害剤がこれらの例に限定されるものではない。

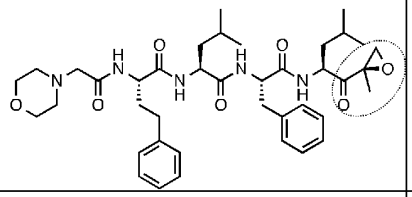
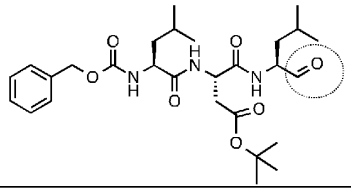
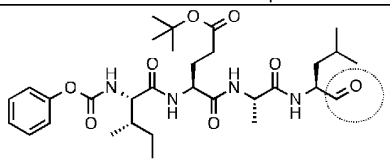
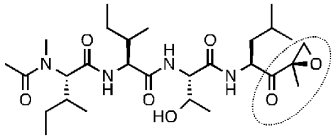
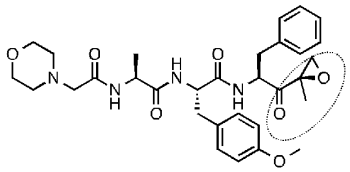
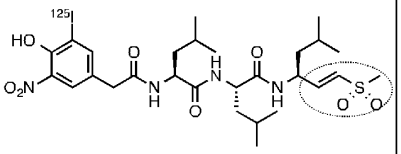
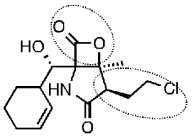
[0060]

[表9]

No.	一般名／商品名	構造式(丸印は活性部位)	分子量
1	Bortezomib		384.24
2	ALLN (MG-101, Calpain inhibitor Ⅰ)		383.53
3	MLN9708 (Ixazomib)		517.12
4	MLN2238		361.03
5	CEP-18770		413.28
6	ONO-7058 (Oprozomib)		532.61
7	MG-132		475.63

[0061]

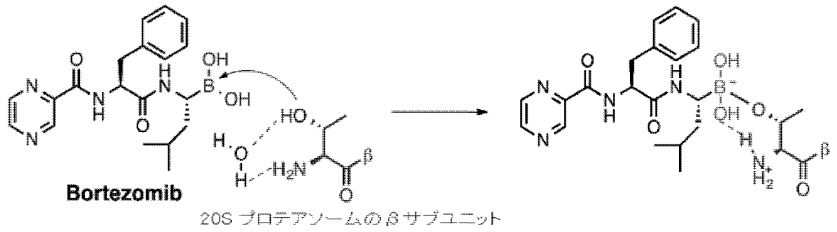
[表10]

No.	一般名／商品名	構造式(丸印は活性部位)	分子量
8	Carfilzomib		719.92
9	BSc-2118		533.66
10	PSI		604.75
11	Epoxomicin		554.73
12	ONX-0914		580.68
13	^{125}I-NIP-L_3VS		720.64
14	NPI-0052 (Marizomib)		313.78

[0062] 例えば、ボロン酸型プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ（Bortezomib）は、下記式に示すように、活性部位であるボロニル基が２０Ｓプロテアソームの分解活性サイトと共有結合することで、プロテアソーム活性を阻害することが知られている（Kisselev, A.F. et al., Chemistry & Biology, 201

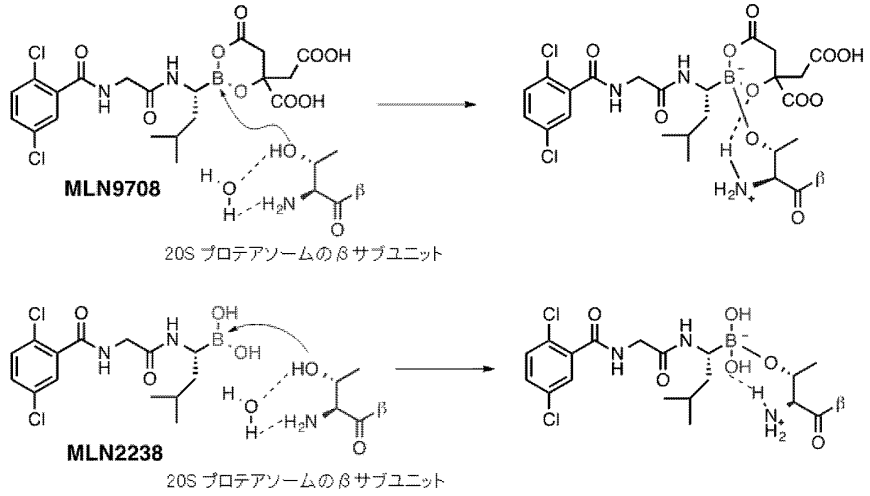
2, 19, 99-115）。

[0063] [化2]



[0064] また、ボロン酸型プロテアソーム阻害剤であるＭＬＮ９７０８及びＭＬＮ２２３８は、下記式に示すように、活性部位であるボロン酸エステル部位又はボロニル基が２０Ｓプロテアソームの分解活性サイトと共有結合することで、プロテアソーム活性を阻害することが知られている（Kisselev, A.F. et al., Chemistry & Biology, 2012, 19, 99-115）。

[0065] [化3]

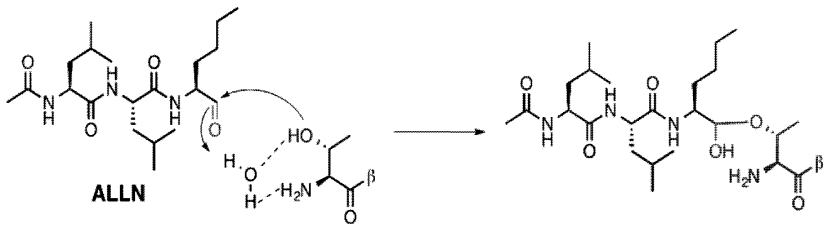


[0066] このため、ボルテゾミブ、ＭＬＮ９７０８、及びＭＬＮ２２３８の活性部位であるボロニル基又はボロン酸エステル部位を他の構造部分（カルボキシ基、アルキル基、アリール基、アミノ基、ヒドロキシ基等）に置き換えてプロテアソーム阻害活性を失活させることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

[0067] なお、ＣＥＰ－１８７７０等の他のボロン酸型プロテアソーム阻害剤についても、活性部位を他の構造部分（カルボキシ基、アルキル基、アリール基、アミノ基、ヒドロキシ基等）に置き換えることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

[0068] また、アルデヒド型プロテアソーム阻害剤であるＡＬＬＮは、下記式に示すように、活性部位であるホルミル基が２０Ｓプロテアソームの分解活性サイトと共有結合することで、プロテアソーム活性を阻害することが知られている（Kisselev, A.F. et al., Chemistry & Biology, 2012, 19, 99-115）。

[0069] [化4]

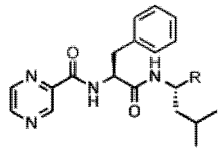
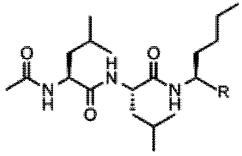
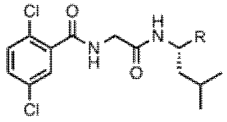
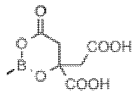
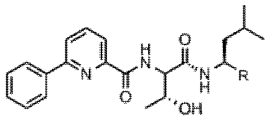
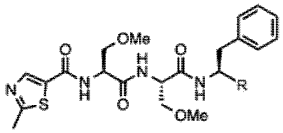
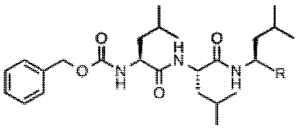
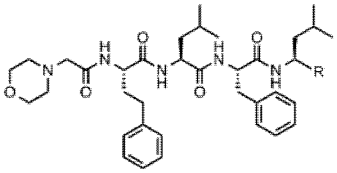


[0070] このため、ＡＬＬＮの活性部位であるホルミル基を他の構造部分（カルボキシ基、アルキル基、アリール基、アミノ基、ヒドロキシ基等）に置き換えてプロテアソーム阻害活性を失活させることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

[0071] なお、ＭＧ－１３２、ＢＳｃ－２１１８、ＰＳＩ等の他のアルデヒド型プロテアソーム阻害剤についても、活性部位であるホルミル基を他の構造部分（カルボキシ基、アルキル基、アリール基、アミノ基、ヒドロキシ基等）に置き換えることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

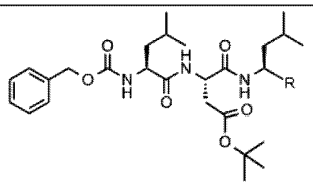
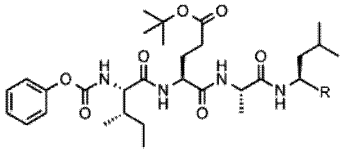
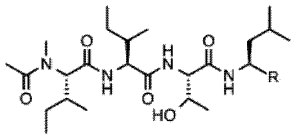
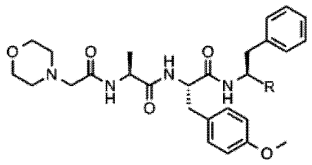
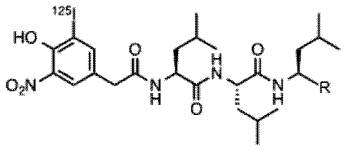
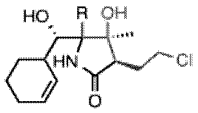
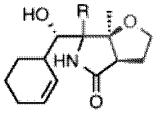
[0072] プロテアソーム阻害剤のプロテアソーム阻害活性を失活させた構造を有するタンパク質分解誘導タグの一例を以下の表１１及び表１２に示す。表中のＲで表される１価の基としては、カルボキシ基、炭素数１～２０のアルキル基、炭素数６～２０のアリール基、アミノ基、ヒドロキシ基等が挙げられる。

[0073] [表11]

No.	構造式
1	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）
2	 （式中、Rは、-CHOを除く1価の基を示す。）
3	 （式中、Rは、 及び  を除く1価の基を示す。）
4	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）
5	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）
6	 （式中、Rは、-CHOを除く1価の基を示す。）
7	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）

[0074]

[表12]

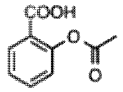
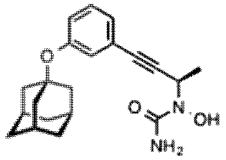
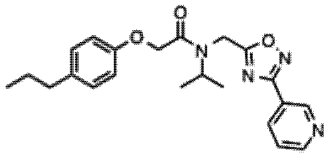
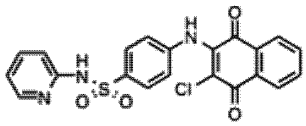
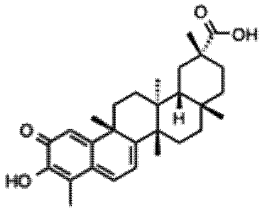
No.	構造式
8	 （式中、Rは、-CHOを除く1価の基を示す。）
9	 （式中、Rは、-CHOを除く1価の基を示す。）
10	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）
11	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）
12	 （式中、Rは、 を除く1価の基を示す。）
13	 （式中、Rは、1価の基を示す。）
14	 （式中、Rは、1価の基を示す。）

[0075] プロテアソーム阻害剤の他の例を以下の表１３～表１８に示す。これらのプロテアソーム阻害剤についても、上記と同様にしてプロテアソーム阻害活性を失活させることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

[0076]

[表13]

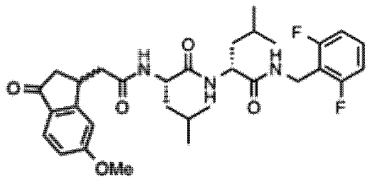
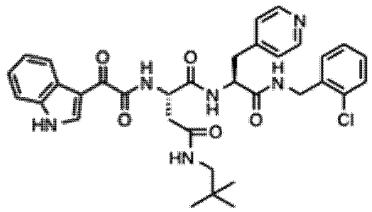
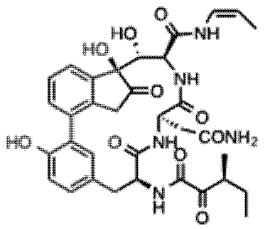
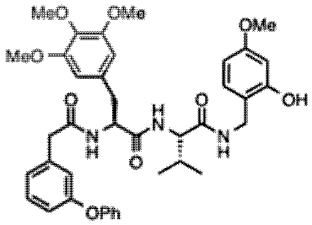
20Sプロテアソーム阻害剤

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
15	Aspirin		180.15
16	Hydroxyurea inhibitor		354.54
17	PI-1840		394.47
18	PI-083		439.87
19	Cerastol		450.61

[0077]

[表14]

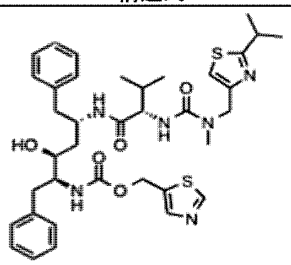
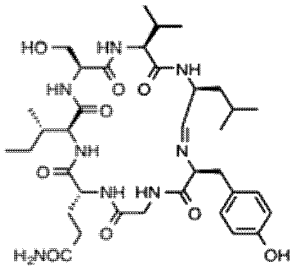
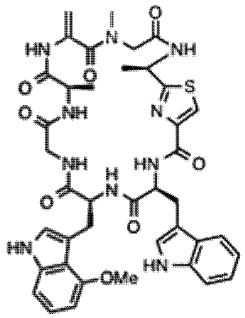
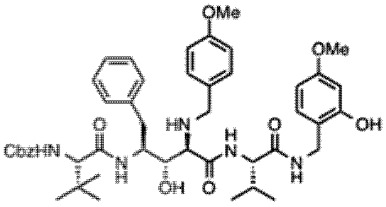
20Sプロテアソーム阻害剤（続き）

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
20	CVT-659		571.66
21	Capped dipeptide 2		645.15
22	TMC95A		677.71
23	Capped dipeptide 1		699.80

[0078]

[表15]

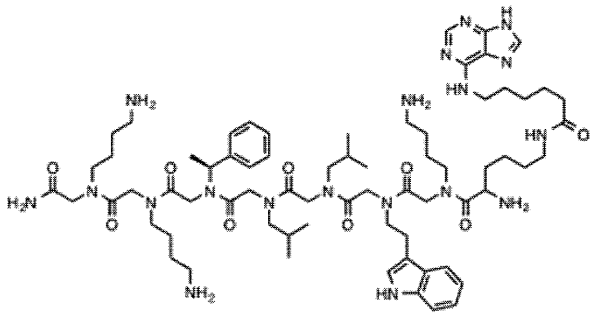
20Sプロテアソーム阻害剤（続き）

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
24	Ritonavir		720.94
25	Scytonemide A		744.89
26	Argyrin A		824.91
27	Benzylstatine peptide 1		826.00

[0079]

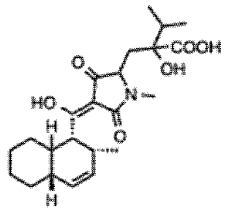
[表16]

19Sプロテアソーム阻害剤

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
1	RIP-1 (Rpt4 inhibitor)		1348.76

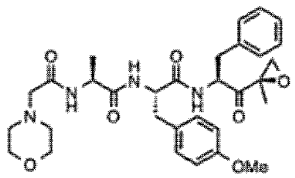
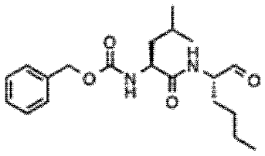
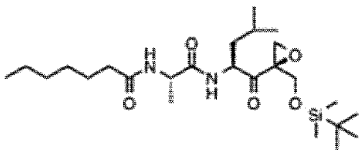
[0080] [表17]

20S/19S以外の構成因子阻害剤

No.	一般名／商品名	構造式	分子量	その他
1	JBIR-22		419.52	PAC-3（分子集合因子）阻害

[0081] [表18]

20S免疫プロテアソーム阻害剤

No.	一般名／商品名	構造式	分子量	その他
1	PR-957		580.68	β5iを阻害
2	IPSI-001		362.47	β2iを阻害
3	LMP2-sp-ek		484.75	β2iを阻害

[0082] 別の態様では、タンパク質分解誘導タグは、プロテアーゼ阻害剤（前述したプロテアソーム阻害剤を除く）のプロテアーゼ阻害活性を失活させた構造とすることができる。

[0083] ここで、「プロテアーゼ阻害活性を失活させた構造」には、プロテアーゼ阻害活性を完全に消失させた構造に加え、プロテアーゼ阻害活性を減弱させた構造も含まれる。ある態様では、タンパク質分解誘導タグは、プロテアーゼ阻害剤の阻害対象となるプロテアーゼに対する５０％阻害濃度（IC_{50}）が、元のプロテアーゼ阻害剤の５０％阻害濃度（IC_{50}）の２倍以上である。

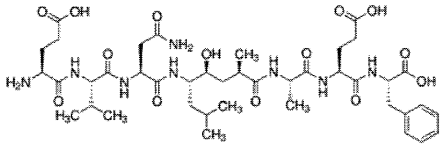
[0084] プロテアーゼ阻害剤としては、プロテアーゼ阻害活性を有するあらゆる化合物を使用することができる。プロテアーゼ阻害剤は、プロテアーゼに対して親和性を有し、且つ、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害する化合物である。したがって、プロテアーゼ阻害剤の活性部位を他の構造部分に置き換えてプロテアーゼ阻害活性を失活させることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。

[0085] プロテアーゼ阻害剤の一例を以下の表１９～表８６に示す。これらのプロテアーゼ阻害剤の活性部位を他の構造部分に置き換えてプロテアーゼ阻害活性を失活させることで、タンパク質分解誘導タグを得ることができる。ただし、タンパク質分解誘導タグの製造に使用可能なプロテアーゼ阻害剤がこれらの例に限定されるものではない。プロテアーゼ及びプロテアーゼ阻害剤については、必要に応じて、既存のデータベース（MEROPS-the peptidase database（http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml）等）の情報を参照することができる。

[0086]

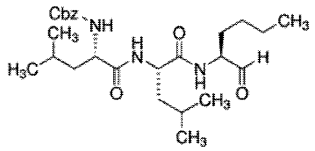
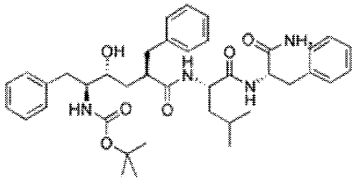
[表19]

β－セクレターゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	OM99-2		892.99	

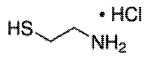
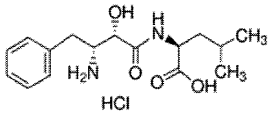
[0087] [表20]

γ－セクレターゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	γ-Secretase inhibitor		705.83	
2	L-685,458		672.85	

[0088] [表21]

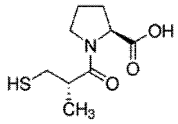
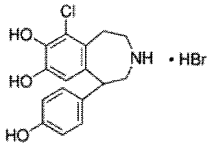
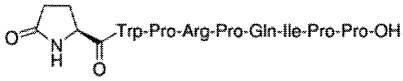
アミノペプチダーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Cysteamine		113.61	
2	Bestatin		344.83	・アミノペプチダーゼB ・ロイシンアミノペプチダーゼ

[0089]

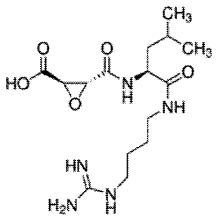
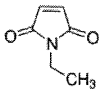
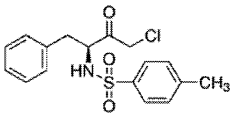
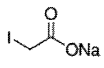
[表22]

アンジオテンシン変換酵素阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Captopril		217.29	・アンジオテンシンⅡの形成を阻害
2	Fenoldopam monohydrobromide		386.67	
3	Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor		1101.26	

[0090] [表23]

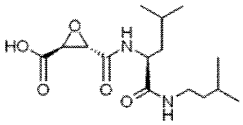
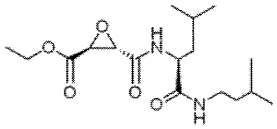
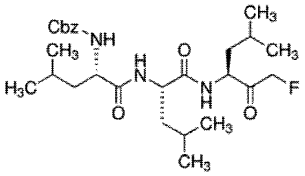
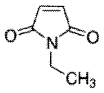
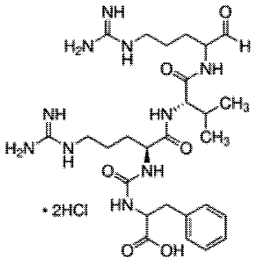
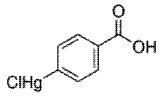
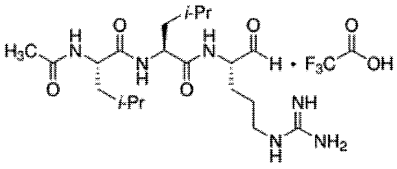
プロメライン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	E-64		357.41	・カテプシンB ・フィシン ・パパイン ・プロメライン
2	N-Ethylmaleimide		125.13	・カルパイン ・フィシン
3	N-p-Tosyl-L-phenilalanine chloromethyl ketone		351.85	・パパイン ・キモトリプシン ・フィシン ・プロメライン
4	Sodium iodoacetate		207.93	・カルボキシペプチダーゼ ・プロメライン ・フィシン ・カテプシン

[0091]

[表24]

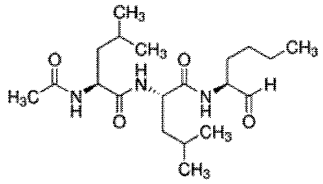
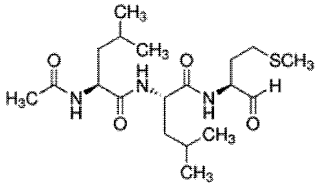
カルパイン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	E-64c		314.38	
2	E-64d		342.43	
3	Z-Leu-Leu-Leu-fluoromethyl ketone		507.64	
4	N-Ethylmaleimide		125.13	・フィシン ・カルパイン
5	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン
6	4-Chloromercuribenzoic acid		357.16	・カルパイン ・カルボキシペプチダーゼ ・クロストリパイン
7	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0092]

[表25]

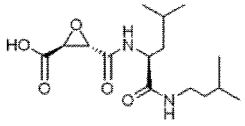
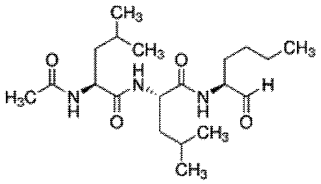
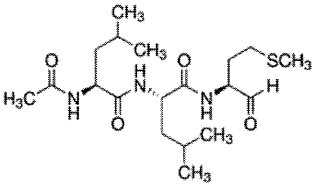
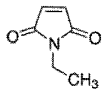
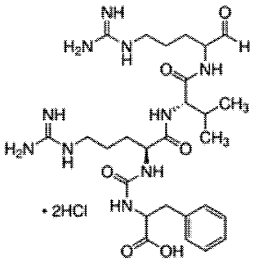
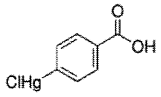
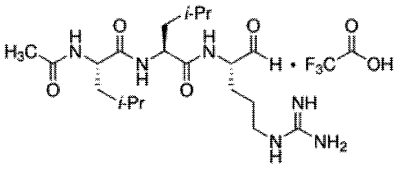
カルパインＩ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Calpain Inhibitor I (ALLN, Ac-LLnL-CHO, MG-101)		383.53	・カテプシンB ・カテプシンL ・カルパイン ・プロテアソーム
2	Calpain Inhibitor II		401.56	・カテプシンB ・カルパイン ・プロテアソーム

[0093]

[表26]

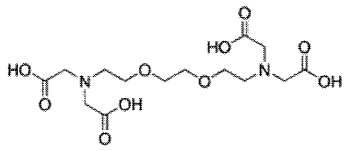
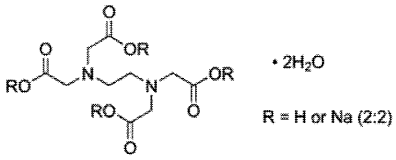
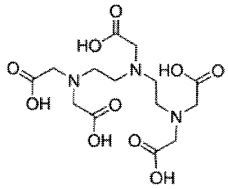
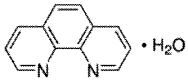
カルパインII阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	E-64c		314.38	
2	Calpain Inhibitor I (ALLN, Ac-LLnL-CHO, MG-101)		383.53	・カテプシンB ・カテプシンL ・カルパイン ・プロテアソーム
3	Calpain Inhibitor II		401.56	・カテプシンB ・カルパイン ・プロテアソーム
4	N-Ethylmaleimide		125.13	・フィシン ・カルパイン
5	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン
6	4-Chloromercuribenzoic acid		357.16	・カルパイン ・カルボキシペプチダーゼ ・クロストリパイン
7	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0094]

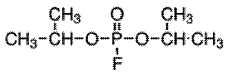
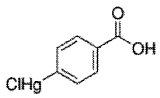
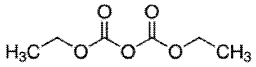
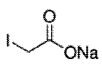
[表27]

カルボキシペプチダーゼA/B阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid		380.35	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB
2	EDTA二ナトリウム塩		372.24	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・コラゲナーゼ
3	ペンテト酸 (DETAPAC, DTPA)		393.35	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB
4	1,10-Phenanthroline monohydrate		198.22	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・ロイシンアミノペプチダーゼ ・サーモリシン

[0095] [表28]

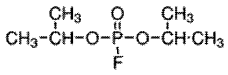
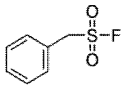
カルボキシペプチダーゼP阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	4-Chloromercuribenzoic acid		357.16	・カルパイン ・カルボキシペプチダーゼ ・クロストリパイン
3	Diethyl pyrocarbonate (DEP)		162.14	
4	Sodium iodoacetate		207.93	・カルボキシペプチダーゼP ・ブロメライン ・フィシン ・カテプシン

[0096]

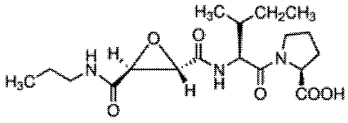
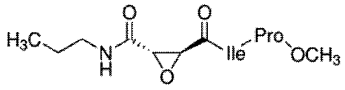
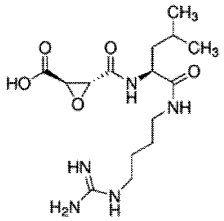
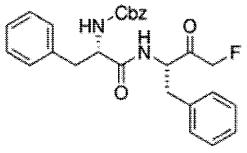
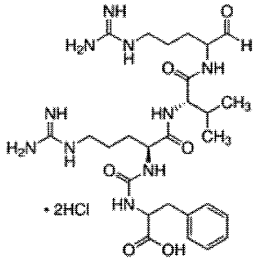
[表29]

カルボキシペプチダーゼY阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	Phenylmethanesulfonyl fluoride		174.19	・トロンビン ・エラスターゼ ・プラスミン ・プロテイナーゼ

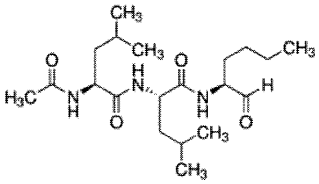
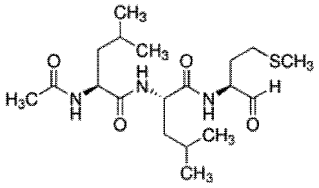
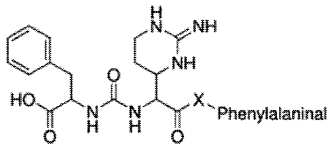
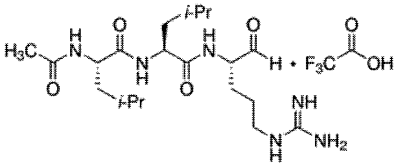
[0097] [表30]

カテプシンB阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	CA-074		383.44	
2	CA-074 methyl ester		397.47	
3	E-64		357.41	・カテプシンB ・フィシン ・パパイン ・ブロメライン
4	Z-Phe-Phe-fluoromethyl ketone (Z-FF-FMK)		462.51	
5	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン

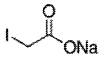
[0098] [表31]

カテプシンB阻害剤（続き）

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
6	Calpain Inhibitor I (ALLN, Ac-LLnL-CHO, MG-101)		383.53	・カテプシンB ・カテプシンL ・カルパイン ・プロテアソーム
7	Calpain Inhibitor II		401.56	・カテプシンB ・カルパイン ・プロテアソーム
8	Chymostatin	 Chymostatin A X = Leu Chymostatin B X = Val Chymostatin C X = Ile	A: MW = 607.7 B: MW = 593.7 C: MW = 607.7	・キモトリプシン ・パパイン ・キモトリプシン様セリンプロテイナーゼ ・カテプシンA、B、C、B、H、L
9	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0099] [表32]

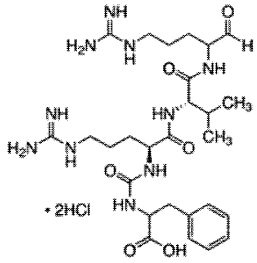
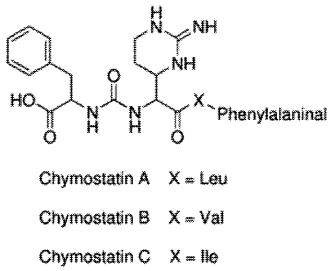
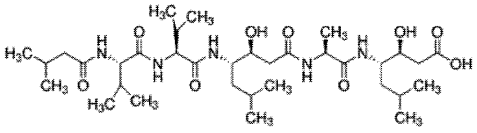
カテプシンC阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Sodium iodoacetate		207.93	・カルボキシペプチダーゼP ・ブロメライン ・フィシン ・カテプシン

[0100]

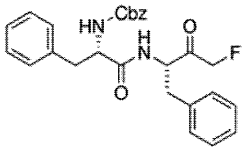
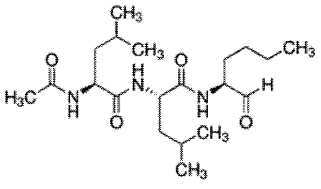
[表33]

カテプシンD阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン
2	Chymostatin	 Chymostatin A X = Leu Chymostatin B X = Val Chymostatin C X = Ile	A: MW = 607.7 B: MW = 593.7 C: MW = 607.7	・キモトリプシン ・パパイン ・キモトリプシン様セリンプロテイナーゼ ・カテプシンA、B、C、B、H、L ・プロテアソーム（β5）
3	Pepstatin A		685.89	・ペプシン ・カテプシン

[0101] [表34]

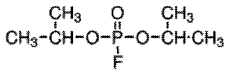
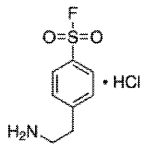
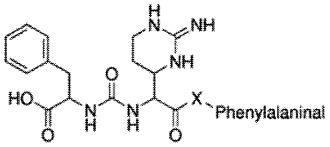
カテプシンL阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Z-Phe-Phe-fluoromethyl ketone (Z-FF-FMK)		462.51	
2	Calpain Inhibitor I (ALLN, Ac-LLnL-CHO, MG-101)		383.53	・カテプシンB ・カテプシンL ・カルパイン ・プロテアソーム

[0102]

[表35]

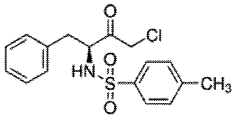
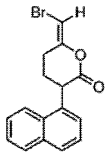
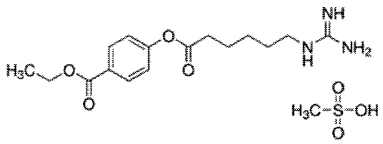
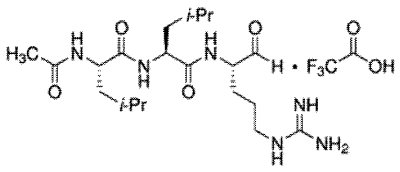
キモトリプシン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)		239.69	・プラスミン ・トリプシン ・キモトリプシン
3	6-Aminocaproic acid		131.17	
4	Chymostatin	 Chymostatin A X = Leu Chymostatin B X = Val Chymostatin C X = Ile	A: MW = 607.7 B: MW = 593.7 C: MW = 607.7	・キモトリプシン ・パパイン ・キモトリプシン様セリンプロテイナーゼ ・カテプシンA、B、C、B、H、L ・プロテアソーム（β5）

[0103]

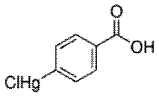
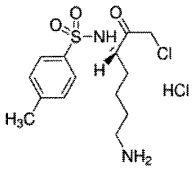
[表36]

キモトリプシン阻害剤（続き）

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone		351.85	・パパイン ・キモトリプシン ・フィシン ・ブロメライン
2	Bromoenol lactone		317.18	
3	Gabexate mesylate		417.48	
4	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0104] [表37]

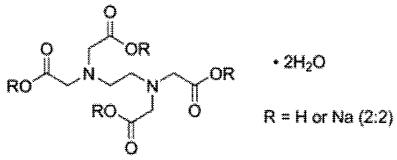
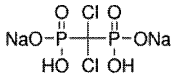
クロストリパイン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	4-Chloromercuribenzoic acid		357.16	・カルパイン ・カルボキシペプチダーゼ ・クロストリパイン
2	Nα-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride		369.31	

[0105]

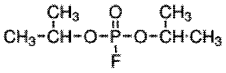
[表38]

コラゲナーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	EDTA二ナトリウム塩		372.24	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・コラゲナーゼ
2	Dichloromethylene diphosphonic acid disodium salt (DMDP)		288.86	

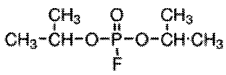
[0106] [表39]

補体C1r/C1s阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ

[0107] [表40]

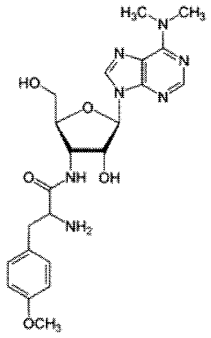
補体D因子/B因子阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ

[0108]

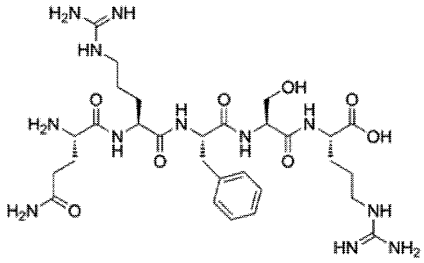
[表41]

ジペプチジルペプチダーゼⅡ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Puromycin		471.51	・ジペプチジルペプチダーゼⅡ ・細胞質アラニルアミノペプチダーゼ

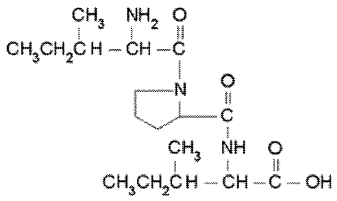
[0109] [表42]

ジペプチジルペプチダーゼⅢ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Opiorphin		692.77	・エンケファリナーゼ ・ネプリライシン ・ジペプチジルペプチダーゼⅢ ・細胞質アラニルアミノペプチダーゼ

[0110] [表43]

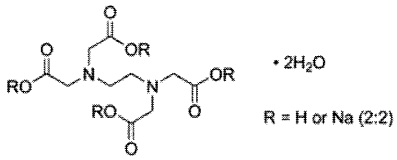
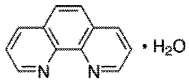
ジペプチジルペプチダーゼⅣ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Ile-Pro-Ile		341.45	・ジペプチジルペプチダーゼⅣ

[0111]

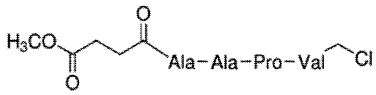
[表44]

ディスパーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	EDTAニナトリウム塩		372.24	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・コラゲナーゼ
2	1,10-Phenanthroline monohydrate		198.22	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・ロイシンアミノペプチダーゼ ・サーモリシン

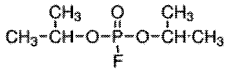
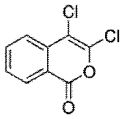
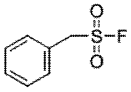
[0112] [表45]

エラスターゼ(顆粒球)阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-(Methoxysuccinyl)-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone		502.99	

[0113] [表46]

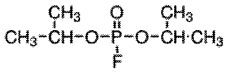
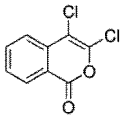
エラスターゼ(白血球)阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
3	Phenylmethanesulfonyl fluoride		174.19	・トロンビン ・エラスターゼ ・プラスミン ・プロテイナーゼ

[0114]

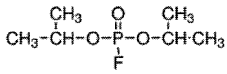
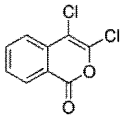
[表47]

エラスターゼ（膵臓）阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン

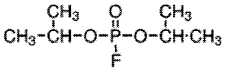
[0115] [表48]

エンドプロテイナーゼArg-C阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン

[0116] [表49]

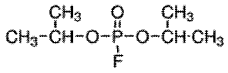
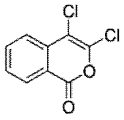
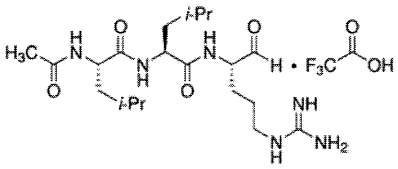
エンドプロテイナーゼGlu-C阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ

[0117]

[表50]

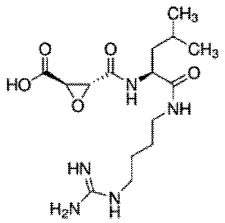
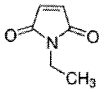
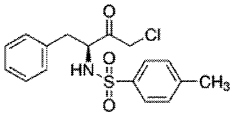
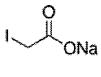
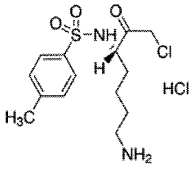
エンドプロテイナーゼLys-C阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
3	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0118]

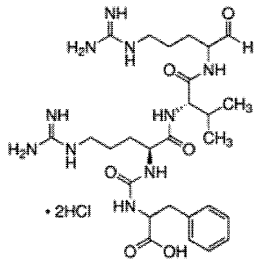
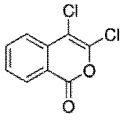
[表51]

フィシン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	E-64		357.41	・カテプシンB ・フィシン ・パパイン ・ブロメライン
2	N-Ethylmaleimide		125.13	・カルパイン ・フィシン
3	N-p-Tosyl-L-phenilalanine chloromethyl ketone		351.85	・パパイン ・キモトリプシン ・フィシン ・ブロメライン
4	Sodium iodoacetate		207.93	・カルボキシペプチダーゼP ・ブロメライン ・フィシン ・カテプシン
5	Nα-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride		369.31	

[0119] [表52]

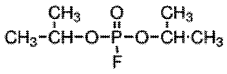
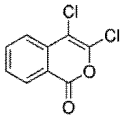
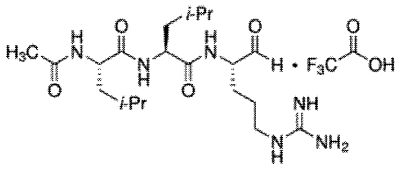
グランザイムB阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン
2	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン

[0120]

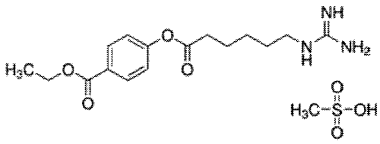
[表53]

カリクレイン（組織）阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
3	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

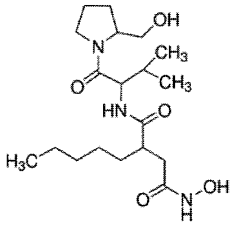
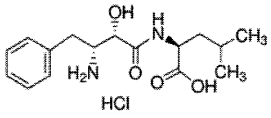
[0121] [表54]

カリクレイン（血漿）阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Gabexate mesylate		417.48	

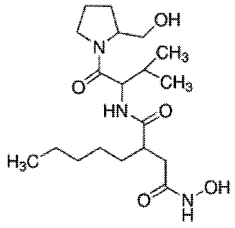
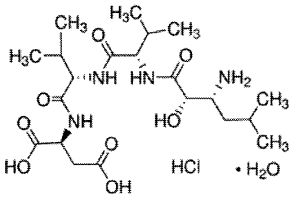
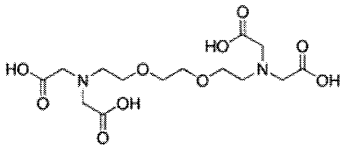
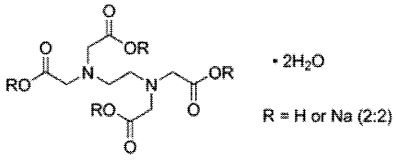
[0122] [表55]

ロイシンアミノペプチダーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Actinonin		385.5	
2	Bestatin hydrochloride		344.83	・アミノペプチダーゼB

[0123] [表56]

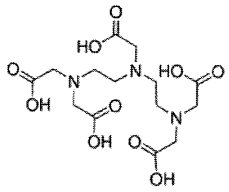
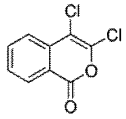
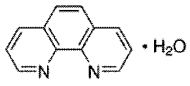
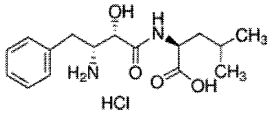
ロイシンアミノペプチダーゼ（細胞質ゾル）阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Actinonin		385.5	
2	Amastatin hydrochloride hydrate		511.01 (anhydrous basis)	
3	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid		380.35	
4	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate		372.24	

[0124]

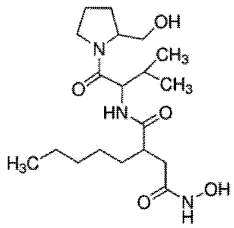
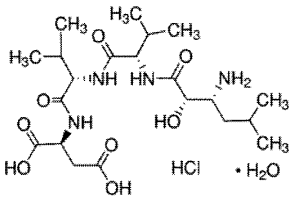
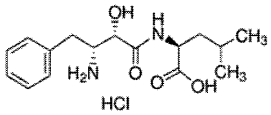
[表57]

ロイシンアミノペプチダーゼ(細胞質ゾル)阻害剤(続き)

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
5	Diethylenetriaminepentaacetic acid		393.35	
6	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
7	1,10-Phenanthroline monohydrate		198.22	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・ロイシンアミノペプチダーゼ ・サーモリシン
8	Bestatin hydrochloride		344.83	・アミノペプチダーゼB

[0125] [表58]

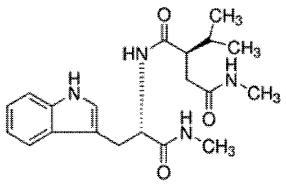
ロイシンアミノペプチダーゼ(ミクロソーム)阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Actinonin		385.5	
2	Amastatin hydrochloride hydrate		511.01 (anhydrous basis)	
3	Bestatin hydrochloride		344.83	・アミノペプチダーゼB

[0126]

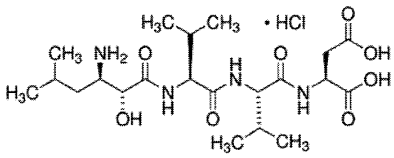
[表59]

マトリックスアミノペプチダーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	GM6001		388.46	

[0127] [表60]

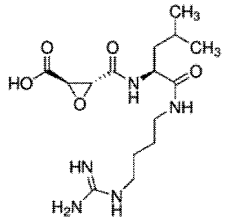
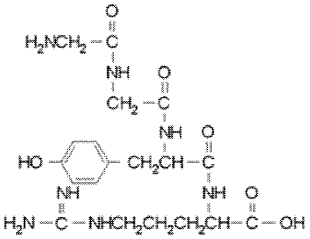
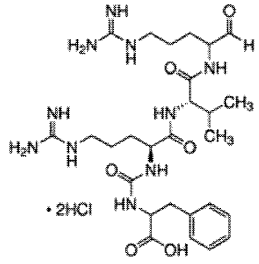
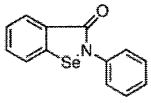
メタロプロテアーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Epiamastatin hydrochloride		474.55	

[0128]

[表61]

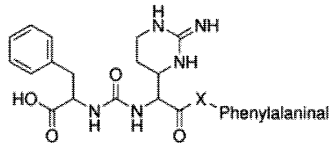
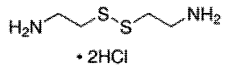
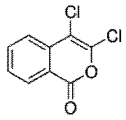
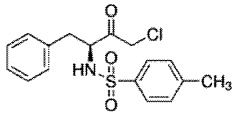
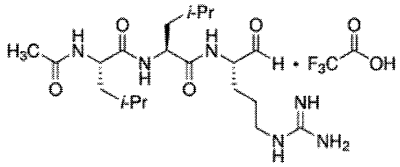
パパイン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	E-64		357.41	
2	Gly-Gly-Tyr-Arg		451.48	
3	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン
4	Ebselen		274.18	

[0129]

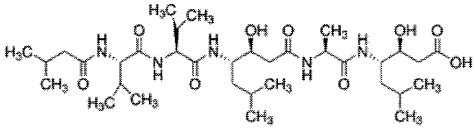
[表62]

パパイン阻害剤（続き）

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
5	Chymostatin	 Chymostatin A X = Leu Chymostatin B X = Val Chymostatin C X = Ile	A: MW = 607.7 B: MW = 593.7 C: MW = 607.7	・キモトリプシン ・パパイン ・キモトリプシン様セリンプロテイナーゼ ・カテプシンA、B、C、B、H、L ・プロテアソーム（β5）
6	Cystamine dihydrochloride	 • 2HCl	225.2	
7	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
8	N-p-Tosyl-L-phenilalanine chloromethyl ketone		351.85	・パパイン ・キモトリプシン ・フィシン ・ブロメライン
9	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0130] [表63]

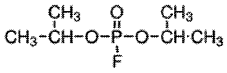
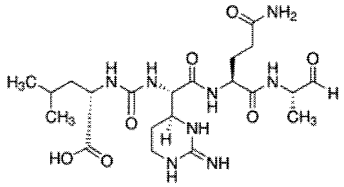
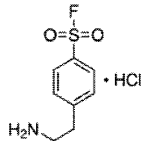
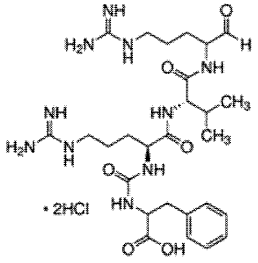
ペプシン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Pepstatin A		685.89	・カテプシンD

[0131]

[表64]

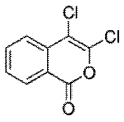
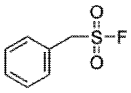
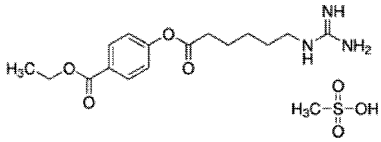
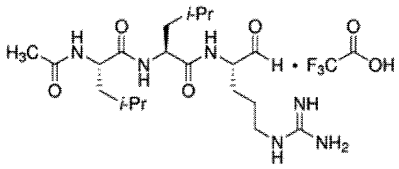
プラスミン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	Elastatinal		512.56	
3	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)		239.69	・プラスミン ・トリプシン ・キモトリプシン
4	6-Aminocaproic acid		131.17	
5	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン

[0132]

[表65]

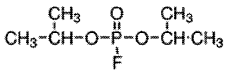
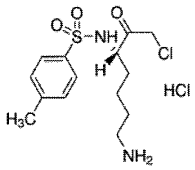
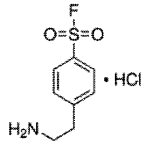
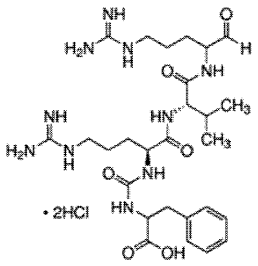
プラスミン阻害剤（続き）

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
6	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
7	Phenylmethanesulfonyl fluoride		174.19	・トロンビン ・エラスターゼ ・プラスミン ・プロテイナーゼ
8	Gabexate mesylate		417.48	
9	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0133]

[表66]

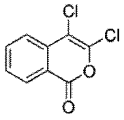
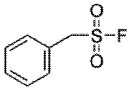
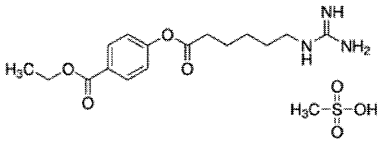
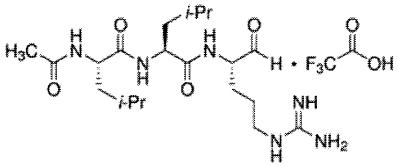
トロンビン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ
2	Nα-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride		369.31	
3	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)		239.69	
4	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン

[0134]

[表67]

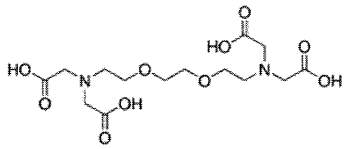
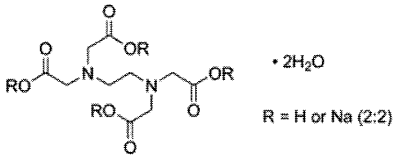
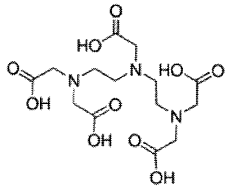
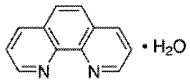
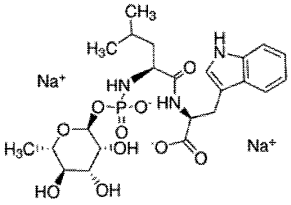
トロンビン阻害剤（続き）

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
5	3,4-Dichloroisocoumarin		215.03	・トロンビン ・パパイン ・プラスミン
6	Phenylmethanesulfonyl fluoride		174.19	・トロンビン ・エラスターゼ ・プラスミン ・プロテイナーゼ
7	Gabexate mesylate		417.48	
8	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム（β2）

[0135]

[表68]

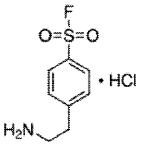
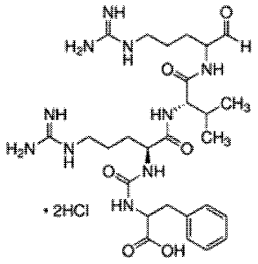
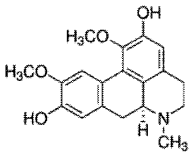
サーモリシン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid		380.35	
2	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate		372.24	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・コラゲナーゼ
3	Diethylenetriaminepentaacetic acid		393.35	
4	1,10-Phenanthroline monohydrate		198.22	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・ロイシンアミノペプチダーゼ ・サーモリシン
5	Phosphoramidon disodium salt		587.47	

[0136]

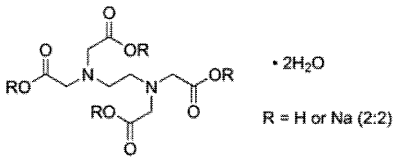
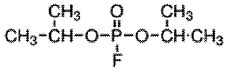
[表69]

トリプシン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride		239.69	・プラスミン ・トリプシン ・キモトリプシン
2	Antipain dihydrochloride from microbial source		677.62	・カルパイン ・パパイン ・トリプシン ・カテプシンA ・カテプシンB ・カテプシンD ・プラスミン ・キモトリプシン ・ペプシン ・グランザイムB ・トロンビン
3	Boldine		327.37	

[0137] [表70]

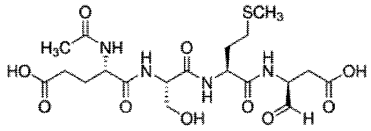
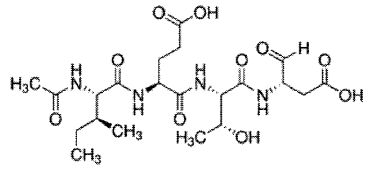
プロナーゼE阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	EDTAニナトリウム塩		372.24	・カルボキシペプチダーゼA ・カルボキシペプチダーゼB ・ディスパーゼ ・コラゲナーゼ
2	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ

[0138]

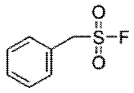
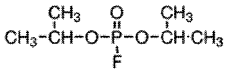
[表71]

プロカスパーゼ3阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-Acetyl-Glu-Ser-Met-Asp-al (Ac-ESMD-CHO)		506.53	
2	N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-al (Ac-IETD-CHO)		502.52	

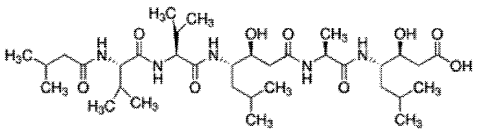
[0139] [表72]

プロテイナーゼK阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Phenylmethanesulfonyl fluoride		174.19	・トロンビン ・エラスターゼ ・プラスミン ・プロテイナーゼ
2	Diisopropylfluorophosphate		184.15	・カルボキシペプチダーゼ ・キモトリプシン ・補体 ・エラスターゼ ・エンドプロテイナーゼ ・カリクレイン ・プラスミン ・トロンビン ・プロナーゼ ・プロテイナーゼ

[0140] [表73]

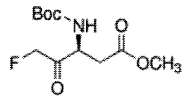
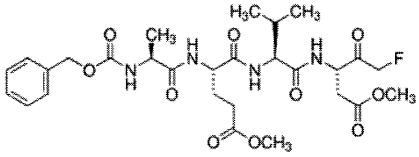
レニン阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Pepstatin A		685.89	・カテプシンD

[0141]

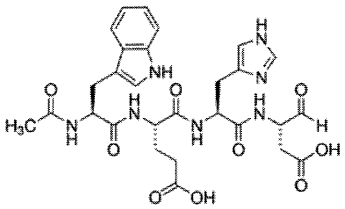
[表74]

カスパーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Boc-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Boc-D-FMK)		263.26	
2	Z-Ala-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Z-AEVD-FMK)		610.63	

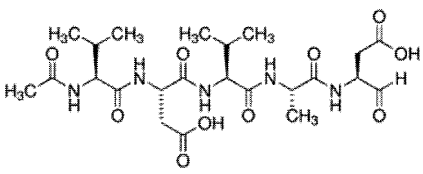
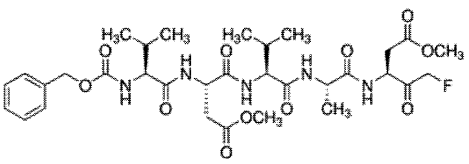
[0142] [表75]

カスパーゼ1阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-Acetyl-Trp-Glu-His-Asp-al (Ac-WEHD-CHO)		611.6	

[0143] [表76]

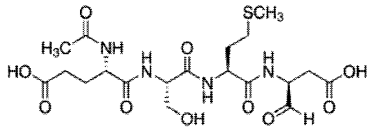
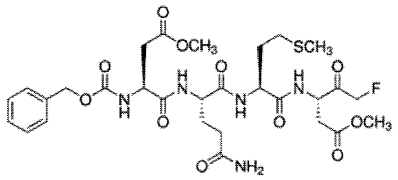
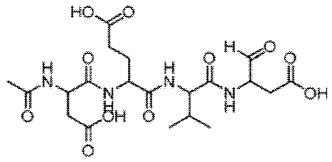
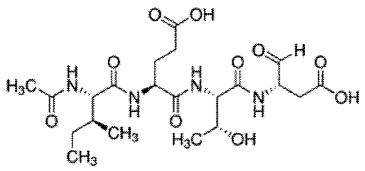
カスパーゼ2阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-Acetyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-CHO (Ac-VDVAD-CHO)		543.52	
2	Z-Val-Asp(O-Me)-Val-Ala-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone (Z-VDVAD-FMK)		695.73	

[0144]

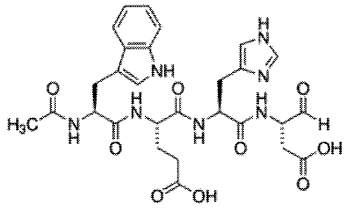
[表77]

カスパーゼ3阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-Acetyl-Glu-Ser-Met-Asp-al (Ac-ESMD-CHO)		506.53	
2	Z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)fluoromethyl ketone		685.72	
3	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al (Ac-DEVD-CHO)		502.47	
4	N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-al (Ac-IETD-CHO)		502.52	

[0145] [表78]

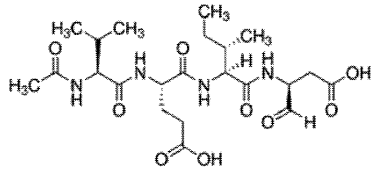
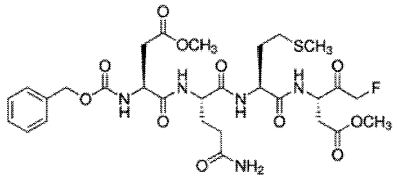
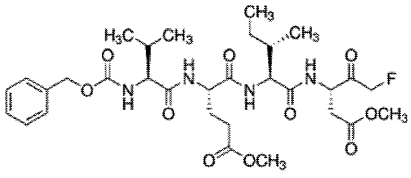
カスパーゼ5阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-Acetyl-Trp-Glu-His-Asp-al (Ac-WEHD-CHO)		611.6	

[0146]

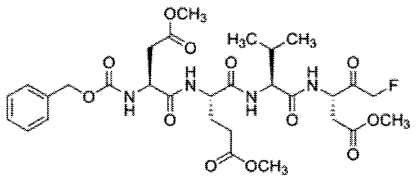
[表79]

カスパーゼ6阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	N-Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-al		500.54	
2	Z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)fluoromethyl ketone		685.72	
3	Z-Val-Glu(O-Me)-Ile-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone		652.71	

[0147] [表80]

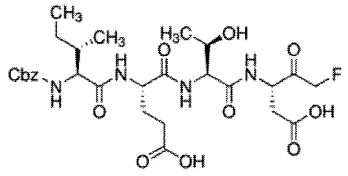
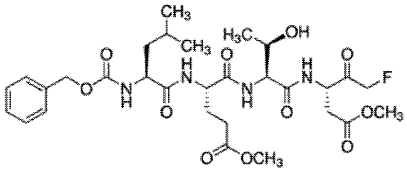
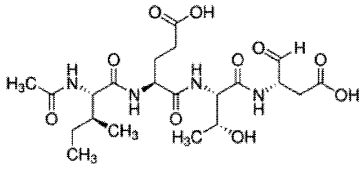
カスパーゼ7阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluoeomethyl ketone (Z-DEVD-FMK)		668.66	

[0148]

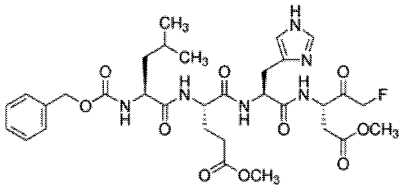
[表81]

カスパーゼ8阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Z-Ile-Glu(O-Me)-Thr-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone (Z-IETD-FMK)		654.68	
2	Z-Leu-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Z-LETD-FMK)		655.69	
3	N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-al (Ac-IETD-CHO)		502.52	

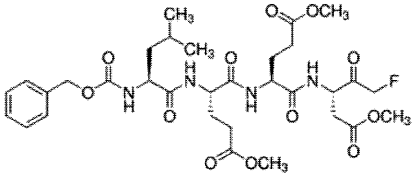
[0149] [表82]

カスパーゼ9阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Z-Leu-Glu(O-Me)-His-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone (Z-LE(OMe)HD(OMe)-FMK, Z-LEHD-FMK)		690.72	

[0150] [表83]

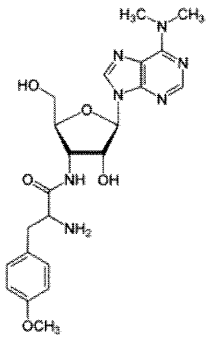
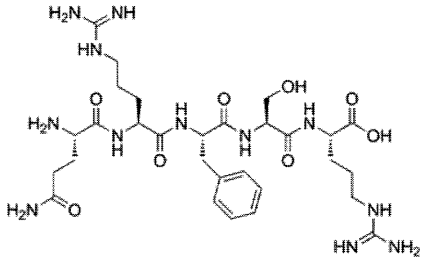
カスパーゼ13阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Z-Leu-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Z-LEED-FMK)		696.72	

[0151]

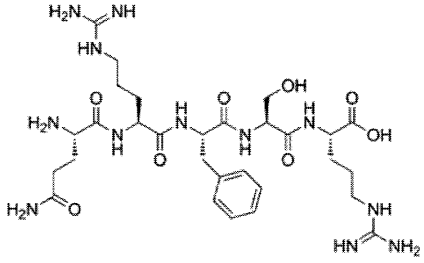
[表84]

細胞質アラニルアミノペプチダーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Puromycin		471.51	・ジペプチジルペプチダーゼII ・細胞質アラニルアミノペプチダーゼ
2	Opiorphin		692.77	・エンケファリナーゼ ・ネプリライシン ・ジペプチジルペプチダーゼIII ・細胞質アラニルアミノペプチダーゼ

[0152] [表85]

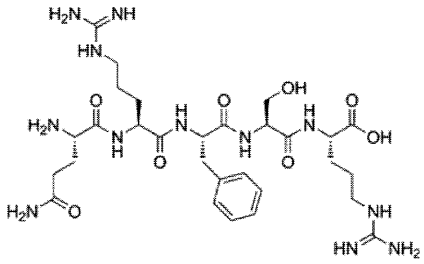
エンケファリナーゼ阻害剤

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Opiorphin		692.77	・エンケファリナーゼ ・ネプリライシン ・ジペプチジルペプチダーゼIII ・細胞質アラニルアミノペプチダーゼ

[0153]

[表86]

ネプリライシン阻害剤

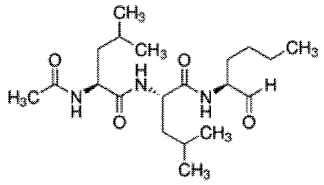
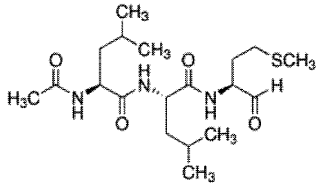
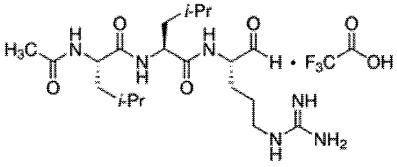
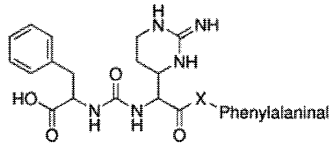
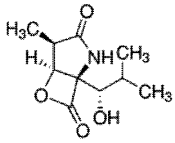
No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Opiorphin		692.77	・エンケファリナーゼ ・ネプリライシン ・ジペプチジルペプチダーゼIII ・細胞質アラニルアミノペプチダーゼ

[0154] なお、以上の説明では、便宜上、プロテアソーム阻害剤とプロテアソーム阻害剤以外のプロテアーゼ阻害剤とを区別したが、プロテアソームとプロテアソーム以外のプロテアーゼとの両者の活性を阻害可能な化合物も知られている。したがって、このような化合物を用いることで、プロテアソームとプロテアソーム以外のプロテアーゼとの両者に対して親和性を有するタンパク質分解誘導タグを得ることができる。

[0155] プロテアソームとプロテアソーム以外のプロテアーゼとの両者の活性を阻害可能な化合物の一例を以下の表８７に示す。ただし、プロテアソームとプロテアソーム以外のプロテアーゼとの両者の活性を阻害可能な化合物がこれらの例に限定されるものではない。

[0156]

[表87]

No.	名称	構造式	分子量	阻害するプロテアーゼ
1	Calpain Inhibitor I (ALLN, Ac-LLnL-CHO, MG-101)		383.53	・プロテアソーム ・カテプシンB ・カテプシンL ・カルパイン
2	Calpain Inhibitor II		401.56	・プロテアソーム ・カテプシンB ・カルパイン
3	Leupeptin		426.55	・プラスミン ・トリプシン ・パパイン ・カルパイン ・カテプシンB ・トロンビン ・カリクレイン ・エンドプロテイナーゼ ・キモトリプシン ・プロテアソーム(β2)
4	Chymostatin	 Chymostatin A X = Leu Chymostatin B X = Val Chymostatin C X = Ile	A: MW = 607.7 B: MW = 593.7 C: MW = 607.7	・プロテアソーム(β5) ・キモトリプシン ・パパイン ・キモトリプシン様セリンプロテイナーゼ ・カテプシンA、B、C、B、H、L
5	clasto-Lactacystin β-lactone		213.23	・tripeptidyl peptidase II ・chlamydial protease-like activity factor

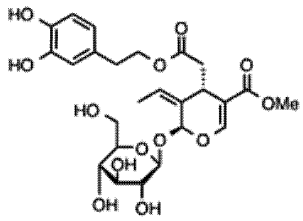
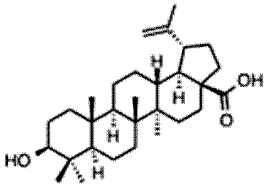
[0157] 別の態様では、タンパク質分解誘導タグとして、プロテアソーム活性化剤を使用することができる。プロテアソーム活性化剤は、プロテアソーム（複合体型プロテアーゼ）に対して親和性を有し、且つ、プロテアソームによるタンパク質の分解を阻害しない化合物であり、タンパク質分解誘導タグとして使用することができる。

[0158] プロテアソーム活性化剤の一例を以下の表８８～表９０に示す。ただし、タンパク質分解誘導タグの製造に使用可能なプロテアソーム活性化剤がこれ

らの例に限定されるものではない。

[0159] [表88]

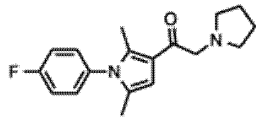
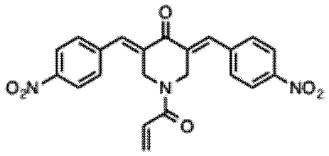
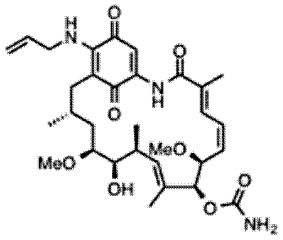
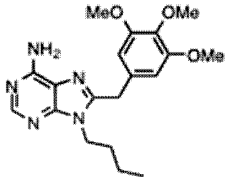
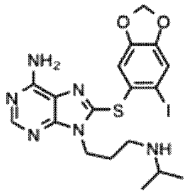
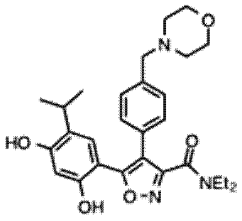
20Sプロテアソーム活性化剤

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
1	Oleuropein		540.51
2	Betulinic acid		456.70

[0160]

[表89]

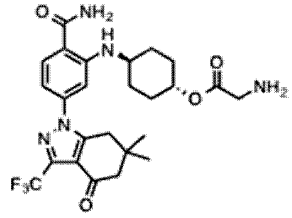
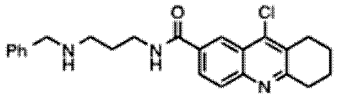
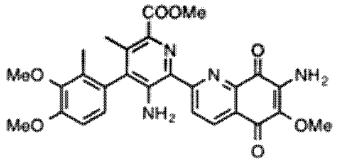
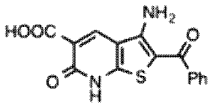
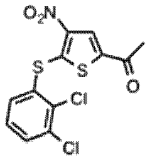
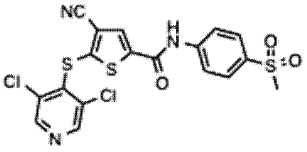
19S/11S(PA28)プロテアソーム活性化剤

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
1	IU1 (Usp 14 inhibitor)		300.38
2	b-AP-15 (Usp 14 and Uch-L5 inhibitor)		419.39
3	17-AAG		585.7
4	PU3		371.44
5	PU-H71		512.37
6	NVP-AUY922		493.60

[0161]

[表90]

19S/11S(PA28)プロテアソーム活性化剤（続き）

No.	一般名／商品名	構造式	分子量
7	SNX-5422		521.54
8	HBX 19,818		407.94
9	LS1		518.53
10	LDN91946		314.32
11	P005091		348.21
12	P0040429		484.38

[0162] 以上のとおり例示したタンパク質分解誘導タグの中でも、特に、２６Ｓプロテアソームに親和性を有するものが好ましい。細胞内のプロテアソームは、通常、２０Ｓプロテアソームに１９Ｓプロテアソームが２つ結合した２６Ｓプロテアソームの状態で存在する。このため、２６Ｓプロテアソームに親和性を有するタンパク質分解誘導タグを用いることで、細胞内のＲａｓタンパク質をより効率的に分解へと導くことが可能となる。

[0163] （Ｒａｓタンパク質親和性分子とタンパク質分解誘導タグとのコンジュゲー

トの様式）

Ｒａｓタンパク質親和性分子とタンパク質分解誘導タグとのコンジュゲートの様式は、Ｒａｓタンパク質親和性分子のＲａｓタンパク質との親和性、及びタンパク質分解誘導タグのプロテアーゼとの親和性が維持される限り、特に制限されない。なお、Ｒａｓタンパク質親和性分子及びタンパク質分解誘導タグがいずれもタンパク質である場合、両者を融合した融合タンパク質を合成することが可能であるが、このような融合タンパク質は「コンジュゲート」には含まれない。

[0164] Ｒａｓタンパク質分解誘導分子は、例えば、少なくとも１つのＲａｓタンパク質親和性分子と少なくとも１つのタンパク質分解誘導タグとが連結された構造とすることができる。Ｒａｓタンパク質分解誘導分子は、１つのＲａｓタンパク質親和性分子と１つのタンパク質分解誘導タグとが連結された構造であってもよく、１つのＲａｓタンパク質親和性分子と複数のタンパク質分解誘導タグとが連結された構造であってもよく、複数のＲａｓタンパク質親和性分子と１つのタンパク質分解誘導タグとが連結された構造であってもよく、複数のＲａｓタンパク質親和性分子と複数のタンパク質分解誘導タグとが連結された構造であってもよい。ある態様では、Ｒａｓタンパク質分解誘導分子は、１つのＲａｓタンパク質親和性分子と１つのタンパク質分解誘導タグとが連結された構造である。

[0165] Ｒａｓタンパク質親和性分子におけるタンパク質分解誘導タグとの連結位置は、Ｒａｓタンパク質との親和性が維持される限り、特に制限されない。

一方、タンパク質分解誘導タグにおけるＲａｓタンパク質親和性分子との連結位置は、プロテアーゼとの親和性が維持される限り、特に制限されない。例えば、タンパク質分解誘導タグが、前述のように、プロテアーゼ阻害剤（例えば、プロテアソーム阻害剤）の活性部位を他の構造部分に置き換えた構造である場合、この置き換えた他の構造部分においてＲａｓタンパク質親和性分子と連結することができる。具体的に、プロテアーゼ阻害剤の活性部位をカルボキシ基に置き換えた場合、カルボキシ基を介してＲａｓタンパク

質親和性分子と連結することができる。

[0166] なお、Ｒａｓタンパク質親和性分子及びタンパク質分解誘導タグは、相互に連結可能な構造であってもよい。Ｒａｓタンパク質親和性分子とタンパク質分解誘導タグとを直接連結することが困難な場合には、相互に連結可能とする構造を、Ｒａｓタンパク質親和性分子及びタンパク質分解誘導タグの少なくとも一方に導入することも考えられる。

例えば、Ｒａｓタンパク質親和性分子としては、Ｒａｓタンパク質に親和性を有する既知の分子を使用することができるが、この既知の分子とタンパク質分解誘導タグとを直接連結することが困難な場合も想定される。このような場合には、タンパク質分解誘導タグと連結可能な構造を当該既知の分子に導入し、Ｒａｓタンパク質親和性分子として使用してもよい。

[0167] ＜医薬組成物＞

本開示の医薬組成物は、本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子を含むものである。前述したとおり、本開示のＲａｓタンパク質分解誘導分子によれば、Ｒａｓタンパク質のユビキチン化を介することなく（すなわち、ユビキチン非依存的に）、Ｒａｓタンパク質をプロテアーゼ（例えば、プロテアソーム）による分解（ノックダウン）へと導くことが可能となる。したがって、Ｒａｓタンパク質分解誘導分子を含む本開示の医薬組成物は、Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状の予防又は治療に用いることができる。本開示によれば、Ｒａｓタンパク質分解誘導分子を含む医薬組成物を投与することを含む、Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状の予防又は治療方法もまた提供される。

[0168] Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状としては、Ｒａｓタンパク質の分解により予防効果又は治療効果を期待し得るものであれば特に制限されない。Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状の一例を以下の表９１に示す。ただし、Ｒａｓタンパク質が仲介する疾患又は症状がこれらの例に限定されるものではない。

[0169]

[表91]

疾患又は症状		参考文献
癌	膵臓癌	*British Jounal of Cancer* vol. 111, pp. 817-822 (**2014**).
	大腸癌	*The New England Journal of Medicine* vol. 359, pp. 1757-1765 (**2008**).
	肺癌	*Annals of the American Thoracic Society* vol. 6, pp. 201-205 (**2009**).
	胃癌	*Oncogene* vol. 22, pp. 6942-6945 (**2003**).
	乳癌	*Breast Cancer Reseach and Treatment* vol. 62, pp. 51-62 (**2000**).
	腎臓癌	*Cancer Research* vol. 48, pp. 5251-5255 (**1988**).
	若年性骨髄単球性白血病(JMML)	*Blood* vol. 125, pp. 2753-2758 (**2015**).
	甲状腺腫瘍	内分泌甲状腺学会誌 vol. 31, pp. 125-129 (**2014**).
	メラノーマ	*Cancer Research* vol. 66, pp. 9483-9491 (**2006**).
		Trends in Molecular Medicine vol. 43, pp. 38-45 (**2011**).
	胆道癌	*Journal of Clinical Oncology* vol. 28, pp. 3531-3540 (**2010**).
	頭頸部癌	*Journal of the National Cancer Institute* vol. 106, dju215 (**2014**).
	食道癌	*Annals of Surgical Oncology* vol. 20, pp. S485-S491 (**2013**).
	肝癌	*Journal of Hepatology* vol. 51, pp. 725-733 (**2010**).
	卵巣癌	*BMC Cancer* vol. 9 (111) (**2009**).
	子宮癌	*Gynecologic Oncology* vol. 63, pp. 238-246 (**1996**).
	前立腺癌	*Journal of Cellular Biochemistry* vol. 91, pp. 13-25 (**2004**).
	膀胱癌	*PloS ONE* vol. 5, e13821 (**2010**).
免疫疾患	自己免疫疾患	*Journal of Clinical Immunology* vol. 35, pp. 454-458 (**2015**).
	関節リウマチ	*The Open Rheumatology Journal* vol. 6, pp. 259-272 (**2012**).
	RAS関連自己免疫性リンパ増殖症	*PNAS* vol. 104, pp. 8953-8958 (**2007**).
		Blood vol. 117, pp. 2887-2890 (**2011**).
感染症	インフルエンザ	*Cancer Research* vol. 61, pp. 8188-8193 (**2001**).
		PLoS ONE vol. 6, e16324 (**2011**).
		生化学 第 87 巻第 1 号, pp. 91-100 (**2015**).
	EBV感染症	*Oncogene* vol. 23, pp. 8619-8628 (**2004**).
	HIV感染症	*Journal of Biological Chemistry* vol. 275, pp. 16513-16517 (**2000**).
神経疾患	アルツハイマー病	*Biochimica et Biophysica Acta* vol. 1802, pp. 396-405 (**2010**).
		Neurobiology of Disease vol. 43, pp. 38-45 (**2011**).
	パーキンソン病	*Biochimica et Biophysica Acta* vol. 1802, pp. 396-405 (**2010**).
	ALS	*Biochimica et Biophysica Acta* vol. 1802, pp. 396-405 (**2010**).
RAS/MAPK症候群	ヌーナン症候群	*Human Molecular Genetics* vol. 15, pp. R220-R226 (**2006**)..
	コステロ症候群	*Genetics in Medicine* vol. 14, pp. 285-292 (**2012**).
	CFC症候群	*Human Mutation* vol. 29, pp. 992-1006 (**2008**).
その他	肝硬変／慢性肝炎	Gastroenterologia Japonica vol. 24, pp. 270-276 (**1989**).
	記憶障害	*Nature Communications* vol. 7, 12926 (**2016**).

[0170] ある態様では、本開示の医薬組成物は、癌の予防又は治療に用いられる。従来、エルロチニブ（Erlotinib）、セツキシマブ（Cetuximab）等のＥＧＦＲ（Epidermal growth factor receptor）阻害剤が抗癌剤として用いられているが、Ｒａｓタンパク質が変異型の場合には奏効率が低いことが知られている。本開示の医薬組成物は、Ｒａｓタンパク質が変異型の場合であっても分解へと導くことが可能であるため、ＥＧＦＲ阻害剤に対して抵抗性を示す癌の治療に用いることもできる。

[0171] 医薬組成物は、Ｒａｓタンパク質分解誘導分子以外の成分を含んでいてもよい。例えば、医薬組成物は、製剤素材として慣用の有機又は無機の担体を

含んでいてもよい。この担体は、固形製剤においては、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等として、液状製剤においては、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤等として配合される。また、医薬組成物は、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を含んでいてもよい。

[0172] 医薬組成物の剤形は特に制限されない。医薬組成物の剤形としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、フィルム剤等の経口剤；注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤、ペレット、経鼻剤、経肺剤（吸入剤）、点眼剤等の非経口剤；などが挙げられる。

[0173] 医薬組成物の投与量は、投与対象、投与経路、対象疾患、症状等に応じて適宜決定される。

実施例

[0174] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。以下の実施例及び参考例において、室温とは２０℃～３０℃の範囲を示す。

[0175] 以下の実施例及び参考例で使用される化合物等の略称は以下のとおりである。

H-Gly-OtBu・HCl：L-Glycine t-butyl ester hydrochloride

ＤＭＦ：N,N-Dimethylformamide

ＤＩＰＥＡ：N,N-Diisopropylethylamine

ＰｙＢＯＰ：1H-Benzotriazol-1-yloxy-tri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate

ＴＦＡ：Trifluoroacetic acid

H-Leu-OtBu・HCl：L-Leucine t-butyl ester hydrochloride

ＨＡＴＵ：O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate

ｅｃ：Escherichia coli

ＤＨＦＲ：Dihydrofolate reductase

ＲＦ：Restriction-free

ＨＡ：Hemagglutinin

ＧＦＰ：Green fluorescent protein

ＤｓＲｅｄ：Discosoma sp. red fluorescent protein

Ｄ－ＭＥＭ：Dulbecco's modified eagle's medium

ＤＭＳＯ：Dimethyl sulfoxide

ＰＢＳ：Phosphate buffered saline

ＥＤＴＡ：Ethylenediamine tetraacetic acid

ＦＢＳ：Fetal bovine serum

ＳＤＳ：Sodium dodecyl sulfate

ＰＡＧＥ：Polyacrylamide gel ectrophoresis

ＢＰＢ：Bromophenol blue

ＰＶＤＦ：Polyvinylidene difluoride

ＴＢＳ：Tris buffered saline

ＧＡＰＤＨ：Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ＦＩＴＣ：Fluorescein isothiocyanate

ＰＭＳＦ：Phenylmethylsulfonyl fluoride

ＤＴＴ：Dithiothreitol

ＴＭＰ：Trimethoprim

ＤＭＴ－ＭＭ：4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride n-hydrate

ＡＭＣ：7-Amino-4-methylcoumarin

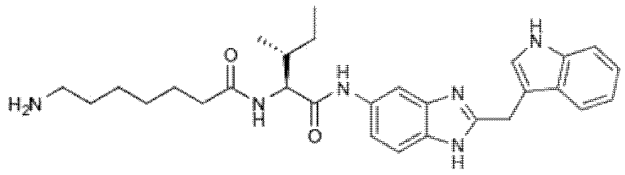
[0176] ＜実施例１＞

実施例１では、Ｒａｓタンパク質親和性分子とタンパク質分解誘導タグとを連結することにより、Ｒａｓタンパク質分解誘導分子であるＴＵＳ－００７を合成した。

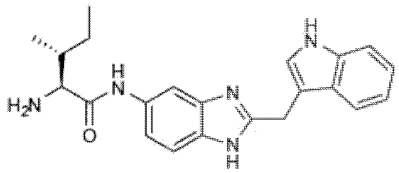
[0177] Ｒａｓタンパク質親和性分子としては、下式で表されるＲａｓ－ＳＯＳ－$ＮＨ_2$を用いた。Ｒａｓ－ＳＯＳ－$ＮＨ_2$は、下式で表されるＲａｓ－ＳＯＳのアミノ基に、$Ｈ_2Ｎ－(ＣＨ_2)_6－ＣＯＯＨ$を反応させて得られた化合物であ

る。

[0178] [化5]



Ras-SOS-NH_2



Ras-SOS

[0179] Ｒａｓ－ＳＯＳは、Sun, Q.らの文献（Sun, Q. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 6140-6143）に記載されたCompound 12である（表４のＮｏ．２２を参照）。ＳＯＳタンパク質がＲａｓタンパク質に結合すると、Ｒａｓタンパク質に結合するＧＤＰがＧＴＰに置き換わり、Ｒａｓタンパク質が活性化される。Ｒａｓ－ＳＯＳは、Ｒａｓタンパク質に結合してＲａｓタンパク質とＳＯＳタンパク質との相互作用を阻害することにより、Ｒａｓタンパク質の活性化を阻害することが知られている。また、Ｒａｓ－ＳＯＳは、野生型のＫ－Ｒａｓタンパク質のみならず、Ｇ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型のＫ－Ｒａｓタンパク質にも結合することが知られている。

[0180] なお、Ｒａｓ－ＳＯＳ及びＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2は、Sun, Q.らの文献に記載された方法に従って合成した。

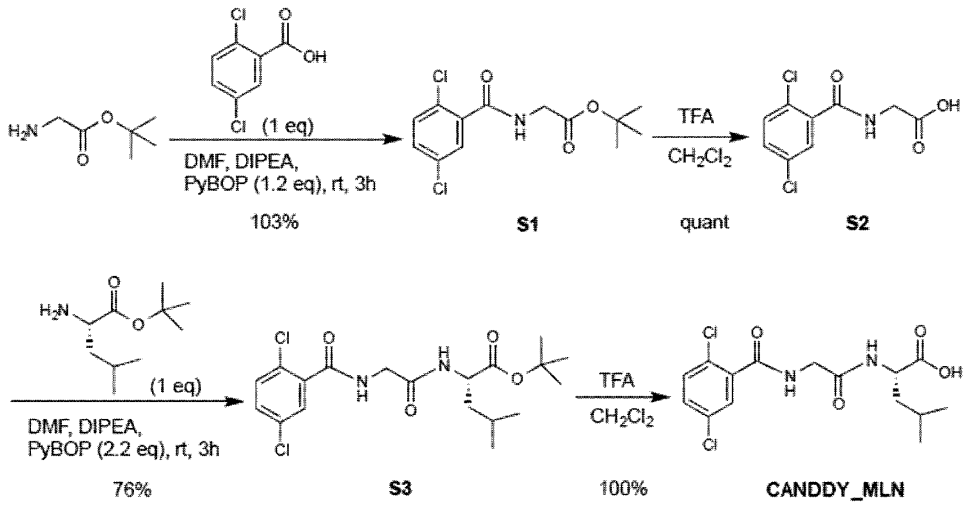
[0181] また、タンパク質分解誘導タグとしては、プロテアソーム阻害剤であるＭＬＮ９７０８及びＭＬＮ２２３８の活性部位（ボロン酸エステル部位又はボロニル基）をカルボキシ基に置き換えた化合物（ＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮ）を用いた。

[0182] ＴＵＳ－００７の合成方法の詳細は以下のとおりである。

[0183] （ＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮの合成）

下記合成スキームに従ってＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮを合成した。

[0184] [化6]



[0185] まず、枝付きナスフラスコにH-Gly-OtBu・HCl（286.8 mg, 1.69 mmol, 1 eq）を仕込み、窒素置換した。窒素気流下で脱水ＤＭＦ１０ｍＬとＤＩＰＥＡ５ｍＬとを加え、室温にて撹拌した。２，５－ジクロロ安息香酸（309.3 mg, 1.62 mmol, 1 eq）を１ｍＬの脱水ＤＭＦ及び１ｍＬのＤＩＰＥＡに溶解した後、反応溶液に加え、室温にて２０分間撹拌した。ＰｙＢＯＰ（1.02 g, 1.96 mmol, 1.2 eq）を１ｍＬの脱水ＤＭＦに溶解した後、反応溶液に加え、室温にて３時間撹拌した。反応溶液を水及び炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチル／ヘキサン（＝４／１）で２回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／クロロホルム＝１／１～０／１，gradient）を用いた分離精製処理により、化合物Ｓ１（531.0 mg, 1.75 mmol, 103%）を得た。

[0186] 次いで、ナスフラスコに化合物Ｓ１（212.4 mg, 0.70 mmol）を仕込み、ジクロロメタンを５ｍＬ加えた。室温にて５分間撹拌した後、ＴＦＡを５ｍＬ加え、室温にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去した後、真空乾燥し、化合物Ｓ２（190.7 mg, quant.）を得た。

[0187] 次いで、枝付きナスフラスコに化合物Ｓ２（190.7 mg, 0.77 mmol, 1 eq）及びH-Leu-OtBu・HCl（175.8 mg, 0.79 mmol, 1 eq）を仕込み、窒素置換し

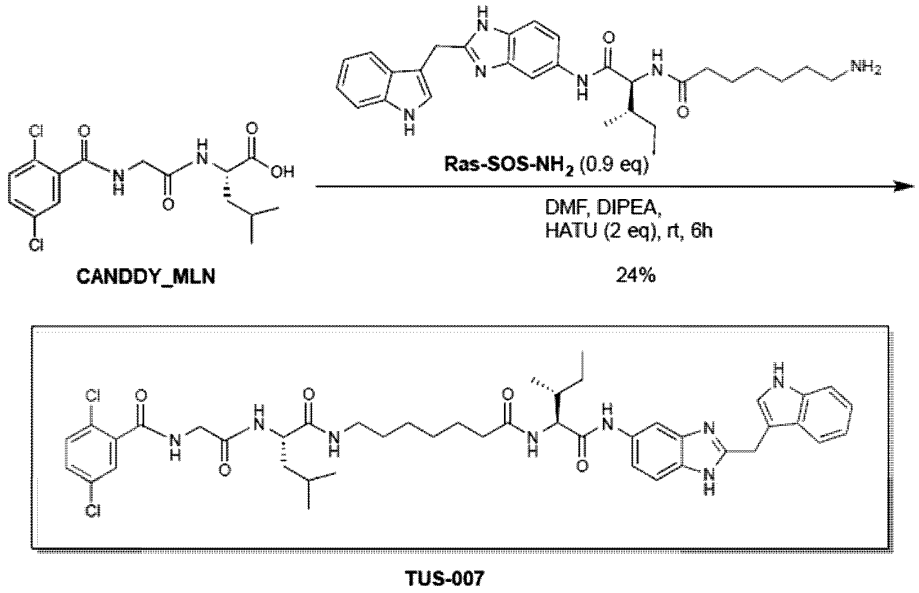
た。窒素気流下で脱水ＤＭＦ５ｍＬとＤＩＰＥＡ５ｍＬとを加え、室温にて２０分間撹拌した。ＰｙＢＯＰ（886.7 mg, 1.70 mmol, 2.2 eq）を１．５ｍＬの脱水ＤＭＦに溶解した後、反応溶液に加え、室温にて３時間撹拌した。反応溶液を水及び炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチル／ヘキサン（＝４／１）で２回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン／クロロホルム＝１／１～０／１, gradient）を用いた分離精製処理により、化合物Ｓ３（244.2 mg, 0.58 mmol, 76%）を得た。

[0188] 次いで、ナスフラスコに化合物Ｓ３（240.8 mg, 0.58 mmol）を仕込み、ジクロロメタンを５ｍＬ加えた。室温にて５分間撹拌した後、ＴＦＡを５ｍＬ加え、室温にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去した後、真空乾燥し、ＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮ（214.7 mg, 0.59 mmol, 100%）を得た。

[0189] （ＴＵＳ－００７の合成）

下記合成スキームに従ってＴＵＳ－００７を合成した。

[0190] [化7]



[0191] ナスフラスコにＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮ（52.4 mg, 0.15 mmol, 1 eq）及び

別途合成したＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2（62.4 mg, 0.12 mmol, 0.9 eq）を仕込み、脱水ＤＭＦを４ｍＬ加えた。室温にて５分間撹拌した後、ＤＩＰＥＡを４ｍＬ加え、溶液を中性にした。室温にて５分間撹拌した後、ＨＡＴＵ（114.1 mg, 0.30 mmol, 2 eq）を反応溶液に直接加え、室温にて６時間撹拌した。冷却下で飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層を分離した後、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を集め、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去した後、シリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール＝２０／１～４／１, gradient）を用いた分離精製処理により、ＴＵＳ－００７（25.2 mg, 0.03 mmol, 24%, isolated yield）を得た。得られたＴＵＳ－００７は、分取用薄層クロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール＝１０／１）を用いて、更に精製処理を行った。

ＴＵＳ－００７の物性データを以下に示す。

HRMS-FAB (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{44}H_{55}Cl_2N_8O_5$, 845.3672; found, 845.3674.

[0192] ＜実施例２＞

実施例２では、ＨｅＬａ細胞（ヒト子宮頸癌細胞）において強制発現させた野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0193] （プラスミドの準備）

野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-WT）を発現するプラスミドは、ｅｃＤＨＦＲタンパク質を発現するプラスミド（pMIR-DsRed-IRES-ecDHFR-HA-GFP）を用いて、ＲＦクローニングにより作製した。ヒトＫ－ｒａｓ遺伝子の全長ｃＤＮＡクローン（Accession No. AK292510）は、独立行政法人製品評価技術基盤機構から購入した。ＰＣＲ増幅は、ＰＣＲ酵素としてKOD-Plus-Neo（東洋紡(株)）を用いて行った。ＲＦクローニングに用いたフォワードプライマー及びリバースプライマーを以下の表９２に示す。

[0194]

[表92]

プライマー名	配列（5'→3'）	配列番号
RFC_IRES-HsKras-HA_Fw	CACGATGATAATATGGCCACAACCATGACTGAATATAAACTTGTGGTAG	1
RFC_IRES-HsKras-HA_Rv	GAACGTCGTACGGGTAATCGATCATAATTACACACTTTGTCTTTGAC	2

[0195] （ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

ＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内に野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（詳細には、ＨＡタグを介した野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質とＧＦＰとの融合タンパク質）又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。

[0196] ＨｅＬａ細胞へのプラスミド導入は、トランスフェクション試薬であるScreenFectA（和光純薬工業(株)）を用いて常法により行った。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞を４×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ ＣＯ$_2$の条件下で４０時間培養した。

[0197] （ＨｅＬａ細胞へのＴＵＳ－００７の添加）

プラスミドを導入してから４０時間培養した後、以下のようにして、ＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７を添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用いた。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液をＤＭＳＯ濃度が１体積％となるように培地と混合し、各ウェル当たり５００μＬ添加して、３７℃、５体積％ ＣＯ$_2$の条件下で培養した。また、ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群のほかに、ＴＵＳ－００７及びＭＬＮ２２３８の両方、又はＲａｓ－ＳＯＳ－ＮＨ$_2$を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群も準備した。なお、コントロールとしてはＤＭＳＯを用いた。

[0198] （ＴＵＳ－００７を介した野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ＦＡＣＳ解析））

ＴＵＳ－００７の添加２４時間後、培地を除去し、ＰＢＳを添加して細胞を洗浄した。ＰＢＳの除去後、３７℃のトリプシン（0.25 w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA・4Na Solution with Phenol Red）（和光純薬工業(株)）を各ウェル当たり２００μＬ添加し、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で１分間培養した。培養後、Ｄ－ＭＥＭ（Low D-Glucose, L-Glutamine, Phenol Red）（和光純薬工業(株)）に１０質量％ ＦＢＳ及び１質量％ PenStrep（100 U/mL Sodium Penicillin G and 100 μg/mL Streptomycin Sulfate）（和光純薬工業(株)）を添加した培地を各ウェル当たり３００μＬ添加して懸濁し、１５ｍＬチューブに細胞溶液を回収した。

[0199] 回収した細胞溶液を遠心分離（１０００ｒｐｍ×５分間、４℃）し、上清を除去した後、２ｍＬのＰＢＳ（３７℃）により懸濁した。懸濁後の細胞溶液を遠心分離（１０００ｒｐｍ×５分間、４℃）し、上清を除去した後、４℃のＦＡＣＳバッファー（１質量％ ＦＢＳ／ＰＢＳ）を５００μＬ添加し、氷上に静置した。

[0200] フローサイトメトリーにはBD FACSCanto II（BD Biosciences）を用い、細胞中におけるＧＦＰ及びＤｓＲｅｄタンパク質の発現を定量した。ＦＡＣＳ解析の直前に、細胞溶液を孔径３２μｍのメッシュに通し、ＦＡＣＳチューブへと移した。解析ソフトFlowJo（トミーデジタルバイオロジー(株)）により細胞１個当たりのＧＦＰ／ＤｓＲｅｄ比を算出し、グラフのシフトから、ＴＵＳ－００７による野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）を確認した。

[0201] ＦＡＣＳ解析結果を図１に示す。図１に示すとおり、ＴＵＳ－００７を添加した場合には、濃度依存的にグラフが左にシフトしており、ＴＵＳ－００７によって野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が誘導されていることが確認できた。一方、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した場合には、コントロール（ＤＭＳＯ）とグラフが重なっており、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質が分解されていないことが確認できた。この結果から、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2に対してタンパク質分解誘導タグであるＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮを連結することによ

り、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が誘導されることが分かる。

また、ＴＵＳ－００７及びＭＬＮ２２３８の両方を添加した場合には、ＴＵＳ－００７を添加した場合と比較して野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が阻害された。この結果は、ＴＵＳ－００７によって、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質がプロテアソームによる分解へと導かれていることを裏付けるものである。

[0202] ＜実施例３＞

実施例３では、ＨｅＬａ細胞において強制発現させた野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した。

[0203] （プラスミドの準備）

実施例２と同様にして、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-WT）を発現するプラスミドを作製した。

[0204] （ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

実施例２と同様にして、ＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内に野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（詳細には、ＨＡタグを介した野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質とＧＦＰとの融合タンパク質）又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞は、４×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で４０時間培養した。

[0205] （ＨｅＬａ細胞へのＴＵＳ－００７の添加）

プラスミドを導入してから４０時間培養した後、以下のようにして、ＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７を添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用いた。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液をＤＭＳＯ濃度が１体積％となるように培地と混合し、各ウェル当たり５００μＬ添加して、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で

培養した。また、ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群のほかに、ＴＵＳ－００７及びＭＬＮ２２３８の両方、ＭＬＮ２２３８、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群も準備した。なお、コントロールとしてはＤＭＳＯを用いた。

[0206] （ＴＵＳ－００７を介した野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ウェスタンブロット解析））

ＴＵＳ－００７の添加２４時間後、培地を除去し、ＰＢＳを添加して細胞を洗浄した。ＰＢＳの除去後、細胞溶解バッファー（CelLytic M, Sigma）とプロテアーゼ阻害剤（cOmplete Mini, EDTA-free, Roche）との混合溶液を各ウェル当たり２７μＬ添加した。４℃にて１５分間静置した後、ピペットチップを用いて氷上で細胞を剥がした。細胞溶液を１．５ｍＬチューブに回収し、液体窒素で瞬間凍結した後、氷上で融解させた。凍結融解を３回繰り返した後、遠心分離（１３８００ｒｐｍ×２０分間、４℃）し、上清（細胞抽出物）を回収した。

[0207] 回収した細胞抽出物について、ウェスタンブロット解析を行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、TGX FastCast Acrylamide Kit, 12% (Bio-Rad) を用いて作製した。泳動サンプルは、６×SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% ２－メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.25% BPB) により調製し、９５℃で４分間ヒートブロックした。電気泳動は１５０Ｖで５０分間行った（泳動バッファー；195 mM グリシン, 25 mM Tris）。

[0208] 電気泳動後、タンク式ブロット装置及び転写バッファー（25 mM Tris-HCl, 195 mM グリシン, 0.01% SDS, 15% メタノール）を用いて、１００Ｖ、１２０分間の条件でＰＶＤＦメンブレン（Immobion-P, Millipore）にタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、５％スキムミルク／High-salt TBS-T（100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 7.6）中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、メンブレンをHigh-salt TBS-Tでリンスし、１％スキムミルク／High-salt TBS-T中で抗体反応を行った。抗体としては、Anti-HA-Peroxidase, High-Affinity (3F10) Ra

t monoclonal antibody (25 U/mL) (Roche) を１０００倍希釈して用いた。室温にて１時間振盪させた後、メンブレンをHigh-salt TBS-Tで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをHigh-salt TBS (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.6) で５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western (Millipore) で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000 (富士フイルム(株)) を用いて検出した。

[0209] 次に、同一のメンブレンを用いて、コントロールであるＧＡＰＤＨの検出反応を行った。メンブレンをＴＢＳ－Ｔ (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6) で洗浄し、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で一次抗体反応を行った。一次抗体としては、抗ＧＡＰＤＨ抗体 (6C5, SantaCruz, ２００００倍希釈) を用いた。室温にて６０分間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。一次抗体反応後、２％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で二次抗体反応を行った。二次抗体としては、抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体 (A90-116P-33, Bethyl) を２００００倍希釈して用いた。室温にて３０分間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをＴＢＳ (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) で５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western (Millipore) で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000 (富士フイルム(株)) を用いて検出した。検出されたバンドの定量には、画像処理ソフトウェアImageJ (NIH) を用いた。

[0210] ウェスタンブロット解析結果を図２に示す。図２中のグラフは、ウェスタンブロット解析により検出された野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の定量結果を、コントロール（ＤＭＳＯ）を１とした相対値で示したものである。

図２に示すとおり、ＴＵＳ－００７を添加した場合には、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の量が減少したが、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した場合には、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の量が減少しなかった。この結果から、Ｒａ

ｓ－ＳＯＳ－NH_2に対してタンパク質分解誘導タグであるＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮを連結することにより、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が誘導されることが分かる。

また、ＴＵＳ－００７及びＭＬＮ２２３８の両方を添加した場合には、コントロール（ＤＭＳＯ）よりも野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の量が増加した。この結果は、ＴＵＳ－００７によって、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質がプロテアソームによる分解へと導かれていることを裏付けるものである。

[0211] ＜実施例４＞

実施例４では、ＨｅＬａ細胞において強制発現させたＧ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0212] （プラスミドの準備）

Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-G12D）又はＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-G12V）を発現するプラスミドは、プライマーを用いて変異を導入したこと以外は実施例２と同様にして作製した。変異導入に用いたフォワードプライマー及びリバースプライマーを以下の表９３に示す。

[0213] [表93]

ﾌﾟﾗｲﾏｰ名	配列（5'→3'）	配列番号
AK292510_G12D_Fw_2	GGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGTGC	3
AK292510_G12D_Rv_2	TACGCCATCAGCTCCAACTACCACAAG	4
AK292510_G12V_Fw_2	GGAGCTGTTGGCGTAGGCAAGAGTGC	5
AK292510_G12V_Rv_2	TACGCCAACAGCTCCAACTACCACAAG	6

[0214] （ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

実施例２と同様にして、ＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内にＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質若しくはＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質、又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞は、４×１０^4個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下

で４０時間培養した。

[0215] （ＨｅＬａ細胞へのＴＵＳ－００７の添加）

実施例２と同様にしてＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７を添加した。また、ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群のほかに、ＴＵＳ－００７及びＭＬＮ２２３８の両方、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群も準備した。コントロールとしてはＤＭＳＯを用いた。

[0216] （ＴＵＳ－００７を介したＧ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ＦＡＣＳ解析））

実施例２と同様にして、ＴＵＳ－００７を介したＧ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解について、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0217] ＦＡＣＳ解析結果を図３に示す。図３に示すとおり、ＴＵＳ－００７を添加した場合には、濃度依存的にグラフが左にシフトしており、ＴＵＳ－００７によってＧ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が誘導されていることが確認できた。一方、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した場合には、コントロール（ＤＭＳＯ）とグラフが重なっており、Ｇ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質が分解されていないことが確認できた。この結果から、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2に対してタンパク質分解誘導タグであるＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮを連結することにより、Ｇ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が誘導されることが分かる。

また、ＴＵＳ－００７及びＭＬＮ２２３８の両方を添加した場合には、ＴＵＳ－００７を添加した場合と比較してＧ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が阻害された。この結果は、ＴＵＳ－００７によって、Ｇ１２Ｄ変異型及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質がプロテアソームによる分解へと導かれていることを裏付けるものである。

[0218] なお、図１及び図３の結果から、ＴＵＳ－００７は、野生型Ｋ－Ｒａｓタ

ンパク質、Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質、及びＧ１２Ｖ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の中でも、Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解を誘導する効果に優れることが分かる。

[0219] ＜実施例５＞

実施例５では、ＨｅＬａ細胞において強制発現させたＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質のＴＵＳ－００７を介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した。

[0220] （プラスミドの準備）

実施例４と同様にして、Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-G12D）を発現するプラスミドを作製した。

[0221] （ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

実施例４と同様にしてＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内にＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞は、４×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で４０時間培養した。

[0222] （ＨｅＬａ細胞へのＴＵＳ－００７の添加）

実施例４と同様にしてＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７を添加した。また、ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群のほかに、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群も準備した。コントロールとしてはＤＭＳＯを用いた。

[0223] （ＴＵＳ－００７を介したＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ウェスタンブロット解析））

実施例３と同様にして、ＴＵＳ－００７を介したＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解について、ウェスタンブロット解析により評価した。

[0224] ウェスタンブロット解析結果を図４に示す。図４に示すとおり、ＴＵＳ－００７を添加した場合には、濃度依存的にＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の量が減少したが、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した場合には、Ｇ１２

Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の量が減少しなかった。この結果から、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2に対してタンパク質分解誘導タグであるＣＡＮＤＤＹ＿ＭＬＮを連結することにより、Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質の分解が誘導されることが分かる。

[0225] ＜実施例６＞

実施例６では、ＴＵＳ－００７を添加したＨｅＬａ細胞における内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した。

[0226] （細胞播種）

ＨｅＬａ細胞を８×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で１６時間培養した。

[0227] （ＨｅＬａ細胞へのＴＵＳ－００７の添加）

細胞播種から１６時間後に、以下のようにして、ＨｅＬａ細胞にＴＵＳ－００７を添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％ Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用いた。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。ＴＵＳ－００７を含有するＤＭＳＯ溶液をＤＭＳＯ濃度が１体積％となるように培地と混合し、各ウェル当たり５００μＬ添加して、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で培養した。コントロールとしてはＤＭＳＯを用いた。

[0228] （ＴＵＳ－００７を介した内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ウェスタンブロット解析））

ＴＵＳ－００７の添加４８時間後、培地を除去し、ＰＢＳを添加して細胞を洗浄した。ＰＢＳの除去後、細胞溶解バッファー（CelLytic M, Sigma）とプロテアーゼ阻害剤（cOmplete Mini, EDTA-free, Roche）との混合溶液を各ウェル当たり２７μＬ添加した。４℃にて１５分間静置した後、ピペットチップを用いて氷上で細胞を剥がした。細胞溶液を１．５ｍＬチューブに回収

し、液体窒素で瞬間凍結した後、氷上で融解させた。融解後、遠心分離（１３８００ｒｐｍ×２０分間、４℃）し、上清（細胞抽出物）を回収した。

[0229] 回収した細胞抽出物について、ウェスタンブロット解析を行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、TGX FastCast Acrylamide Kit, 12% (Bio-Rad) を用いて作製した。泳動サンプルは、６×SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% ２－メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.25% BPB) により調製し、９５℃で４分間ヒートブロックした。電気泳動は１５０Ｖで５０分間行った（泳動バッファー；195 mM グリシン, 25 mM Tris）。

[0230] 電気泳動後、タンク式ブロット装置及び転写バッファー（25 mM Tris-HCl, 195 mM グリシン, 0.01% SDS, 15% メタノール）を用いて、１００Ｖ、２時間の条件でＰＶＤＦメンブレン（Immobion-P, Millipore）にタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ（100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6）中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で一次抗体反応を行った。一次抗体としては、抗Ｋ－Ｒａｓ抗体（C-17, SantaCruz, ５００倍希釈）、抗Ｈ－Ｒａｓ抗体（C-20, SantaCruz, １０００倍希釈）、及び抗ＳＯＳ１抗体（C-23, SantaCruz, １０００倍希釈）を用いた。４℃にて１６時間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western（Millipore）で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000（富士フイルム(株)）を用いて検出した。

[0231] 次に、同一のメンブレンを用いて、コントロールであるＧＡＰＤＨの検出反応を行った。メンブレンをＴＢＳ－Ｔで洗浄し、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で一次抗体反応を行った。一次抗体としては、抗ＧＡＰＤＨ抗体（6C5, SantaCruz, ２００００倍希釈）を用いた。室温にて６０分間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間

洗浄した。なお、洗浄は３回行った。一次抗体反応後、２％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で二次抗体反応を行った。二次抗体としては、抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（A90-116P-33, Bethyl）を２００００倍希釈して用いた。室温にて３０分間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをＴＢＳ（100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6）で５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western（Millipore）で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000（富士フイルム(株)）を用いて検出した。検出されたバンドの定量には、画像処理ソフトウェアImageJ（NIH）を用いた。

[0232] ウェスタンブロット解析結果を図５に示す。図５中の各バンドの下の数値は、ウェスタンブロット解析により検出された各タンパク質の定量結果を、コントロール（ＤＭＳＯ）を１．０とした相対値で示したものである。

図５に示すとおり、ＴＵＳ－００７を添加した場合には、内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の量が減少したが、ＳＯＳ１タンパク質の量は減少しなかった。この結果は、Sun, Q.らの文献（Sun, Q. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 6140-6143）にて報告されているＲａｓ－ＳＯＳのタンパク質親和性の結果と整合するものであった。

[0233] ＜実施例７＞

実施例７では、ＨｅＬａ細胞又はＳＷ１９９０細胞（ヒト膵臓癌細胞）にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した場合のアポトーシス誘導について、ＦＡＣＳ解析により評価した。なお、ＨｅＬａ細胞においては野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-WT）が発現しており、ＳＷ１９９０細胞においてはＧ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質（K-Ras-G12D）が発現している。

[0234] （細胞播種）

ＨｅＬａ細胞又はＳＷ１９９０細胞を８×10^4個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で１６時

間培養した。

[0235] （ＨｅＬａ細胞又はＳＷ１９９０細胞へのＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2の添加）

細胞播種から１６時間後に、以下のようにして、ＨｅＬａ細胞又はＳＷ１９９０細胞にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％ Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用いた。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。ＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2を含有するＤＭＳＯ溶液をＤＭＳＯ濃度が１体積％となるように培地と混合し、各ウェル当たり５００μＬ添加して、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で培養した。コントロールとしてはＤＭＳＯを用いた。

[0236] （ＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2によるアポトーシス誘導（ＦＡＣＳ解析））

ＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ、又はＲａｓ－ＳＯＳ－NH_2の添加２４時間後、培地を除去し、ＰＢＳを添加して細胞を洗浄した。ＰＢＳの除去後、３７℃のトリプシン（0.25 w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA・4Na Solution with Phenol Red）（和光純薬工業(株)）を各ウェル当たり２００μＬ添加し、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で１分間培養した。培養後、Ｄ－ＭＥＭ（Low D-Glucose, L-Glutamine, Phenol Red）（和光純薬工業(株)）に１０質量％ ＦＢＳ及び１質量％ PenStrep（100 U/mL Sodium Penicillin G and 100 μg/mL Streptomycin Sulfate）（和光純薬工業(株)）を添加した培地を各ウェル当たり８００μＬ添加して懸濁し、１５ｍＬチューブに細胞溶液を回収した。

[0237] 回収した細胞溶液を遠心分離（１０００ｒｐｍ×５分間、４℃）し、上清を除去した後、８５μＬのbinding buffer（Annexin V-FITC Kit, Medical & Biological Labolatories）を添加して細胞を再懸濁した。更に、１０μＬのAnnexin V-FITC及び５μＬのヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を添加し、暗所

にて室温下で１５分間インキュベートすることにより、細胞を染色した。インキュベーション後、氷上にて４００μＬのbinding bufferを添加した。

[0238] フローサイトメトリーにはBD FACSCanto II（BD Biosciences）を用いた。ＦＡＣＳ解析の直前に、細胞溶液を孔径３２μｍのメッシュに通し、ＦＡＣＳチューブへと移した。解析ソフトFlowJo（トミーデジタルバイオロジー(株)）により、Annexin V陽性且つＰＩ陰性の細胞の割合を算出し、アポトーシス細胞の割合とした。

[0239] ＨｅＬａ細胞におけるアポトーシス細胞の割合を図６Ａに示し、ＳＷ１９９０細胞におけるアポトーシス細胞の割合を図６Ｂに示す。図６Ａ及び図６Ｂは、２回のＦＡＣＳ解析により測定されたアポトーシス細胞の割合を平均値±標準誤差で示したものである。

図６Ａに示すとおり、野生型Ｒａｓタンパク質を発現するＨｅＬａ細胞においては、ＴＵＳ－００７又はＲａｓ－ＳＯＳの添加により濃度依存的にアポトーシスが誘導されたが、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加してもアポトーシスは誘導されなかった。

一方、図６Ｂに示すとおり、Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質を発現するＳＷ１９９０細胞においては、Ｒａｓ－ＳＯＳによるアポトーシス誘導効果が大きく低減したが、ＴＵＳ－００７によるアポトーシス誘導効果は、ＨｅＬａ細胞の場合と同程度に高かった。

[0240] ＜実施例８＞

実施例８では、ＨｅＬａ細胞又はＳＷ１９９０細胞にＴＵＳ－００７、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2、又は抗癌剤（ＥＧＦＲ阻害剤）であるエルロチニブ（Erlotinib）を添加した場合のアポトーシス誘導について、実施例７と同様に、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0241] ＨｅＬａ細胞におけるアポトーシス細胞の割合を図７Ａに示し、ＳＷ１９９０細胞におけるアポトーシス細胞の割合を図７Ｂに示す。図７Ａ及び図７Ｂは、２回のＦＡＣＳ解析により測定されたアポトーシス細胞の割合を平均値±標準誤差で示したものである。

図７Ａに示すとおり、野生型Ｒａｓタンパク質を発現するＨｅＬａ細胞においては、ＴＵＳ－００７又はエルロチニブの添加により濃度依存的にアポトーシスが誘導されたが、Ｒａｓ－ＳＯＳ－NH_2を添加してもアポトーシスは誘導されなかった。

一方、図７Ｂに示すとおり、Ｇ１２Ｄ変異型Ｋ－Ｒａｓタンパク質を発現するＳＷ１９９０細胞においては、エルロチニブによるアポトーシス誘導効果が大きく低減したが、ＴＵＳ－００７によるアポトーシス誘導効果は、ＨｅＬａ細胞の場合と同程度に高かった。

[0242] ＜実施例９＞

実施例９では、ＴＵＳ－００７を投与したマウス個体における内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した。

[0243] （マウスへのＴＵＳ－００７の投与）

ＴＵＳ－００７をＤＭＳＯに溶解した後、ＤＭＳＯの濃度が１０体積％となるようにトウモロコシ油に溶解し、４０ｍｇ／ｋｇ体重又は８０ｍｇ／ｋｇ体重の投与量で、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ野生型マウス（８週齢～９週齢、雄）（日本クレア(株)）に腹腔内投与した（ｎ＝３～４）。また、ＴＵＳ－００７を投与する投与群のほかに、Ｒａｓ－ＳＯＳを８０ｍｇ／ｋｇ体重の投与量で投与する投与群も準備した。コントロールとしては、注射液の担体（１０体積％ ＤＭＳＯを含有するトウモロコシ油）を用いた。マウスは、餌及び水が自由摂取できる環境下で飼育した。投与４８時間後に、深麻酔下でマウスを解剖した。膵臓及び大腸を摘出し、液体窒素で瞬間凍結させた。

[0244] （マウス組織のウェスタンブロット解析）

凍結した膵臓及び大腸をそれぞれ粉砕した後、ＴＫＭ組織溶解バッファー（50 mM トリエタノールアミン（pH 7.8），50 mM KCl，5 mM $MgCl_2$，0.25 M sucrose，1 mM PMSF，protein inhibitors cocktail-EDTA free（ナカライテスク(株)），1 mM DTT，Recombinant RNase inhibitor (0.2 U/μL，Takara Bio））を加え、遠心分離（１３８００ｒｐｍ×３０分間、４℃）し、上清（

膵臓組織抽出物及び大腸組織抽出物）を回収した。抽出したタンパク質は、分光光度計で濃度を定量した。

[0245] 回収した各組織抽出物について、ウェスタンブロット解析を行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、TGX FastCast Acrylamide Kit, 12% (Bio-Rad) を用いて作製した。泳動サンプルは、６×SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% ２－メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.25% BPB) により調製し、９５℃で５分間ヒートブロックした。電気泳動は１８０Ｖで５０分間行った（泳動バッファー；195 mM グリシン, 25 mM Tris）。

[0246] 電気泳動後、タンク式ブロット装置及び転写バッファー（25 mM Tris-HCl, 195 mM グリシン, 0.01% SDS, 15% メタノール）を用いて、２００ｍＡ、９０分間の条件でＰＶＤＦメンブレン（Immobion-P, Millipore）にタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ（100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6）中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で一次抗体反応を行った。一次抗体としては、抗Ｋ－Ｒａｓ抗体（F-234, SantaCruz, ５００倍希釈）、抗Ｈ－Ｒａｓ抗体（M-90, Santa Cruz, ５００倍希釈）、抗ＳＯＳ１抗体（C-23, SantaCruz, １０００倍希釈）、及び抗ＧＡＰＤＨ抗体（6C5, SantaCruz, ２００００倍希釈）を用いた。室温にて２時間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western (Millipore) で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000（富士フイルム(株)）を用いて検出した。

[0247] ウェスタンブロット解析結果を図８に示す。図８に示すとおり、ＴＵＳ－００７をマウスに投与した場合には、濃度依存的に内在の野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の量が減少し、特に膵臓組織内において顕著に減少した。一方、Ｒａｓ－ＳＯＳをマウスに投与した場合に

は、野生型Ｋ－Ｒａｓタンパク質及び野生型Ｈ－Ｒａｓタンパク質の量は減少しなかった。

[0248] ＜実施例１０＞

実施例１０では、ヒト膵臓癌細胞（ＳＷ１９９０細胞）の皮下移植マウスにＴＵＳ－００７を投与し、抗腫瘍効果を評価した。

[0249] （ＳＷ１９９０細胞皮下移植マウスの作製）

Ｔ細胞機能欠如マウス（ＢＡＬＢ／ｃＡＪｃｌ－ｎｕ/ｎｕ、４週齢、雌）（日本クレア(株)）の皮下に、ＳＷ１９９０細胞を１×１０^{7}細胞／ｍＬとなるようにＰＢＳに懸濁させた細胞懸濁液０．１ｍＬを、２６ゲージの注射針（テルモ(株)）を用いて移植した。

[0250] （ＴＵＳ－００７の経口投与）

投与の直前にＴＵＳ－００７をＤＭＳＯに溶解し、０．５質量%のカルボキシメチルセルロース（Code No. 039-01335、和光純薬工業(株)）溶液をＤＭＳＯの濃度が２．５体積%となるように添加し、超音波処理によって粉砕することによりＴＵＳ－００７の懸濁液を調製した。ＳＷ１９９０細胞皮下移植マウスの腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の大きさに成長したところで、調製したＴＵＳ－００７懸濁液を８０ｍｇ／ｋｇ体重の投与量で３日に１回、計７回に亘って、胃ゾンデ（Code No. 5202K、(有)フチガミ器械）を用いて強制的に経口投与した（ｎ＝６～９）。コントロール（Vehicle）としては、２．５体積% ＤＭＳＯを含有する０．５質量%カルボキシメルセルロース溶液を同様の方法で投与した。

[0251] （抗腫瘍効果の評価）

ＴＵＳ－００７の投与による経時的な腫瘍体積の変化を図９Ａに示す。腫瘍体積（ｍｍ^{3}）は、ノギスを用いて腫瘍径を測定し、（短径）^{2}×長径／２の式に従って算出した。図９Ａに示すとおり、ＴＵＳ－００７の投与群では、コントロール群（Vehicle）と比較して腫瘍体積の増大が有意に抑制された（ｐ＝０．００４）。

[0252] （体重変化の評価）

ＴＵＳ－００７の投与による経時的な体重変化を図９Ｂに示す。図９Ｂに示すとおり、３日に１回、計７回に亘る反復投与において、ＴＵＳ－００７の投与群はコントロール群（Vehicle）と比較して体重変動に大きな差はなかった。また、マウスの一般状態に異常はなかった。

[0253]（急性毒性の評価）

Ｊｃｌ：ＩＣＲマウス（８週齢、雌）（日本クレア(株)）にＴＵＳ－００７を８０ｍｇ／ｋｇ体重、３００ｍｇ／ｋｇ体重、又は１０００ｍｇ／ｋｇ体重の投与量で単回経口投与した場合の急性毒性を評価した。いずれの投与量でもマウスの一般状態に異常はなく、LD_{50}＞１０００ｍｇ／ｋｇ体重であった。

[0254]＜参考例１＞

参考例１では、タンパク質親和性分子とタンパク質分解誘導タグとを連結することにより、タンパク質分解誘導分子であるＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを合成した。

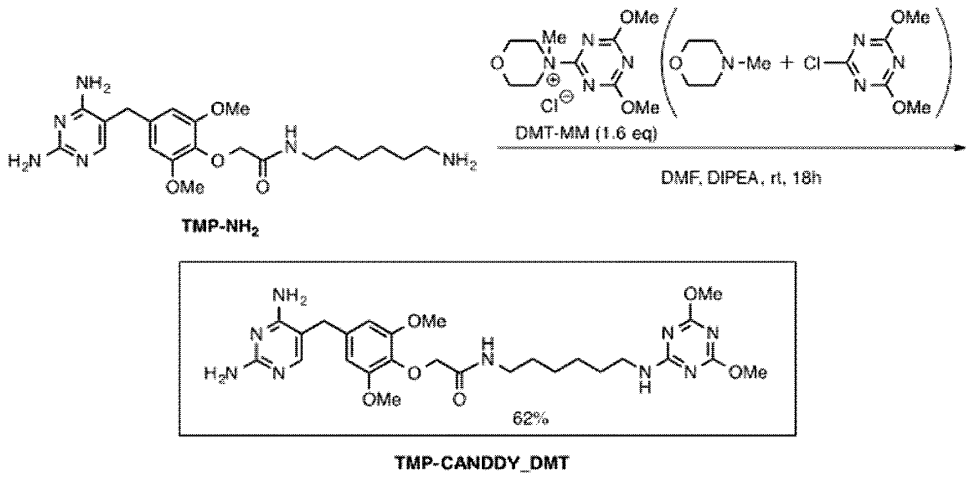
[0255] タンパク質親和性分子としては、ｅｃＤＨＦＲタンパク質と結合するジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤であるＴＭＰにアミノ基を含む官能基を導入したＴＭＰ誘導体（$TMP-NH_2$）を用いた。

また、タンパク質分解誘導タグとしては、前述した式（Ｉ）においてR^1及びR^2をいずれもメトキシ基とした化合物（ＤＭＴ）を用いた。ＤＭＴは、プロテアソーム阻害剤に由来しないものの、プロテアソームに対して親和性を有する化合物である。

[0256] ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの合成方法の詳細は下記合成スキームのとおりである。

[0257]

[化8]



[0258] ナスフラスコにＴＭＰ－ＮＨ$_2$（Long, M.J. et al., Chem. Biol., 2012, 19(5), 629-637）（31.7 mg, 0.073 mmol）を仕込み、脱水ＤＭＦを０．３ｍＬ加えた。室温で１０分間撹拌した後、ＤＩＰＥＡを０．１ｍＬ加え、室温で１０分間撹拌した。ＤＭＴ－ＭＭ（33.6 mg, 0.12 mmol, 1.6 eq, 和光純薬工業(株)）を反応溶液に直接加え、室温にて１８時間撹拌した。反応溶液を水及び炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、クロロホルムで５回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール＝９２／８）を用いた分離精製処理により、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴ（25.8 mg, 0.045 mmol, 62%, isolated yield）を得た。

[0259] ＜参考例２＞

参考例２では、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴのプロテアソーム阻害活性及びプロテアソームとの親和性を評価した。ポジティブコントロールとしては、プロテアソーム阻害剤であるＭＧ－１３２を用いた。

[0260] 評価には、20S Proteasome StressXpress Assay Kit Gold (Bioscience)を用い、２０Ｓプロテアソームのβ５（キモトリプシン様活性）、β２（トリプシン様活性）、及びβ１（カスパーゼ様活性）の各βサブユニットに特異的なＡＭＣ結合プロテアソーム蛍光基質のＣ末端が切断されることにより

生成するＡＭＣをMulti-Detection Microplate Reader (Synergy HT, BIO-TEK) により測定した。測定波長は、励起光（Ex.）を３６０ｎｍ、蛍光（Em.）を４６０ｎｍとした。

[0261] β１（カスパーゼ様活性）、β２（トリプシン様活性）、及びβ５（キモトリプシン様活性）の各プロテアソーム活性を図１０Ａ～図１０Ｃに示す。

図１０Ａ～図１０Ｃに示すとおり、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴは、ＭＧ－１３２と比較して、プロテアソーム阻害活性が著しく低いことが確認できた。また、β１、β２、及びβ５のいずれに対しても、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの濃度依存的に阻害活性が高まることから、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴがプロテアソームと穏やかな親和性を有していることが示唆された。すなわち、ＤＭＴは、プロテアソームと親和性を有するものの、分解を阻害しないと評価された。

[0262] ＜参考例３＞

参考例３では、ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0263] （プラスミドの準備）

ｅｃＤＨＦＲタンパク質を発現するプラスミド（pMIR-DsRed-IRES-ecDHFR-HA-GFP）を大腸菌で増幅した後、Miniprep Kit（QIAGEN）で精製した。

[0264] （ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

実施例２と同様にして、ＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内にｅｃＤＨＦＲタンパク質（詳細には、ＨＡタグを介したｅｃＤＨＦＲタンパク質とＧＦＰとの融合タンパク質）又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞は、６×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で４０時間培養した。

[0265] （ＨｅＬａ細胞へのＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの添加）

プラスミドを導入してから４０時間培養した後、以下のようにして、Ｈｅ

Ｌａ細胞にＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％ Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用い、各ウェル当たり２９７μＬ添加した。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを含有するＤＭＳＯ溶液を各ウェル当たり３μＬ添加して、３７℃、５体積％ CO_2 の条件下で培養した。コントロールとしては、ＴＭＰを含有するＤＭＳＯ溶液又はＤＭＳＯを用いた。

[0266] （ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介したｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ＦＡＣＳ解析））

ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの添加２４時間後、培地を除去し、ＰＢＳを添加して細胞を洗浄した。ＰＢＳの除去後、３７℃のトリプシン（0.25 w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA・4Na Solution with Phenol Red）（和光純薬工業(株)）を各ウェル当たり３００μＬ添加し、３７℃、５体積％ CO_2 の条件下で１分間培養した。培養後、Ｄ－ＭＥＭ（Low D-Glucose, L-Glutamine, Phenol Red）（和光純薬工業(株)）に１０質量％ ＦＢＳ及び１質量％ PenStrep (100 U/mL Sodium Penicillin G and 100 μg/mL Streptomycin Sulfate)（和光純薬工業(株)）を添加した培地を各ウェル当たり５００μＬ添加して懸濁し、１５ｍＬチューブに細胞溶液を回収した。

[0267] 回収した細胞溶液を遠心分離（１０００ｒｐｍ×５分間、４℃）し、上清を除去した後、２ｍＬのＰＢＳ（３７℃）により懸濁した。懸濁後の細胞溶液を遠心分離（１０００ｒｐｍ×５分間、４℃）し、上清を除去した後、４℃のＦＡＣＳバッファー（１質量％ ＦＢＳ／ＰＢＳ）を５００μＬ添加し、氷上に静置した。

[0268] フローサイトメトリーにはBD FACSCanto II (BD Biosciences) を用い、細胞中におけるＧＦＰ及びＤｓＲｅｄタンパク質の発現を定量した。ＦＡＣＳ解析の直前に、細胞溶液を孔径３２μｍのメッシュに通し、ＦＡＣＳチューブへと移した。解析ソフトFlowJo（トミーデジタルバイオロジー(株)）によ

り細胞１個当たりのＧＦＰ／ＤｓＲｅｄ比を算出し、グラフのシフトから、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴによるｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解（ノックダウン）を確認した。

[0269] ＦＡＣＳ解析結果を図１１に示す。図１１に示すとおり、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを添加した場合には、濃度依存的にグラフが左にシフトしており、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴによってｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解が誘導されていることが確認できた。一方、ＴＭＰを添加した場合には、コントロール（ＤＭＳＯ）とグラフが重なっており、ｅｃＤＨＦＲタンパク質が分解されていないことが確認できた。

[0270] ＜参考例４＞

参考例４では、ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介した分解（ノックダウン）について、ウェスタンブロット解析により評価した。

[0271] （プラスミドの準備）

参考例３と同様にして、ｅｃＤＨＦＲタンパク質を発現するプラスミドを準備した。

[0272] （ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

参考例３と同様にして、ＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内にｅｃＤＨＦＲタンパク質又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞は、４×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で４０時間培養した。

[0273] （ＨｅＬａ細胞へのＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの添加）

プラスミドを導入してから４０時間培養した後、以下のようにして、ＨｅＬａ細胞にＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％ Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用いた。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。

ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを含有するＤＭＳＯ溶液をＤＭＳＯ濃度が１体積％となるように培地と混合し、各ウェル当たり３００μＬ添加して、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で培養した。また、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群のほかに、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴ及びボルテゾミブ（Bortezomib）を含有するＤＭＳＯ溶液を添加する実験群も準備した。ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの添加１２時間後に、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを５０μｇ／ｍＬの濃度となるように培地中に添加した。なお、コントロールとしては、ＴＭＰを含有するＤＭＳＯ溶液又はＤＭＳＯを用いた。

[0274] （ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを介したｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ウェスタンブロット解析））

ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴの添加２４時間後、培地を除去し、ＰＢＳを添加して細胞を洗浄した。ＰＢＳの除去後、細胞溶解バッファー（CelLytic M, Sigma）とプロテアーゼ阻害剤（cOmplete Mini, EDTA-free, Roche）との混合溶液を各ウェル当たり５５μＬ添加した。４℃にて１５分間静置した後、ピペットチップを用いて氷上で細胞を剥がした。細胞溶液を１．５ｍＬチューブに回収し、液体窒素で瞬間凍結した後、氷上で融解させた。凍結融解を３回繰り返した後、遠心分離（１３０００ｒｐｍ×２０分間、４℃）し、上清（細胞抽出物）を回収した。

[0275] 回収した細胞抽出物について、ウェスタンブロット解析を行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、TGX FastCast Acrylamide Kit, 12% (Bio-Rad) を用いて作製した。泳動サンプルは、６×SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% ２－メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.25% BPB) により調製し、９５℃で４分間ヒートブロックした。電気泳動は１５０Ｖで５０分間行った（泳動バッファー；195 mM グリシン, 25 mM Tris）。

[0276] 電気泳動後、タンク式ブロット装置及び転写バッファー（25 mM Tris-HCl, 195 mM グリシン, 0.01% SDS, 15% メタノール）を用いて、１００Ｖ、４０分間の条件でＰＶＤＦメンブレン（Immobion-P, Millipore）にタンパク質を

転写した。転写後のメンブレンは、５％スキムミルク／High-salt TBS-T（100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 7.6）中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、メンブレンをHigh-salt TBS-Tでリンスし、１％スキムミルク／High-salt TBS-T中で抗体反応を行った。抗体としては、Anti-HA-Peroxidase, High-Affinity (3F10) Rat monoclonal antibody (25 U/mL) (Roche) を１０００倍希釈して用いた。室温にて１時間振盪させた後、メンブレンをHigh-salt TBS-Tで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをHigh-salt TBS (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.6) で５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western (Millipore) で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000（富士フイルム(株)）を用いて検出した。

[0277] 次に、同一のメンブレンを用いて、コントロールであるＧＡＰＤＨの検出反応を行った。メンブレンをＴＢＳ－Ｔ（100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6）で洗浄し、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中、室温にて３０分間振盪することによりブロッキングした。ブロッキング後、５％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で一次抗体反応を行った。一次抗体としては、抗ＧＡＰＤＨ抗体（6C5, SantaCruz, ２００００倍希釈）を用いた。室温にて６０分間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。一次抗体反応後、２％スキムミルク／ＴＢＳ－Ｔ中で二次抗体反応を行った。二次抗体としては、抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（A90-116P-33, Bethyl）を２００００倍希釈して用いた。室温にて３０分間振盪させた後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間洗浄した。なお、洗浄は３回行った。更に、メンブレンをＴＢＳ (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) で５分間洗浄した。そして、メンブレンを化学発光試薬Immobilon Western (Millipore) で処理した後、化学発光をルミノイメージアナライザLAS-3000（富士フイルム(株)）を用いて検出した。検出されたバンドの定量には、画像処理ソフトウェアImageJ (NIH) を用いた。

[0278] ウェスタンブロット解析結果を図１２Ａ及び図１２Ｂに示す。図１２Ａ及

び図１２Ｂに示すとおり、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを添加した場合には、ｅｃＤＨＦＲタンパク質の量が減少したが、ＴＭＰを添加した場合には、ｅｃＤＨＦＲタンパク質の量が減少しなかった。また、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴ及びボルテゾミブの両方を添加した場合には、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴを添加した場合と比較してｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解が阻害された。この結果は、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＤＭＴによって、ｅｃＤＨＦＲタンパク質がプロテアソームによる分解へと導かれていることを裏付けるものである。

[0279] ＜参考例５＞

参考例５では、タンパク質親和性分子とタンパク質分解誘導タグとを連結することにより、タンパク質分解誘導分子であるＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを合成した。

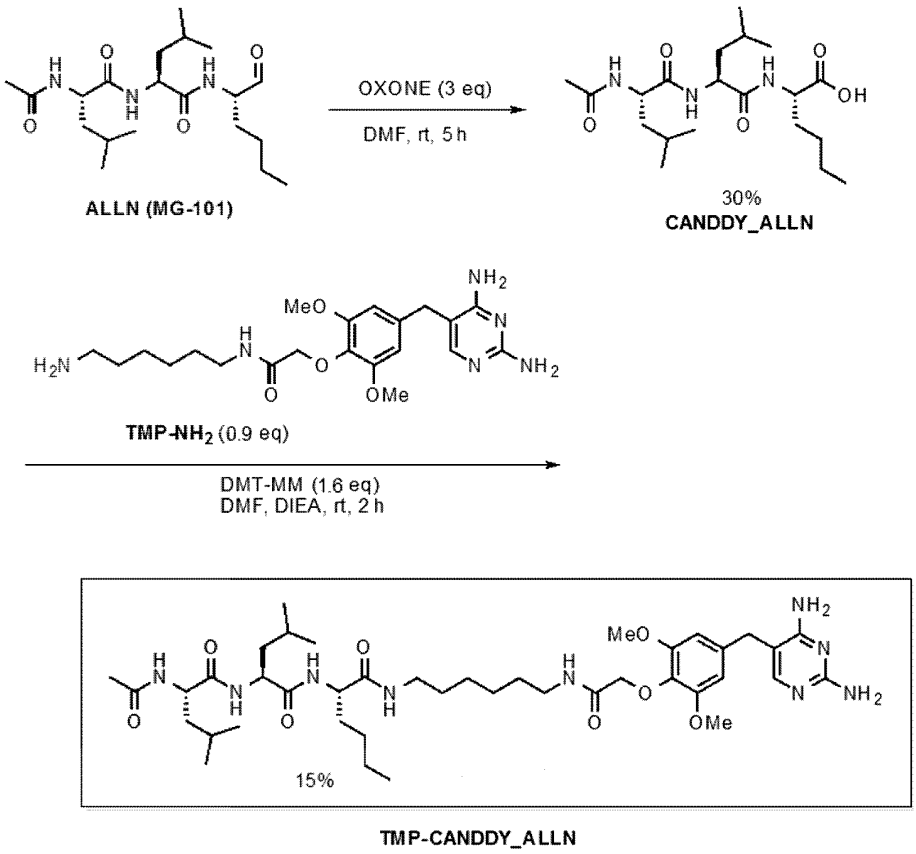
[0280] タンパク質親和性分子としては、参考例１と同様に$TMP-NH_2$を用いた。

また、タンパク質分解誘導タグとしては、プロテアソーム阻害剤であるＡＬＬＮの活性部位（ホルミル基）をカルボキシ基に置き換えた化合物（ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ）を用いた。

[0281] ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮの合成方法の詳細は下記合成スキームのとおりである。

[0282]

[化9]



[0283] （ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮの合成）

ナスフラスコにＡＬＬＮ（87.2 mg, 0.23 mmol, 1 eq, Code No. 07036-24, ナカライテスク(株)）を仕込み、脱水ＤＭＦを２ｍＬ加えた。室温にて５分間撹拌した後、Oxone（212.1 mg, 0.69 mmol, 3 eq, Code No. 228036, Sigma-Aldrich）を反応溶液に直接加え、室温にて５時間撹拌した。反応溶液を水で希釈した後、クロロホルムで３回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルクロマトグラフィー（Code No. 30511-35, ナカライテスク(株)）（クロロホルム／メタノール＝２０／１～１０／１, gradient）を用いた分離精製処理により、ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ（27.0 mg, 0.068 mmol, 30%）を得た。

[0284] （ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮの合成）

ナスフラスコにＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ（26.8 mg, 0.067 mmol, 1 eq）及び別途合成したＴＭＰ－ＮＨ$_2$（Long, M.J. et al., Chem. Biol., 2012, 19(5), 629-637）（26.0 mg, 0.060 mmol, 0.9 eq）を仕込み、脱水ＤＭＦを２ｍＬ加えた。室温にて５分間撹拌した後、ＤＩＰＥＡを０．１ｍＬ加え、溶液を中性にした。室温にて５分間撹拌した後、ＤＭＴ－ＭＭ（30.0 mg, 0.11 mmol, 1.6 eq, Code No. 329-53751, 和光純薬工業(株)）を反応溶液に直接加え、室温にて２時間撹拌した。冷却下で１０ｍＬの１０質量％食塩水／０．１Ｎ 塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで３回抽出した。０．５Ｎ 塩酸水溶液、次いで食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去した後、シリカゲルクロマトグラフィー（Code No. 30511-35, ナカライテスク(株)）（クロロホルム／メタノール＝１０／１）を用いた分離精製処理により、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮ（8.2 mg, 0.010 mmol, 15%, isolated yield）を得た。

[0285] ＜参考例６＞

参考例６では、参考例２と同様にして、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮのプロテアソーム阻害活性及びプロテアソームとの親和性を評価した。

[0286] β１（カスパーゼ様活性）、β２（トリプシン様活性）、及びβ５（キモトリプシン様活性）の各プロテアソーム活性を図１３Ａ～図１３Ｃに示す。

図１３Ａ～図１３Ｃに示すとおり、β２及びβ５の活性に対して、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮでは、ＡＬＬＮ単独と比較して阻害活性が弱まり、ＡＬＬＮの阻害活性が失活していることが確認できた。β１については、ＡＬＬＮではあまり阻害されないことが報告されており（Kaiser, M. et al., Chem. Bio. Chem., 2004, 5, 1256-1266）、この報告と矛盾しない結果であった。

また、β１、β２、及びβ５のいずれに対しても、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮの濃度依存的に阻害活性が高まることから、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮとプロテアソームとの親和性が確認された。

[0287] ＜参考例７＞

参考例７では、ＨｅＬａ細胞において強制発現させたｅｃＤＨＦＲタンパク質のＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを介した分解（ノックダウン）について、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0288]（プラスミドの準備）

参考例３と同様にして、ｅｃＤＨＦＲタンパク質を発現するプラスミド（pMIR-DsRed-IRES-ecDHFR-HA-GFP）を準備した。

[0289]（ＨｅＬａ細胞へのプラスミドの導入及び細胞播種）

参考例３と同様にして、ＨｅＬａ細胞にプラスミドを導入することにより、細胞内にｅｃＤＨＦＲタンパク質又は比較用のＤｓＲｅｄタンパク質を一過的に過剰発現させた。プラスミド導入後のＨｅＬａ細胞は、４×１０^{4}個／ウェルの細胞密度で２４ウェルプレートに播種した後、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で４０時間培養した。

[0290]（ＨｅＬａ細胞へのＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮの添加）

プラスミドを導入してから４０時間培養した後、以下のようにして、ＨｅＬａ細胞にＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを添加した。培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（High D-Glucose, Phenol Red, Sodium Pyruvate）（和光純薬工業(株)）に１質量％ Ｌ－グルタミン溶液（Sigma-Aldrich）を添加した無血清培地（３７℃）を用い、各ウェル当たり３００μＬ添加した。なお、Ｌ－グルタミン溶液は使用直前に添加した。ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを含有するＤＭＳＯ溶液を各ウェル当たり３μＬ添加して、３７℃、５体積％ CO_2の条件下で培養した。コントロールとしては、ＴＭＰを含有するＤＭＳＯ溶液又はＤＭＳＯを用いた。

[0291]（ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを介したｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解（ノックダウン）の評価（ＦＡＣＳ解析））

実施例２と同様にして、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを介したｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解について、ＦＡＣＳ解析により評価した。

[0292] ＦＡＣＳ解析結果を図１４に示す。図１４に示すとおり、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮを添加した場合には、コントロール（ＤＭＳＯ）と比較し

てグラフが大きく左にシフトしており、ＴＭＰ－ＣＡＮＤＤＹ＿ＡＬＬＮによってｅｃＤＨＦＲタンパク質の分解が誘導されていることが確認できた。一方、ＴＭＰを添加した場合には、コントロール（ＤＭＳＯ）とグラフが重なっており、ｅｃＤＨＦＲタンパク質が分解されていないことが確認できた。

[0293] ２０１６年１１月１５日に出願された日本出願２０１６－２２２６８３の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的且つ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。