

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年10月3日(03.10.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/201691 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/52 (2006.01) C12Q 1/24 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/012419

(22) 国際出願日: 2023年3月28日(28.03.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(72) 発明者: 有本 博一 (ARIMOTO Hirokazu); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 高橋 大輝 (TAKAHASHI Daiki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人浅村特許事務所 (ASAMURA IP P.C.); 〒1000004 東京都千代田区大手町1-5-1 大手町ファーストスクエア ウエストタワー17F Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING COMPOUND INDUCING AUTOPHAGY

(54) 発明の名称: オートファジーを誘導する化合物のスクリーニング方法

(57) Abstract: Provided is a screening method for searching for a new autophagy-inducing compound. The present invention searches for a new autophagy-inducing compound through at least one of the following characteristics: (1) having high binding affinity for DEAD-box RNA helicase, (2) promoting interaction by approximating DEAD-box RNA helicase and p62, and (3) promoting droplet formation of DEAD-box RNA helicase and p62.

(57) 要約: 新たなオートファジー誘導化合物を探索するためのスクリーニング方法を提供する。(1) DEAD-box型RNAヘリカーゼに対して高い結合親和性を有する、(2) DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62とを近接化して相互作用を促す、および(3) DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62の液滴形成を促す、の少なくとも1つの特性を利用して、新たなオートファジー誘導化合物を探索する。



WO 2024/201691 A1

明 細 書

発明の名称：

オートファジーを誘導する化合物のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、オートファジーを誘導する化合物のスクリーニング方法および標的細胞内分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する化合物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] オートファジーは、細胞内における細胞内分子の分解機構の一つであって、酵母からヒトにいたるまでの真核生物に見られる機構である。オートファジーが誘導されると、オートファゴソームと呼ばれる膜胞が形成され、続いて、オートファゴソームがリソソームと融合することにより、オートファゴソーム内に取り込まれた分子が分解される。

[0003] 細胞が飢餓状態に陥ることによってオートファジーが誘導されることが知られているほか、発生、分化等の生理機能や、細胞内に侵入したウイルスの排除等の感染防御機能にもオートファジーが関与することが明らかになってきている。

[0004] オートファジーが誘導される機構についても様々な報告により明らかになってきている。

M o h a m m a d O m a r F a r u kらは、レビュー論文において、特定の可溶性タンパク質、超分子複合体、液相分離した液滴、異常または過剰なオルガネラ、病原性侵入細菌などを分解し、細胞の恒常性に寄与する選択的なオートファジーのメカニズムを詳細に報告している（非特許文献1）。具体的には、p 6 2がユビキチン化タンパク質に結合して液相分離が起これ、p 6 2およびユビキチン化タンパク質が凝縮している液滴を形成し、この液滴が他のタンパク質をリクルートし隔離膜／貪食膜を形成させ、液滴中のp 6 2および他のタンパク質がリソソームで分解されることを報告してい

る。

[0005] Lin Maらは、食道扁平上皮癌（ESCC）で、DDX5のノックダウンが小胞体ストレスを抑制し、オートファジーのフラックスの回復を促進することを示唆している（非特許文献2）。

[0006] Hao Zhangらは、DDX5がオートファジー受容体p62と相互作用することで、オートファジーを刺激し、肝癌の発生を抑制することを報告している（非特許文献3）。また、DDX5がp62の分解を促進し、その半減期を顕著に減少させたことも報告している。

[0007] Yongsang Joらは、膜なしのタンパク質液滴内の本質的に無秩序なタンパク質間の相互作用に関する報告において、Streptavidinの添加によりDDX4の液滴を形成したことを開示している（非特許文献4）。

[0008] また、オートファジーを積極的に誘導して新しい治療方法（デグレーダーと呼ばれることがある）を提供する試みも著しい進展を見せている（例えば、非特許文献5乃至8）。

デグレーダーの代表的な例は、タンパク質分解ターゲットキメラ（PROTAC）／特異的・非遺伝的IAP依存性タンパク質消去剤（SNIPER）であり、これらは、標的分子に結合するリガンドとユビキチン-プロテアソームシステム（UPS）による分解を誘導する分解タグからなる異種二機能性分子である（非特許文献5、9および10）。これらの異種二機能性分子は、分解タグを最適化し、標的リガンドを置き換えることで、幅広い基質をターゲットにできる利点がある。しかし、UPSを利用した分解システムはタンパク質をターゲットにしたものに限られていた。

これに対して、近年、リソソームを利用した分解システム、細胞外基質を分解するリソソームターゲティングキメラ（LYTAC）およびオートファジー標的キメラ（AUTAC）が開発され（非特許文献11および12）、さらなる新規キメラ分子の創出が期待される。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1: Cancer Sci, 2021, 112 (10) : 3972-3978
- 非特許文献2: Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533 (4) : 1449-1456
- 非特許文献3: Hepatology, 2019, 69 (3) : 1046-1063
- 非特許文献4: Chem. Sci., 2020, 11, 1269
- 非特許文献5: Samarasinghe, K. T. G. ; Crews, C. M. Targeted protein degradation: a promise for undruggable proteins. Cell Chem. Biol. 2021, 28, 934-951.
- 非特許文献6: Li, K. ;M. Crews, C. PROTACs: Past, Present and Future. Chem. Soc. Rev. 2022. doi: 10.1039/d2cs00193d.
- 非特許文献7: Burslem, G. M. ;Crews, C. M. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery. Cell 2020, 181, 102-114.
- 非特許文献8: Paiva, S. -L. ;Crews, C. M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. Curr. Opin. Chem. Biol. 2019, 50, 111-119.
- 非特許文献9: 友重聡、石川昌彦 PROTACs and other chemical protein degradation technologies for the treatment of neurodegenerative disorders. Angew. Chem.

Int. Ed. 2021, 60, 3346–3354.

非特許文献10：内藤正人、大岡信行、柴田直樹 SNIPERs–hijacking LAP activity to induce protein degradation. Drug Discov. Today Technol. 2019, 31, 35–42.

非特許文献11：Banik, S. M. ; Pedram, K. ; Wisnovsky, S. ; Ahn, G. ; Riley, N. M. ; Bertozzi, C. R. ; Lysosome–targeting Chimaeras for degradation of extracellular proteins. Nature 2020, 584, 291–297.

非特許文献12：高橋大輔、有本博史 オートファジーを利用した分解機の基本となる選択的オートファジー. Cell Chem. Biol. 2021, 28, 1061–1071.

非特許文献13：一村義信、小松雅明 p62/SQSTM1 : オートファジーにおけるその役割 Journal of Japanese Biochemical Society 91 (3) : 380–387 (2019) doi:10.14952/SEIKAGAKU.2019.910380

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかし、これら選択的なオートファジーを誘導するキメラ分子における分解タグの設計は、試行錯誤により経験的に得たものであり、新規キメラ分子を効率的に創出するために、分解タグを設計するツールの開発が望まれていた。

本発明は、このようなニーズに対応するものであり、選択的なオートファジーを誘導するキメラ分子の分解タグを得るためのツールを提供する。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、自らが開発したオートファジー誘導化合物およびタグ部分

について、オートファジーを誘導するメカニズムを探求していたところ、これらの化合物について、以下の特性を発見した。

(1) DEAD-box型RNAヘリカーゼに対して高い結合親和性を有する。

(2) DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62とを近接化して相互作用を促す。

(3) DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62の液滴形成を促す。

本発明者らは、これらの特性を利用して、新たなオートファジー誘導化合物を探索するためのスクリーニング方法を構築し、これを使用して、新規オートファジー誘導化合物の探索に成功した。

本発明は、これらの知見に基づくものであり、以下の方法を提供する。

[0012] [1] DEAD-box型RNAヘリカーゼに試験化合物を接触させ、前記DEAD-box型RNAヘリカーゼに対する前記試験化合物の結合親和性を測定し、

所定値以上の結合親和性を有する化合物を選択する、

オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法。

[2] p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼに試験化合物を接触させ、

前記DEAD-box型RNAヘリカーゼと前記p62の相互作用を測定し、

前記相互作用を誘導した化合物を選択する、

オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法。

[3] 前記DEAD-box型RNAヘリカーゼおよび前記p62を、細胞内で発現し、前記細胞に前記試験化合物を接触させる、[2]に記載の方法。

[4] p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼに試験化合物を接触させ、

DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62の液滴形成を測定し、

前記液滴形成を誘導した化合物を選択する、

オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法。

[5] 前記DEAD-box型RNAヘリカーゼは、DDX5またはDDX17である、[1]～[4]のいずれか1項に記載の方法。

[6] [1]～[5]のいずれか1項に記載の方法で得られた化合物に、リンカーを介して、標的細胞内分子またはオルガネラに特異的に結合するリガンドを連結する、標的細胞内分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する化合物の製造方法。

[7] [6]に記載の方法で得られた化合物を、細胞内で、p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼと接触させて、標的細胞内分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する方法。

[8] [6]に記載の方法で得られた化合物を、細胞内で、p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼと接触させて、前記化合物、前記p62および前記DEAD-box型RNAヘリカーゼを含む液滴を形成する、[7]に記載の方法。

[9] 癌を予防または治療する、[7]または[8]に記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明の実施形態による方法によれば、オートファジー誘導化合物を効率的に得ることができ、これを分解タグ部分としてリンカーを介して、標的細胞内分子に特異的に結合するリガンドに連結することにより、標的分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する化合物を合成することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例1乃至4においてルミネッセンスの測定を開始してから10分経過後の発光量を示す。

[図2] pEGFP-FKBP12でトランスフェクトした細胞を、それぞれ0.01mM、0.1mM、1質量mM、および10mMのAUTAC2-2Gを含む新鮮なDMEM中、並びに比較対照としてDMSOを含む新鮮なD

MEM中で培養した際のEGFP蛍光レベルを示す。

[図3] GFP-FKBP^{F36V}を一過性発現するHeLa細胞を、SLF'-AUTACで処理し、パラホルムアルデヒドで固定した後、抗DDX5抗体または抗p62抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察したイメージを示す。右上の四角い囲みは、やや左上の小さな四角い囲みの細胞質部分を拡大して示したイメージである。

[図4] 図4Aが、GFP-FKBP12およびRFP-DDX5を一過性発現したHeLa細胞をAUTAC2-2Gで処理した場合の蛍光顕微鏡で観察したイメージを示し、図4Bが、GFP-FKBP12およびRFP-p62を一過性発現したHeLa細胞をAUTAC2-2Gで処理した場合の蛍光顕微鏡で観察したイメージを示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の実施の形態を詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施の形態に限定して理解されるべきものではない。

[0016] 1. オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法

本発明によるスクリーニング方法は、以下の特性の少なくとも1つを利用してオートファジー誘導化合物をスクリーニングするものである。

(1) DEAD-box型RNAヘリカーゼに対して高い結合親和性を有する。

(2) DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62とを近接化して相互作用を促す。

(3) DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62の液滴形成を促す。

後述する実施例で実証する通り、オートファジー誘導活性を有する化合物は、これらの特性を有するため、これらの特性の少なくとも1つを有する化合物をスクリーニングすることでオートファジー誘導化合物を得ることができる。

[0017] 1-1. DEAD-box型RNAヘリカーゼ

DEAD-box型RNAヘリカーゼとは、DEAD (Asp-Glu-

A l a - A s p) というモチーフをもつRNAヘリカーゼのスーパーファミリーである。DEAD-box型RNAヘリカーゼは、ATP加水分解のエネルギーを用いて、二本鎖RNAやRNA-タンパク質複合体の解体や形成に関与し、転写、スプライシング、RNAの核外輸送や分解、翻訳、リボソームの生合成などで重要な役割を果たすことが知られている。

[0018] DEAD-box型RNAヘリカーゼのメンバーには、DDX4 (DEAD box protein 4)、DDX5 (DEAD box protein 5) およびDDX17 (DEAD box protein 17) が含まれ、DEAD-Box Helicase 5 (DDX5) は、P68としても知られる。

[0019] DDX5およびDDX17のアミノ酸配列およびそれをコードする核酸配列は以下の通りである。

[化1]

DDX5 アミノ酸配列 (配列番号1)

MSGYSSDRDRGRDRGFGAPRFGGSRAGPLSGKKFGNPGEKLVKKKWNLDLPKFEKNFYQEHPLARRTAQEVETYR
RSKEITVRGHNCPPVLFNFYEANFPANVMDVIARQNFTEPTAIQAQGWPVALSGLDMVGVAQTGSGKTL SYLLPAIV
HINHQPFLERGDGPICLVLAPTRELAQQVQQVAAEYCRACRLKSTCIYGGAPKGPQIRDLERGVEICIA TPGR LIDF
LECGKTNLRRTTYLVLDEADRMLDMGFEPQIRKIVDQIRPDRQTLMWSATWPKEVRQLAEDFLKDYIHINIGALELS
ANHNLQIVDVCHDVEKDEKLIRLMEEIMSEKENKTIVFVETKRRCDELTRKMRRDGWPAMGIHGDKSQQERDWVLN
EFKHGKAPILIATDVASRGLDVEDVKFVINYDYPNSSSEDYIHRIGRTARSTKTGTAYTFFTPNNIKQVSD LISVLR
ANQAINPKLLQLVEDRGSGRSRGRGGMKDDRRDRYSAGKRGGFNTFRDRENYDRGYSSLLKRDFGAKTQNGVYSAAN
YTNGSFGSNFVSAGIQTSFRTGNPTGTYQNGYDSTQQYGSNVPNMHNGMNQQAYAYPATAAAPMIGYPMPTGYSQ

[0020]

[化2]

DDX5 DNA 配列 (配列番号 2)

atgtcgggttattcagtgaccgagaccgcgcgggaccgagggtttggtgcacctcgatttggaggaagtagggc
agggecccttatctggaaagaagtttgaaaccctggggagaaattagttaaaaagaagtggaaattgatgagctgc
ctaaatttgagaagaatttttatcaagagcaccctgatttggctagggcgcacagcacaagagggtgaaacatacaga
agaagcaaggaaattacagtttagaggtcacaaactgcccgaagccagttctaaattttatgaagccaatttccctgc
aaatgtcatggatgttattgcaagacagaatttcactgaacccactgctattcaagctcagggatggccagtgtctc
taagtggattggatatggttgagtgccacagactggatctgggaaaacattgtcttatttgccttccctgcatgtc
cacatcaatcatcagccattcctagagagaggcgatgggcctatttgtttggtgctggcaccacactcgggaactggc
ccaacaggtgcagcaagtagctgctgaatattgtagagcatgtecttgaagtctacttgtatctacggtgggtgctc
ctaagggaaccacaaatacgtgatttggagagagggtgtggaaatctgtattgcaacacctggaagactgattgacttt
ttagagtgtggaaaaaccaatctgagaagaacaacctaccttgtccttgatgaagcagatagaatgcttgatatggg
ctttgaaccccaataaggaagattgtggatcaaataagacctgataggcaaacctctaattgtggagtgcgacttggc
caaaagaagtaagacagcttgcgaagatttctgaaagactatattcatataaacattggtgcacttgaactgagt
gcaaacacacacatttctcagattgtggatgtgtgtcatgacgtagaaaaggatgaaaaacttattcgtctaattgga
agagatcatgagtgagaaggagaataaaaccattgttttggtaaaccaaaagaagatgtgatgagcttaccagaa
aatgaggagagatgggtggcctgcatgggtatccatgggtgacaagagtcacaagagcgtgactgggttctaaat
gaattcaaacatggaaaagctcctattctgattgtctacagatgtggcctccagagggttagatgtggaagatgtgaa
atttgtcatcaattatgactaccctaactcctcagaggattatattcatcgaattggaagaactgctcgcagtacca
aaacaggcacagcatacactttcttacacctaaataacataaagcaagtgcgacacttatctctgtgcttcgtgaa
gctaataagcaattaatcccaagttgcttcagttggctgaagacagaggttcaggtcgttcaggggtagaggagg
catgaaggatgaccgtcgggacagatactctcggggcaaaagggttgatttaatacctttagagacagggaaaatt
atgacagaggttactctagcctgcttaaaagagattttggggcaaaaactcagaatggtgtttacagtgtgcgaat
tacaccaatgggagctttggaagtaattttgtgtctgctggtatacagaccagttttaggactggtaatccaacagg
gacttaccagaatgggttatgatagcactcagcaatacgggaagtaatgttccaaatatgcacaatggtatgaaccaac
aggecatatgcatatcctgctactgcagctgcacctatgatttggttatccaatgccaacaggatattcccaataa

[0021] [化3]

DDX17 アミノ酸配列 (配列番号 3)

MPTGFVAPILCVLLPSPTREAATVASATGDSASERESAAPAAAPTAEAPPSVVTRPEPQALPSPAIRAPLPDLYPF
GTMRGGGFGDRDRDRGGFGARGGGGLPPKKFGNPGERLRKKKWDLSELPKFEKNFYVEHPEVARLTPYEVDLRR
KKEITVRGGDVC PKPVFAFHANFPQYVMDV LMDQHFTEPTPIQCQGFPLALSGRDMVGIAQTGSGKTLAYLLPAIV
HINHQP YLERGDGPICLVLAPTRELAQQVQQVADDY GKCSRLKSTCIYGGAPKGPQIRDLERGVEIC IATPGRLIDF
LES GKTNLRRCTYLVLDEADRMLDMGFEPQIRKIVDQIRPDRQTL MWSATWPKEVRQLAEDFLDYTQINVG NLELS
ANHNILQIVDVCMESEKDHKLIQLMEEIMAEKENKTIIFVETKRRCDL TRRMRRDGWPAMCIHGDKSQPERDWVLN
EFRSGKAPIL IATDVASRGLDVEDVKFVINYDYPNSS EYVHRIGRTARSTNKGTAYTFFTPGNLQKARELIKVLEE
ANQAINPKLMQLVDHRRGGGGGGGSR YRTTSSANNPNLMYQDECDRLRGVKDGGRRDSASYRDRSETDRAGYANG
SGYGSPNSAFGAQAGQYTYGQGTYGAAAYGTSSYTAQEYGACTYGASSTTSTGRSSQSSSQFSGIGRSGQQPQPLM
SQQFAQPPGATNMIGYMGQTAYQYPPPPPPPPPSRK

[0022]

[化4]

DDX17 DNA 配列 (配列番号 4)

atgccacacggcgtttgtagccccgattctctgtgttttgcctccgtctccgacagagaggcgccgacggtggcgct
tgcgacgggagacagcgcgtcggagcgcagagagcgcgtgcgcctgccgcgcgcccaacagcggaggcgcgcgcgc
cggtegtcaccagacccgagccgcaggccctcccagccccggccatccgtgccccgcctcccagatctctatctttt
gggaccatgcgcggaggagcgtttggggaccgggaccgggatcgtgaccgtggaggatttggagcaagaggtggtgg
tggccttcccccgaaataatttgtaatcctggggagcgtttgcgtaaaaaaaagtgggatttgagtgcgtcccca
agtttgagaaaaattttatgtggaacatccggaagttagcaaggetgacaccatatgaggttgatgagctacgccga
aagaaggagattacagtgagggggggagatgtttgtctaaaccgcgtttgccttccatcatgtctaacttcccaca
atatgtaatggatgtgttgatggatcagcactttacagaaccaactccaattcagtgccagggtttccgttggctc
ttagtggccgggatatggtgggcattgctcagactggctctgggaagacgttggcgctatctcctgctgcaattggt
catattaaccaccagccatacttggaaaggggagatggcccaatctgtctagtcttggtcctaccagagagccttgc
ccagcaagtacagcaggtggccgatgactatggcaaatgttctagattgaagagtacttgtatttatggaggtgctc
ctaaaggctcccagattccgagacttggaaagaggtgttgagatctgcatagccactccctggacgtctgatagattc
ctggagtcaggaaagacaaatcttcgcgcgatgtacttaccttgtattggacgaagctgacagaatgcttgatatggg
gtttgaaccccagatccgtaaaaattgttgaccaaactcaggcctgataggcagacactgatgtggagtgcacactggc
caaaagaagtaagacagcttgcagaggatttcccttcgtgattacaccagatcaacgtaggcaatctggagttgagt
gccaaccacaacatcctccagatagtggatgtctgcatggaaagtgaanaagaccacaagttgatccaactaatgga
agaaaataatggctgaaaaggaaaacaaaacaataatatttgtggagacaaaagagacgcgtgtgatgatctgactcgaa
ggatgcgcagagatggttggccagctatgtgtatccatggagacaagagtcaaccagaaaagagattgggtacttaat
gagttccgttctggaaaggcacccatccttattgtctacagatgtagcctcccgtgggctagatgtggaagatgtcaa
gtttgtgatcaactatgactatccaaacagctcagaggattatgtgcaccgtattggccgaacagcccgtagcacca
acaagggtaccgcctataccttcttccaccccagggaacctaaaacaggccagagagccttatcaaagtgcgtggaagag
gccaatcaggctatcaatccaaaactgatgcagcttgtggaccacagaggaggcgccggaggcggggggtggtcgttc
tcgttaccggaccacttcttcagccaacaatcccaatctgatgtatcaggatgagtgtagccgaaggcttcgaggag
tcaaggatggtggccggagagactctgcaagctatcgggatcgtagtgaaccgatagagctggttatgctaattggc
agtggctatggaagtccaaattctgcctttggagcacaagcaggcccaatacacctatgggtcaaggcacctatggggc
agctgcttatggcaccagtagctatacagctcaagaatatggtgctggcacttatggagctagtagcacccacctcaa
ctgggagaagttcacagagctctagccagcagtttagtgggataggccggtctgggcagcagccacagccactgatg
tcacaacagtttgacagacctccgggagctaccaatatgataggttacatggggcagactgectaccaataacctcc
tctctctccccctctctctcttcaagtaaatga

[0023] 1-2. 結合親和性を測定する方法

表面プラスモン共鳴アッセイによって、測定することができる。例えば、オートファジー誘導化合物をセンサーチップの金薄膜上に固定した上で、精製したDEAD-box型RNAヘリカーゼタンパク質溶液をセンサーチップの表面に流し、両者の結合状態に応じて変化するSPRシグナルをBIACoreによって測定できる。また、CETSAと呼ばれるサーマルシフトアッセイによって、オートファジー誘導化合物と結合することによる、DEAD-box型RNAヘリカーゼタンパク質の熱安定性変化を検出することによっても測定することができる。

[0024] 1-3. p 62

p 62 は、特異的なタンパク質や細胞小器官（オルガネラ）をオートファジーへと導く受容体タンパク質である。p 62 は、細胞質や核に散在性に局在するが、半減期は 10 時間程度であり、基本的にオートファジー依存的に分解される。p 62 は、N 末端の P h o x 1 および B e m 1 p ドメイン（Phox1 and Bem1p: PB1）、ジンクフィンガー（Zinc finger: ZZ）、T R A F 6 結合モチーフ（TRAF6-binding domain: TB）、L C 3 相互作用領域（LC3-interacting region: LIR、DDDWTHL 配列からなる）、K e a p 1 相互作用領域（Keap1-interacting region: KIR）、および C 末端のユビキチン会合ドメイン（ubiquitin-associated: UBA）といった多数のドメインを有し、L C 3 相互作用領域（L I R）でオートファゴソーム局在タンパク質である L C 3 と相互作用してオートファジーへと導く（非特許文献 13 参照）。p 62 のアミノ酸配列またはそれをコードする S Q S T M 1 遺伝子の核酸配列は、以下の通りある。

[0025] [化5]

p62 アミノ酸配列（配列番号 5）

MASLTVKAYLLGKEDAAREIRRFSFCCSPEPEAEAEAAAAGPGPCERLLSRVAALFPALRPGGFQAHYRDEDGDLVAF
SSDEELTMAMSYVKDDIFRIYIKEKKECRRDHRPPCAQEAPRNMVHPNVICDGCNGPVVGTRYKCSVCPDYDLCSVC
EGKGLHRGHTKLAFPPSPFGHLSEGFSHRWLRKVKHGHFGWPGWEMGPPGNWSPRPPRAGEARPGPTAESASGPSED
PSVNFLKNVGESVAAALSPLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPSSSTEKSSSQPSSCCSDPSKPGGNVEGATQSLA
EQMRKIALESEGRPEEQMESDNCSGGDDWTHLSSKEVDPSTGELQSLQMPSESGPSSLDPSQEGPTGLKEAALYPH
LPPEADPRLIESLSQMLSMGFSDEGGWLTRLQLTKNYDIGAALDTIQYSKHPPPL

[0026]

[化6]

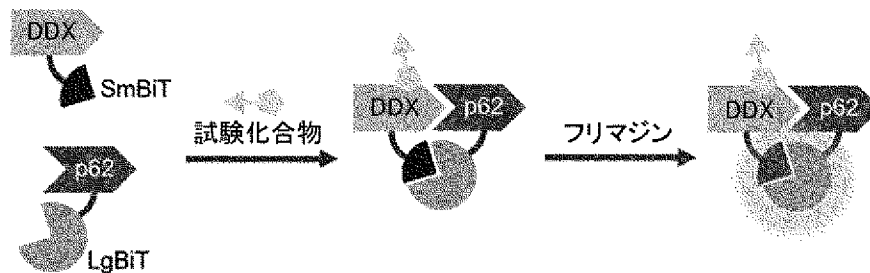
p62 DNA 配列 (配列番号 6)

atggcgtcgtcacccgtgaaggcctaccttctgggcaaggaggacggcgcgagattcgcgcgttcagcttctget
gcagccccgagcctgaggcggaagccgaggctgcgggcggtccgggaccctgcgagcggtgctgagccgggtggccgc
cctgttccccgcgtgcggcctggcggttccaggcgcaactaccgcgatgaggacggggaacttggttgccttttcagt
gacgaggaattgacaatggccatgtcctacgtgaaggatgacatcttccgaatctacattaaagagaaaaagagtgc
ggcgggaccacccgccaccgtgtgtcaggaggcgccccgcaacatggtgcaccccaatgtgatctgcgatggctgcaa
tgggcctgtggttaggaacccgctacaagtgcagcgtctgccagactacgacttgtgtagcgtctgcgagggaaagggc
ttgcacggggggcacaccaagctcgattccccagccccctcgggcaacctgtctgagggttctctgcacagccgctgge
tccggaagggtgaaacacggacacttcgggtggccaggatgggaaatgggtccaccaggaaactggagcccacgtctctc
tctgtagggggagggcccgctggccccacggcagaatcagcttctggtccatcgaggagatccgagtgtgaatttctg
aagaacgttggggagagtggtgcagctgcccttagccctctgggcattgaagttgatctgatgtggagcacggaggga
aaagaagccgctgacccccgtctctccagagagttccagcacagaggagaagagcagctcagaccaagcagctgctg
ctctgacccccagcaagccgggtgggaatgttgaggcgccacgcagctctctggcgagcagatgaggaagatcgcttg
gagtcgagggggcgccctgaggaacagatggagtcggataactgttcaggaggagatgatgactggacccatctgtctt
caaaaagaagtggaccgcttacagggtgaactccagtcctacagatgccagaatccgaaggggccaagctctctggaccc
ctcccaggaggggacccacagggtgaaggaagctgcttgtaccacatctcccgcagaggtgacccgcggctgatt
gagtcctctctccagatgctgtccatgggtctctctgatgaaggcggtggtccaccaggtctctgcagaccaagaact
atgacatcgagcggtcttggaaccatccagtattcaaageatcccccgccgtttag

[0027] 1-4. DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62との相互作用（近接化）を検出する方法

本発明では、DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62との相互作用（近接化）を検出する方法について特に制限はなく、利用可能な方法で実施すればよい。例えば、NanoLuc（登録商標） Binary Technology Assays (NanoBiT（登録商標） Assays) を用いて、以下に示す反応スキームにより実施することができる。

[化7]



(式中、LgBiTは、Large BiTであり、SmBiTは、Small BiTの略称である。)

このアッセイでは、DEAD-box型RNAヘリカーゼとp62に、そ

れぞれルシフェラーゼの一部を構成し、両者で完全となるルシフェラーゼ部分ペプチドを融合した修飾DEAD-b ox型RNAヘリカーゼ（SmBiT-DDX）およびp62（LgBiT-p62）を発現する細胞を準備し、この細胞を試験化合物と接触させた際に、試験化合物がDEAD-b ox型RNAヘリカーゼとp62を近接させるとそれぞれに融合されているルシフェラーゼ部分ペプチドSmBiTおよびLgBiTが会合して、ルシフェラーゼとして活性が復活する。このような状態で、ルシフェラーゼの基質であるフリマジンを追加すると、強い発光が得られ、DEAD-b ox型RNAヘリカーゼとp62の近接（相互作用）を検出できる。

[0028] 1-5. DEAD-b ox型RNAヘリカーゼとp62の液滴形成の検出

本願明細書において「液滴」とは、DEAD-b ox型RNAヘリカーゼおよびこれと会合した化合物、ならびにp62が濃縮され、外部と液-液相分離されている液体様の凝集体である。

このような「液滴」は、DEAD-b ox型RNAヘリカーゼおよび／またはp62を蛍光標識などで標識しておき、これらが存在する系に試験化合物を導入、好ましくは少なくともこれらの何れか一方を発現する細胞を試験化合物で処理し、蛍光顕微鏡などで標識により可視化された物質の存在を観察することで確認できる。また、液体の性質をさらに詳しく確認する目的では、光褪色蛍光回復法（FRAP）と組み合わせることが好ましい。

[0029] 2. 標的細胞内分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する化合物の製造方法

上述のスクリーニング方法で得られた化合物に、リンカーを介して、標的細胞内分子またはオルガネラに特異的に結合するリガンドを連結することで、標的細胞内分子のオートファジーによる分解を誘導する化合物を製造することができる。

[0030] 本明細書において、「標的細胞内分子またはオルガネラ」とは、オートファジーによる分解の標的とする細胞内分子またはオルガネラを意味する。「細胞内分子」とは、少なくともその一部が細胞内に存在する生体分子を意味

し、細胞内に存在する天然の生体分子のみならず、人為的に細胞内に導入または発現させた分子を含む。また、「オルガネラ」は、細胞内に存在する天然のオルガネラ（例えば、機能不全ミトコンドリア）の他、細胞に侵入した外来のウイルス、微生物をも含むものとする。

「細胞内分子」としては、例えば、細胞内に存在する脂質、糖脂質、タンパク質、糖タンパク質等が挙げられ、典型的には細胞内に存在するタンパク質であり、これには、アミロイド β ($A\beta$)、タウタンパク質、 α シヌクレインなどのたんぱく質の凝集体も含まれる。「細胞内分子」が存在する細胞種について特に制限はないが、細胞としては哺乳動物（例、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト）の細胞が好ましく、ヒト細胞が実用上最も念頭に置かれる。細胞内タンパク質としては、病態に関連した細胞内タンパク質（特に、ヒトの病態に関連した細胞内タンパク質）が実用的な標的として挙げられ、多数の報告がなされている。そのような病態に関連した細胞内タンパク質は、例えば、UniProtや、Human Protein Atlasで確認することができ、ごく一部の例として、 $A\beta$ 、タウタンパク質、 α シヌクレインまたはこれらの凝集体（アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患に関与）、BRD4（多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病などに関与）、Ras（大腸癌、膵臓癌などに関与）、カルシニューリン、Cyp、FRB、FKBP、PyL、ABI1、GID1、GA1、FKBP F36V、IAA17 TIR1、EGFR、BTKが挙げられる（B. Z. Stantonら Science; 359; eaa05902 (2018)、N. Shindoら Bioorg. Med. Chem; 47: 116386 (2021) などに記載されており、参照にその内容を本書に組み込む）。

また、細胞内分子は、例えば、ハロタグ（登録商標）、SNAPタグ（登録商標）、CLIPタグ（登録商標）などのタグ化技術により、任意の標的細胞内分子またはオルガネラに所定のタグを融合して、後述するリガンドの結合が可能となる細胞内タンパク質が含まれる。ハロタグ（登録商標）と融

合した細胞内タンパク質は、*Rhodococcus rhodochrous* 由来脱ハロゲン化酵素 Dha A の F 2 7 2 H 変異体を有するタグが融合され、SNAP タグ（登録商標）と融合した細胞内タンパク質は、ヒト由来 O⁶-アルキルグアニン-DNA アルキルトランスフェラーゼ h A T G 変異体を有するタグが融合され、CLIP タグ（登録商標）と融合した細胞内タンパク質は、SNAP タグタンパク質の E 3 0 R 変異体を有するタグが融合される。これらは、例えば、Halo SNAP CLIP for Protein Labeling - Bitesize Bio に概説されており、参照によりその内容を本書に取り込む。

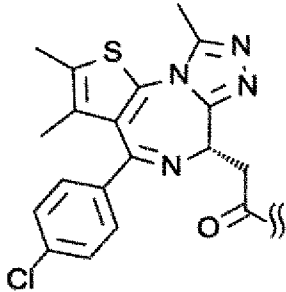
また、変異 FKBP でタグ化した α シヌクレインまたはこの凝集体などの変異 FKBP でタグ化した細胞内タンパク質もオートファジーのために標的化した細胞内分子となり得る。

[0031] 本明細書中、「細胞内分子またはオルガネラに特異的に結合するリガンド」とは、標的細胞内分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する化合物の一部を構成し、標的細胞内分子（これには、上記タグ化された融合タンパク質を含む）またはオルガネラへの特異的な結合活性を有する構造単位を意味する。従って、リガンドを構成する物質は、細胞内分子またはオルガネラへの特異的な結合活性を有する物質であり、このような物質についても多数の報告がある。例えば、BindingDB (<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>) で確認することができ、ごく一部の例として、例えば、FK506（カルシニューリン）、シクロスポリンA（カルシニューリン、CyP）、FKCsA（CyP、FKBP）、ラパマイシン（FRB、FKBP）、FK1012（FKBP）、アブシジン酸（PyI、ABI1）、ジベレリン3（GID1、GA1）、AP1903/AP20187（FKBP F36V）、Auxin（IAA17 TIR1）、アフチニブ（EGFR）、オシメルチニブ（EGFR）、ダコミチニブ（EGFR）、ネラチニブ（EGFR）、ソトラシブ（EGFR）、イブルチニブ（BTK）、アカラブルチニブ（BTK）、ザヌブルチニブ（BTK）、

チラブルチニブ（BTK）、アダグラシブ（BTK）が挙げられる（カッコ内は結合対象を示す）。

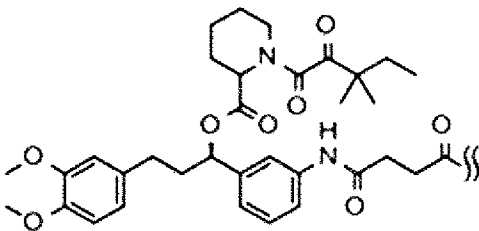
[0032] また、BRD4に対するリガンドとしては、例えば

[化8]



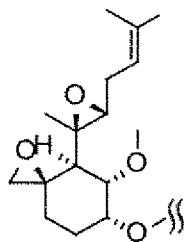
が挙げられ、FKBP12に対するリガンドとしては、例えば

[化9]



が挙げられ、MetAP2に対するリガンドとしては、例えば

[化10]

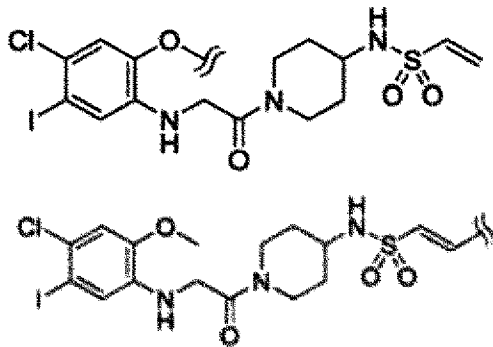


が挙げられる。

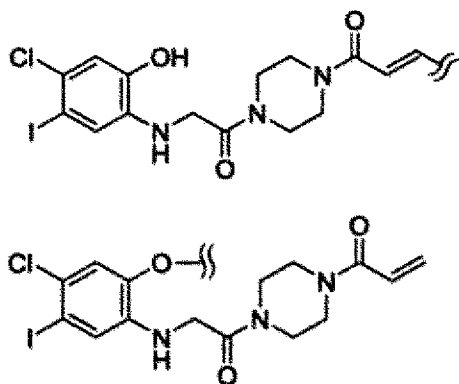
[0033] Rasに対するリガンド化合物としては、例えば、以下の文献に記載されたりガンドが挙げられる；Nature, 2013, 503, 548-551；国際公開2013/155223号；Science, 2016, 351, 604-608；国際公開W02014152588号；国際公開2015/054572号；国際公開2016/049524号；Nat. Rev. Drug Discov., 2014, 13, 828-851；Chem. Soc. Rev., 2016, advance article (DOI: 10.1039/C5CS00

911A)。従って、R a s に対するリガンドは、これらの化合物により構成することができる。R a s に対するリガンドとしては、例えば、

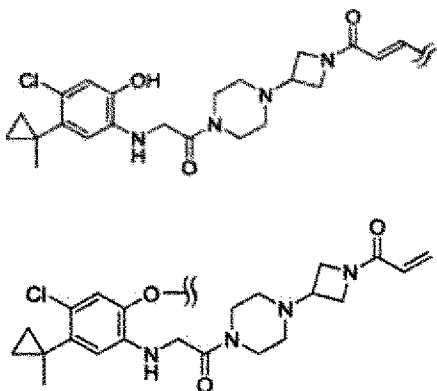
[化11]



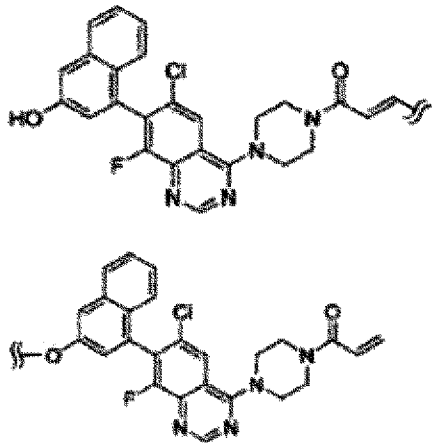
[化12]



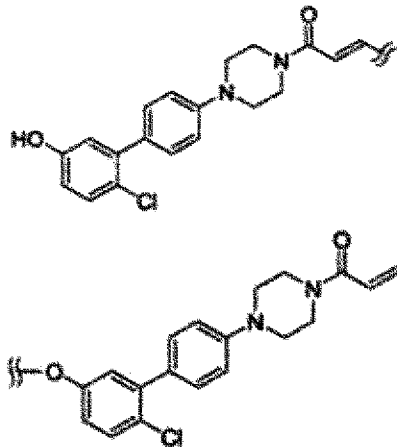
[化13]



[化14]



[化15]



が挙げられる。

[0034] ハロタグ（登録商標）を融合した細胞内タンパク質に対するリガンドとしては、例えば、ハロゲン化 C_{1-12} アルコキシ基（特に、末端の炭素がハロゲン化された C_{1-6} アルコキシ基）が挙げられ、好ましくはハロゲン化された（特に、末端の炭素がハロゲン化された）ヘキシルオキシ基（特に、塩素化ヘキシルオキシ基）である。

SNA Pタグ（登録商標）を融合した細胞内タンパク質に対するリガンドとしては、例えば、 O^6 -ベンジルグアニンが挙げられる。

CLIPタグ（登録商標）を融合した細胞内タンパク質に対するリガンドとしては、例えば、 O^6 -ベンジルシトシンが挙げられる。

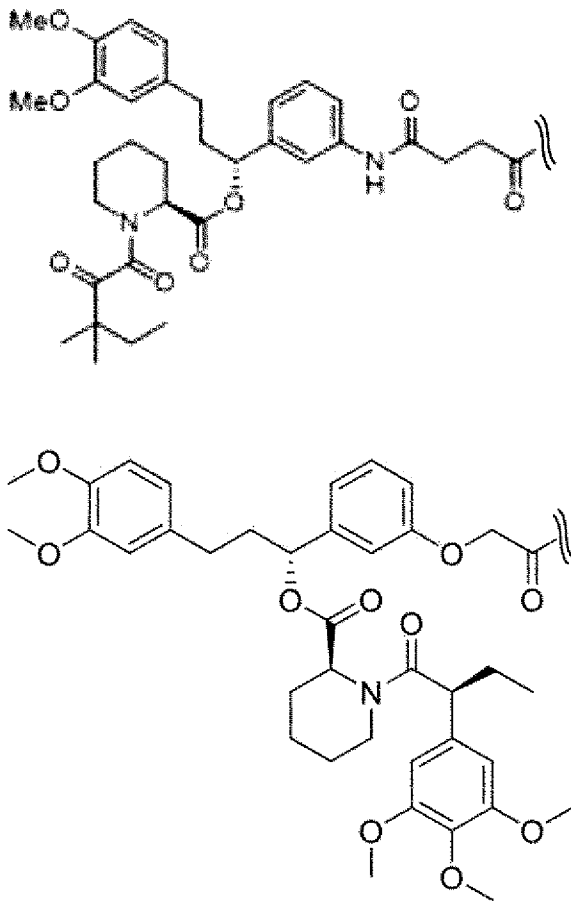
なお、タグを融合した細胞内タンパク質に対するリガンドについては、H

also SNAP CLIP for Protein Labeling

— Bitesize Bioに概説されており、参照によりその内容を本書に取り込む。

[0035] また、変異FKBPでタグ化した α シヌクレインまたはこの凝集体などの変異FKBPでタグ化した標的細胞内分子に対するリガンドとしては、例えば、

[化16]



を挙げることができる。

[0036] 本明細書中、「リンカー」とは、本発明の化合物における「リガンド」の部分とオートファジーを誘導するタグ部分とを連結する原子団を意味する。リンカー構造は、異なる機能を有する分子を連結する際に利用される既知のリンカー構造を利用することができる。また、特許7161760号ならびに非特許文献5、9および10には、細胞内分子とオートファジーを誘導す

るタグ部分とを連結するリンカーの構造について詳細に記載されており、これら文献に記載する構造を利用すればよい。

[0037] また、「リンカー」と「リガンド」およびタグ部分との連結も公知の反応を利用して実施することができる。例えば、特許7161760号；非特許文献5、9および10；第5版実験化学講座、13巻～19巻（日本化学会編）；新実験化学講座、14巻～15巻（日本化学会編）；精密有機化学改定第2版（L. F. Tietze, Th. Eicher、南江堂）；改訂 有機人名反応 そのしくみとポイント（東郷秀雄著、講談社）；ORGANIC SYNTHESSES Collective Volume I～VII（John Wiley & Sons Inc）；Modern Organic Synthesis in the Laboratory A Collection of Standard Experimental Procedures（Jie Jack Li著、OXFORD UNIVERSITY出版）；Comprehensive Heterocyclic Chemistry III、Vol. 1～Vol. 14（エルゼビア・ジャパン株式会社）；人名反応に学ぶ有機合成戦略（富岡清監訳、化学同人発行）；コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ（VCH Publishers Inc.）1989年刊、Wiley-Interscience社2007年刊「Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Ed.」（Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts著）；Thieme社2004年刊「Protecting Groups 3rd Ed.」（P. J. Kocienski著）などに記載された方法に準じて行うことができる。これら文献の内容は参照により本書に組み込む。

利用される反応としては、官能基の保護または脱保護反応、還元反応、酸化反応、芳香族求核置換反応、アルコール類、アルキルハライド類、スルホン酸エステル類のアジド化反応、還元的アミノ化反応、光延反応、エステル

化反応、アミド化反応、あるいはウレア化反応、カップリング反応、Wohl-Ziegler反応、スルホンエステル化反応、加水分解反応、臭素化反応、N-アルキル化反応、ジアゾ化を経由する水酸化反応、脱アミノ化反応、環化反応、カーバメート化反応、一酸化炭素挿入反応により行うアミド化、エステル化、クリック反応などがあるが、これらの反応に必要な試薬、反応条件は、本発明は属する技術分野の当業者に周知である。

[0038] 上記の製造方法で得られた化合物は、標的分子またはオルガネラに特異的に結合するリガンドと、オートファジーを誘導するタグ部分とがリンカーを介して連結されており、標的分子またはオルガネラに応じてこれらに結合するリガンドを置き換えることで、幅広い基質をターゲットにできる利点がある。

[0039] p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼと接触し得る状態で、上記の製造方法で得られた化合物で細胞を処理すると、リガンドに標的分子またはオルガネラが結合した状態でオートファジーが誘導され、標的分子またはオルガネラをオートファジーにより分解することができる。上記の製造方法で得られた化合物を、細胞内で、p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼと接触させると、当該化合物、標的分子またはオルガネラ、p62およびDEAD-box型RNAヘリカーゼを含む液滴が形成される。これによって、隔離膜が伸長して液滴を取り囲んだオートファゴソームが形成され、生じたオートファゴソームがエンドソームないしはリソソームと融合し内容物を消化する。

[0040] このため、本発明の化合物は、標的とする細胞内分子またはオルガネラが関与する疾患の予防または治療剤として有用である。特に、本発明の化合物は、AUTACに基づくその作用機序に照らして、標的となる細胞内分子またはオルガネラが関与するあらゆる疾患の予防または治療に有効で有り得る。中でも、癌、炎症性疾患、自己免疫性疾患、および骨・関節変性疾患の治療又は予防への応用が期待される。

実施例

[0041] 本発明は、更に以下の実施例、試験例および製剤例によって詳しく説明されるが、これらは本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

[0042] 1. DDX5とp62の相互作用（近接化）を誘導する化合物のスクリーニング法の構築

本発明者らが開発した標的細胞内分子をオートファジーにより分解するいくつかの化合物またはそのタグ部分（特許7161760号参照）が、DDX5とp62の相互作用を誘導するかNanoBiTシステムを用いて測定した。このシステムでは、試験化合物がDDX5とp62との相互作用を誘導した場合には、発光強度が増大して、そのような活性を有する化合物の存在を検出することができる。

[0043] 1-1. 試験材料

pLgBiT-p62およびpSmBiT-DDX5の作製

pLgBiT-p62を生成するために、pBiT1.1-N [TK/LgBiT] Vector (Promega #N2014)をオリゴプライマー(5'-gcctccacctgctc-3' および 5'-gctagcagatcttagagtcgg-3')を用いてポリメラーゼチェーン反応により線形化した。オリゴ(dT)₁₅プライマーを用いてHeLa細胞のtotal RNAからp62 cDNAを合成し、オリゴプライマー(5'-agcggtaggcattggcgtcgctcaccg-3' と 5'-agaagatctgctagtagacaacggcgggatgc-3')を用いて増幅し、In-fusion cloning systemでベクターに挿入した（下線15ntはIn-fusionアーム）。

pSmBiT-DDX5を生成するために、pBiT2.1-N [TK/SmBiT] Vector (Promega #N2014)をオリゴプライマー(5'-ggtagcatttaccaacagtaccg-3' と 5'-gctagcagatcttctagtcgg-3')を用いてポリメラーゼチェーン反応により直線化した。DDX5 cDNAは、HeLa細胞total RNAからオリゴ(dT)₁₅プライマーを用いて合成し、オリゴプライマー(5'-agcggtaggcattggcgtcgggattcgagtgaccg-3' と 5'-agaagatctgctagcttattgggaatcctgttggcattg-3')を用いて増幅し、In-fusion cloning system（下線15ntはIn-fusion arm

) でベクターに挿入した。

[0044] 以下に各ベクターが担持する p L g B i T - p 6 2 および p S m B i T - D D X 5 の核酸配列を示す。

[化17]

pLgBiT-p62 の核酸配列 (配列番号 1 5)

ggcctaactggccggtacctgagttctaaatgagttcttcggacctcgcgggggcccgttaagcgggtggttagggtttgtctga
cgcggggggaggagggaaggaacgaaacactctcattcggaggcggtcgcgggtttggtcttggtggccacgggcacgcagaa
gagcgcgcgatcctcttaagcaccceccgcctccgtggaggcgggggtttggtcggcggtggttaactggcgggcccgt
gactcggcggttcgcgcgcacagagtgtagcttttcggtctgctcgcagaccccgggcggtcgcgcgcggcggtgac
gggtcgcgtgggtcctaggtccatggggaccgtatacgtggacaggtcttgagcatccgcacgactgcggtgatattacc
ggagaccttctgcgggacgagccgggtcacgcggtgacgcggagcgtccgttggcgacaaaacaccaggacggggcacagg
tacactatcttgtcacccggaggcgcgagggaactgcaggagcttcaggagtggtgcgcagctgcttcaccccggtggccggt
gctcgcgtttgctggcggtgtcccggaagaaatataattgcatgtctttagttctatgatgacacaaaccccgccagcgt
cttgtcattggcgaagtgcgaacgcagatgcagtcggggcggtcgcgggtccaggtccacttcgcataattaagtgacgcgt
gtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagcgaccgcttaaaagcttggcaatccggtactgttggttaaagccaccatggtc
ttcacactcgaagatttctgtgggactgggaacagacgcgcctacaacctggaccaagtccttgaacaggaggtgtgt
ccagtttgcgtgcagaatctcgcggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtccggagcggtgaaaatgcctcgaagatcga
catccatgtcatcaccggtatgaaggtctgagcgcgcac

[0045] [化18]

pSmBiT-DDX5 の核酸配列 (配列番号 1 6)

ggcctaactggccggtacctgagttctaaatgagttcttcggacctcgcgggggcccgttaagcgggtggttagggtttgtctga
cgcggggggaggagggaaggaacgaaacactctcattcggaggcggtcgcgggtttggtcttggtggccacgggcacgcagaa
gagcgcgcgatcctcttaagcaccceccgcctccgtggaggcgggggtttggtcggcggtggttaactggcgggcccgt
gactcggcggttcgcgcgcacagagtgtagcttttcggtctgctcgcagaccccgggcggtcgcgcgcggcggtgac
gggtcgcgtgggtcctaggtccatggggaccgtatacgtggacaggtcttgagcatccgcacgactgcggtgatattacc
ggagaccttctgcgggacgagccgggtcacgcggtgacgcggagcgtccgttggcgacaaaacaccaggacggggcacagg
tacactatcttgtcacccggaggcgcgagggaactgcaggagcttcaggagtggtgcgcagctgcttcaccccggtggccggt
gctcgcgtttgctggcggtgtcccggaagaaatataattgcatgtctttagttctatgatgacacaaaccccgccagcgt
cttgtcattggcgaagtgcgaacgcagatgcagtcggggcggtcgcgggtccaggtccacttcgcataattaagtgacgcgt
gtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagcgaccgcttaaaagcttggcaatccggtactgttggttaaagccaccatggtg
accggtaccggtgttcgaggagattctcgggagttccggtggtggcgggagcggaggtggaggcatgtcgggttatcga
gtgaccgagacgcgcggcggaacgagggtttggtgcacctcgatttggaggaagtagggcagggcccttatctggaaagaa
gtttggaaacctggggagaaattagttaaaaagaagtgg

[0046] リソースおよび試薬

HeLa細胞: 理研BRC細胞バンク #RCB0007

DMEM: 富士フィルム和光 #043-30085

FBS: Thermo Fisher Scientific #10437028

非必須アミノ酸: 富士フィルム・和光 #139-15651

Opti-MEM I: Thermo Fisher Scientific #11058-021

96ウェルカルチャープレート。Promega #E5650

Lipofectamine3000 transfection reagent: Thermo Fisher Scientific #L3000008

Nano-Glo (登録商標) Live Cell Reagent: Promega #N2014

GloMax Discover Microplate Reader: Promega #GM3000

PrimeSTAR Max DNA polymerase: TaKaRa #R045A

TRIzol reagent (for total RNA extraction): Thermo Fisher Scientific #15596026

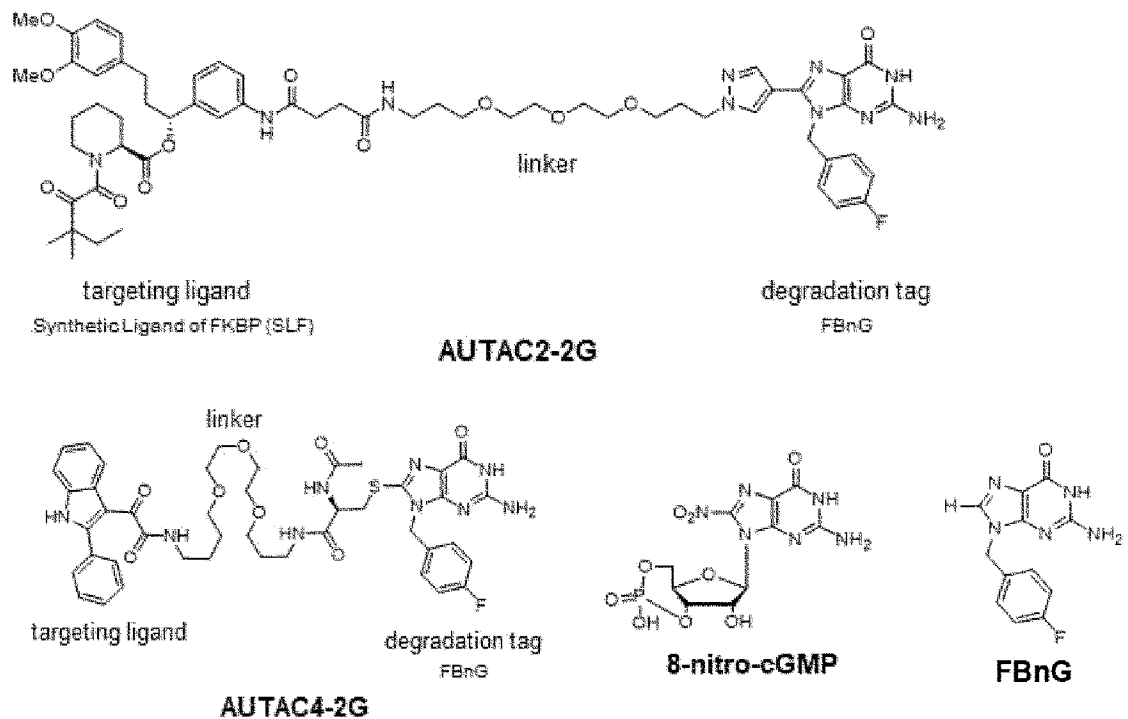
PrimeScript (商標) RT reagent Kit (for cDNA synthesis): TaKaRa #RR037A

In-Fusion HD Cloning Kit: TaKaRa #Z9649N

[0047] 試験化合物

本発明のスクリーニング方法を検証するために以下の化合物を用いた。

[化19]

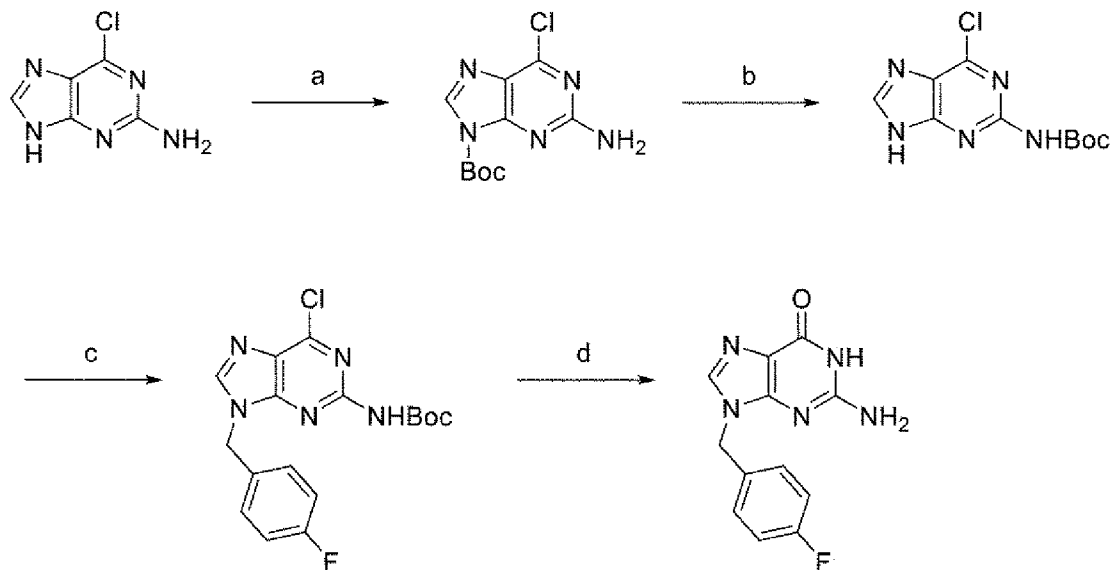


AUTAC4-2G、および8-ニトロ-cGMPは、特許7161760号に開示されている化合物およびそのタグ部分であり、AUTAC2-2G、およびFBnGは、本発明の方法でスクリーニングされた化合物が実際

にオートファジーを誘導するかを検証するために新たに合成した化合物およびそのタグ部分である（F B n GおよびA U T A C 2 - 2 Gの合成スキームは以下の通り）。

[0048] F B n Gの合成スキーム

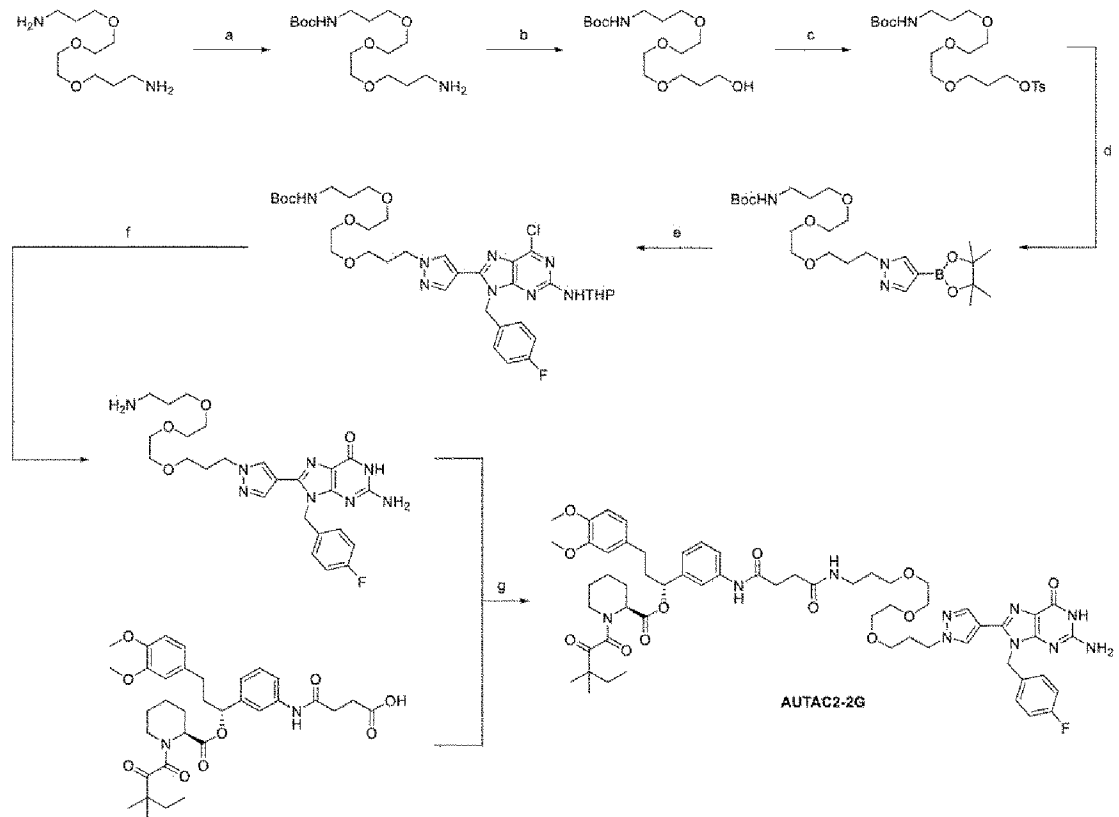
[化20]



(a) Boc₂O, DMAP, DMSO, rt, 12 h; (b) NaH, THF, 0 ° C, 1 h, 62% (2 steps); (c) 4-fluorobenzyl alcohol, DEAD, PPh₃, THF, rt, 3 h, 72%; (d) 80% HCO₂H, 80 ° C, 16 h, 83%.

[0049] A U T A C 2 - 2 Gの合成スキーム

[化21]



(a) Boc_2O , CH_2Cl_2 , rt, 3 h; (b) NaNO_2 , 20% CH_3COOH , rt, 3 h, 40%; (c) TsCl, $(\text{CH}_3)_3\text{N} \cdot \text{HCl}$, NEt_3 , CH_2Cl_2 , rt, 2 h, 96%; (d) 4-pyrazoleboronic acid pinacol ester, K_2CO_3 , DMF, 75 ° C, overnight, 71%; (e) 6-chloro-9-(4-fluorobenzyl)-8-iodo-N-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-2-amine, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , 66% N,N'-dimethylethyleneurea, 120 ° C, 2 h, 61%; (f) 80% HCOOH , 80 ° C, overnight, 85%; (g) PyBOP, DIPEA, rt, 18 h, 33%.

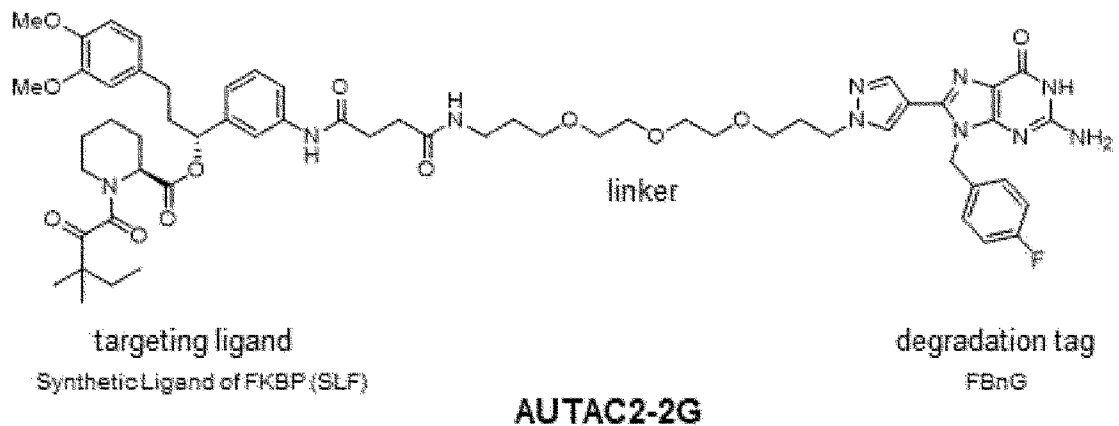
[0050] 1-2. 試験手順

[実施例1]

成長培地を入れた96ウェルプレートで増殖したHeLa細胞に、Lipofectamine3000（登録商標）トランスフェクション試薬（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いて、添付書類の記載に従って、pLgBiT-p62とpSmBiT-DDX5をトランスフェクションした。試薬を添加して24時間経過した後、ウェルにAUTAC2-2Gを10 μM の濃度となる量添加

して12時間トランスフェクションした細胞をAUTAC2-2Gで処理した。その後、成長培地を、100 μ LのOpti-MEM（登録商標）I（Thermo Fisher Scientific Inc.）に交換した。基質フリマジンを含む5x Nano-Glo Live Cell Reagentを25 μ L添加し、直ちにGloMax（登録商標）Discover Microplate Reader（Promega Corporation）でルミネッセンスを測定した。

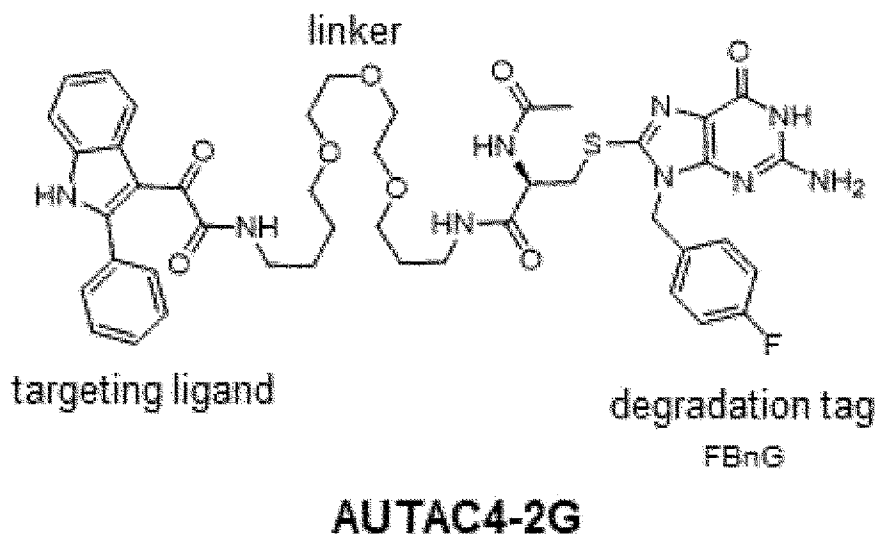
[化22]



[0051] [実施例2]

ウェルにAUTAC4-2Gを10 μ Mの濃度となる量添加して12時間トランスフェクションした細胞をAUTAC4-2Gで処理した以外は、実施例1と同様にして、細胞を処理してルミネッセンスを測定した。

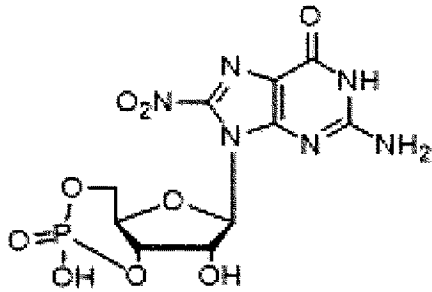
[化23]



[0052] [実施例 3]

ウェルに 8-ニトロ-cGMP を $10\ \mu\text{M}$ の濃度となる量添加し、24 時間トランスフェクションした細胞を 8-ニトロ-cGMP で処理した以外は、実施例 1 と同様にして、細胞を処理してルミネッセンスを測定した。

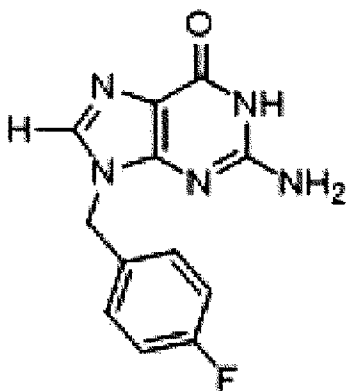
[化24]

**8-nitro-cGMP**

[0053] [実施例 4]

ウェルに FBnG を $10\ \mu\text{M}$ の濃度となる量添加し、24 時間トランスフェクションした細胞を FBnG で処理した以外は、実施例 1 と同様にして、細胞を処理してルミネッセンスを測定した。

[化25]

**FBnG**

[0054] [比較例 1]

ウェルに DMSO（ジメチルスルホキシド）を $10\ \mu\text{M}$ の濃度となる量添加し、24 時間トランスフェクションした細胞を DMSO で処理した以外は、実施例 1 と同様にして、細胞を処理してルミネッセンスを測定した。

[0055] 1-3. 測定結果

図1に、実施例1乃至4においてルミネッセンスの測定開始から10分後の発光量を示す。データは、3回の独立した実験からの平均値で示す。グラフは、107を上限に示しており、実際には、それ以上の発光量を示した。エラーバーは標準偏差を示す。統計解析は、Turkey-Kramer多重比較検定を用いて行った。P値<0.01は統計的に有意であるとみなした。

AUTAC2-2G、AUTAC4-2G、8-ニトロ-cGMP、およびFBnGで処理した細胞で、DMSOで処理した細胞に比べ、千倍以上の発光量を示し、これらの化合物の存在で、p62とDDX5が近接したことが実証され、この方法を用いることでp62とDDX5を近接させる化合物をスクリーニングできることが示された。

[0056] 2. スクリーニングされた試験化合物のオートファジー誘導作用の検証

本発明のスクリーニング方法の有効性を実証するために、本発明者らが今回新たに合成した化合物AUTAC2-2Gで、FKBP12でトランスフェクトした細胞を処理してFKBP12を分解し得るか試験した。

[0057] 2-1. pEGFP-FKBP12の調製

pEGFP-FKBP12を作製するために、pEGFP-HaloTag [Takahashi et al., Mol. Cell 76 797-810.e10 (2019)]を、オリゴプライマー(5'-cgcaaactctagacttgtacagctcgtcc-3' および 5'-ggccgcttcgagcagatg-3')を用いてポリメラーゼチェーン反応により線形化した。FKBP12のcDNAは、HeLa細胞total RNAからオリゴ(dT)₁₅プライマーを用いて合成し、オリゴプライマー(5'-aagtctagatttgcgatgggagtgca ggtgg-3' と 5'-ctgctcgaagcggcctcattccagttagaagc-3')で増幅し、Infusion cloning systemでベクターに挿入した(下線15 ntはInfusion arm)。

[0058]

[化26]

pEGFP-FKBP12のコード配列は以下の通り（配列番号20）。

```
tcaatattggccattagccatattattcattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttgat  
ctatatcataaatgtacatttatattggtcatgtccaatatgaccgcatgttggcattgattattgactagtattaat  
agtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccggttacataacttaaggtaaattggccgctgg  
ctgaccgccccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattga  
cgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctattg  
acgtcaatgacggtaaattggccgctggcattatgccagtagcatgaccttaagggaactttcctacttggcagtagcat  
cgtatttagtcacgtattaccatgggtgatgcggttttggcagtagcaccaatggcggtggatagcggtttgactcagggga  
tttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaatcaacgggaactttccaaatgtcgtaata  
accccgccccgttgacgcaaatggcggttagcggtgtacggtgggaggtctatataagcagagctgggttagtgaaccgtca  
gatcactagaagctttattgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcagtgctctgacacacagtcctcgaac  
ttaagctgcagaagttggctgtaggcactgggcaggtaagtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaac  
tgggcttgcgcagacagagaagactcttgcgcttctgataggcacctattggtcttactgacatccactttgcctttctctc  
cacaggtgtccactccagttcaattacagctcttaaggc
```

[0059] 2-2. リソースと試薬

HeLa細胞: 理研BRC細胞バンク #RCB0007

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): 富士フィルム和光 #043-30085

FBS: Thermo Fisher Scientific #10437028

非必須アミノ酸: 富士フィルム・和光 #139-15651

Opti-MEM I: Thermo Fisher Scientific #11058-021

96ウェル培養プレート: Thermo Fisher Scientific #165305

Lipofectamine3000 transfection reagent: サーマフィッシャーサイエンティ
フィック #L3000008

ライブセルイメージング溶液: Thermo Fisher Scientific #A14291DJ

蛍光顕微鏡: キーエンス #BZ-X800

PrimeSTAR Max DNA polymerase: TaKaRa #R045A

TRIzol reagent (for total RNA extraction): Thermo Fisher Scientific #
15596026

PrimeScript (商標) RT reagent Kit (for cDNA synthesis): TaKaRa #RR037
A

In-Fusion HD Cloning Kit: TaKaRa #Z9649N

[0060] 2-3. 試験手順

[実施例 5]

HeLa細胞を96ウェルプレート上で増殖させ、Lipofectamine 3000トランスフェクション試薬を用いてpEGFP-FKBP12でトランスフェクトした。24時間後、トランスフェクトされた細胞を、0.01mMのAUTAC2-2Gを含む新鮮なDMEM中、並びに比較対照としてDMSOを含む新鮮なDMEM中でさらに24時間インキュベートした。その後、培地を除去し、100 μ Lのライブセルイメージング溶液に置き換えた。EGFP-FKBP12レベルは、EGFP蛍光を測定することによって分析された。

[0061] [実施例 6]

トランスフェクトされた細胞を、0.1mMのAUTAC2-2Gを含む新鮮なDMEM中でさらに24時間インキュベートした以外は、実施例5と同様にして細胞を処理してEGFP蛍光を測定した。

[0062] [実施例 7]

トランスフェクトされた細胞を、1mMのAUTAC2-2Gを含む新鮮なDMEM中でさらに24時間インキュベートした以外は、実施例5と同様にして細胞を処理してEGFP蛍光を測定した。

[0063] [実施例 8]

トランスフェクトされた細胞を、10mMのAUTAC2-2Gを含む新鮮なDMEM中でさらに24時間インキュベートした以外は、実施例5と同様にして細胞を処理してEGFP蛍光を測定した。

[0064] [比較例 2]

トランスフェクトされた細胞を、DMSOを含む新鮮なDMEM中でさらに24時間インキュベートした以外は、実施例5と同様にして細胞を処理してEGFP蛍光を測定した。

[0065] 2-4. 測定結果

図2は、各条件でのEGFP蛍光レベルを示す。各数値は3つの独立した実験からの平均EGFP蛍光レベルを示す。同じ文字が添えられていないデ

ータは、Turkey-Kramer 多重比較検定を用いて統計的に有意である。P 値<0.01 は統計的に有意とみなされた。データは、DMSO コントロールの平均値に対して正規化した。

AUTAC2-2G を含む培地中で pEGFP-FKBP12 でトランスフェクトされた細胞を培養すると、AUTAC2-2G 濃度依存的に、蛍光レベルが減少し、AUTAC2-2G がオートファジーによる FKBP12 の分解を誘導していることが確認された。従って、本発明のスクリーニング方法によれば、オートファジーを誘導する新規化合物を探索可能である。

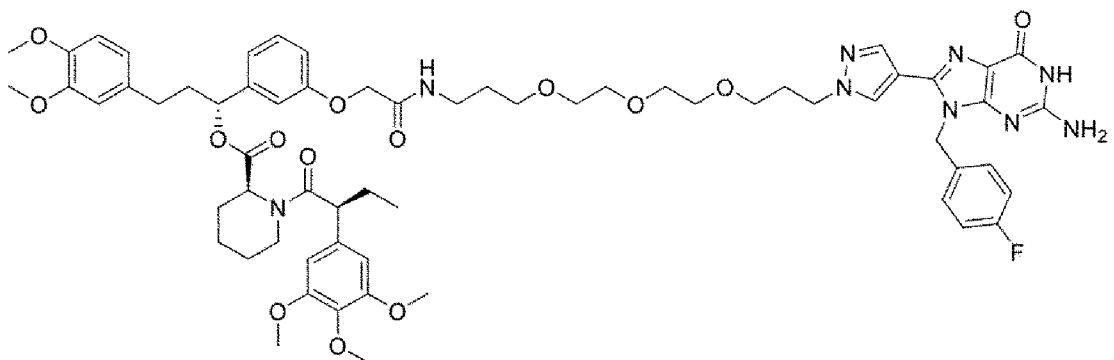
[0066] 3. DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼおよび p62 を含む液滴の形成の測定

[実施例 9]

新たに合成し、オートファジーによりシヌクレインを分解することを確認した化合物 SLF'-AUTAC を用いて、DDX5 および p62 を含む液滴の形成を誘導するかを試験した (SLF'-AUTAC の構造および合成スキームならびにシヌクレイン分解試験の概要は以下の通り)。

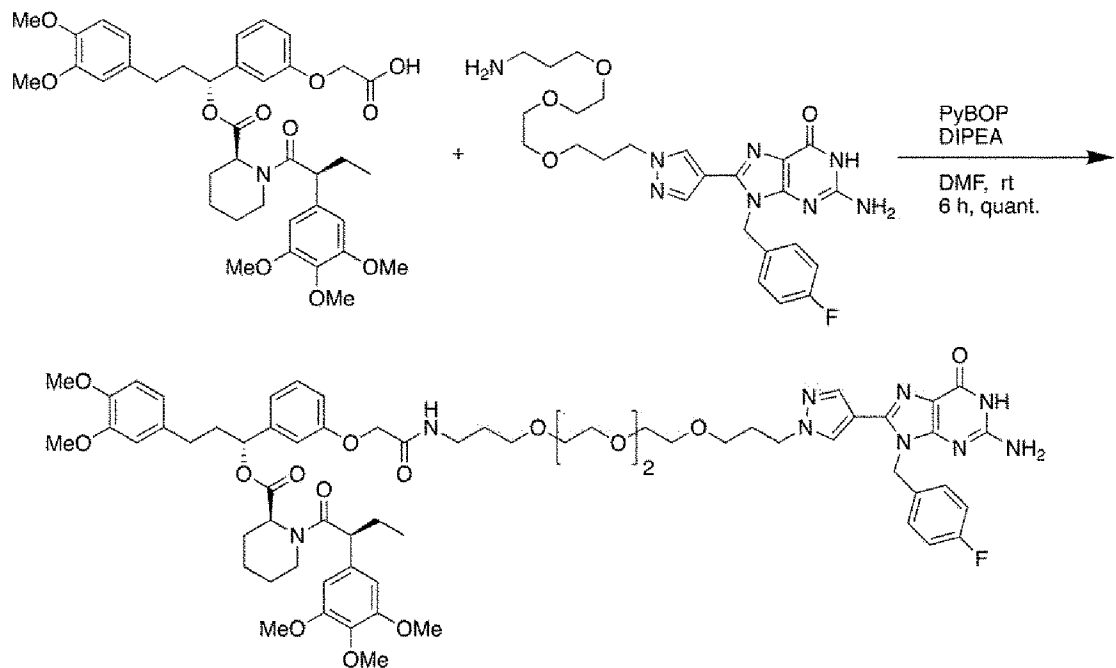
[0067] SLF'-AUTAC の構造式

[化27]



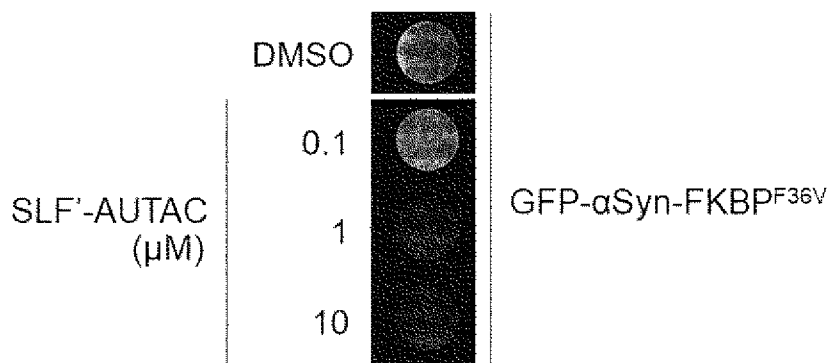
[0068] SLF'-AUTAC の合成スキーム

[化28]



[0069] SLF' -AUTACによる変異FKBPタグ化シヌクレイン分解試験の概要

[化29]



変異FKBPでタグ化したGFP- α -シヌクレイン (GFP- α Syn-FKBP^{F36V}) が一過性発現したHeLa細胞をSLF' -AUTACで48時間処理した。非処理細胞のウェル、処理細胞のウェルそれぞれにおいて、GFP蛍光を蛍光顕微鏡で撮影した。GFP蛍光強度からGFP- α Syn-FKBP^{F36V}の分解を評価した。上図から、1 μ M、10 μ MのSLF' -AUTAC処理細胞では、非処理群 (DMSO) と比較して、GFP- α Syn-FKBP^{F36V}の分解が認められた。

[0070] 試験手順

変異FKBPでタグ化したGFP（GFP-FKBP^{F36V}）を一過性発現するHeLa細胞を、1 μ MのSLF'-AUTACで12時間処理した。処理後の細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定してから、0.1%Triton X-100/PBSで浸透化し、1%BSA/PBSでブロッキングし、ウサギ由来抗DDX5抗体とマウス由来抗p62抗体をそれぞれ1%ずつ含むPBSに浸けて一晩4℃でインキュベートした。その後、Alexa Fluor 555標識抗ウサギIgGとAlexa Fluor 555標識抗マウスIgGをそれぞれ1%ずつ含むPBSに浸けて1時間室温でインキュベートした。免疫染色後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

[0071] 試験結果

図3に蛍光顕微鏡で観察したイメージを示す（スケールバー：10 μ m）。

FBnG構造を含むSLF'-AUTACをHeLa細胞に添加することによって、細胞内でDDX5とp62が液滴を形成したことが観察された。この実験では、SLF'-AUTACで処理後に細胞を固定化してからDDX5およびp62を観察しており、DDX5とp62が、細胞内の同一位置に観測されていることから、両者が同一の液滴に存在することが証明された。

[0072] [実施例10]

AUTAC2-2Gを用いて、DDX5およびp62を含む液滴の形成を誘導するかを試験した。

[0073] 試験手順

GFP-FKBP12およびRFP-DDX5、またはGFP-FKBP12およびRFP-p62を一過性発現したHeLa細胞を、10 μ Mの濃度となるようにAUTAC2-2Gを添加して13時間細胞を処理した。処理した細胞を蛍光顕微鏡により生細胞観察し、GFPおよびRFPに由来する蛍光を継続的に観察した。途中、観察開始5分後に5% 1, 6-ヘキサソールを添加して、視野にあるドット状の構造が消失するかを観察した。

。

1, 6-ヘキサンジオールは、液滴を解消する作用が知られており、これにより、顕微鏡の視野にあるドット状の構造が液滴であることを確認することが可能となる。

[0074] 試験結果

図4に蛍光顕微鏡で観察したイメージを示す（スケールバー：10 μ m）。図4Aが、GFP-FKBP12およびRFP-DDX5を一過性発現したHeLa細胞をAUTAC2-2Gで処理した場合の蛍光顕微鏡で観察したイメージであり、図4Bが、GFP-FKBP12およびRFP-p62を一過性発現したHeLa細胞をAUTAC2-2Gで処理した場合の蛍光顕微鏡で観察したイメージである。

それぞれのHeLa細胞で、GFP-FKBP12およびRFP-DDX5を含む液滴、およびGFP-FKBP12およびRFP-p62を含むドット状の構造が観察された。この構造は、1, 6-ヘキサンジオール添加後に消失したことから液滴であることが確認された。

請求の範囲

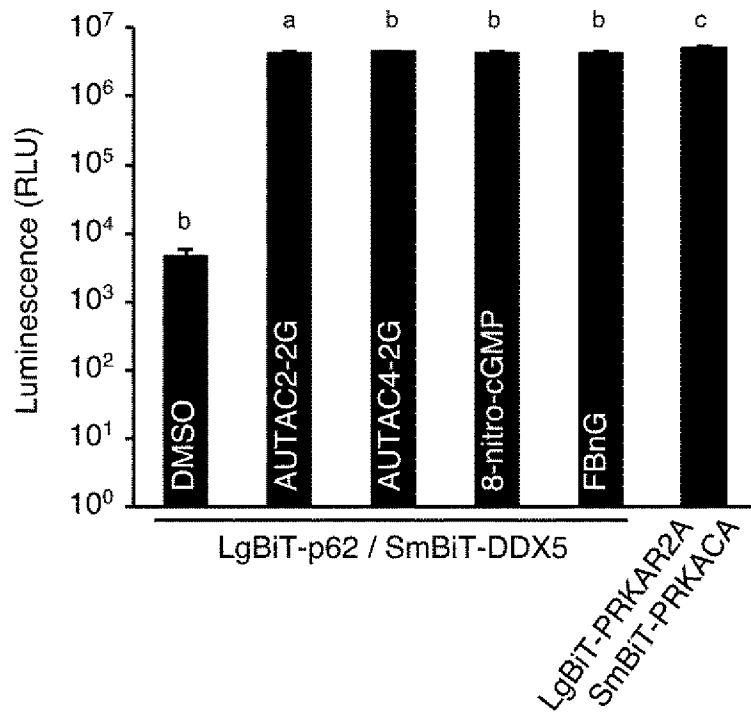
- [請求項1] D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼに試験化合物を接触させ、前記 D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼに対する前記試験化合物の結合親和性を測定し、
- 所定値以上の結合親和性を有する化合物を選択する、
- オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法。
- [請求項2] p 6 2 の存在下で、D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼに試験化合物を接触させ、
- 前記 D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼと前記 p 6 2 の相互作用を測定し、
- 前記相互作用を誘導した化合物を選択する、
- オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法。
- [請求項3] 前記 D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼおよび前記 p 6 2 を、細胞内で発現し、前記細胞に前記試験化合物を接触させる、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項4] p 6 2、および D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼの存在下で、試験化合物を導入し、
- 前記 D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼおよび前記 p 6 2 を含む液滴の形成を測定し、
- 前記液滴形成を誘導した化合物を選択する、
- オートファジー誘導化合物をスクリーニングする方法。
- [請求項5] 前記 D E A D－b o x 型 R N A ヘリカーゼは、D D X 5 または D D X 1 7 である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項6] 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた化合物に、リンカーを介して、標的細胞内分子またはオルガネラに特異的に結合するリガンドを連結する、標的細胞内分子またはオルガネラのオートファジーによる分解を誘導する化合物の製造方法。
- [請求項7] 請求項 6 に記載の方法で得られた化合物を、細胞内で、p 6 2 の存

在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼと接触させて、標的細胞内分子または標的オルガネラのオートファジーによる分解を誘導する方法。

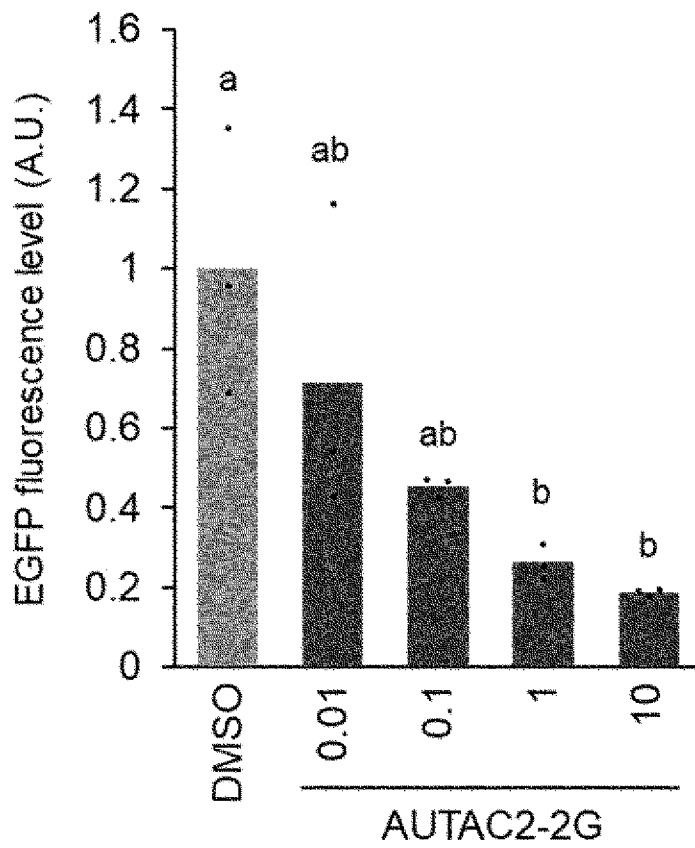
[請求項8] 請求項6に記載の方法で得られた化合物を、細胞内で、p62の存在下で、DEAD-box型RNAヘリカーゼと接触させて、前記化合物、前記p62および前記DEAD-box型RNAヘリカーゼを含む液滴を形成する、請求項7に記載の方法。

[請求項9] 癌または細胞変性疾患を予防または治療する、請求項7または8に記載の方法。

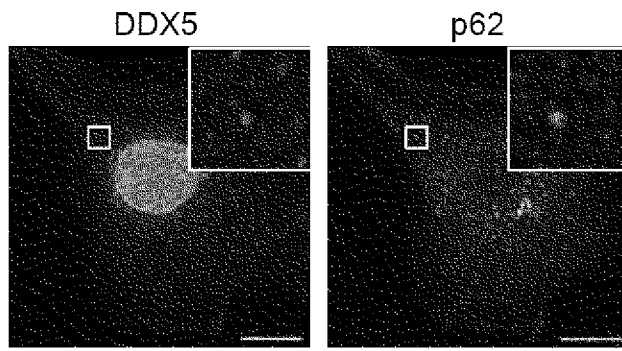
[図1]



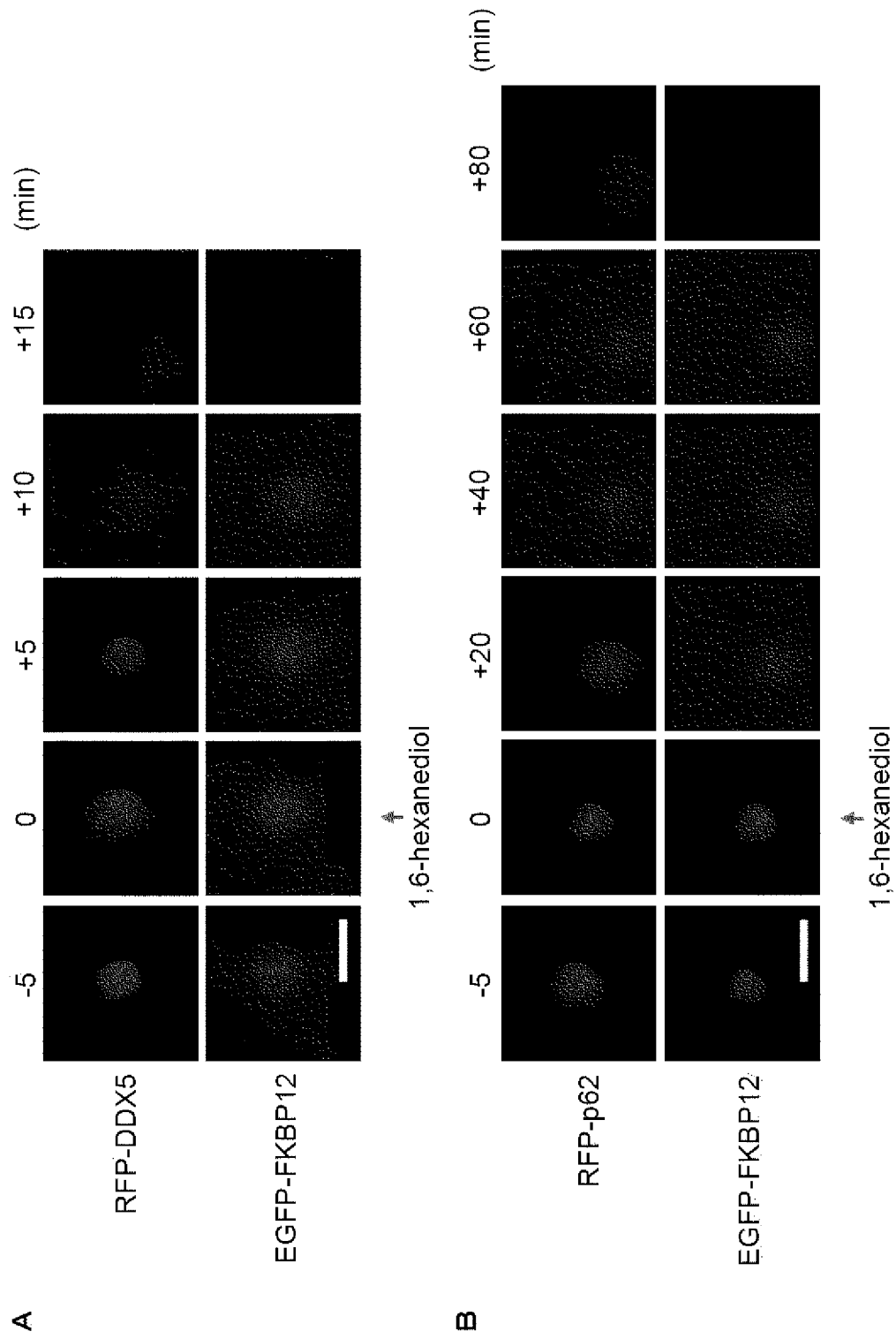
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/012419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 15/52*(2006.01)i; *C12Q 1/24*(2006.01)i

FI: C12Q1/24 ZNA; C12N15/52

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/52; C12Q1/24

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/143403 A1 (TOHOKU UNIVERSITY) 09 August 2018 (2018-08-09) paragraphs [0001]-[0223], tables 1-1 to 1-19	6, 9
A		1-5, 7, 8
A	WO 2019/013181 A1 (TOHOKU UNIVERSITY) 17 January 2019 (2019-01-17) entire text, all drawings	1-9
A	有本博一 他, 選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物, 日本農芸化学会 2018年度大会講演要旨集, [online], 05 March 2018, 4SY24-5, (ARIMOTO, Hirokazu et al., Targeted degradation of cytosolic materials using selective autophagy, Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2018) entire text	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May 2023

Date of mailing of the international search report

13 June 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/012419

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/012419

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018/143403	A1	09 August 2018	US	2020/0163970	A1	
				paragraphs [0001]-[0521]			
				EP	3578549	A1	
WO	2019/013181	A1	17 January 2019	US	2020/0223848	A1	
				entire text, all drawings			
				EP	3679935	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/52(2006.01)i; C12Q 1/24(2006.01)i FI: C12Q1/24 ZNA; C12N15/52		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/52; C12Q1/24		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2018/143403 A1 (国立大学法人東北大学) 09.08.2018 (2018-08-09) [0001]-[0223], [表1-1]-[表1-19]	6, 9
A		1-5, 7, 8
A	WO 2019/013181 A1 (国立大学法人東北大学) 17.01.2019 (2019-01-17) 全文、全図	1-9
A	有本博一, 他, 選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物, 日本農芸化学 会2018年度大会講演要旨集 (オンライン), 2018.03.05, 4SY24-5 全文	1-9
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30.05.2023		国際調査報告の発送日 13.06.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 太田 雄三 4N 3959 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/012419

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2018/143403	A1	09.08.2018	US	2020/0163970	A1	
				[0001]-[0521]			
				EP	3578549	A1	
WO	2019/013181	A1	17.01.2019	US	2020/0223848	A1	
				全文、全図			
				EP	3679935	A1	