

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7631191号

(P7631191)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/55 (2017.01)

A 6 1 K 47/55

A 6 1 K 31/167 (2006.01)

A 6 1 K 31/167

A 6 1 K 31/365 (2006.01)

A 6 1 K 31/365

A 6 1 K 31/5517 (2006.01)

A 6 1 K 31/5517

A 6 1 K 45/06 (2006.01)

A 6 1 K 45/06

Z N A

請求項の数 14 (全383頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-519602(P2021-519602)

(86)(22)出願日 令和1年10月9日(2019.10.9)

(65)公表番号 特表2022-512643(P2022-512643
A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/055461

(87)国際公開番号 WO2020/076996

(87)国際公開日 令和2年4月16日(2020.4.16)

審査請求日 令和4年10月7日(2022.10.7)

(31)優先権主張番号 62/743,337

(32)優先日 平成30年10月9日(2018.10.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 507127440

ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバー
シティー・オブ・カリフォルニア
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94
607-5200、オークランド、フラ
ンクリン・ストリート・1111、トゥ
エルプス・フロアー

(73)特許権者 504389991

ノバルティス アーゲー
スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
35

(74)代理人 110001173

弁理士法人川口国際特許事務所

(72)発明者 スブラドリン, ジェシカ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94

最終頁に続く

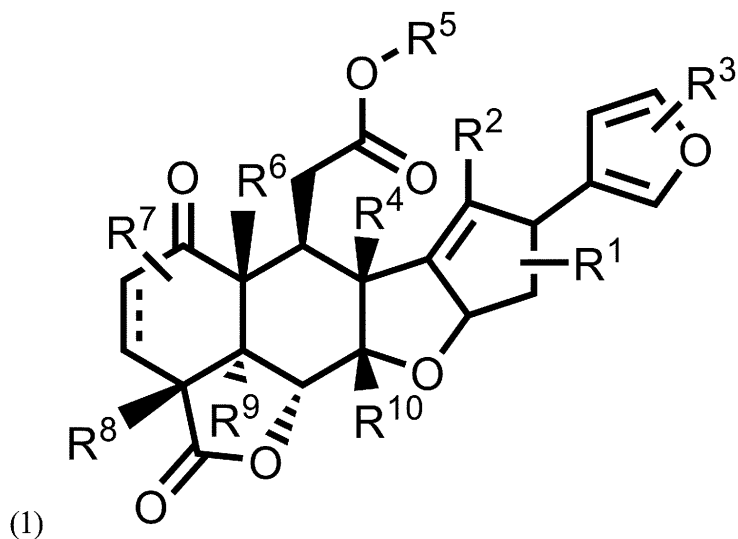
(54)【発明の名称】 E3リガーゼの共有結合による標的化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

結合剤リンカーを介して標的タンパク質結合剤に共有結合しているE3ユビキチンリガ
ーゼ結合剤の一価形態を含む化合物またはその薬学的に許容される塩であって、前記E3
ユビキチンリガーゼ結合剤は、

【化 1】



であり、
式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 および R^{10} は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは前記結合剤リンカーへの結合であり、

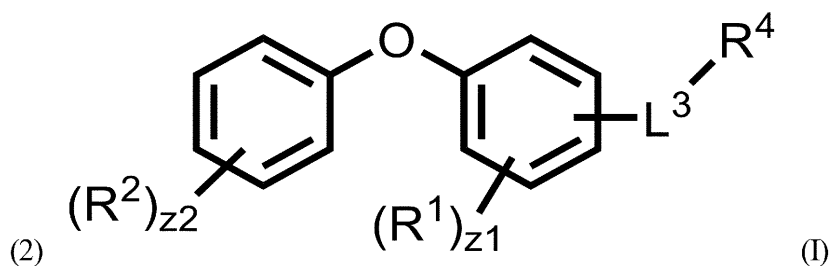
ここで、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 または R^{10} のうちの1つだけが前記結合剤リンカーへの結合であり、

【化 2】



は、単結合または二重結合であり、または

【化 3】

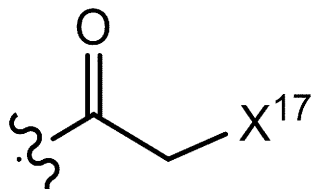


式中、

R^1 は、ハロゲンであり、

z¹ は、0 または 1 であり、
z² は、1 であり、および R² は、前記結合剤リンカーへの結合であり、
L³ は、-N(R³)- または -N(H)- であり、
R³ は、R^{3 1}-置換メチルであり、
R^{3 1} は、独立して、非置換フェニルであり、
R⁴ は、E であり、
E は、

【化 4】



10

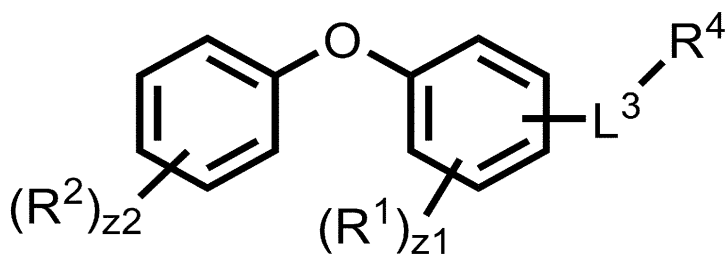
であり、ならびに

X¹⁷ は、独立して、C₁である、化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、

【化 5】



(I)

20

である、請求項 1 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 3】

z¹ が 0 である、請求項 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

30

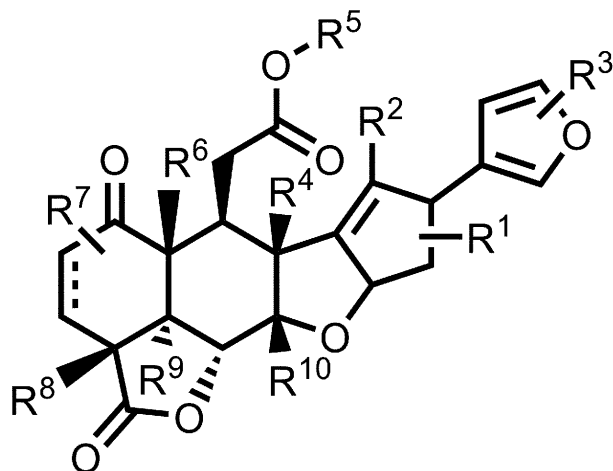
【請求項 4】

L³ が、-N(R³)- である、請求項 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 5】

前記 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式：

【化 6】



40

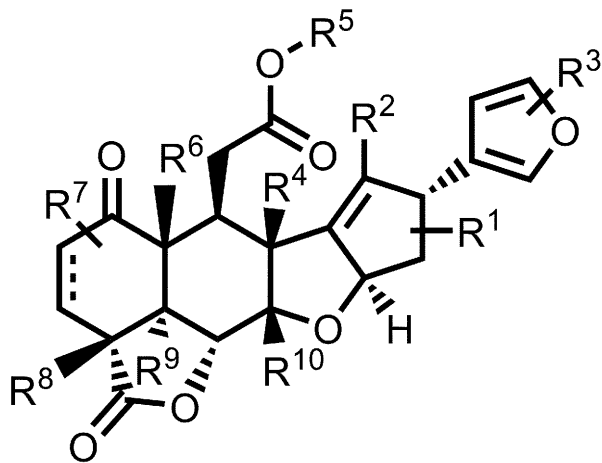
の一価形態である、請求項 1 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

50

【請求項 6】

前記 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式：

【化 7】



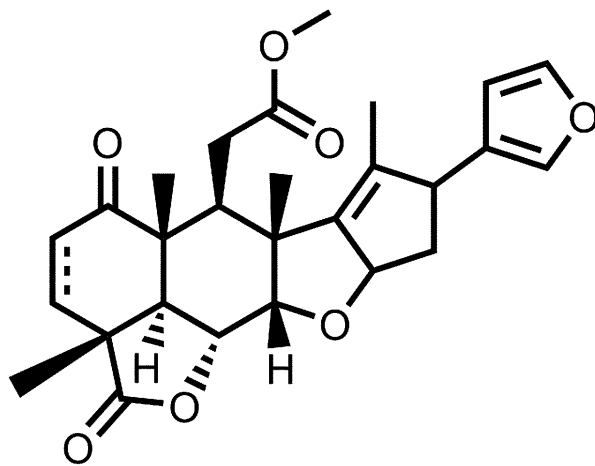
10

の一価形態である、請求項 5 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 7】

前記 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式：

【化 8】



20

30

の一価形態である、請求項 5 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

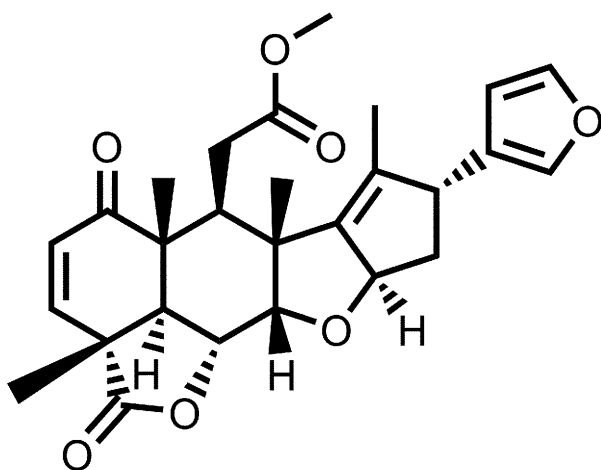
【請求項 8】

前記 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式：

40

50

【化 9】



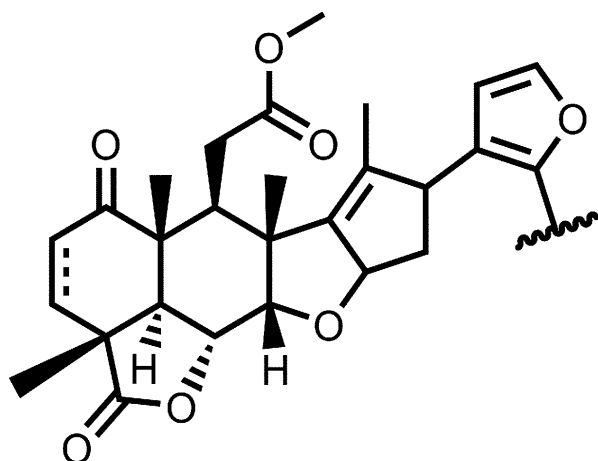
10

の一価形態である、請求項 5 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 9】

前記 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式：

【化 10】



20

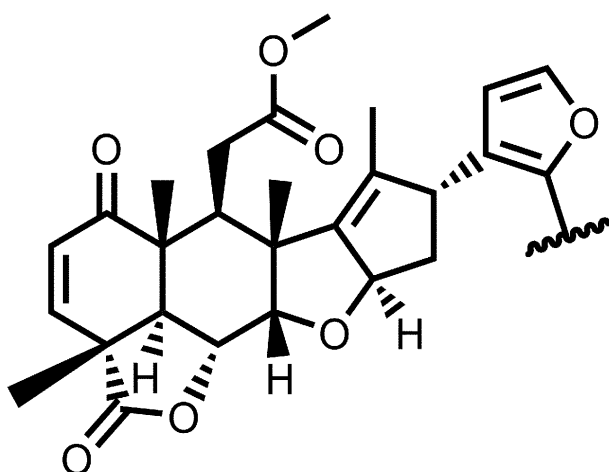
30

を有する、請求項 5 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 10】

前記 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式：

【化 11】



40

50

を有する、請求項 5 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 1】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される賦形剤と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 2】

細胞タンパク質の濃度を低下させる方法において使用するための組成物であって、前記組成物は請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩を含み、前記方法は、前記細胞タンパク質を、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩と接触させることを含む、組成物。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩の治療有効量を含む、癌を治療するための薬学的組成物。

【請求項 1 4】

E 3 ユビキチンリガーゼ－E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤－細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、

A) 前記 E 3 ユビキチンリガーゼを請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより E 3 ユビキチンリガーゼ－E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、

B) 前記 E 3 ユビキチンリガーゼ－E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を前記細胞タンパク質と接触させ、それにより E 3 ユビキチンリガーゼ－E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤－細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 8 年 1 0 月 9 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 7 4 3 , 3 3 7 号の権益を主張し、参照によりその全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

A S C I I ファイルとして提出される「配列表」、表、またはコンピュータプログラムリスト付属書類を参照

2 0 1 9 年 1 0 月 4 日に作成された、1 8 , 6 7 0 バイトの機械フォーマット、I B M － P C、M S W i n d o w s オペレーティングシステムである、ファイル 0 5 2 1 0 3 － 5 1 7 0 0 1 W O _ S e q u e n c e _ L i s t i n g _ S T 2 5 . t x t に記載の配列表が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

標的タンパク質分解は、疾患の治療のための強力な戦略として生まれた。このアプローチでは、E 3 リガーゼを特定のタンパク質基質に結合してプロテアソーム依存的にこれらの基質をユビキチン化させ、分解する E 3 リガーゼリクルーターに結合したタンパク質標的化リガンドからなる二官能性分解剤を使用する。しかしながら、このアプローチの 1 つの課題は、標的タンパク質分解用途のために現在存在する E 3 リガーゼリクルーターが比較的少ないことである。とりわけ、当該技術分野におけるこれらおよび他の問題に対する解決策が本明細書に提供される。

【発明の概要】

【0 0 0 4】

一態様では、1) 標的タンパク質結合剤および 2) E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤を含む標的タンパク質分解剤であって、E 3 ユビキチンリガーゼが、ヒト R N F 4 またはヒト R N F 1 1 4 である、標的タンパク質分解剤である。

【0 0 0 5】

一態様では、実施形態を含む明細書に記載の化合物と、薬学的に許容される賦形剤と、

10

20

30

40

50

を含む、薬学的組成物が提供される。

【0006】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる（例えば、対照と比較して低下させる）方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法が提供される。実施形態では、標的タンパク質分解剤は、本明細書に記載の化合物である。

【0007】

一態様では、癌を治療する方法であって、癌に関連する細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載の化合物）と接触させることを含む、方法が提供される。

【0008】

一態様では、癌を治療する方法であって、実施形態を含む本明細書に記載の標的タンパク質分解剤の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法が提供される。

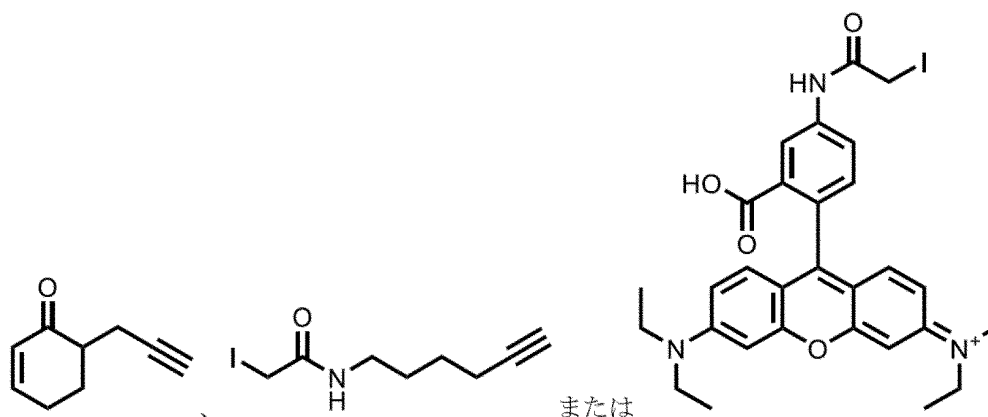
【0009】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤－細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、（i）一価のE3ユビキチンリガーゼ結合剤と、（ii）一価の標的タンパク質結合剤と、（iii）一価のE3ユビキチンリガーゼ結合剤および標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。

【0010】

一態様では、標的タンパク質結合剤が接触する細胞タンパク質を同定する方法であって、（A）細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルを標的タンパク質結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質－標的タンパク質結合剤複合体を形成することと、（B）得られたステップAの細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルと、標的タンパク質結合剤と接触していない細胞プロテオームまたは細胞の第2のサンプルの両方を、式：

【化1】



を有する化合物と接触させることと、（C）得られたステップBの第1のサンプルを第1の検出可能な薬剤と接触させ、得られたステップBの第2のサンプルを第2の検出可能な薬剤と接触させることと、（D）選択されたタンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルを測定することと、（E）細胞タンパク質－標的タンパク質結合剤複合体を形成することができる細胞タンパク質にそれぞれ結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルの差を測定することにより、細胞タンパク質－標的タンパク質結合剤複合体中の細胞タンパク質を同定することと、を含む、方法が提供される。

【0011】

一態様では、E3ユビキチンリガーゼ－E3ユビキチンリガーゼ結合剤－細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、（A）E3ユビキチンリガーゼをE3ユビキチンリガ

ーゼ結合剤と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼーE3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、(B)E3ユビキチンリガーゼーE3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼーE3ユビキチンリガーゼ結合剤ー細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法である。

【0012】

一態様では、細胞タンパク質ーE3ユビキチンリガーゼ結合剤ーE3ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、(A)細胞タンパク質をE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質ーE3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、(B)細胞タンパク質ーE3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体をE3ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質ーE3ユビキチンリガーゼ結合剤ーE3ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法が提供される。

10

【0013】

一態様では、細胞タンパク質ーE3ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害する方法であって、E3ユビキチンリガーゼをE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質ーE3ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害することを含む、方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】ゲルベースABPPを用いたRNF4に対する共有結合リガンドスクリーニング。(図1A)E3リガーゼMDM2、RNF4、およびUBE3AのゲルベースABPP標識。純粋なタンパク質をIAーローダミンで30分間室温で標識した後、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光による可視化を行った。(図1B)純粋なRNF4のIAーローダミン標識に対する共有結合リガンド(50μM)のゲルベースABPPスクリーニングの概略図であり、蛍光の喪失をもたらすプローブ標識を阻害する化合物を探している。(図1C~1D)RNF4のIAーローダミン標識に対するシステイン反応性共有結合リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IAーローダミン標識(250nM)を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。このスクリーンからの潜在的なヒットを強調表示した。(図1E)(図1C~1D)に記載されているように実施した、再現性のあるRNF4スクリーニングヒットの構造およびゲルベースABPP確認。ゲルも銀染色した。

20

30

【図1B】ゲルベースABPPを用いたRNF4に対する共有結合リガンドスクリーニング。(図1A)E3リガーゼMDM2、RNF4、およびUBE3AのゲルベースABPP標識。純粋なタンパク質をIAーローダミンで30分間室温で標識した後、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光による可視化を行った。(図1B)純粋なRNF4のIAーローダミン標識に対する共有結合リガンド(50μM)のゲルベースABPPスクリーニングの概略図であり、蛍光の喪失をもたらすプローブ標識を阻害する化合物を探している。(図1C~1D)RNF4のIAーローダミン標識に対するシステイン反応性共有結合リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IAーローダミン標識(250nM)を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。このスクリーンからの潜在的なヒットを強調表示した。(図1E)(図1C~1D)に記載されているように実施した、再現性のあるRNF4スクリーニングヒットの構造およびゲルベースABPP確認。ゲルも銀染色した。

40

【図1C】ゲルベースABPPを用いたRNF4に対する共有結合リガンドスクリーニング。(図1A)E3リガーゼMDM2、RNF4、およびUBE3AのゲルベースABPP標識。純粋なタンパク質をIAーローダミンで30分間室温で標識した後、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光による可視化を行った。(図1B)純粋なRNF4のIAーローダミン標識に対する共有結合リガンド(50μM)のゲルベースABPPスクリーニングの概略図であり、蛍光の喪失をもたらすプローブ標識を阻害する化合物を探している。(

50

図1C～1D) RNF4のIA-ローダミン標識に対するシステイン反応性共有結合リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識(250nM)を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。このスクリーンからの潜在的なヒットを強調表示した。(図1E)(図1C～1D)に記載されているように実施した、再現性のあるRNF4スクリーニングヒットの構造およびゲルベースABPP確認。ゲルも銀染色した。

【図1D】ゲルベースABPPを用いたRNF4に対する共有結合リガンドスクリーニング。(図1A)E3リガーゼMDM2、RNF4、およびUBE3AのゲルベースABPP標識。純粋なタンパク質をIA-ローダミンで30分間室温で標識した後、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光による可視化を行った。(図1B)純粋なRNF4のIA-ローダミン標識に対する共有結合リガンド(50μM)のゲルベースABPPスクリーニングの概略図であり、蛍光の喪失をもたらすプローブ標識を阻害する化合物を探している。(図1C～1D)RNF4のIA-ローダミン標識に対するシステイン反応性共有結合リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識(250nM)を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。このスクリーンからの潜在的なヒットを強調表示した。(図1E)(図1C～1D)に記載されているように実施した、再現性のあるRNF4スクリーニングヒットの構造およびゲルベースABPP確認。ゲルも銀染色した。

【図1E】ゲルベースABPPを用いたRNF4に対する共有結合リガンドスクリーニング。(図1A)E3リガーゼMDM2、RNF4、およびUBE3AのゲルベースABPP標識。純粋なタンパク質をIA-ローダミンで30分間室温で標識した後、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光による可視化を行った。(図1B)純粋なRNF4のIA-ローダミン標識に対する共有結合リガンド(50μM)のゲルベースABPPスクリーニングの概略図であり、蛍光の喪失をもたらすプローブ標識を阻害する化合物を探している。(図1C～1D)RNF4のIA-ローダミン標識に対するシステイン反応性共有結合リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識(250nM)を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。このスクリーンからの潜在的なヒットを強調表示した。(図1E)(図1C～1D)に記載されているように実施した、再現性のあるRNF4スクリーニングヒットの構造およびゲルベースABPP確認。ゲルも銀染色した。

【図2A】TRH1-23は、RNF4の亜鉛配位システインと非官能的に反応する。(図2A)RNF4へのTRH1-23共有結合付加物のLC-MS/MS分析。RNF4をTRH1-23(50μM)とともに室温で30分間インキュベートした。RNF4をトリプシンで消化し、トリプシン消化物をLC-MS/MSで分析し、TRH1-23修飾付加物を検索した。示されているのは、TRH1-23修飾C132およびC135RNF4トリプシンペプチドのMS/MSスペクトルである。ペプチド配列において強調表示されているのは、修飾されたシステインである。ペプチド配列は、配列番号1の残基118～147に対応する。(図2B)RNF4のC132もしくはC135とのTRH1-23反応性の概略図。(図2C)TRH1-23は、RNF4自己ユビキチン化アッセイを阻害しない。RNF4をTRH1-23(100μM)とブレインキュベートした後、UBA1、E2酵素、およびATPを37℃で40分間加えた。反応をクエンチし、RNF4のSDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングに供した。(図2C)に示されたゲルは、n=3からの代表的なゲルである。

【図2B】TRH1-23は、RNF4の亜鉛配位システインと非官能的に反応する。(図2A)RNF4へのTRH1-23共有結合付加物のLC-MS/MS分析。RNF4をTRH1-23(50μM)とともに室温で30分間インキュベートした。RNF4をトリプシンで消化し、トリプシン消化物をLC-MS/MSで分析し、TRH1-23修

飾付加物を検索した。示されているのは、TRH1-23修飾C132およびC135 RNF4トリプシンペプチドのMS/MSスペクトルである。ペプチド配列において強調表示されているのは、修飾されたシステインである。ペプチド配列は、配列番号1の残基118~147に対応する。(図2B) RNF4のC132もしくはC135とのTRH1-23反応性の概略図。(図2C) TRH1-23は、RNF4自己ユビキチン化アッセイを阻害しない。RNF4をTRH1-23(100 μM)とブレインキュベートした後、UBA1、E2酵素、およびATPを37℃で40分間加えた。反応をクエンチし、RNF4のSDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングに供した。(図2C)に示されたゲルは、n=3からの代表的なゲルである。

【図2C】TRH1-23は、RNF4の亜鉛配位システインと非官能的に反応する。(図2A) RNF4へのTRH1-23共有結合付加物のLC-MS/MS分析。RNF4をTRH1-23(50 μM)とともに室温で30分間インキュベートした。RNF4をトリプシンで消化し、トリプシン消化物をLC-MS/MSで分析し、TRH1-23修飾付加物を検索した。示されているのは、TRH1-23修飾C132およびC135 RNF4トリプシンペプチドのMS/MSスペクトルである。ペプチド配列において強調表示されているのは、修飾されたシステインである。ペプチド配列は、配列番号1の残基118~147に対応する。(図2B) RNF4のC132もしくはC135とのTRH1-23反応性の概略図。(図2C) TRH1-23は、RNF4自己ユビキチン化アッセイを阻害しない。RNF4をTRH1-23(100 μM)とブレインキュベートした後、UBA1、E2酵素、およびATPを37℃で40分間加えた。反応をクエンチし、RNF4のSDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングに供した。(図2C)に示されたゲルは、n=3からの代表的なゲルである。

【図3A】ゲルベースABPPを使用したRNF4共有結合リガンドの最適化。(図3A~3B) TRH1-23の類似体を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3C) CCW16を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3A~3C)の場合、共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。(図3C)では、ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図3C)に示されたゲルは、n=3からの代表的なゲルである。

【図3B-1】ゲルベースABPPを使用したRNF4共有結合リガンドの最適化。(図3A~3B) TRH1-23の類似体を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3C) CCW16を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3A~3C)の場合、共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。(図3C)では、ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図3C)に示されたゲルは、n=3からの代表的なゲルである。

【図3B-2】ゲルベースABPPを使用したRNF4共有結合リガンドの最適化。(図3A~3B) TRH1-23の類似体を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3C) CCW16を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3A~3C)の場合、共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。(図3C)では、ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図3C)に示されたゲルは、n=3からの代表的なゲルである。

【図3C】ゲルベースABPPを使用したRNF4共有結合リガンドの最適化。(図3A~3B) TRH1-23の類似体を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3C) CCW16を、ゲルベースABPPを使用してRNF4のIA-ローダミン標識に対して試験した。(図3A~3C)の場合、共有結

合リガンドを純粋な RNF4 タンパク質と 30 分間ブレインキュベートした後、IAーローダミン標識を 1 時間行った。タンパク質を SDS/PAGE に供し、ゲル内蛍光で可視化した。(図 3 C) では、ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50 値を計算した。(図 3 C) に示されたゲルは、n = 3 からの代表的なゲルである。

【図 4 A】RNF4 リクルーターベースの BRD4 分解剤。(図 4 A) BRD4 阻害剤 JQ1 に結合した RNF4 リクルーターベースの分解剤である CCW28-3 の構造。(図 4 B) 純粋なヒト RNF4 に対する CCW28-3 のゲルベース ABPP 分析。CCW28-3 を純粋な RNF4 タンパク質と 30 分間ブレインキュベートした後、IAーローダミン標識を 1 時間行った。タンパク質を SDS/PAGE に供し、ゲル内蛍光で可視化した。ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50 値を計算した。(図 4 C) 231MFP 乳癌細胞における CCW28-3 処理は、BRD4 分解をもたらす。231MFP 乳癌細胞をビヒクル DMSO もしくは CCW28-3 で 3 時間処理した。タンパク質を SDS/PAGE ならびに BRD4 および GAPDH ローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図 4 D、4 E) 231MFP 乳癌細胞における CCW28-3 処理は、プロテアソーム、E1 阻害剤および BRD4 阻害剤依存性の BRD4 分解をもたらす。ビヒクル DMSO またはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) (10 μM)、E1 阻害剤 TAK-243 (10 μM)、または BRD4 阻害剤 JQ1 (10 μM) を 30 分間ブレインキュベートした後、MZ1 (1 μM) もしくは CCW28-3 (1 μM) で 3 時間処理した。タンパク質を SDS/PAGE ならびに BRD4 およびアクチンローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図 4 F) RNF4 野生型およびノックアウト HeLa 細胞を CCW28-3 (10 μM) で 5 時間処理し、SDS/PAGE ならびに BRD4、RNF4 および GAPDH のウエスタンブロットティングに供した。(図 4 B~4 F) のプロットを、デンストメトリーによって定量化した。(図 4 B~4 F) のデータは、n = 3 からの代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均 ± sem、n = 3-5/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して *p < 0.05、(B、D~E) の CCW28-3 で処理した群および (図 4 F) の CCW28-3 で処理した野生型細胞と比較して #p < 0.05 として表される。

【図 4 B】RNF4 リクルーターベースの BRD4 分解剤。(図 4 A) BRD4 阻害剤 JQ1 に結合した RNF4 リクルーターベースの分解剤である CCW28-3 の構造。(図 4 B) 純粋なヒト RNF4 に対する CCW28-3 のゲルベース ABPP 分析。CCW28-3 を純粋な RNF4 タンパク質と 30 分間ブレインキュベートした後、IAーローダミン標識を 1 時間行った。タンパク質を SDS/PAGE に供し、ゲル内蛍光で可視化した。ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50 値を計算した。(図 4 C) 231MFP 乳癌細胞における CCW28-3 処理は、BRD4 分解をもたらす。231MFP 乳癌細胞をビヒクル DMSO もしくは CCW28-3 で 3 時間処理した。タンパク質を SDS/PAGE ならびに BRD4 および GAPDH ローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図 4 D、4 E) 231MFP 乳癌細胞における CCW28-3 処理は、プロテアソーム、E1 阻害剤および BRD4 阻害剤依存性の BRD4 分解をもたらす。ビヒクル DMSO またはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) (10 μM)、E1 阻害剤 TAK-243 (10 μM)、または BRD4 阻害剤 JQ1 (10 μM) を 30 分間ブレインキュベートした後、MZ1 (1 μM) もしくは CCW28-3 (1 μM) で 3 時間処理した。タンパク質を SDS/PAGE ならびに BRD4 およびアクチンローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図 4 F) RNF4 野生型およびノックアウト HeLa 細胞を CCW28-3 (10 μM) で 5 時間処理し、SDS/PAGE ならびに BRD4、RNF4 および GAPDH のウエスタンブロットティングに供した。(図 4 B~4 F) のプロットを、デンストメトリーによって定量化した。(図 4 B~4 F) のデータは、n = 3 からの代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均 ± sem、n = 3-5/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して *p < 0.05、(B、D~E) の CCW28-3 で処理した群および (図 4 F) の CCW28-3 で処理した野生型細胞と比較して #p < 0.05 として表される。

10

20

30

40

50

【図4C】RNF4リクルーターベースのBRD4分解剤。(図4A)BRD4阻害剤JQ1に結合したRNF4リクルーターベースの分解剤であるCCW28-3の構造。(図4B)純粋なヒトRNF4に対するCCW28-3のゲルベースABPP分析。CCW28-3を純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図4C)231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、BRD4分解をもたらす。231MFP乳癌細胞をビヒクルDMSOもしくはCCW28-3で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびGAPDHローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4D、4E)231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、プロテアソーム、E1阻害剤およびBRD4阻害剤依存性のBRD4分解をもたらす。ビヒクルDMSOまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(10μM)、E1阻害剤TAK-243(10μM)、またはBRD4阻害剤JQ1(10μM)を30分間ブレインキュベートした後、MZ1(1μM)もしくはCCW28-3(1μM)で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびアクチンローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4F)RNF4野生型およびノックアウトHeLa細胞をCCW28-3(10μM)で5時間処理し、SDS/PAGEならびにBRD4、RNF4およびGAPDHのウエスタンブロットティングに供した。(図4B~4F)のプロットを、デンストメトリーによって定量化した。(図4B~4F)のデータは、n=3からの代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均±sem、n=3-5/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して*p<0.05、(B、D~E)のCCW28-3で処理した群および(図4F)のCCW28-3で処理した野生型細胞と比較して#p<0.05として表される。

10

20

【図4D】RNF4リクルーターベースのBRD4分解剤。(図4A)BRD4阻害剤JQ1に結合したRNF4リクルーターベースの分解剤であるCCW28-3の構造。(図4B)純粋なヒトRNF4に対するCCW28-3のゲルベースABPP分析。CCW28-3を純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図4C)231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、BRD4分解をもたらす。231MFP乳癌細胞をビヒクルDMSOもしくはCCW28-3で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびGAPDHローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4D、4E)231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、プロテアソーム、E1阻害剤およびBRD4阻害剤依存性のBRD4分解をもたらす。ビヒクルDMSOまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(10μM)、E1阻害剤TAK-243(10μM)、またはBRD4阻害剤JQ1(10μM)を30分間ブレインキュベートした後、MZ1(1μM)もしくはCCW28-3(1μM)で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびアクチンローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4F)RNF4野生型およびノックアウトHeLa細胞をCCW28-3(10μM)で5時間処理し、SDS/PAGEならびにBRD4、RNF4およびGAPDHのウエスタンブロットティングに供した。(図4B~4F)のプロットを、デンストメトリーによって定量化した。(図4B~4F)のデータは、n=3からの代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均±sem、n=3-5/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して*p<0.05、(B、D~E)のCCW28-3で処理した群および(図4F)のCCW28-3で処理した野生型細胞と比較して#p<0.05として表される。

30

40

【図4E】RNF4リクルーターベースのBRD4分解剤。(図4A)BRD4阻害剤JQ1に結合したRNF4リクルーターベースの分解剤であるCCW28-3の構造。(図4B)純粋なヒトRNF4に対するCCW28-3のゲルベースABPP分析。CCW28-3を純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダ

50

ミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図4C) 231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、BRD4分解をもたらす。231MFP乳癌細胞をビヒクルDMSOもしくはCCW28-3で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびGAPDHローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4D、4E) 231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、プロテアソーム、E1阻害剤およびBRD4阻害剤依存性のBRD4分解をもたらす。ビヒクルDMSOまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(10μM)、E1阻害剤TAK-243(10μM)、またはBRD4阻害剤JQ1(10μM)を30分間ブレインキュベートした後、MZ1(1μM)もしくはCCW28-3(1μM)で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびアクチンローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4F) RNF4野生型およびノックアウトHeLa細胞をCCW28-3(10μM)で5時間処理し、SDS/PAGEならびにBRD4、RNF4およびGAPDHのウエスタンブロットティングに供した。(図4B~4F)のプロットを、デンストメトリーによって定量化した。(図4B~4F)のデータは、n=3からの代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均±sem、n=3-5/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して*p<0.05、(B、D~E)のCCW28-3で処理した群および(図4F)のCCW28-3で処理した野生型細胞と比較して#p<0.05として表される。

【図4F】RNF4リクルーターベースのBRD4分解剤。(図4A) BRD4阻害剤JQ1に結合したRNF4リクルーターベースの分解剤であるCCW28-3の構造。(図4B) 純粋なヒトRNF4に対するCCW28-3のゲルベースABPP分析。CCW28-3を純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。ゲルをデンストメトリーによって定量化して、IC50値を計算した。(図4C) 231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、BRD4分解をもたらす。231MFP乳癌細胞をビヒクルDMSOもしくはCCW28-3で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびGAPDHローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4D、4E) 231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3処理は、プロテアソーム、E1阻害剤およびBRD4阻害剤依存性のBRD4分解をもたらす。ビヒクルDMSOまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(10μM)、E1阻害剤TAK-243(10μM)、またはBRD4阻害剤JQ1(10μM)を30分間ブレインキュベートした後、MZ1(1μM)もしくはCCW28-3(1μM)で3時間処理した。タンパク質をSDS/PAGEならびにBRD4およびアクチンローディング対照のウエスタンブロットティングに供した。(図4F) RNF4野生型およびノックアウトHeLa細胞をCCW28-3(10μM)で5時間処理し、SDS/PAGEならびにBRD4、RNF4およびGAPDHのウエスタンブロットティングに供した。(図4B~4F)のプロットを、デンストメトリーによって定量化した。(図4B~4F)のデータは、n=3からの代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均±sem、n=3-5/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して*p<0.05、(B、D~E)のCCW28-3で処理した群および(図4F)のCCW28-3で処理した野生型細胞と比較して#p<0.05として表される。

【図5】RNF4に対する追加のヒットおよびゲルベースABPPによるRNF4ヒットのプロテオーム全体の選択性の一般的な評価。RNF4のIA-ローダミン標識に対するDKM2-76およびTRH1-74のゲルベースABPP分析。共有結合リガンドを純粋なRNF4タンパク質と30分間ブレインキュベートした後、IA-ローダミン標識(250nM)を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。231MFP乳癌細胞プロテオームのIA-ローダミン標識に対する、RNF4ヒット(YP1-44およびTRH1-23)のゲルベースABPPスクリーン。YP1-44およびTRH1-23をプロテオームと30分間ブレインキュベートした後、IA

ーローダミン標識 (250 nM) を1時間行った。タンパク質をSDS/PAGEに供し、ゲル内蛍光で可視化した。

【図6】インサイチュでの231MFP乳癌細胞におけるCCW28-3のisoTOP-ABPP分析。231MFP細胞をDMSOビヒクルもしくはCCW28-3 (10 μM) で1時間インサイチュで処理した後、IA-アルキン (100 μM) で1時間インビトロでプロテオームを標識した。同位体的に軽い (DMSOで処理した場合) または重い (化合物で処理した場合) TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグをCuAACにより付加して、isoTOP-ABPP分析を行った。データは3つの生物学的複製のものである。

【図7】RNF4野生型およびノックアウトHeLa細胞において低濃度で試験したCCW28-3。RNF4野生型およびノックアウトHeLa細胞をDMSOビヒクルもしくはCCW28-3 (5または1 μM) で5時間処理し、SDS/PAGEならびにBRD4およびGAPDHのウエスタンブロッティングに供した。プロットを、デンストメトリーによって定量化した。のデータは、n=3の代表的なゲルからのものである。棒グラフは平均±sem、n=3/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して* $p < 0.05$ 、CCW28-3で処理した野生型細胞と比較して# $p < 0.05$ として表される。

【図8A】ニンボリドは乳癌細胞の増殖または生存を低減する。(図8A) ニンボリドの構造。ニンボリドは、潜在的にシステイン反応性である環状エノンをもっている。(図8B~8C) 血清含有培地における231MFPおよびHCC38乳癌細胞の増殖および無血清細胞生存。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞生存率を評価した。(図8B~8C) に示されるデータは、平均±sem、n=6/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して、* $p < 0.05$ として表される。

【図8B】ニンボリドは乳癌細胞の増殖または生存を低減する。(図8A) ニンボリドの構造。ニンボリドは、潜在的にシステイン反応性である環状エノンをもっている。(図8B~8C) 血清含有培地における231MFPおよびHCC38乳癌細胞の増殖および無血清細胞生存。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞生存率を評価した。(図8B~8C) に示されるデータは、平均±sem、n=6/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して、* $p < 0.05$ として表される。

【図8C】ニンボリドは乳癌細胞の増殖または生存を低減する。(図8A) ニンボリドの構造。ニンボリドは、潜在的にシステイン反応性である環状エノンをもっている。(図8B~8C) 血清含有培地における231MFPおよびHCC38乳癌細胞の増殖および無血清細胞生存。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞生存率を評価した。(図8B~8C) に示されるデータは、平均±sem、n=6/群である。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して、* $p < 0.05$ として表される。

【図9A】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドのisoTOP-ABPP分析により、RNF114が標的であることが明らかになる。(図9A) 231MFP乳癌細胞プロテオームまたは細胞をDMSOまたはニンボリド (10 μM、インビトロで30分またはインサイチュで1.5時間) で前処理した後、IA-アルキン (100 μM、1時間) でプロテオームをインビトロで標識し、続いて銅触媒アジド-アルキン付加環化 (CuAAC) により同位体的に軽い (DMSOで処理した場合) または重い (ニンボリドで処理した場合) TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグを付加したisoTOP-ABPPの概略図。続いて、対照プロテオームおよび処理プロテオームを1:1の比で組み合わせ、プローブ標識タンパク質をアビジン濃縮し、トリプシンで消化し、プローブ修飾トリプシンペプチドをTEVプロテアーゼで溶出し、LC-MS/MSで分析し、軽いプローブ修飾ペプチド対重いプローブ修飾ペプチド比を定量化した。(図9B) (図9A) に記載されているようにインビトロ分析された231MFP乳癌細胞プロテ

10

20

30

40

50

オームにおけるニンボリド (10 μ M) の *isoTOP-ABPP* 分析。5 を超える軽／重比を示した3つの標的には、PTOV1のC308、RNF114のC8、およびPFKPのC123が含まれていた。(図9C) (図9A)に記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド (10 μ M) の *isoTOP-ABPP* 分析。(図9D) RNF114は、231MFP細胞においてショートヘアピンRNAオリゴヌクレオチドを使用して安定してノックダウンされた。*shRNF114*細胞におけるRNF114ノックダウンは、*sh*対照細胞と比較してqPCRによって確認した。細胞増殖は、ヘキスト染色によって細胞を播種してから48時間後に評価した。(図9E) ニンボリドに対する231MFP *sh*対照および*shRNF114*の感受性。231MFP *sh*対照および*shRNF114*細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞増殖を評価した。ニンボリド処理による%増殖を、*sh*対照または*shRNF114*対照群それぞれに対して正規化した。(図9D~9E)に示されるデータは、平均±semである。(図9B~9E)に示されるデータは、n=6/群からのものである。(図9D、9E)の有意性は、*sh*対照群と比較して* $p < 0.05$ として表される。

【図9B】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドの *isoTOP-ABPP* 分析により、RNF114が標的であることが明らかになる。(図9A) 231MFP乳癌細胞プロテオームまたは細胞をDMSOまたはニンボリド (10 μ M、インビトロで30分またはインサイチュで1.5時間) で前処理した後、IAーアルキン (100 μ M、1時間) でプロテオームをインビトロで標識し、続いて銅触媒アジドーアルキン付加環化 (CuAAC) により同位体的に軽い (DMSOで処理した場合) または重い (ニンボリドで処理した場合) TEVプロテアーゼ切断可能なビオチンーアジドタグを付加した *isoTOP-ABPP* の概略図。続いて、対照プロテオームおよび処理プロテオームを1:1の比で組み合わせ、プローブ標識タンパク質をアビジン濃縮し、トリプシンで消化し、プローブ修飾トリプシンペプチドをTEVプロテアーゼで溶出し、LC-MS/MSで分析し、軽いプローブ修飾ペプチド対重いプローブ修飾ペプチド比を定量化した。(図9B) (図9A)に記載されているようにインビトロ分析された231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリド (10 μ M) の *isoTOP-ABPP* 分析。5 を超える軽／重比を示した3つの標的には、PTOV1のC308、RNF114のC8、およびPFKPのC123が含まれていた。(図9C) (図9A)に記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド (10 μ M) の *isoTOP-ABPP* 分析。(図9D) RNF114は、231MFP細胞においてショートヘアピンRNAオリゴヌクレオチドを使用して安定してノックダウンされた。*shRNF114*細胞におけるRNF114ノックダウンは、*sh*対照細胞と比較してqPCRによって確認した。細胞増殖は、ヘキスト染色によって細胞を播種してから48時間後に評価した。(図9E) ニンボリドに対する231MFP *sh*対照および*shRNF114*の感受性。231MFP *sh*対照および*shRNF114*細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞増殖を評価した。ニンボリド処理による%増殖を、*sh*対照または*shRNF114*対照群それぞれに対して正規化した。(図9D~9E)に示されるデータは、平均±semである。(図9B~9E)に示されるデータは、n=6/群からのものである。(図9D、9E)の有意性は、*sh*対照群と比較して* $p < 0.05$ として表される。

【図9C】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドの *isoTOP-ABPP* 分析により、RNF114が標的であることが明らかになる。(図9A) 231MFP乳癌細胞プロテオームまたは細胞をDMSOまたはニンボリド (10 μ M、インビトロで30分またはインサイチュで1.5時間) で前処理した後、IAーアルキン (100 μ M、1時間) でプロテオームをインビトロで標識し、続いて銅触媒アジドーアルキン付加環化 (CuAAC) により同位体的に軽い (DMSOで処理した場合) または重い (ニンボリドで処理した場合) TEVプロテアーゼ切断可能なビオチンーアジドタグを付加した *isoTOP-ABPP* の概略図。続いて、対照プロテオームおよび処理プロテオームを1:

10

20

30

40

50

1の比で組み合わせ、プローブ標識タンパク質をアビジン濃縮し、トリプシンで消化し、プローブ修飾トリプシンペプチドをTEVプロテアーゼで溶出し、LC-MS/MSで分析し、軽いプローブ修飾ペプチド対重いプローブ修飾ペプチド比を定量化した。(図9B)(図9A)に記載されているようにインビトロ分析された231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリド(10 μ M)のiSoTOP-ABPP分析。5を超える軽/重比を示した3つの標的には、PTOV1のC308、RNF114のC8、およびPFKPのC123が含まれていた。(図9C)(図9A)に記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド(10 μ M)のiSoTOP-ABPP分析。(図9D)RNF114は、231MFP細胞においてショートヘアピンRNAオリゴヌクレオチドを使用して安定してノックダウンされた。shRNF114細胞におけるRNF114ノックダウンは、sh対照細胞と比較してqPCRによって確認した。細胞増殖は、ヘキスト染色によって細胞を播種してから48時間後に評価した。(図9E)ニンボリドに対する231MFP sh対照およびshRNF114の感受性。231MFP sh対照およびshRNF114細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞増殖を評価した。ニンボリド処理による%増殖を、sh対照またはshRNF114対照群それぞれに対して正規化した。(図9D~9E)に示されるデータは、平均 $\pm$ semである。(図9B~9E)に示されるデータは、n=6/群からのものである。(図9D、9E)の有意性は、sh対照群と比較して* p <0.05として表される。

【図9D】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドのiSoTOP-ABPP分析により、RNF114が標的であることが明らかになる。(図9A)231MFP乳癌細胞プロテオームまたは細胞をDMSOまたはニンボリド(10 μ M、インビトロで30分またはインサイチュで1.5時間)で前処理した後、IA-アルキン(100 μ M、1時間)でプロテオームをインビトロで標識し、続いて銅触媒アジド-アルキン付加環化(CuAAC)により同位体的に軽い(DMSOで処理した場合)または重い(ニンボリドで処理した場合)TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグを付加したiSoTOP-ABPPの概略図。続いて、対照プロテオームおよび処理プロテオームを1:1の比で組み合わせ、プローブ標識タンパク質をアビジン濃縮し、トリプシンで消化し、プローブ修飾トリプシンペプチドをTEVプロテアーゼで溶出し、LC-MS/MSで分析し、軽いプローブ修飾ペプチド対重いプローブ修飾ペプチド比を定量化した。(図9B)(図9A)に記載されているようにインビトロ分析された231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリド(10 μ M)のiSoTOP-ABPP分析。5を超える軽/重比を示した3つの標的には、PTOV1のC308、RNF114のC8、およびPFKPのC123が含まれていた。(図9C)(図9A)に記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド(10 μ M)のiSoTOP-ABPP分析。(図9D)RNF114は、231MFP細胞においてショートヘアピンRNAオリゴヌクレオチドを使用して安定してノックダウンされた。shRNF114細胞におけるRNF114ノックダウンは、sh対照細胞と比較してqPCRによって確認した。細胞増殖は、ヘキスト染色によって細胞を播種してから48時間後に評価した。(図9E)ニンボリドに対する231MFP sh対照およびshRNF114の感受性。231MFP sh対照およびshRNF114細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞増殖を評価した。ニンボリド処理による%増殖を、sh対照またはshRNF114対照群それぞれに対して正規化した。(図9D~9E)に示されるデータは、平均 $\pm$ semである。(図9B~9E)に示されるデータは、n=6/群からのものである。(図9D、9E)の有意性は、sh対照群と比較して* p <0.05として表される。

【図9E】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドのiSoTOP-ABPP分析により、RNF114が標的であることが明らかになる。(図9A)231MFP乳癌細胞プロテオームまたは細胞をDMSOまたはニンボリド(10 μ M、インビトロで30分またはインサイチュで1.5時間)で前処理した後、IA-アルキン(100 μ M、

10

20

30

40

50

1時間)でプロテオームをインビトロで標識し、続いて銅触媒アジド-アルキン付加環化(CuAAC)により同位体的に軽い(DMSOで処理した場合)または重い(ニンボリドで処理した場合)TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグを付加したisoTOP-ABPPの概略図。続いて、対照プロテオームおよび処理プロテオームを1:1の比で組み合わせ、プローブ標識タンパク質をアビジン濃縮し、トリプシンで消化し、プローブ修飾トリプシンペプチドをTEVプロテアーゼで溶出し、LC-MS/MSで分析し、軽いプローブ修飾ペプチド対重いプローブ修飾ペプチド比を定量化した。(図9B)(図9A)に記載されているようにインビトロ分析された231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリド(10 μM)のisoTOP-ABPP分析。5を超える軽/重比を示した3つの標的には、PTOV1のC308、RNF114のC8、およびPFKPのC123が含まれていた。(図9C)(図9A)に記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド(10 μM)のisoTOP-ABPP分析。(図9D)RNF114は、231MFP細胞においてショートヘアピンRNAオリゴヌクレオチドを使用して安定してノックダウンされた。shRNF114細胞におけるRNF114ノックダウンは、sh対照細胞と比較してqPCRによって確認した。細胞増殖は、ヘキスト染色によって細胞を播種してから48時間後に評価した。(図9E)ニンボリドに対する231MFP sh対照およびshRNF114の感受性。231MFP sh対照およびshRNF114細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後にヘキスト染色により細胞増殖を評価した。ニンボリド処理による%増殖を、sh対照またはshRNF114対照群それぞれに対して正規化した。(図9D~9E)に示されるデータは、平均±semである。(図9B~9E)に示されるデータは、n=6/群からのものである。(図9D、9E)の有意性は、sh対照群と比較して*p<0.05として表される。

【図10A】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。(図10A)ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図10B)アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図10C)231MFP乳癌細胞プロテオームのニンボリドプローブ標識。231MFPプロテオームをDMSOまたはニンボリド(10 μM、30分)とプレインキュベートした後、ニンボリド-アルキンプローブ(1 μM、1時間)で標識し、続いてローダミン-アジドのCuAAC付加、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光の分析を行った。ニンボリド競合バンドは、PTOV1およびRNF114の分子量に対応する。(図10D)ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド(100 μM、30分)とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ(10 μM、1時間)で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、1 mg/mlのBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ(10 μM、1時間)で標識した。両方の実験について、RNF114のニンボリド-アルキン標識および銀染色が示されている。(図10E)純粋なRNF114タンパク質をニンボリド(100 μM、1時間)で標識し、トリプシン消化およびLC-MS/MS分析に供した。示されているのは、RNF114のC8へのニンボリド修飾付加物である。ペプチド配列は、配列番号2の残基7~26に対応する。(図10C~10D)に示されるデータは、n=3/群からのものである。

【図10B】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。(図10A)ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図10B)アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図10C)231MFP乳癌細胞プロテオームのニンボリドプローブ標識。231MFPプロテオームをDMSOまたはニンボリド(10 μM、30分)とプレインキュベートした後、ニンボリド-アルキンプローブ(1 μM、1時間)で標識し、続いてローダミン-アジドのCuAAC付加、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光の分析を行った。ニンボリド競合バンドは、PTOV1およびRNF114の分子量に対応する。(図10D)ニンボリドプロー

10

20

30

40

50

ブで標識された純粋なヒト RNF114 タンパク質のゲルベース ABPP 分析。上の 2 つのパネルでは、純粋な RNF114 タンパク質を DMSO ビヒクルまたはニンボリド (100 μ M、30 分) とプレインキュベートした後、PBS 中のニンボリドプローブ (10 μ M、1 時間) で標識した。下の 2 つのパネルでは、純粋な野生型および C8A 突然変異体 RNF114 タンパク質を、1 mg/ml の BSA を含む PBS 中のニンボリドプローブ (10 μ M、1 時間) で標識した。両方の実験について、RNF114 のニンボリド-アルキン標識および銀染色が示されている。(図 10E) 純粋な RNF114 タンパク質をニンボリド (100 μ M、1 時間) で標識し、トリプシン消化および LC-MS/MS 分析に供した。示されているのは、RNF114 の C8 へのニンボリド修飾付加物である。ペプチド配列は、配列番号 2 の残基 7~26 に対応する。(図 10C~10D) に示されるデータは、n = 3 / 群からのものである。

10

【図 10C】ニンボリドは RNF114 の C8 と共有結合的に反応する。(図 10A) ニンボリドは、PONDR によって評価されるように、RNF114 内の天然変性領域を標的とする。(図 10B) アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図 10C) 231MF P 乳癌細胞プロテオームのニンボリドプローブ標識。231MF P プロテオームを DMSO またはニンボリド (10 μ M、30 分) とプレインキュベートした後、ニンボリド-アルキンプローブ (1 μ M、1 時間) で標識し、続いてローダミン-アジドの CuAAC 付加、SDS/PAGE およびゲル内蛍光の分析を行った。ニンボリド競合バンドは、PTOV1 および RNF114 の分子量に対応する。(図 10D) ニンボリドプローブで標識された純粋なヒト RNF114 タンパク質のゲルベース ABPP 分析。上の 2 つのパネルでは、純粋な RNF114 タンパク質を DMSO ビヒクルまたはニンボリド (100 μ M、30 分) とプレインキュベートした後、PBS 中のニンボリドプローブ (10 μ M、1 時間) で標識した。下の 2 つのパネルでは、純粋な野生型および C8A 突然変異体 RNF114 タンパク質を、1 mg/ml の BSA を含む PBS 中のニンボリドプローブ (10 μ M、1 時間) で標識した。両方の実験について、RNF114 のニンボリド-アルキン標識および銀染色が示されている。(図 10E) 純粋な RNF114 タンパク質をニンボリド (100 μ M、1 時間) で標識し、トリプシン消化および LC-MS/MS 分析に供した。示されているのは、RNF114 の C8 へのニンボリド修飾付加物である。ペプチド配列は、配列番号 2 の残基 7~26 に対応する。(図 10C~10D) に示されるデータは、n = 3 / 群からのものである。

20

30

【図 10D】ニンボリドは RNF114 の C8 と共有結合的に反応する。(図 10A) ニンボリドは、PONDR によって評価されるように、RNF114 内の天然変性領域を標的とする。(図 10B) アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図 10C) 231MF P 乳癌細胞プロテオームのニンボリドプローブ標識。231MF P プロテオームを DMSO またはニンボリド (10 μ M、30 分) とプレインキュベートした後、ニンボリド-アルキンプローブ (1 μ M、1 時間) で標識し、続いてローダミン-アジドの CuAAC 付加、SDS/PAGE およびゲル内蛍光の分析を行った。ニンボリド競合バンドは、PTOV1 および RNF114 の分子量に対応する。(図 10D) ニンボリドプローブで標識された純粋なヒト RNF114 タンパク質のゲルベース ABPP 分析。上の 2 つのパネルでは、純粋な RNF114 タンパク質を DMSO ビヒクルまたはニンボリド (100 μ M、30 分) とプレインキュベートした後、PBS 中のニンボリドプローブ (10 μ M、1 時間) で標識した。下の 2 つのパネルでは、純粋な野生型および C8A 突然変異体 RNF114 タンパク質を、1 mg/ml の BSA を含む PBS 中のニンボリドプローブ (10 μ M、1 時間) で標識した。両方の実験について、RNF114 のニンボリド-アルキン標識および銀染色が示されている。(図 10E) 純粋な RNF114 タンパク質をニンボリド (100 μ M、1 時間) で標識し、トリプシン消化および LC-MS/MS 分析に供した。示されているのは、RNF114 の C8 へのニンボリド修飾付加物である。ペプチド配列は、配列番号 2 の残基 7~26 に対応する。(図 10C~10D) に示されるデータは、n = 3 / 群からのものである。

40

【図 10E】ニンボリドは RNF114 の C8 と共有結合的に反応する。(図 10A) ニ

50

ンボリドは、POND Rによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図10B)アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図10C)231MFP乳癌細胞プロテオームのニンボリドプローブ標識。231MFPプロテオームをDMSOまたはニンボリド(100 μ M、30分)とプレインキュベートした後、ニンボリド-アルキンプローブ(1 μ M、1時間)で標識し、続いてローダミン-アジドのCuAAC付加、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光の分析を行った。ニンボリド競合バンドは、PTOV1およびRNF114の分子量に対応する。(図10D)ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド(100 μ M、30分)とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ(10 μ M、1時間)で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、1mg/mlのBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ(10 μ M、1時間)で標識した。両方の実験について、RNF114のニンボリド-アルキン標識および銀染色が示されている。(図10E)純粋なRNF114タンパク質をニンボリド(100 μ M、1時間)で標識し、トリプシン消化およびLC-MS/MS分析に供した。示されているのは、RNF114のC8へのニンボリド修飾付加物である。ペプチド配列は、配列番号2の残基7~26に対応する。(図10C~10D)に示されるデータは、n=3/群からのものである。

【図11A】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114活性を阻害する。(図11A)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21を加えた場合、または加えていない場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチン(左)またはp21(右)に対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド(100 μ M)をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。(図11B)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド(100 μ M)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図11C)純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド(100 μ M)によって阻害された。D)231MFP細胞をニンボリド(100 μ M)で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。(図11A~11D)に示されるゲルは、n=3/群からの代表的な画像である。(図11C)に示されるデータは、平均 $\pm$ semである。(図11C)に示されるデータは、n=3/群からのものである。(図11C)の有意性は、(図11C)ではp21/RNF114群と比較して、または(図11D)では各時点についてのビヒクル処理対照群に対して、*p<0.05として表される。

【図11B】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114活性を阻害する。(図11A)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21を加えた場合、または加えていない場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチン(左)またはp21(右)に対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド(100 μ M)をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。(図11B)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド(100 μ M)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図11C)純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド(100 μ M)によって阻害された。D)231MFP細胞をニンボリド(100 μ M)で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。(図11A~11D)に示されるゲルは、n=3/群からの代表的な画像である。(図11C)に示されるデータは、平均 $\pm$ semである。

(図11C)に示されるデータは、n=3/群からのものである。(図11C)の有意性

10

20

30

40

50

は、(図11C)ではp21/RNF114群と比較して、または(図11D)では各時点についてのビヒクル処理対照群に対して、* $p < 0.05$ として表される。

【図11C】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114活性を阻害する。(図11A)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21を加えた場合、または加えていない場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチン(左)またはp21(右)に対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド(100 μ M)をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。(図11B)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド(100 μ M)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図11C)純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド(100 μ M)によって阻害された。D)231MFP細胞をニンボリド(100 μ M)で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。(図11A~11D)に示されるゲルは、 $n = 3$ / 群からの代表的な画像である。(図11C)に示されるデータは、平均 $\pm$ semである。

(図11C)に示されるデータは、 $n = 3$ / 群からのものである。(図11C)の有意性は、(図11C)ではp21/RNF114群と比較して、または(図11D)では各時点についてのビヒクル処理対照群に対して、* $p < 0.05$ として表される。

【図11D】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114活性を阻害する。(図11A)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21を加えた場合、または加えていない場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチン(左)またはp21(右)に対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド(100 μ M)をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。(図11B)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド(100 μ M)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図11C)純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド(100 μ M)によって阻害された。D)231MFP細胞をニンボリド(100 μ M)で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。(図11A~11D)に示されるゲルは、 $n = 3$ / 群からの代表的な画像である。(図11C)に示されるデータは、平均 $\pm$ semである。

(図11C)に示されるデータは、 $n = 3$ / 群からのものである。(図11C)の有意性は、(図11C)ではp21/RNF114群と比較して、または(図11D)では各時点についてのビヒクル処理対照群に対して、* $p < 0.05$ として表される。

【図12A】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図12A)RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。(図12B、12C)12時間のXH1処理(図12B)またはXH2(図12C)処理(100 nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1 μ M)で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12D)12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12E~12G)12時間のXH2処理(100 nM)の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243(10 μ M)(E)、JQ1(1 μ M)(F)またはエメチン(75 μ M)(図12G)で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照とをSDS/PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンシトメトリーによって定量化した(図12B~12G)。(B~G)に示すゲルは、 $n = 3$ / 群の代

10

20

30

40

50

表的な画像である。(B、C、E～G)に示されているデータは、平均±semである。

(図12B、12C、12E～12G)の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して* $p < 0.05$ 、XH2処理群と比較して# $p < 0.05$ として表される。

【図12B】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図12A)RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。(図12B、12C)12時間のXH1処理(図12B)またはXH2(図12C)処理(100nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1μM)で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12D)12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12E～12G)12時間のXH2処理(100nM)の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243(10μM)(E)、JQ1(1μM)(F)またはエメチン(75μM)(図12G)で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照とをSDS/PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンシトメトリーによって定量化した(図12B～12G)。(B～G)に示すゲルは、 $n = 3$ ／群の代表的な画像である。(B、C、E～G)に示されているデータは、平均±semである。

(図12B、12C、12E～12G)の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して* $p < 0.05$ 、XH2処理群と比較して# $p < 0.05$ として表される。

【図12C】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図12A)RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。(図12B、12C)12時間のXH1処理(図12B)またはXH2(図12C)処理(100nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1μM)で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12D)12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12E～12G)12時間のXH2処理(100nM)の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243(10μM)(E)、JQ1(1μM)(F)またはエメチン(75μM)(図12G)で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照とをSDS/PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンシトメトリーによって定量化した(図12B～12G)。(B～G)に示すゲルは、 $n = 3$ ／群の代表的な画像である。(B、C、E～G)に示されているデータは、平均±semである。

(図12B、12C、12E～12G)の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して* $p < 0.05$ 、XH2処理群と比較して# $p < 0.05$ として表される。

【図12D】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図12A)RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。(図12B、12C)12時間のXH1処理(図12B)またはXH2(図12C)処理(100nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1μM)で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12D)12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。(図12E～12G)12時間のXH2処理(100nM)の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243(10μM)(E)、JQ1(1μM)(F)またはエメチン(75μM)(図12G)で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照とをSDS/PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンシトメトリ

ーによって定量化した（図12B～12G）。（B～G）に示すゲルは、 $n = 3$ ／群の代表的な画像である。（B、C、E～G）に示されているデータは、平均±semである。

（図12B、12C、12E～12G）の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して $*p < 0.05$ 、XH2処理群と比較して $\#p < 0.05$ として表される。

【図12E】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。（図12A）RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。（図12B、12C）12時間のXH1処理（図12B）またはXH2（図12C）処理（100nM）の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ（BTZ）（1μM）で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。（図12D）12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。（図12E～12G）12時間のXH2処理（100nM）の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243（10μM）（E）、JQ1（1μM）（F）またはエメチン（75μM）（図12G）で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照とをSDS／PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンシトメトリーによって定量化した（図12B～12G）。（B～G）に示すゲルは、 $n = 3$ ／群の代表的な画像である。（B、C、E～G）に示されているデータは、平均±semである。

（図12B、12C、12E～12G）の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して $*p < 0.05$ 、XH2処理群と比較して $\#p < 0.05$ として表される。

【図12F】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。（図12A）RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。（図12B、12C）12時間のXH1処理（図12B）またはXH2（図12C）処理（100nM）の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ（BTZ）（1μM）で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。（図12D）12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。（図12E～12G）12時間のXH2処理（100nM）の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243（10μM）（E）、JQ1（1μM）（F）またはエメチン（75μM）（図12G）で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照とをSDS／PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンシトメトリーによって定量化した（図12B～12G）。（B～G）に示すゲルは、 $n = 3$ ／群の代表的な画像である。（B、C、E～G）に示されているデータは、平均±semである。

（図12B、12C、12E～12G）の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して $*p < 0.05$ 、XH2処理群と比較して $\#p < 0.05$ として表される。

【図12G】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。（図12A）RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH1およびXH2を合成するための経路。（図12B、12C）12時間のXH1処理（図12B）またはXH2（図12C）処理（100nM）の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ（BTZ）（1μM）で前処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。（図12D）12時間のMZ1またはXH2処理で処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4レベル。（図12E～12G）12時間のXH2処理（100nM）の前30分間およびその処理中の、DMSOビヒクルまたはE3リガーゼ阻害剤TAK-243（10μM）（E）、JQ1（1μM）（F）またはエメチン（75μM）（図12G）で前処理した231MFP乳癌細胞のBRD4レベル。長いおよび短いBRD4アイソフォームと、GAPDHローディング対照と

を SDS / PAGE および ウェスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化した (図 12 B ~ 12 G)。(B ~ G) に示すゲルは、 $n = 3$ / 群の代表的な画像である。(B、C、E ~ G) に示されているデータは、平均 $\pm$ s e m である。(図 12 B、12 C、12 E ~ 12 G) の有意性は、ビヒクル処理対照群と比較して $* p < 0.05$ 、XH2 処理群と比較して $\# p < 0.05$ として表される。

【図 13 A】RNF114 に対して合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを同定するための、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。(図 13 A) 純粋な RNF114 タンパク質の IA-アルキン ($10 \mu\text{M}$) または JNS27 ($50 \mu\text{M}$) 標識に対するニンボリド競合のゲルベース ABPP 分析。IA-アルキンおよび JNS27 プローブの構造 (反応性部分が赤で強調表示されている) が示されている。野生型および C8A 突然変異体 RNF114 タンパク質の JNS27 標識に対するニンボリド ($50 \mu\text{M}$) 競合のゲルベース ABPP 分析も示されている。これらの実験では、DMSO またはニンボリドを 30 分間ブレインキュベートした後、1 時間プローブ標識した。(図 13 B) RNF114 の JNS27 標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングしたとき、EN62 はトップヒットの 1 つであった。示されているのは、アクリルアミド反応性部分が赤で強調表示されている EN62 の構造である。純粋な RNF114 の JNS27 標識に対する EN62 のゲルベース ABPP 分析も示されている。(図 13 C) 野生型もしくは C8A 突然変異体 RNF114 による DMSO または EN62 ($50 \mu\text{M}$) 処理による RNF114 自己ユビキチン化アッセイ。(図 13 D) インビトロでの 231MFP 乳癌細胞プロテオームにおける EN62 の IsoTOP-ABPP 分析。DMSO または EN62 ($50 \mu\text{M}$) を 231MFP プロテオームとブレインキュベートしてから 30 分後に IA-アルキン標識 ($100 \mu\text{M}$) を 1 時間行い、続いて isoTOP-ABPP 法を行った。(図 13 E) ヘキスト染色によって評価した 48 時間後の EN62 による 231MFP 細胞の生存。(図 13 F) ビヒクル (18 : 1 : 1 の生理食塩水 : PEG40 : エタノール) または EN62 ($50 \text{mg} / \text{kg}$ i p、1 日 1 回、231MFP 細胞の皮下注射の 17 日後に開始) で処理した C. B-17 雌 SCID マウスにおける 231MFP 腫瘍異種移植片の増殖。(図 13 A ~ 13 C) に示されるゲルは、 $n = 3$ / 群からの代表的な画像である。(図 13 D、13 F) に示されるデータは、平均 $\pm$ s e m、 $n = 3 \sim 8$ / 群である。(図 13 E ~ 13 F) の有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $* p < 0.05$ として表される。

【図 13 B】RNF114 に対して合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを同定するための、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。(図 13 A) 純粋な RNF114 タンパク質の IA-アルキン ($10 \mu\text{M}$) または JNS27 ($50 \mu\text{M}$) 標識に対するニンボリド競合のゲルベース ABPP 分析。IA-アルキンおよび JNS27 プローブの構造 (反応性部分が赤で強調表示されている) が示されている。野生型および C8A 突然変異体 RNF114 タンパク質の JNS27 標識に対するニンボリド ($50 \mu\text{M}$) 競合のゲルベース ABPP 分析も示されている。これらの実験では、DMSO またはニンボリドを 30 分間ブレインキュベートした後、1 時間プローブ標識した。(図 13 B) RNF114 の JNS27 標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングしたとき、EN62 はトップヒットの 1 つであった。示されているのは、アクリルアミド反応性部分が赤で強調表示されている EN62 の構造である。純粋な RNF114 の JNS27 標識に対する EN62 のゲルベース ABPP 分析も示されている。(図 13 C) 野生型もしくは C8A 突然変異体 RNF114 による DMSO または EN62 ($50 \mu\text{M}$) 処理による RNF114 自己ユビキチン化アッセイ。(図 13 D) インビトロでの 231MFP 乳癌細胞プロテオームにおける EN62 の IsoTOP-ABPP 分析。DMSO または EN62 ($50 \mu\text{M}$) を 231MFP プロテオームとブレインキュベートしてから 30 分後に IA-アルキン標識 ($100 \mu\text{M}$) を 1 時間行い、続いて isoTOP-ABPP 法を行った。(図 13 E) ヘキスト染色によって評価した 48 時間後の EN62 による 231MFP 細胞の生存。(図 13 F) ビヒクル (18 : 1 : 1 の生理食塩水 : PEG40 : エタノール) または EN62 ($50 \text{mg} / \text{kg}$ i p

10

20

30

40

50

、1日1回、231MFP細胞の皮下注射の17日後に開始)で処理したC.B-17雌SCIDマウスにおける231MFP腫瘍異種移植片の増殖。(図13A~13C)に示されるゲルは、 $n=3$ ／群からの代表的な画像である。(図13D、13F)に示されるデータは、平均±sem、 $n=3\sim 8$ ／群である。(図13E~13F)の有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p<0.05$ として表される。

【図13C】RNF114に対して合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを同定するための、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。(図13A)純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン(10μM)またはJNS27(50μM)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド(50μM)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間ブレインキュベートした後、1時間プローブ標識した。(図13B)RNF114のJNS27標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングしたとき、EN62はトップヒットの1つであった。示されているのは、アクリルアミド反応性部分が赤で強調表示されているEN62の構造である。純粋なRNF114のJNS27標識に対するEN62のゲルベースABPP分析も示されている。(図13C)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはEN62(50μM)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図13D)インビトロでの231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるEN62のIsoTOP-ABPP分析。DMSOまたはEN62(50μM)を231MFPプロテオームとブレインキュベートしてから30分後にIA-アルキン標識(100μM)を1時間行い、続いてisoTOP-ABPP法を行った。(図13E)ヘキスト染色によって評価した48時間後のEN62による231MFP細胞の生存。(図13F)ビヒクル(18:1:1の生理食塩水:PEG40:エタノール)またはEN62(50mg/kg ip、1日1回、231MFP細胞の皮下注射の17日後に開始)で処理したC.B-17雌SCIDマウスにおける231MFP腫瘍異種移植片の増殖。(図13A~13C)に示されるゲルは、 $n=3$ ／群からの代表的な画像である。(図13D、13F)に示されるデータは、平均±sem、 $n=3\sim 8$ ／群である。(図13E~13F)の有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p<0.05$ として表される。

【図13D】RNF114に対して合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを同定するための、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。(図13A)純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン(10μM)またはJNS27(50μM)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド(50μM)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間ブレインキュベートした後、1時間プローブ標識した。(図13B)RNF114のJNS27標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングしたとき、EN62はトップヒットの1つであった。示されているのは、アクリルアミド反応性部分が赤で強調表示されているEN62の構造である。純粋なRNF114のJNS27標識に対するEN62のゲルベースABPP分析も示されている。(図13C)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはEN62(50μM)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図13D)インビトロでの231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるEN62のIsoTOP-ABPP分析。DMSOまたはEN62(50μM)を231MFPプロテオームとブレインキュベートしてから30分後にIA-アルキン標識(100μM)を1時間行い、続いてisoTOP-ABPP法を行った。(図13E)ヘキスト染色によって評価した48時間後のEN62による231MFP細胞の生存。(図13F)ビヒクル(18:1:1の生理食塩水:PEG40:エタノール)またはEN62(50mg/kg ip

10

20

30

40

50

、1日1回、231MFP細胞の皮下注射の17日後に開始)で処理したC.B-17雌SCIDマウスにおける231MFP腫瘍異種移植片の増殖。(図13A~13C)に示されるゲルは、 $n=3$ ／群からの代表的な画像である。(図13D、13F)に示されるデータは、平均 $\pm$ sem、 $n=3\sim 8$ ／群である。(図13E~13F)の有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p<0.05$ として表される。

【図13E】RNF114に対して合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを同定するための、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。(図13A)純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン(10 μ M)またはJNS27(50 μ M)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド(50 μ M)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間ブレインキュベートした後、1時間プローブ標識した。(図13B)RNF114のJNS27標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングしたとき、EN62はトップヒットの1つであった。示されているのは、アクリルアミド反応性部分が赤で強調表示されているEN62の構造である。純粋なRNF114のJNS27標識に対するEN62のゲルベースABPP分析も示されている。(図13C)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはEN62(50 μ M)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図13D)インビトロでの231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるEN62のIsoTOP-ABPP分析。DMSOまたはEN62(50 μ M)を231MFPプロテオームとブレインキュベートしてから30分後にIA-アルキン標識(100 μ M)を1時間行い、続いてisoTOP-ABPP法を行った。(図13E)ヘキスト染色によって評価した48時間後のEN62による231MFP細胞の生存。(図13F)ビヒクル(18:1:1の生理食塩水:PEG40:エタノール)またはEN62(50mg/kg ip、1日1回、231MFP細胞の皮下注射の17日後に開始)で処理したC.B-17雌SCIDマウスにおける231MFP腫瘍異種移植片の増殖。(図13A~13C)に示されるゲルは、 $n=3$ ／群からの代表的な画像である。(図13D、13F)に示されるデータは、平均 $\pm$ sem、 $n=3\sim 8$ ／群である。(図13E~13F)の有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p<0.05$ として表される。

【図13F】RNF114に対して合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを同定するための、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。(図13A)純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン(10 μ M)またはJNS27(50 μ M)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド(50 μ M)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間ブレインキュベートした後、1時間プローブ標識した。(図13B)RNF114のJNS27標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングしたとき、EN62はトップヒットの1つであった。示されているのは、アクリルアミド反応性部分が赤で強調表示されているEN62の構造である。純粋なRNF114のJNS27標識に対するEN62のゲルベースABPP分析も示されている。(図13C)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはEN62(50 μ M)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図13D)インビトロでの231MFP乳癌細胞プロテオームにおけるEN62のIsoTOP-ABPP分析。DMSOまたはEN62(50 μ M)を231MFPプロテオームとブレインキュベートしてから30分後にIA-アルキン標識(100 μ M)を1時間行い、続いてisoTOP-ABPP法を行った。(図13E)ヘキスト染色によって評価した48時間後のEN62による231MFP細胞の生存。(図13F)ビヒクル(18:1:1の生理食塩水:PEG40:エタノール)またはEN62(50mg/kg ip

10

20

30

40

50

、1日1回、231MFP細胞の皮下注射の17日後に開始)で処理したC.B-17雌SCIDマウスにおける231MFP腫瘍異種移植片の増殖。(図13A~13C)に示されるゲルは、 $n=3$ /群からの代表的な画像である。(図13D、13F)に示されるデータは、平均 $\pm$ sem、 $n=3\sim 8$ /群である。(図13E~13F)の有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p<0.05$ として表される。

【図14】231MFP乳癌細胞におけるPTOV1およびPFKPのノックダウン。PTOV1およびPFKPは、shRNAオリゴヌクレオチドで安定してノックダウンされ、qPCRによって発現が確認された。231MFP sh対照細胞は、GFPを標的とするshRNAオリゴヌクレオチドを使用した。231MFP sh対照、shPFKPおよびshPTOV1細胞の増殖を、ヘキスト染色によって48時間後に評価した。示されているデータは、平均 $\pm$ sem、 $n=6$ /群である。有意性は、sh対照細胞と比較して $*p<0.05$ として表される。

10

【図15】ニンボリド処理した231MFP乳癌細胞におけるp53のレベル。DMSOビヒクルまたはニンボリド(100 μ M)で処理した231MFP乳癌細胞のp53レベルは、ローディング対照としてのGAPDHレベルと共にウエスタンブロッティングによって評価した。ゲルは $n=3$ /群の代表である。プロットは、デンストメトリーによって定量化し、ローディング対照に対して正規化した。棒グラフに示されているデータは、平均 $\pm$ semである。

【図16A-1】RNF114に対するシステイン反応性リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。システイン反応性共有結合リガンドは、純粋なヒトRNF114タンパク質のJNS27標識に対してスクリーニングした。共有結合リガンド(50 μ M)をRNF114と30分間プレインキュベートした後、JNS27で1時間標識した。次に、ローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加した。タンパク質をSDS/PAGEで分離し、ゲル内蛍光で可視化した。プローブ標識の阻害を示したこれらのタンパク質を、以下の用量反応研究において再試験して、RNF114のJNS27標識を再現性よく阻害したヒットを同定した。

20

【図16A-2】RNF114に対するシステイン反応性リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。システイン反応性共有結合リガンドは、純粋なヒトRNF114タンパク質のJNS27標識に対してスクリーニングした。共有結合リガンド(50 μ M)をRNF114と30分間プレインキュベートした後、JNS27で1時間標識した。次に、ローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加した。タンパク質をSDS/PAGEで分離し、ゲル内蛍光で可視化した。プローブ標識の阻害を示したこれらのタンパク質を、以下の用量反応研究において再試験して、RNF114のJNS27標識を再現性よく阻害したヒットを同定した。

30

【図16B-1】RNF114に対するシステイン反応性リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。システイン反応性共有結合リガンドは、純粋なヒトRNF114タンパク質のJNS27標識に対してスクリーニングした。共有結合リガンド(50 μ M)をRNF114と30分間プレインキュベートした後、JNS27で1時間標識した。次に、ローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加した。タンパク質をSDS/PAGEで分離し、ゲル内蛍光で可視化した。プローブ標識の阻害を示したこれらのタンパク質を、以下の用量反応研究において再試験して、RNF114のJNS27標識を再現性よく阻害したヒットを同定した。

40

【図16B-2】RNF114に対するシステイン反応性リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。システイン反応性共有結合リガンドは、純粋なヒトRNF114タンパク質のJNS27標識に対してスクリーニングした。共有結合リガンド(50 μ M)をRNF114と30分間プレインキュベートした後、JNS27で1時間標識した。次に、ローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加した。タンパク質をSDS/PAGEで分離し、ゲル内蛍光で可視化した。プローブ標識の阻害を示したこれらのタンパク質を、以下の用量反応研究において再試験して、RNF114のJNS27標識を再現性よく阻害したヒットを同定した。

50

【図16C】RNF114に対するシステイン反応性リガンドのゲルベースABPPスクリーニング。システイン反応性共有結合リガンドは、純粋なヒトRNF114タンパク質のJNS27標識に対してスクリーニングした。共有結合リガンド(50 μM)をRNF114と30分間プレインキュベートした後、JNS27で1時間標識した。次に、ローダミン-AジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加した。タンパク質をSDS/PAGEで分離し、ゲル内蛍光で可視化した。プローブ標識の阻害を示したこれらのタンパク質を、以下の用量反応研究において再試験して、RNF114のJNS27標識を再現性よく阻害したヒットを同定した。

【図17A】ニンボリドは乳癌細胞の増殖または生存を低減する。(図17A~17B) 血清含有培地における231MFP乳癌細胞の増殖(図17A)および無血清細胞生存(図17B)。図17A~17Bに示されるデータは、平均±sem、n=6の生物学的に独立したサンプル/群である。(図17C)231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後、フローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロピジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。示されているのは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なFACSデータである。FITC+/PI+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージの定量化が図18Dに示されている。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して、図17Aでは100および10 μMの場合、それぞれ*P=7.75 x 10⁻¹⁴および1.14 x 10⁻¹³であり、図17Bでは、100および10 μMの場合、それぞれ*P=3.88 x 10⁻⁸および1.53 x 10⁻⁷として表される。

【図17B】ニンボリドは乳癌細胞の増殖または生存を低減する。(図17A~17B) 血清含有培地における231MFP乳癌細胞の増殖(図17A)および無血清細胞生存(図17B)。図17A~17Bに示されるデータは、平均±sem、n=6の生物学的に独立したサンプル/群である。(図17C)231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後、フローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロピジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。示されているのは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なFACSデータである。FITC+/PI+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージの定量化が図18Dに示されている。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して、図17Aでは100および10 μMの場合、それぞれ*P=7.75 x 10⁻¹⁴および1.14 x 10⁻¹³であり、図17Bでは、100および10 μMの場合、それぞれ*P=3.88 x 10⁻⁸および1.53 x 10⁻⁷として表される。

【図17C】ニンボリドは乳癌細胞の増殖または生存を低減する。(図17A~17B) 血清含有培地における231MFP乳癌細胞の増殖(図17A)および無血清細胞生存(図17B)。図17A~17Bに示されるデータは、平均±sem、n=6の生物学的に独立したサンプル/群である。(図17C)231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後、フローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロピジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。示されているのは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なFACSデータである。FITC+/PI+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージの定量化が図18Dに示されている。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクルで処理した対照と比較して、図17Aでは100および10 μMの場合、それぞれ*P=7.75 x 10⁻¹⁴および1.14 x 10⁻¹³であり、図17Bでは、100および10 μMの場合、それぞれ*P=3.88 x 10⁻⁸および1.53 x 10⁻⁷として表される。

【図18A】ニンボリドは乳癌細胞の増殖および生存を低減し、アポトーシスを誘導する。(図18A~18B) 血清含有培地におけるHCC38乳癌細胞の増殖(図18A)および無血清細胞生存(図18B)。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、

48時間後に細胞生存率を評価した。(図18C)示されているのは、フローサイトメトリーデータのゲーティング戦略である。2つのゲーティングステップを使用した。最初のステップでは、前方散乱および側方散乱によってゲートした。2番目のゲートは、細胞死染色(PI/アネキシン)による象限への分離に基づいていた。(図18D~18E)231MFP(図18D)およびHCC38(図18E)細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後にフローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロビジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。図17Cに示される図18Dの231MFP細胞およびHCC38細胞からの代表的なFACSデータが、(図18E)の左側のパネルに示されている。図18D~18Eの棒グラフは、PI+/アネキシン-V+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージである。図18A~18Bおよび図18D~18Eに示されるデータは、平均±semであり、図18A~18Bではn=6、図18D~18Eではn=3の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、図18Aでは、100および10μMの場合、それぞれ $p=1.64 \times 10^{-13}$ および 2.05×10^{-13} 、図18Bでは、100および10μMの場合、それぞれ $p=2.09 \times 10^{-11}$ および 7.07×10^{-12} 、図18Dの24時間データでは、10および100μMの場合、それぞれ $p=9.05 \times 10^{-5}$ および 1.87×10^{-5} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ $p=0.00139$ 、 0.000142 および 7.97×10^{-9} 、図18Eの24時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ $p=0.00424$ 、 0.0182 および 2.22×10^{-11} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ $p=6.68 \times 10^{-6}$ 、 4.70×10^{-7} および 9.00×10^{-11} として表される。

【図18B】ニンボリドは乳癌細胞の増殖および生存を低減し、アポトーシスを誘導する。(図18A~18B)血清含有培地におけるHCC38乳癌細胞の増殖(図18A)および無血清細胞生存(図18B)。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後に細胞生存率を評価した。(図18C)示されているのは、フローサイトメトリーデータのゲーティング戦略である。2つのゲーティングステップを使用した。最初のステップでは、前方散乱および側方散乱によってゲートした。2番目のゲートは、細胞死染色(PI/アネキシン)による象限への分離に基づいていた。(図18D~18E)231MFP(図18D)およびHCC38(図18E)細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後にフローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロビジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。図17Cに示される図18Dの231MFP細胞およびHCC38細胞からの代表的なFACSデータが、(図18E)の左側のパネルに示されている。図18D~18Eの棒グラフは、PI+/アネキシン-V+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージである。図18A~18Bおよび図18D~18Eに示されるデータは、平均±semであり、図18A~18Bではn=6、図18D~18Eではn=3の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、図18Aでは、100および10μMの場合、それぞれ $p=1.64 \times 10^{-13}$ および 2.05×10^{-13} 、図18Bでは、100および10μMの場合、それぞれ $p=2.09 \times 10^{-11}$ および 7.07×10^{-12} 、図18Dの24時間データでは、10および100μMの場合、それぞれ $p=9.05 \times 10^{-5}$ および 1.87×10^{-5} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ $p=0.00139$ 、 0.000142 および 7.97×10^{-9} 、図18Eの24時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ $p=0.00424$ 、 0.0182 および 2.22×10^{-11} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ $p=6.68 \times 10^{-6}$ 、 4.70×10^{-7} および 9.00×10^{-11} として表され

る。

【図18C】ニンボリドは乳癌細胞の増殖および生存を低減し、アポトーシスを誘導する。(図18A～18B) 血清含有培地におけるHCC38乳癌細胞の増殖(図18A)および無血清細胞生存(図18B)。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後に細胞生存率を評価した。(図18C) 示されているのは、フローサイトメトリーデータのゲーティング戦略である。2つのゲーティングステップを使用した。最初のステップでは、前方散乱および側方散乱によってゲートした。2番目のゲートは、細胞死染色(PI/アネキシン)による象限への分離に基づいていた。(図18D～18E) 231MFP(図18D)およびHCC38(図18E)細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後にフローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロピジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。図17Cに示される図18Dの231MFP細胞およびHCC38細胞からの代表的なFACSデータが、(図18E)の左側のパネルに示されている。図18D～18Eの棒グラフは、PI+/アネキシン-V+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージである。図18A～18Bおよび図18D～18Eに示されるデータは、平均±semであり、図18A～18Bではn=6、図18D～18Eではn=3の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、図18Aでは、100および10μMの場合、それぞれ* $p=1.64 \times 10^{-13}$ および 2.05×10^{-13} 、図18Bでは、100および10μMの場合、それぞれ* $p=2.09 \times 10^{-11}$ および 7.07×10^{-12} 、図18Dの24時間データでは、10および100μMの場合、それぞれ* $p=9.05 \times 10^{-5}$ および 1.87×10^{-5} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ* $p=0.00139$ 、 0.000142 および 7.97×10^{-9} 、図18Eの24時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ* $p=0.00424$ 、 0.0182 および 2.22×10^{-11} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ* $p=6.68 \times 10^{-6}$ 、 4.70×10^{-7} および 9.00×10^{-11} として表される。

【図18D】ニンボリドは乳癌細胞の増殖および生存を低減し、アポトーシスを誘導する。(図18A～18B) 血清含有培地におけるHCC38乳癌細胞の増殖(図18A)および無血清細胞生存(図18B)。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで処理し、48時間後に細胞生存率を評価した。(図18C) 示されているのは、フローサイトメトリーデータのゲーティング戦略である。2つのゲーティングステップを使用した。最初のステップでは、前方散乱および側方散乱によってゲートした。2番目のゲートは、細胞死染色(PI/アネキシン)による象限への分離に基づいていた。(図18D～18E) 231MFP(図18D)およびHCC38(図18E)細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間または48時間処理した後にフローサイトメトリーによって評価したヨウ化プロピジウムおよびアネキシンV陽性(PI+/アネキシンV+)細胞のパーセント。図17Cに示される図18Dの231MFP細胞およびHCC38細胞からの代表的なFACSデータが、(図18E)の左側のパネルに示されている。図18D～18Eの棒グラフは、PI+/アネキシン-V+細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージである。図18A～18Bおよび図18D～18Eに示されるデータは、平均±semであり、図18A～18Bではn=6、図18D～18Eではn=3の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、図18Aでは、100および10μMの場合、それぞれ* $p=1.64 \times 10^{-13}$ および 2.05×10^{-13} 、図18Bでは、100および10μMの場合、それぞれ* $p=2.09 \times 10^{-11}$ および 7.07×10^{-12} 、図18Dの24時間データでは、10および100μMの場合、それぞれ* $p=9.05 \times 10^{-5}$ および 1.87×10^{-5} 、図18Eの48時間データでは、1、10および100μMの場合、それぞれ* $p=0.00139$ 、 0

． 0 0 0 1 4 2 および 7.97×10^{-9} 、図 1 8 E の 2 4 時間データでは、1、1 0 および $100 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 0.00424$ 、 0.0182 および 2.22×10^{-11} 、図 1 8 E の 4 8 時間データでは、1、1 0 および $100 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 6.68 \times 10^{-6}$ 、 4.70×10^{-7} および 9.00×10^{-11} として表される。

【図 1 8 E】ニンボリドは乳癌細胞の増殖および生存を低減し、アポトーシスを誘導する。(図 1 8 A ~ 1 8 B) 血清含有培地における H C C 3 8 乳癌細胞の増殖 (図 1 8 A) および無血清細胞生存 (図 1 8 B)。細胞を D M S O ビヒクルまたはニンボリドで処理し、4 8 時間後に細胞生存率を評価した。(図 1 8 C) 示されているのは、フローサイトメトリデータのゲーティング戦略である。2 つのゲーティングステップを使用した。最初のステップでは、前方散乱および側方散乱によってゲートした。2 番目のゲートは、細胞死染色 (P I / アネキシン) による象限への分離に基づいていた。(図 1 8 D ~ 1 8 E) 2 3 1 M F P (図 1 8 D) および H C C 3 8 (図 1 8 E) 細胞を D M S O ビヒクルまたはニンボリドで 2 4 時間または 4 8 時間処理した後にフローサイトメトリによって評価したヨウ化プロビジウムおよびアネキシン V 陽性 (P I + / アネキシン V +) 細胞のパーセント。図 1 7 C に示される図 1 8 D の 2 3 1 M F P 細胞および H C C 3 8 細胞からの代表的な F A C S データが、(図 1 8 E) の左側のパネルに示されている。図 1 8 D ~ 1 8 E の棒グラフは、P I + / アネキシン V + 細胞として定義されるように定義された後期アポトーシス細胞のパーセンテージである。図 1 8 A ~ 1 8 B および図 1 8 D ~ 1 8 E に示されるデータは、平均 $\pm$ s e m であり、図 1 8 A ~ 1 8 B では $n = 6$ 、図 1 8 D ~ 1 8 E では $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル / 群である。統計的有意性は、不對両側スチューデント t 検定を使用して計算した。有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、図 1 8 A では、 100 および $10 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 1.64 \times 10^{-13}$ および 2.05×10^{-13} 、図 1 8 B では、 100 および $10 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 2.09 \times 10^{-11}$ および 7.07×10^{-12} 、図 1 8 D の 2 4 時間データでは、 10 および $100 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 9.05 \times 10^{-5}$ および 1.87×10^{-5} 、図 1 8 E の 4 8 時間データでは、1、1 0 および $100 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 0.00139$ 、 0.000142 および 7.97×10^{-9} 、図 1 8 E の 2 4 時間データでは、1、1 0 および $100 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 0.00424$ 、 0.0182 および 2.22×10^{-11} 、図 1 8 E の 4 8 時間データでは、1、1 0 および $100 \mu\text{M}$ の場合、それぞれ $*p = 6.68 \times 10^{-6}$ 、 4.70×10^{-7} および 9.00×10^{-11} として表される。

【図 1 9 A】2 3 1 M F P 乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドの i s o T O P - A B P P 分析により、R N F 1 1 4 が標的であることが明らかになった。(図 1 9 A) 図 1 9 A に記載されているようにインサイチュ分析された 2 3 1 M F P 乳癌細胞におけるニンボリド ($10 \mu\text{M}$) の i s o T O P - A B P P 分析。軽い同位体プローブ修飾ペプチド対重い同位体プローブ修飾ペプチド比が左側のプロットに示されており、比が最も高い主要な標的は R N F 1 1 4 の C 8 であった。右側に示されているのは、R N F 1 1 4 の C 8 を持つプローブ修飾ペプチドの代表的な M S 1 の軽いピーク対重いピークである。(図 1 9 B) s i 対照 2 3 1 M F P 細胞と比較した R N F 1 1 4 のウエスタンブロッティングによって検証した R N F 1 1 4 を標的とする低分子干渉 RNA (s i R N A) による R N F 1 1 4 ノックダウン。G A P D H 発現はローディング対照として示されている。示されているゲルは、 $n = 3$ の生物学的複製 / 群からの代表的なゲルである。(図 1 9 C) s i 対照および s i R N F 1 1 4 細胞における 2 4 時間後の 2 3 1 M F P 細胞の増殖。(図 1 9 D) 2 3 1 M F P s i 対照および s i R N F 1 1 4 2 3 1 M F P 乳癌細胞に対するニンボリドの効果。2 3 1 M F P s i 対照および s i R N F 1 1 4 2 3 1 M F P 乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞を D M S O ビヒクルまたはニンボリドで 2 4 時間処理した後、増殖を評価した。s i 対照または s i R N F 1 1 4 群のデータは、各群のそれぞれの D M S O ビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。図 1 9 C に示されるデータは、平均 $\pm$ s e m である。図 1 9 A ~

10

20

30

40

50

19Bに示されるデータは、 $n = 3$ からのものであり、図18D～18Eでは、 $n = 5$ の生物学的に独立したサンプル／群からのものである。図18D～18Eの統計的有意性は、不對兩側スチューデント t 検定を使用して計算した。図18Dの有意性は、 $s i$ 対照細胞と比較して $*P = 4.52 \times 10^{-5}$ として表される。図18Eにおける有意性は、 $s i$ 対照群からの対応するニンボリド処理濃度と比較して、10、6、および $3 \mu M$ の場合、それぞれ $*p = 1.90 \times 10^{-5}$ 、 2.72×10^{-4} および 0.00101 として表される。

【図19B】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドの $i s o T O P - A B P$ P分析により、RNF114が標的であることが明らかになった。(図19A) 図19Aに記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド ($10 \mu M$) の $i s o T O P - A B P$ P分析。軽い同位体プローブ修飾ペプチド対重い同位体プローブ修飾ペプチド比が左側のプロットに示されており、比が最も高い主要な標的はRNF114のC8であった。右側に示されているのは、RNF114のC8を持つプローブ修飾ペプチドの代表的なMS1の軽いピーク対重いピークである。(図19B) $s i$ 対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする低分子干渉RNA ($s i R N A$) によるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。示されているゲルは、 $n = 3$ の生物学的複製／群からの代表的なゲルである。(図19C) $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図19D) 231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、増殖を評価した。 $s i$ 対照または $s i R N F 114$ 群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。図19Cに示されるデータは、平均 $\pm s e m$ である。図19A～19Bに示されるデータは、 $n = 3$ からのものであり、図18D～18Eでは、 $n = 5$ の生物学的に独立したサンプル／群からのものである。図18D～18Eの統計的有意性は、不對兩側スチューデント t 検定を使用して計算した。図18Dの有意性は、 $s i$ 対照細胞と比較して $*P = 4.52 \times 10^{-5}$ として表される。図18Eにおける有意性は、 $s i$ 対照群からの対応するニンボリド処理濃度と比較して、10、6、および $3 \mu M$ の場合、それぞれ $*p = 1.90 \times 10^{-5}$ 、 2.72×10^{-4} および 0.00101 として表される。

【図19C】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドの $i s o T O P - A B P$ P分析により、RNF114が標的であることが明らかになった。(図19A) 図19Aに記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド ($10 \mu M$) の $i s o T O P - A B P$ P分析。軽い同位体プローブ修飾ペプチド対重い同位体プローブ修飾ペプチド比が左側のプロットに示されており、比が最も高い主要な標的はRNF114のC8であった。右側に示されているのは、RNF114のC8を持つプローブ修飾ペプチドの代表的なMS1の軽いピーク対重いピークである。(図19B) $s i$ 対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする低分子干渉RNA ($s i R N A$) によるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。示されているゲルは、 $n = 3$ の生物学的複製／群からの代表的なゲルである。(図19C) $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図19D) 231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、増殖を評価した。 $s i$ 対照または $s i R N F 114$ 群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。図19Cに示されるデータは、平均 $\pm s e m$ である。図19A～

10

20

30

40

50

19Bに示されるデータは、 $n = 3$ からのものであり、図18D～18Eでは、 $n = 5$ の生物学的に独立したサンプル／群からのものである。図18D～18Eの統計的有意性は、不對兩側スチューデント t 検定を使用して計算した。図18Dの有意性は、 $s i$ 対照細胞と比較して $*P = 4.52 \times 10^{-5}$ として表される。図18Eにおける有意性は、 $s i$ 対照群からの対応するニンボリド処理濃度と比較して、10、6、および $3 \mu M$ の場合、それぞれ $*p = 1.90 \times 10^{-5}$ 、 2.72×10^{-4} および 0.00101 として表される。

【図19D】231MFP乳癌細胞プロテオーム中のニンボリドの $i s o T O P - A B P P$ 分析により、RNF114が標的であることが明らかになった。(図19A) 図19Aに記載されているようにインサイチュ分析された231MFP乳癌細胞におけるニンボリド ($10 \mu M$) の $i s o T O P - A B P P$ 分析。軽い同位体プローブ修飾ペプチド対重い同位体プローブ修飾ペプチド比が左側のプロットに示されており、比が最も高い主要な標的はRNF114のC8であった。右側に示されているのは、RNF114のC8を持つプローブ修飾ペプチドの代表的なMS1の軽いピーク対重いピークである。(図19B) $s i$ 対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする低分子干渉RNA ($s i R N A$) によるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。示されているゲルは、 $n = 3$ の生物学的複製／群からの代表的なゲルである。(図19C) $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図19D) 231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、増殖を評価した。 $s i$ 対照または $s i R N F 114$ 群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。図19Cに示されるデータは、平均 $\pm s e m$ である。図19A～19Bに示されるデータは、 $n = 3$ からのものであり、図18D～18Eでは、 $n = 5$ の生物学的に独立したサンプル／群からのものである。図18D～18Eの統計的有意性は、不對兩側スチューデント t 検定を使用して計算した。図18Dの有意性は、 $s i$ 対照細胞と比較して $*P = 4.52 \times 10^{-5}$ として表される。図18Eにおける有意性は、 $s i$ 対照群からの対応するニンボリド処理濃度と比較して、10、6、および $3 \mu M$ の場合、それぞれ $*p = 1.90 \times 10^{-5}$ 、 2.72×10^{-4} および 0.00101 として表される。

【図20A】ニンボリドを介した効果におけるRNF114の役割の解明。(図20A) $s i$ 対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする3つの独立した $s i R N A$ によるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。(図20B) ヘキスト染色によって評価した $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図20C) 231MFP $s i$ 対照および $s i R N F 114$ 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、ヘキスト染色により増殖を評価した。各 $s i$ 対照または $s i R N F 114$ 群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。(図20D) 組換えヒトRNF114タンパク質のIA-ローダミン標識に対するニンボリド、JNS27およびヨードアセトアミド競合のゲルベースABPP分析。RNF114タンパク質を、DMSOビヒクルまたはニンボリド、JNS27またはヨードアセトアミドで30分間前処理した後、RNF114をIA-ローダミン ($100 nM$) で30分間標識した。RNF114のIA-ローダミン標識は、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって評価した。示されているデータは、 $n = 1$ の生物学的複製からのものである。示されているデータは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル／群からのものである。図20Aおよび図20Dに示されるゲルは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的なゲルで

10

20

30

40

50

ある。図20Bに示されるデータは、平均±semであり、図20Bの場合、 $n=5$ の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図20B、図20Cの不對兩側スチューデントt検定を用いて計算した。図20Bの有意性は、si対照細胞と比較して、siRNF114-1、siRNF114-2およびsiRNF114-3の場合、それぞれ $*p=4.52 \times 10^{-5}$ 、 0.0429 および 0.00230 として表される。図20Cの有意性は、si対照細胞での対応するニンボリド処理濃度と比較して、siRNF114-1の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=1.90 \times 10^{-5}$ 、 0.000272 、 0.00101 として表され、siRNF114-2の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.000626$ 、 0.00139 、 3.66×10^{-5} として表され、siRNF114-3の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.00134$ 、 9.15×10^{-5} 、 0.00769 として表される。図20Fの有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p=0.0188$ として表される。

【図20B】ニンボリドを介した効果におけるRNF114の役割の解明。(図20A) si対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする3つの独立したsiRNAによるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。(図20B) ヘキスト染色によって評価したsi対照およびsiRNF114細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図20C) 231MFP si対照およびsiRNF114 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、ヘキスト染色により増殖を評価した。各si対照またはsiRNF114群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。(図20D) 組換えヒトRNF114タンパク質のIA-ローダミン標識に対するニンボリド、JNS27およびヨードアセトアミド競合のゲルベースABPP分析。RNF114タンパク質を、DMSOビヒクルまたはニンボリド、JNS27またはヨードアセトアミドで30分間前処理した後、RNF114をIA-ローダミン(100 nM)で30分間標識した。RNF114のIA-ローダミン標識は、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって評価した。示されているデータは、 $n=1$ の生物学的複製からのものである。示されているデータは、 $n=3$ の生物学的に独立したサンプル／群からのものである。図20Aおよび図20Dに示されるゲルは、 $n=3$ の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的なゲルである。図20Bに示されるデータは、平均±semであり、図20Bの場合、 $n=5$ の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図20B、図20Cの不對兩側スチューデントt検定を用いて計算した。図20Bの有意性は、si対照細胞と比較して、siRNF114-1、siRNF114-2およびsiRNF114-3の場合、それぞれ $*p=4.52 \times 10^{-5}$ 、 0.0429 および 0.00230 として表される。図20Cの有意性は、si対照細胞での対応するニンボリド処理濃度と比較して、siRNF114-1の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=1.90 \times 10^{-5}$ 、 0.000272 、 0.00101 として表され、siRNF114-2の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.000626$ 、 0.00139 、 3.66×10^{-5} として表され、siRNF114-3の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.00134$ 、 9.15×10^{-5} 、 0.00769 として表される。図20Fの有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p=0.0188$ として表される。

【図20C】ニンボリドを介した効果におけるRNF114の役割の解明。(図20A) si対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする3つの独立したsiRNAによるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。(図20B) ヘキスト染色によって評価したsi対照およびsiRNF114細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図20C) 231MFP si対照およびsiRNF114 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、ヘキスト染色により増殖を評価した。各si対照またはsiRN

F114群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。(図20D)組換えヒトRNF114タンパク質のIA-ローダミン標識に対するニンボリド、JNS27およびヨードアセトアミド競合のゲルベースABPP分析。RNF114タンパク質を、DMSOビヒクルまたはニンボリド、JNS27またはヨードアセトアミドで30分間前処理した後、RNF114をIA-ローダミン(100nM)で30分間標識した。RNF114のIA-ローダミン標識は、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって評価した。示されているデータは、 $n=1$ の生物学的複製からのものである。示されているデータは、 $n=3$ の生物学的に独立したサンプル/群からのものである。図20Aおよび図20Dに示されるゲルは、 $n=3$ の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。図20Bに示されるデータは、平均 $\pm$ semであり、図20Bの場合、 $n=5$ の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、図20B、図20Cの対両側スチューデントt検定を用いて計算した。図20Bの有意性は、si対照細胞と比較して、siRNF114-1、siRNF114-2およびsiRNF114-3の場合、それぞれ $*p=4.52 \times 10^{-5}$ 、 0.0429 および 0.00230 として表される。図20Cの有意性は、si対照細胞での対応するニンボリド処理濃度と比較して、siRNF114-1の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=1.90 \times 10^{-5}$ 、 0.000272 、 0.00101 として表され、siRNF114-2の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.000626$ 、 0.00139 、 3.66×10^{-5} として表され、siRNF114-3の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.00134$ 、 9.15×10^{-5} 、 0.00769 として表される。図20Fの有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p=0.0188$ として表される。

【図20D】ニンボリドを介した効果におけるRNF114の役割の解明。(図20A) si対照 231MFP細胞と比較したRNF114のウエスタンブロッティングによって検証したRNF114を標的とする3つの独立したsiRNAによるRNF114ノックダウン。GAPDH発現はローディング対照として示されている。(図20B)ヘキスト染色によって評価したsi対照およびsiRNF114細胞における24時間後の231MFP細胞の増殖。(図20C)231MFP si対照およびsiRNF114 231MFP乳癌細胞に対するニンボリドの効果。細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドで24時間処理した後、ヘキスト染色により増殖を評価した。各si対照またはsiRNF114群のデータは、各群のそれぞれのDMSOビヒクル対照に対して正規化した。個々の生物学的に独立したサンプルデータが示され、線は平均値を示す。(図20D)組換えヒトRNF114タンパク質のIA-ローダミン標識に対するニンボリド、JNS27およびヨードアセトアミド競合のゲルベースABPP分析。RNF114タンパク質を、DMSOビヒクルまたはニンボリド、JNS27またはヨードアセトアミドで30分間前処理した後、RNF114をIA-ローダミン(100nM)で30分間標識した。RNF114のIA-ローダミン標識は、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって評価した。示されているデータは、 $n=1$ の生物学的複製からのものである。示されているデータは、 $n=3$ の生物学的に独立したサンプル/群からのものである。図20Aおよび図20Dに示されるゲルは、 $n=3$ の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。図20Bに示されるデータは、平均 $\pm$ semであり、図20Bの場合、 $n=5$ の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、図20B、図20Cの対両側スチューデントt検定を用いて計算した。図20Bの有意性は、si対照細胞と比較して、siRNF114-1、siRNF114-2およびsiRNF114-3の場合、それぞれ $*p=4.52 \times 10^{-5}$ 、 0.0429 および 0.00230 として表される。図20Cの有意性は、si対照細胞での対応するニンボリド処理濃度と比較して、siRNF114-1の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=1.90 \times 10^{-5}$ 、 0.000272 、 0.00101 として表され、siRNF114-2の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ $*p=0.000626$ 、 0.00139 、 3.66×10^{-5} として表され、siRNF114-3の場合、 10 、 6 および $3 \mu\text{M}$ で、それぞれ*

10

20

30

40

50

$p = 0.00134$ 、 9.15×10^{-5} 、 0.00769 として表される。図20Fの有意性は、ビヒクル処理対照と比較して、 $*p = 0.0188$ として表される。

【図21A】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。(図21A)ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図21B)アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図21C)ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド($100 \mu\text{M}$ 、30分)とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ($10 \mu\text{M}$ 、1時間)で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、 1 mg/ml のBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ($10 \mu\text{M}$ 、1時間)で標識した。(図21D)純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン($10 \mu\text{M}$)またはJNS27($50 \mu\text{M}$)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド($50 \mu\text{M}$)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間プレインキュベートした後、プローブを1時間標識した。(図21E)231MFP細胞におけるFlag-RNF114のニンボリド-アルキン標識。Flagタグ付きRNF114を安定して発現する231MFP細胞を、DMSOビヒクルまたはニンボリド-アルキンで2時間処理した。続いて、回収した細胞溶解物からRNF114を濃縮し、次にローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリド-アルキン標識をSDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって可視化した。(図21F)231MFP細胞における内因性RNF114のニンボリド-アルキン標識。231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリド-アルキン($50 \mu\text{M}$)で1.5時間処理した。ビオチン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質をSDS/PAGEおよびRNF114のウェスタンブロッティングで分析した。図21C~21Fに示されるゲルは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。

【図21B】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。(図21A)ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図21B)アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図21C)ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド($100 \mu\text{M}$ 、30分)とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ($10 \mu\text{M}$ 、1時間)で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、 1 mg/ml のBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ($10 \mu\text{M}$ 、1時間)で標識した。(図21D)純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン($10 \mu\text{M}$)またはJNS27($50 \mu\text{M}$)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド($50 \mu\text{M}$)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間プレインキュベートした後、プローブを1時間標識した。(図21E)231MFP細胞におけるFlag-RNF114のニンボリド-アルキン標識。Flagタグ付きRNF114を安定して発現する231MFP細胞を、DMSOビヒクルまたはニンボリド-アルキンで2時間処理した。続いて、回収した細胞溶解物からRNF114を濃縮し、次にローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリド-アルキン標識をSDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって可視化した。(図21F)231MFP細胞における内因性RNF114のニンボリド-アルキン標

識。231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドールキン（50 μ M）で1.5時間処理した。ビオチン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質をSDS/PAGEおよびRNF114のウエスタンブロッティングで分析した。図21C~21Fに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。

【図21C】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。（図21A）ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。（図21B）アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。（図21C）ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド（100 μ M、30分）とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ（10 μ M、1時間）で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、1mg/mlのBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ（10 μ M、1時間）で標識した。（図21D）純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン（10 μ M）またはJNS27（50 μ M）標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造（反応性部分が赤で強調表示されている）が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド（50 μ M）競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間プレインキュベートした後、プローブを1時間標識した。（図21E）231MFP細胞におけるFlag-RNF114のニンボリドールキン標識。Flagタグ付きRNF114を安定して発現する231MFP細胞を、DMSOビヒクルまたはニンボリドールキンで2時間処理した。続いて、回収した細胞溶解物からRNF114を濃縮し、次にローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリドールキン標識をSDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって可視化した。（図21F）231MFP細胞における内因性RNF114のニンボリドールキン標識。231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドールキン（50 μ M）で1.5時間処理した。ビオチン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質をSDS/PAGEおよびRNF114のウエスタンブロッティングで分析した。図21C~21Fに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。

【図21D】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。（図21A）ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。（図21B）アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。（図21C）ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド（100 μ M、30分）とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ（10 μ M、1時間）で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、1mg/mlのBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ（10 μ M、1時間）で標識した。（図21D）純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン（10 μ M）またはJNS27（50 μ M）標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造（反応性部分が赤で強調表示されている）が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド（50 μ M）競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間プレインキュベートした後、プローブを1時間標識した。（図21E）231MFP細胞におけるFlag-RNF114のニンボリドールキン標識。Flagタグ付きRNF114を安定して発現する231MFP細胞を、DMSOビヒクルまたはニンボリ

10

20

30

40

50

ドールキンで2時間処理した。続いて、回収した細胞溶解物からRNF114を濃縮し、次にローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリドールキン標識をSDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって可視化した。(図21F) 231MFP細胞における内因性RNF114のニンボリドールキン標識。231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドールキン(50 μM)で1.5時間処理した。ビオチン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質をSDS/PAGEおよびRNF114のウエスタンブロットティングで分析した。図21C~21Fに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。

10

【図21E】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。(図21A) ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図21B) アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図21C) ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド(100 μM, 30分)とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ(10 μM, 1時間)で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、1 mg/mlのBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ(10 μM, 1時間)で標識した。(図21D) 純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン(10 μM)またはJNS27(50 μM)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド(50 μM)競合のゲルベースABPP分析も示されている。これらの実験では、DMSOまたはニンボリドを30分間プレインキュベートした後、プローブを1時間標識した。(図21E) 231MFP細胞におけるFlag-RNF114のニンボリドールキン標識。Flagタグ付きRNF114を安定して発現する231MFP細胞を、DMSOビヒクルまたはニンボリドールキンで2時間処理した。続いて、回収した細胞溶解物からRNF114を濃縮し、次にローダミン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリドールキン標識をSDS/PAGEおよびゲル内蛍光によって可視化した。(図21F) 231MFP細胞における内因性RNF114のニンボリドールキン標識。231MFP細胞をDMSOビヒクルまたはニンボリドールキン(50 μM)で1.5時間処理した。ビオチン-アジドをCuAACによってプローブ標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質をSDS/PAGEおよびRNF114のウエスタンブロットティングで分析した。図21C~21Fに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的なゲルである。

20

30

【図21F】ニンボリドはRNF114のC8と共有結合的に反応する。(図21A) ニンボリドは、PONDRによって評価されるように、RNF114内の天然変性領域を標的とする。(図21B) アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図21C) ニンボリドプローブで標識された純粋なヒトRNF114タンパク質のゲルベースABPP分析。上の2つのパネルでは、純粋なRNF114タンパク質をDMSOビヒクルまたはニンボリド(100 μM, 30分)とプレインキュベートした後、PBS中のニンボリドプローブ(10 μM, 1時間)で標識した。下の2つのパネルでは、純粋な野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質を、1 mg/mlのBSAを含むPBS中のニンボリドプローブ(10 μM, 1時間)で標識した。(図21D) 純粋なRNF114タンパク質のIA-アルキン(10 μM)またはJNS27(50 μM)標識に対するニンボリド競合のゲルベースABPP分析。IA-アルキンおよびJNS27プローブの構造(反応性部分が赤で強調表示されている)が示されている。野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質のJNS27標識に対するニンボリド(50 μM)競合のゲル

40

50

ベース A B P P 分析も示されている。これらの実験では、DMSO または ニンボリドを 30 分間 プレインキュベートした後、プローブを 1 時間 標識した。(図 2 1 E) 2 3 1 M F P 細胞における F l a g - R N F 1 1 4 の ニンボリド - アルキン 標識。F l a g タグ付き R N F 1 1 4 を安定して発現する 2 3 1 M F P 細胞を、DMSO ビヒクル または ニンボリド - アルキンで 2 時間 処理した。続いて、回収した細胞溶解物から R N F 1 1 4 を濃縮し、次にローダミン - アジドを C u A A C によってプローブ 標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリド - アルキン 標識を S D S / P A G E およびゲル内蛍光によって可視化した。(図 2 1 F) 2 3 1 M F P 細胞における内因性 R N F 1 1 4 の ニンボリド - アルキン 標識。2 3 1 M F P 細胞を DMSO ビヒクル または ニンボリド - アルキン (50 μ M) で 1 . 5 時間 処理した。ビオチン - アジドを C u A A C によってプローブ 標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質を S D S / P A G E および R N F 1 1 4 のウエスタンブロッティングで分析した。図 2 1 C ~ 2 1 F に示されるゲルは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル / 群からの代表的なゲルである。

【図 2 1 G】ニンボリドは R N F 1 1 4 の C 8 と共有結合的に反応する。(図 2 1 A) ニンボリドは、P O N D R によって評価されるように、R N F 1 1 4 内の天然変性領域を標的とする。(図 2 1 B) アルキン官能化ニンボリドプローブの合成経路。(図 2 1 C) ニンボリドプローブで標識された純粋なヒト R N F 1 1 4 タンパク質のゲルベース A B P P 分析。上の 2 つのパネルでは、純粋な R N F 1 1 4 タンパク質を DMSO ビヒクル または ニンボリド (100 μ M, 30 分) とプレインキュベートした後、P B S 中のニンボリド プローブ (10 μ M, 1 時間) で標識した。下の 2 つのパネルでは、純粋な野生型および C 8 A 突然変異体 R N F 1 1 4 タンパク質を、1 m g / m l の B S A を含む P B S 中の ニンボリドプローブ (10 μ M, 1 時間) で標識した。(図 2 1 D) 純粋な R N F 1 1 4 タンパク質の I A - アルキン (10 μ M) または J N S 2 7 (50 μ M) 標識に対する ニンボリド競合のゲルベース A B P P 分析。I A - アルキンおよび J N S 2 7 プローブの構造 (反応性部分が赤で強調表示されている) が示されている。野生型および C 8 A 突然変異体 R N F 1 1 4 タンパク質の J N S 2 7 標識に対する ニンボリド (50 μ M) 競合のゲルベース A B P P 分析も示されている。これらの実験では、DMSO または ニンボリドを 30 分間 プレインキュベートした後、プローブを 1 時間 標識した。(図 2 1 E) 2 3 1 M F P 細胞における F l a g - R N F 1 1 4 の ニンボリド - アルキン 標識。F l a g タグ付き R N F 1 1 4 を安定して発現する 2 3 1 M F P 細胞を、DMSO ビヒクル または ニンボリド - アルキンで 2 時間 処理した。続いて、回収した細胞溶解物から R N F 1 1 4 を濃縮し、次にローダミン - アジドを C u A A C によってプローブ 標識タンパク質に付加し、その後、ニンボリド - アルキン 標識を S D S / P A G E およびゲル内蛍光によって可視化した。(図 2 1 F) 2 3 1 M F P 細胞における内因性 R N F 1 1 4 の ニンボリド - アルキン 標識。2 3 1 M F P 細胞を DMSO ビヒクル または ニンボリド - アルキン (50 μ M) で 1 . 5 時間 処理した。ビオチン - アジドを C u A A C によってプローブ 標識タンパク質に付加し、その後、これらのタンパク質をアビジン濃縮した。得られたプルダウンタンパク質を S D S / P A G E および R N F 1 1 4 のウエスタンブロッティングで分析した。図 2 1 C ~ 2 1 F に示されるゲルは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル / 群からの代表的なゲルである。

【図 2 2 A】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、R N F 1 1 4 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な G S T - U b e 1、G S T - U B E 2 D 1 および R N F 1 1 4 タンパク質、F l a g - ユビキチンおよび A T P (p 2 1 を加えた場合、または加えていない場合) を用いた R N F 1 1 4 ユビキチン化アッセイ、ならびに F l a g - ユビキチン (図 2 2 A) または p 2 1 (図 2 2 B) に対するブロッティング。(図 2 2 C) 野生型もしくは C 8 A 突然変異体 R N F 1 1 4 による DMSO または ニンボリド (100 μ M) 処理による R N F 1 1 4 自己ユビキチン化アッセイ。(図 2 2 D) 純粋な R N F 1 1 4 および p 2 1 タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、F l a g - R N F 1 1 4 プルダウンおよび p 2 1 濃縮が、ニンボリド (100 μ M) によって阻害された。(

図 2 2 E) 2 3 1 M F P 細胞をニンボリド (1 0 0 μ M) で処理した。示されているのは、DMSO 対照またはニンボリド処理細胞における p 2 1 レベルである。(図 2 2 F) DMSO ビヒクルまたはニンボリド (1 0 0 nM) で 1 2 時間処理した 2 3 1 M F P 乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2 倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図 2 2 F) に示されるデータは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル／群において 2 つ以上の固有のペプチドで定量化した 6 3 9 7 個のタンパク質に関するものである。(図 2 2 G) 純粋な GST-Ube1、GST-UBE2D1 および RNF114 タンパク質、Flag-ユビキチンおよび ATP (p 2 1 (CDKN1A)、PEG10 もしくは CTGF を加えた場合) を用いた RNF114 ユビキチン化アッセイ、ならびに Flag-ユビキチンに対するプロットティング。DMSO またはニンボリド (1 0 0 μ M) を RNF114 とプレインキュベートした後、E1 および E2 酵素、Flag-ユビキチンおよび ATP を加えて反応を開始した。(図 2 2 H) ローディング対照としてのアクチンとともに、ウエスタンブロットティングによって評価した、si 対照および si CDKN1A / si CDKN1C 2 3 1 M F P 細胞における p 2 1 (CDKN1A) および p 5 7 (CDKN1C) の発現。(図 2 2 I) DMSO ビヒクルまたはニンボリド (6 μ M) で 2 4 時間処理した si 対照または si CDKN1A / si CDKN1C 細胞における 2 3 1 M F P 細胞の増殖。図 2 2 A ~ 2 2 E および図 2 2 G に示されるゲルは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的な画像である。図 2 2 A ~ 2 2 D に示されるプロットの定量化は、図 2 3 A ~ 2 3 D にある。生物学的に独立した 3 つのサンプル／群全てが図 2 2 H に示されている。図 2 2 I に示されるデータは、平均 $\pm$ s e m、n = 5 の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図 2 2 E および図 2 2 I の不對両側スチューデント t 検定を使用して計算した。有意性は、図 2 2 E の各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および 8 時間でそれぞれ * p = 0 0 0 7 9 9、0 . 0 2 9 5、0 . 0 0 9 6 2 および 0 . 0 1 3 5 として表され、図 2 2 I のビヒクルで処理した si 対照 (si Control) および si CDKN1A / si CDKN1C 群と比較して、それぞれ、p = 5 . 6 5 $\times$ 1 0 $^{-8}$ および 0 . 0 1 7 3 として表される。図 2 2 I において、ニンボリドで処理した si 対照細胞と比較して、# p = 6 . 7 0 $\times$ 1 0 $^{-5}$ として表される有意性。

【図 2 2 B】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な GST-Ube1、GST-UBE2D1 および RNF114 タンパク質、Flag-ユビキチンおよび ATP (p 2 1 を加えた場合、または加えていない場合) を用いた RNF114 ユビキチン化アッセイ、ならびに Flag-ユビキチン (図 2 2 A) または p 2 1 (図 2 2 B) に対するプロットティング。(図 2 2 C) 野生型もしくは C8A 突然変異体 RNF114 による DMSO またはニンボリド (1 0 0 μ M) 処理による RNF114 自己ユビキチン化アッセイ。(図 2 2 D) 純粋な RNF114 および p 2 1 タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114 プルダウンおよび p 2 1 濃縮が、ニンボリド (1 0 0 μ M) によって阻害された。(図 2 2 E) 2 3 1 M F P 細胞をニンボリド (1 0 0 μ M) で処理した。示されているのは、DMSO 対照またはニンボリド処理細胞における p 2 1 レベルである。(図 2 2 F) DMSO ビヒクルまたはニンボリド (1 0 0 nM) で 1 2 時間処理した 2 3 1 M F P 乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2 倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図 2 2 F) に示されるデータは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル／群において 2 つ以上の固有のペプチドで定量化した 6 3 9 7 個のタンパク質に関するものである。(図 2 2 G) 純粋な GST-Ube1、GST-UBE2D1 および RNF114 タンパク質、Flag-ユビキチンおよび ATP (p 2 1 (CDKN1A)、PEG10 もしくは CTGF を加えた場合) を用いた RNF114 ユビキチン化アッセイ、ならびに Flag-ユビキチンに対するプロットティング。DMSO またはニンボリド (1 0 0 μ M) を RNF114 とプレインキュベートした後、E1 および E2 酵素、Flag-ユビキチンおよび ATP

を加えて反応を開始した。(図22H)ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンブロッティングによって評価した、*si*対照および*si*CDKN1A/*si*CDKN1C 231MFP細胞におけるp21(CDKN1A)およびp57(CDKN1C)の発現。(図22I)DMSOビヒクルまたはニンボリド(6 μM)で24時間処理した*si*対照または*si*CDKN1A/*si*CDKN1C細胞における231MFP細胞の増殖。図22A~22Eおよび図22Gに示されるゲルは、*n* = 3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像である。図22A~22Dに示されるプロットの定量化は、図23A~23Dにある。生物学的に独立した3つのサンプル/群全てが図22Hに示されている。図22Iに示されるデータは、平均±*sem*、*n* = 5の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、図22Eおよび図22Iの不對両側スチューデント*t*検定を使用して計算した。有意性は、図22Eの各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および8時間でそれぞれ**p* = 0.00799、0.0295、0.00962および0.0135として表され、図22Iのビヒクルで処理した*si*対照(*si*Control)および*si*CDKN1A/*si*CDKN1C群と比較して、それぞれ、*p* = 5.65 × 10⁻⁸および0.0173として表される。図22Iにおいて、ニンボリドで処理した*si*対照細胞と比較して、#*p* = 6.70 × 10⁻⁵として表される有意性。

【図22C】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114活性を阻害する。(図22A~22B)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21を加えた場合、または加えていない場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチン(図22A)またはp21(図22B)に対するブロッティング。(図22C)野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド(100 μM)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図22D)純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド(100 μM)によって阻害された。(図22E)231MFP細胞をニンボリド(100 μM)で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。(図22F)DMSOビヒクルまたはニンボリド(100 nM)で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT)ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図22F)に示されるデータは、*n* = 3の生物学的に独立したサンプル/群において2つ以上の固有のペプチドで定量化した6397個のタンパク質に関するものである。(図22G)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21(CDKN1A)、PEG10もしくはCTGFを加えた場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチンに対するブロッティング。DMSOまたはニンボリド(100 μM)をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。(図22H)ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンブロッティングによって評価した、*si*対照および*si*CDKN1A/*si*CDKN1C 231MFP細胞におけるp21(CDKN1A)およびp57(CDKN1C)の発現。(図22I)DMSOビヒクルまたはニンボリド(6 μM)で24時間処理した*si*対照または*si*CDKN1A/*si*CDKN1C細胞における231MFP細胞の増殖。図22A~22Eおよび図22Gに示されるゲルは、*n* = 3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像である。図22A~22Dに示されるプロットの定量化は、図23A~23Dにある。生物学的に独立した3つのサンプル/群全てが図22Hに示されている。図22Iに示されるデータは、平均±*sem*、*n* = 5の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、図22Eおよび図22Iの不對両側スチューデント*t*検定を使用して計算した。有意性は、図22Eの各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および8時間でそれぞれ**p* = 0.00799、0.0295、0

10

20

30

40

50

． 0 0 9 6 2 および 0 ． 0 1 3 5 として表され、図 2 2 I のビヒクルで処理した *s i* 対照 (*s i* *C o n t r o l*) および *s i* *C D K N 1 A* / *s i* *C D K N 1 C* 群と比較して、それぞれ、 $p = 5 . 6 5 \times 10^{-8}$ および 0 ． 0 1 7 3 として表される。図 2 2 I において、ニンボリドで処理した *s i* 対照細胞と比較して、 $\# p = 6 . 7 0 \times 10^{-5}$ として表される有意性。

【図 2 2 D】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、*R N F 1 1 4* 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な *G S T - U b e 1*、*G S T - U B E 2 D 1* および *R N F 1 1 4* タンパク質、*F l a g - ユビキチン* および *A T P* (*p 2 1* を加えた場合、または加えていない場合) を用いた *R N F 1 1 4* ユビキチン化アッセイ、ならびに *F l a g - ユビキチン* (図 2 2 A) または *p 2 1* (図 2 2 B) に対するプロットティング。(図 2 2 C) 野生型もしくは *C 8 A* 突然変異体 *R N F 1 1 4* による *D M S O* またはニンボリド ($100 \mu M$) 処理による *R N F 1 1 4* 自己ユビキチン化アッセイ。(図 2 2 D) 純粋な *R N F 1 1 4* および *p 2 1* タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、*F l a g - R N F 1 1 4* プルダウンおよび *p 2 1* 濃縮が、ニンボリド ($100 \mu M$) によって阻害された。(図 2 2 E) 2 3 1 *M F P* 細胞をニンボリド ($100 \mu M$) で処理した。示されているのは、*D M S O* 対照またはニンボリド処理細胞における *p 2 1* レベルである。(図 2 2 F) *D M S O* ビヒクルまたはニンボリド ($100 nM$) で 1 2 時間処理した 2 3 1 *M F P* 乳癌細胞のタンデム質量タグ (*T M T*) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2 倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図 2 2 F) に示されるデータは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル／群において 2 つ以上の固有のペプチドで定量化した 6 3 9 7 個のタンパク質に関するものである。(図 2 2 G) 純粋な *G S T - U b e 1*、*G S T - U B E 2 D 1* および *R N F 1 1 4* タンパク質、*F l a g - ユビキチン* および *A T P* (*p 2 1* (*C D K N 1 A*)、*P E G 1 0* もしくは *C T G F* を加えた場合) を用いた *R N F 1 1 4* ユビキチン化アッセイ、ならびに *F l a g - ユビキチン* に対するプロットティング。*D M S O* またはニンボリド ($100 \mu M$) を *R N F 1 1 4* とブレインキュベートした後、*E 1* および *E 2* 酵素、*F l a g - ユビキチン* および *A T P* を加えて反応を開始した。(図 2 2 H) ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンブロットティングによって評価した、*s i* 対照および *s i* *C D K N 1 A* / *s i* *C D K N 1 C* 2 3 1 *M F P* 細胞における *p 2 1* (*C D K N 1 A*) および *p 5 7* (*C D K N 1 C*) の発現。(図 2 2 I) *D M S O* ビヒクルまたはニンボリド ($6 \mu M$) で 2 4 時間処理した *s i* 対照または *s i* *C D K N 1 A* / *s i* *C D K N 1 C* 細胞における 2 3 1 *M F P* 細胞の増殖。図 2 2 A ~ 2 2 E および図 2 2 G に示されるゲルは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的な画像である。図 2 2 A ~ 2 2 D に示されるプロットの定量化は、図 2 3 A ~ 2 3 D にある。生物学的に独立した 3 つのサンプル／群全てが図 2 2 H に示されている。図 2 2 I に示されるデータは、平均 $\pm s e m$ 、 $n = 5$ の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図 2 2 E および図 2 2 I の不對両側スチューデント *t* 検定を使用して計算した。有意性は、図 2 2 E の各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および 8 時間でそれぞれ $* p = 0 0 0 7 9 9$ 、0 ． 0 2 9 5、0 ． 0 0 9 6 2 および 0 ． 0 1 3 5 として表され、図 2 2 I のビヒクルで処理した *s i* 対照 (*s i* *C o n t r o l*) および *s i* *C D K N 1 A* / *s i* *C D K N 1 C* 群と比較して、それぞれ、 $p = 5 . 6 5 \times 10^{-8}$ および 0 ． 0 1 7 3 として表される。図 2 2 I において、ニンボリドで処理した *s i* 対照細胞と比較して、 $\# p = 6 . 7 0 \times 10^{-5}$ として表される有意性。

【図 2 2 E】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、*R N F 1 1 4* 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な *G S T - U b e 1*、*G S T - U B E 2 D 1* および *R N F 1 1 4* タンパク質、*F l a g - ユビキチン* および *A T P* (*p 2 1* を加えた場合、または加えていない場合) を用いた *R N F 1 1 4* ユビキチン化アッセイ、ならびに *F l a g - ユビキチン* (図 2 2 A) または *p 2 1* (図 2 2 B) に対するプロットティング。(図 2 2 C) 野生型もしくは *C 8 A* 突然変異体 *R N F 1 1 4* による *D M S O* またはニンボリド ($100 \mu M$) 処理による *R N F 1 1 4* 自己ユビキチン化アッセイ。(図 2 2 D) 純粋な *R N F 1 1 4*

および p 2 1 タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、F l a g - R N F 1 1 4 プルダウンおよび p 2 1 濃縮が、ニンボリド (1 0 0 μ M) によって阻害された。(図 2 2 E) 2 3 1 M F P 細胞をニンボリド (1 0 0 μ M) で処理した。示されているのは、D M S O 対照またはニンボリド処理細胞における p 2 1 レベルである。(図 2 2 F) D M S O ビヒクルまたはニンボリド (1 0 0 n M) で 1 2 時間処理した 2 3 1 M F P 乳癌細胞のタンデム質量タグ (T M T) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2 倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図 2 2 F) に示されるデータは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル／群において 2 つ以上の固有のペプチドで定量化した 6 3 9 7 個のタンパク質に関するものである。(図 2 2 G) 純粋な G S T - U b e 1、G S T - U B E 2 D 1 および R N F 1 1 4 タンパク質、F l a g - ユビキチンおよび A T P (p 2 1 (C D K N 1 A)、P E G 1 0 もしくは C T G F を加えた場合) を用いた R N F 1 1 4 ユビキチン化アッセイ、ならびに F l a g - ユビキチンに対するプロットティング。D M S O またはニンボリド (1 0 0 μ M) を R N F 1 1 4 とプレインキュベートした後、E 1 および E 2 酵素、F l a g - ユビキチンおよび A T P を加えて反応を開始した。(図 2 2 H) ローディング対照としてのアクチンとともに、ウエスタンブロットティングによって評価した、s i 対照および s i C D K N 1 A / s i C D K N 1 C 2 3 1 M F P 細胞における p 2 1 (C D K N 1 A) および p 5 7 (C D K N 1 C) の発現。(図 2 2 I) D M S O ビヒクルまたはニンボリド (6 μ M) で 2 4 時間処理した s i 対照または s i C D K N 1 A / s i C D K N 1 C 細胞における 2 3 1 M F P 細胞の増殖。図 2 2 A ~ 2 2 E および図 2 2 G に示されるゲルは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的な画像である。図 2 2 A ~ 2 2 D に示されるプロットの定量化は、図 2 3 A ~ 2 3 D にある。生物学的に独立した 3 つのサンプル／群全てが図 2 2 H に示されている。図 2 2 I に示されるデータは、平均 ± s e m、n = 5 の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図 2 2 E および図 2 2 I の不對両側スチューデント t 検定を使用して計算した。有意性は、図 2 2 E の各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および 8 時間でそれぞれ * p = 0 0 0 7 9 9、0 . 0 2 9 5、0 . 0 0 9 6 2 および 0 . 0 1 3 5 として表され、図 2 2 I のビヒクルで処理した s i 対照 (s i C o n t r o l) および s i C D K N 1 A / s i C D K N 1 C 群と比較して、それぞれ、p = 5 . 6 5 × 1 0 ⁻⁸ および 0 . 0 1 7 3 として表される。図 2 2 I において、ニンボリドで処理した s i 対照細胞と比較して、# p = 6 . 7 0 × 1 0 ⁻⁵ として表される有意性。

【図 2 2 F】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、R N F 1 1 4 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な G S T - U b e 1、G S T - U B E 2 D 1 および R N F 1 1 4 タンパク質、F l a g - ユビキチンおよび A T P (p 2 1 を加えた場合、または加えていない場合) を用いた R N F 1 1 4 ユビキチン化アッセイ、ならびに F l a g - ユビキチン (図 2 2 A) または p 2 1 (図 2 2 B) に対するプロットティング。(図 2 2 C) 野生型もしくは C 8 A 突然変異体 R N F 1 1 4 による D M S O またはニンボリド (1 0 0 μ M) 処理による R N F 1 1 4 自己ユビキチン化アッセイ。(図 2 2 D) 純粋な R N F 1 1 4 および p 2 1 タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、F l a g - R N F 1 1 4 プルダウンおよび p 2 1 濃縮が、ニンボリド (1 0 0 μ M) によって阻害された。(図 2 2 E) 2 3 1 M F P 細胞をニンボリド (1 0 0 μ M) で処理した。示されているのは、D M S O 対照またはニンボリド処理細胞における p 2 1 レベルである。(図 2 2 F) D M S O ビヒクルまたはニンボリド (1 0 0 n M) で 1 2 時間処理した 2 3 1 M F P 乳癌細胞のタンデム質量タグ (T M T) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2 倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図 2 2 F) に示されるデータは、n = 3 の生物学的に独立したサンプル／群において 2 つ以上の固有のペプチドで定量化した 6 3 9 7 個のタンパク質に関するものである。(図 2 2 G) 純粋な G S T - U b e 1、G S T - U B E 2 D 1 および R N F 1 1 4 タンパク質、F l a g - ユビキチンおよび A T P (p 2 1 (C D K N 1 A)、P E G 1 0 もしくは C T G F を加えた場合) を用いた R N F 1 1 4 ユビキチン化アッセイ、ならびに F l a g - ユビキ

チンに対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド（100 μ M）をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。（図22H）ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンブロットティングによって評価した、si対照およびsiCDKN1A/siCDKN1C 231MFP細胞におけるp21（CDKN1A）およびp57（CDKN1C）の発現。（図22I）DMSOビヒクルまたはニンボリド（6 μ M）で24時間処理したsi対照またはsiCDKN1A/siCDKN1C細胞における231MFP細胞の増殖。図22A～22Eおよび図22Gに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的な画像である。図22A～22Dに示されるプロットの定量化は、図23A～23Dにある。生物学的に独立した3つのサンプル／群全てが図22Hに示されている。図22Iに示されるデータは、平均 $\pm$ sem、n=5の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図22Eおよび図22Iの不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、図22Eの各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および8時間でそれぞれ $p=0.00799$ 、 0.0295 、 0.00962 および 0.0135 として表され、図22Iのビヒクルで処理したsi対照（siControl）およびsiCDKN1A/siCDKN1C群と比較して、それぞれ、 $p=5.65 \times 10^{-8}$ および 0.0173 として表される。図22Iにおいて、ニンボリドで処理したsi対照細胞と比較して、 $p=6.70 \times 10^{-5}$ として表される有意性。

【図22G】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114活性を阻害する。（図22A～22B）純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP（p21を加えた場合、または加えていない場合）を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチン（図22A）またはp21（図22B）に対するプロットティング。（図22C）野生型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド（100 μ M）処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。（図22D）純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド（100 μ M）によって阻害された。（図22E）231MFP細胞をニンボリド（100 μ M）で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。（図22F）DMSOビヒクルまたはニンボリド（100 nM）で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ（TMT）ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。（図22F）に示されるデータは、n=3の生物学的に独立したサンプル／群において2つ以上の固有のペプチドで定量化した6397個のタンパク質に関するものである。（図22G）純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP（p21（CDKN1A）、PEG10もしくはCTGFを加えた場合）を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチンに対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド（100 μ M）をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。（図22H）ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンブロットティングによって評価した、si対照およびsiCDKN1A/siCDKN1C 231MFP細胞におけるp21（CDKN1A）およびp57（CDKN1C）の発現。（図22I）DMSOビヒクルまたはニンボリド（6 μ M）で24時間処理したsi対照またはsiCDKN1A/siCDKN1C細胞における231MFP細胞の増殖。図22A～22Eおよび図22Gに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル／群からの代表的な画像である。図22A～22Dに示されるプロットの定量化は、図23A～23Dにある。生物学的に独立した3つのサンプル／群全てが図22Hに示されている。図22Iに示されるデータは、平均 $\pm$ sem、n=5の生物学的に独立したサンプル／群である。統計的有意性は、図22Eおよび図22Iの不對両側スチュー

10

20

30

40

50

デント t 検定を使用して計算した。有意性は、図 2 2 E の各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および 8 時間でそれぞれ $p = 0.000799$ 、 0.0295 、 0.00962 および 0.0135 として表され、図 2 2 I のビヒクルで処理した *si* 対照 (*si* Control) および *si* CDKN1A / *si* CDKN1C 群と比較して、それぞれ、 $p = 5.65 \times 10^{-8}$ および 0.0173 として表される。図 2 2 I において、ニンボリドで処理した *si* 対照細胞と比較して、 $p = 6.70 \times 10^{-5}$ として表される有意性。

【図 2 2 H】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な GST-Ube1、GST-UBE2D1 および RNF114 タンパク質、Flag-ユビキチンおよび ATP (p21 を加えた場合、または加えていない場合) を用いた RNF114 ユビキチン化アッセイ、ならびに Flag-ユビキチン (図 2 2 A) または p21 (図 2 2 B) に対するプロットティング。(図 2 2 C) 野生型もしくは C8A 突然変異体 RNF114 による DMSO またはニンボリド ($100 \mu\text{M}$) 処理による RNF114 自己ユビキチン化アッセイ。(図 2 2 D) 純粋な RNF114 および p21 タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114 プルダウンおよび p21 濃縮が、ニンボリド ($100 \mu\text{M}$) によって阻害された。(図 2 2 E) 231MFP 細胞をニンボリド ($100 \mu\text{M}$) で処理した。示されているのは、DMSO 対照またはニンボリド処理細胞における p21 レベルである。(図 2 2 F) DMSO ビヒクルまたはニンボリド (100nM) で 12 時間処理した 231MFP 乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2 倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図 2 2 F) に示されるデータは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル / 群において 2 つ以上の固有のペプチドで定量化した 6397 個のタンパク質に関するものである。(図 2 2 G) 純粋な GST-Ube1、GST-UBE2D1 および RNF114 タンパク質、Flag-ユビキチンおよび ATP (p21 (CDKN1A)、PEG10 もしくは CTGF を加えた場合) を用いた RNF114 ユビキチン化アッセイ、ならびに Flag-ユビキチンに対するプロットティング。DMSO またはニンボリド ($100 \mu\text{M}$) を RNF114 とプレインキュベートした後、E1 および E2 酵素、Flag-ユビキチンおよび ATP を加えて反応を開始した。(図 2 2 H) ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンブロットティングによって評価した、*si* 対照および *si* CDKN1A / *si* CDKN1C 231MFP 細胞における p21 (CDKN1A) および p57 (CDKN1C) の発現。(図 2 2 I) DMSO ビヒクルまたはニンボリド ($6 \mu\text{M}$) で 24 時間処理した *si* 対照または *si* CDKN1A / *si* CDKN1C 細胞における 231MFP 細胞の増殖。図 2 2 A ~ 2 2 E および図 2 2 G に示されるゲルは、 $n = 3$ の生物学的に独立したサンプル / 群からの代表的な画像である。図 2 2 A ~ 2 2 D に示されるプロットの定量化は、図 2 3 A ~ 2 3 D にある。生物学的に独立した 3 つのサンプル / 群全てが図 2 2 H に示されている。図 2 2 I に示されるデータは、平均 $\pm$ sem、 $n = 5$ の生物学的に独立したサンプル / 群である。統計的有意性は、図 2 2 E および図 2 2 I の不對両側スチューデント t 検定を使用して計算した。有意性は、図 2 2 E の各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および 8 時間でそれぞれ $p = 0.000799$ 、 0.0295 、 0.00962 および 0.0135 として表され、図 2 2 I のビヒクルで処理した *si* 対照 (*si* Control) および *si* CDKN1A / *si* CDKN1C 群と比較して、それぞれ、 $p = 5.65 \times 10^{-8}$ および 0.0173 として表される。図 2 2 I において、ニンボリドで処理した *si* 対照細胞と比較して、 $p = 6.70 \times 10^{-5}$ として表される有意性。

【図 2 2 I】ニンボリドは基質認識を妨害することにより、RNF114 活性を阻害する。(図 2 2 A ~ 2 2 B) 純粋な GST-Ube1、GST-UBE2D1 および RNF114 タンパク質、Flag-ユビキチンおよび ATP (p21 を加えた場合、または加えていない場合) を用いた RNF114 ユビキチン化アッセイ、ならびに Flag-ユビキチン (図 2 2 A) または p21 (図 2 2 B) に対するプロットティング。(図 2 2 C) 野生

10

20

30

40

50

型もしくはC8A突然変異体RNF114によるDMSOまたはニンボリド(100 μM)処理によるRNF114自己ユビキチン化アッセイ。(図22D)純粋なRNF114およびp21タンパク質のインビトロインキュベーションにおいて、Flag-RNF114プルダウンおよびp21濃縮が、ニンボリド(100 μM)によって阻害された。(図22E)231MFP細胞をニンボリド(100 μM)で処理した。示されているのは、DMSO対照またはニンボリド処理細胞におけるp21レベルである。(図22F)DMSOビヒクルまたはニンボリド(100 nM)で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT)ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。赤で示されているのは、2倍を超えるレベルで大幅に上昇しているタンパク質である。(図22F)に示されるデータは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群において2つ以上の固有のペプチドで定量化した6397個のタンパク質に関するものである。(図22G)純粋なGST-Ube1、GST-UBE2D1およびRNF114タンパク質、Flag-ユビキチンおよびATP(p21(CDKN1A)、PEG10もしくはCTGFを加えた場合)を用いたRNF114ユビキチン化アッセイ、ならびにFlag-ユビキチンに対するプロットティング。DMSOまたはニンボリド(100 μM)をRNF114とプレインキュベートした後、E1およびE2酵素、Flag-ユビキチンおよびATPを加えて反応を開始した。(図22H)ローディング対照としてのアクチンとともに、ウェスタンプロットティングによって評価した、si対照およびsiCDKN1A/siCDKN1C 231MFP細胞におけるp21(CDKN1A)およびp57(CDKN1C)の発現。(図22I)DMSOビヒクルまたはニンボリド(6 μM)で24時間処理したsi対照またはsiCDKN1A/siCDKN1C細胞における231MFP細胞の増殖。図22A~22Eおよび図22Gに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像である。図22A~22Dに示されるプロットの定量化は、図23A~23Dにある。生物学的に独立した3つのサンプル/群全てが図22Hに示されている。図22Iに示されるデータは、平均±sem、n=5の生物学的に独立したサンプル/群である。統計的有意性は、図22Eおよび図22Iの不對両側スチューデントt検定を使用して計算した。有意性は、図22Eの各時点のビヒクル処理対照群と比較して、1、2、4、および8時間でそれぞれ* $p=0.00799$ 、 0.0295 、 0.00962 および 0.0135 として表され、図22Iのビヒクルで処理したsi対照(sicontrol)およびsiCDKN1A/siCDKN1C群と比較して、それぞれ、 $p=5.65 \times 10^{-8}$ および 0.0173 として表される。図22Iにおいて、ニンボリドで処理したsi対照細胞と比較して、 $\#p=6.70 \times 10^{-5}$ として表される有意性。

【図23A】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A)RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B)RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間プレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μM)し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D)XH2(図23C)対MZ1(図23D)処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F)231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1(1 μM)処理またはXH2(100 nM)処理(100 nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1 μM)(図23E)またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243(10 μM)(図23F)で細胞を前処理した。(図24G)RNF114野生型(WT)およびノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H)DMSOビヒクル、MZ1(1 μM)またはXH2(100 nM)で12時間処理したRNF114野生型(WT)またはノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I)DMSOビヒク

10

20

30

40

50

ルまたはX H 2 (100 nM) で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるブロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

10

【図23B】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるX H 2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するX H 2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはX H 2と30分間ブレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μM)し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D) X H 2 (図23C) 対MZ1 (図23D) 処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F) 231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1 (1 μM) 処理またはX H 2 (100 nM) 処理(100 nM) の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ) (1 μM) (図23E) またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243 (10 μM) (図23F) で細胞を前処理した。(図24G) RNF114野生型(WT) およびノックアウト(KO) HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H) DMSOビヒクル、MZ1 (1 μM) またはX H 2 (100 nM) で12時間処理したRNF114野生型(WT) またはノックアウト(KO) HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I) DMSOビヒクルまたはX H 2 (100 nM) で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるブロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

20

30

【図23C】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるX H 2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するX H 2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはX H 2と30分間ブレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μM)し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D) X H 2 (図23C) 対MZ1 (図23D) 処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F) 231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1 (1 μM) 処理またはX H 2 (100 nM) 処理(100 nM) の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ) (1 μM) (図23E) またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243 (10 μM) (図23F) で細胞を前処理した。(図24G) RNF114野生型(WT)

40

50

およびノックアウト (KO) HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H) DMSOビヒクル、MZ1 (1 μ M) またはXH2 (100 nM) で12時間処理したRNF114野生型(WT)またはノックアウト(KO) HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I) DMSOビヒクルまたはXH2 (100 nM) で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるブロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

10

【図23D】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間プレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μ M) し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D) XH2 (図23C) 対MZ1 (図23D) 処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F) 231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1 (1 μ M) 処理またはXH2 (100 nM) 処理(100 nM) の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ) (1 μ M) (図23E) またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243 (10 μ M) (図23F) で細胞を前処理した。(図24G) RNF114野生型(WT) およびノックアウト(KO) HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H) DMSOビヒクル、MZ1 (1 μ M) またはXH2 (100 nM) で12時間処理したRNF114野生型(WT) またはノックアウト(KO) HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I) DMSOビヒクルまたはXH2 (100 nM) で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるブロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

20

30

40

【図23E】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間プレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μ M) し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D) XH2 (図23C) 対MZ1 (図23D) 処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F) 231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。1

50

2時間のMZ1 (1 μ M) 処理またはXH2 (100 nM) 処理 (100 nM) の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) (1 μ M) (図23E) またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243 (10 μ M) (図23F) で細胞を前処理した。(図24G) RNF114野生型 (WT) およびノックアウト (KO) HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H) DMSOビヒクル、MZ1 (1 μ M) またはXH2 (100 nM) で12時間処理したRNF114野生型 (WT) またはノックアウト (KO) HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I) DMSOビヒクルまたはXH2 (100 nM) で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるブロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

【図23F】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間プレインキュベートした後、1時間JNS27標識 (50 μ M) し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D) XH2 (図23C) 対MZ1 (図23D) 処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F) 231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1 (1 μ M) 処理またはXH2 (100 nM) 処理 (100 nM) の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) (1 μ M) (図23E) またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243 (10 μ M) (図23F) で細胞を前処理した。(図24G) RNF114野生型 (WT) およびノックアウト (KO) HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H) DMSOビヒクル、MZ1 (1 μ M) またはXH2 (100 nM) で12時間処理したRNF114野生型 (WT) またはノックアウト (KO) HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I) DMSOビヒクルまたはXH2 (100 nM) で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ (TMT) ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるブロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

【図23G】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間プレインキュベートした後、

10

20

30

40

50

1時間JNS27標識(50 μ M)し、続いてCuAACによるローダミン-Aジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D)XH2(図23C)対MZ1(図23D)処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F)231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1(1 μ M)処理またはXH2(100nM)処理(100nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1 μ M)(図23E)またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243(10 μ M)(図23F)で細胞を前処理した。(図24G)RNF114野生型(WT)およびノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H)DMSOビヒクル、MZ1(1 μ M)またはXH2(100nM)で12時間処理したRNF114野生型(WT)またはノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I)DMSOビヒクルまたはXH2(100nM)で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT)ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるプロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

10

20

【図23H】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分解を行うことができる。(図23A)RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B)RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間ブレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μ M)し、続いてCuAACによるローダミン-Aジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D)XH2(図23C)対MZ1(図23D)処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F)231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1(1 μ M)処理またはXH2(100nM)処理(100nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1 μ M)(図23E)またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243(10 μ M)(図23F)で細胞を前処理した。(図24G)RNF114野生型(WT)およびノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H)DMSOビヒクル、MZ1(1 μ M)またはXH2(100nM)で12時間処理したRNF114野生型(WT)またはノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I)DMSOビヒクルまたはXH2(100nM)で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT)ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロッティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるプロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

30

40

【図23I】ニンボリドを使用してRNF114を動員し、BRD4の標的タンパク質分

50

解を行うことができる。(図23A) RNF114リクルーターとしてのニンボリド、リンカーおよびBRD4阻害剤JQ1からなるニンボリドベースの分解剤であるXH2を合成するための経路。(図23B) RNF114に対するXH2のゲルベースABPP分析。RNF114をDMSOビヒクルまたはXH2と30分間プレインキュベートした後、1時間JNS27標識(50 μM)し、続いてCuAACによるローダミン-アジドの付加、SDS/PAGE、およびゲル内蛍光の分析を行った。(図23C~23D) XH2(図23C)対MZ1(図23D)処理で12時間処理した231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。(図23E~23F) 231MFP乳癌細胞におけるBRD4発現。12時間のMZ1(1 μM)処理またはXH2(100 nM)処理(100 nM)の30分前およびその処理中に、DMSOビヒクルまたはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)(1 μM)(図23E)またはE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243(10 μM)(図23F)で細胞を前処理した。(図24G) RNF114野生型(WT)およびノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびローディング対照GAPDHの発現。(図23H) DMSOビヒクル、MZ1(1 μM)またはXH2(100 nM)で12時間処理したRNF114野生型(WT)またはノックアウト(KO)HAP1細胞におけるRNF114およびBRD4の発現。(図23I) DMSOビヒクルまたはXH2(100 nM)で12時間処理した231MFP乳癌細胞のタンデム質量タグ(TMT)ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。図23C~23Hの長いおよび短いBRD4アイソフォームを、SDS/PAGEおよびウエスタンブロットティングによって可視化し、デンストメトリーによって定量化し、GAPDHローディング対照に対して正規化した。図23B~23Hに示されるゲルは、n=3の生物学的に独立したサンプル/群からの代表的な画像であり、図23C~23Fおよび図23Hにおけるプロットの定量化が、図25C~25Fおよび図25Iに示される。図23Iに示されるデータは、3回の処理において2つ以上の固有のペプチドで定量化した5797個のタンパク質に関するものである。図23Iの統計的有意性は、方法のセクションに記載されている。

【発明を実施するための形態】

【0015】

I. 定義

本明細書で使用される略語は、化学的および生物学的分野内のそれらの従来の意味を有する。本明細書に記載の化学構造および化学式は、化学的分野で既知の化学原子価の標準規則に従って構築される。

【0016】

置換基が左から右に書かれたそれらの従来の化学式によって特定される場合、それらは、右から左に構造を書くことから生じるであろう化学的に同一の置換基を等しく包含し、例えば-CH₂O-は-OCH₂-と等しい。

【0017】

「アルキル」という用語は、それ自体でまたは別の置換基の一部として、特に明記しない限り、直鎖(すなわち、非分岐)または分岐炭素鎖(または炭素)、またはそれらの組み合わせを意味し、これは、完全飽和、一価または多価不飽和であってもよく、一価、二価、および多価ラジカルを含むことができる。アルキルは、指定された炭素数を含み得る(例えば、C₁-C₁₀は、1~10個の炭素を意味する)。アルキルは、非環化鎖である。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。アルコキシは、酸素リンカー(-O-)を介して分子の残り部分に結合しているアルキルである。アルキル部分は、アルケニル部分であり得る。アルキル部分は、アルキニル部分であり得る。アルキル部分は、完全飽和であり得る。アルケニルは、1つ以上の二重結合に加えて、1つより多くの二重結合および/または1つ以上の三重結合を含み得る。アルキニルは、1つ以上の三重結合に加えて、1つより多くの三重結合および/または1つ以上の二重結合を含み得る。「アルキレン」という用語は、単独で、または別の置換基の一部として、別途明記されない限り、アルキルに由来する二価ラジカルを意味する。「アルケニレ

ン」という用語は、単独で、または別の置換基の一部として、別途明記されない限り、アルケンに由来する二価ラジカルを意味する。

【0018】

「ヘテロアルキル」という用語は、単独で、または別の用語と組み合わせて、別途明記されない限り、少なくとも1つの炭素原子および少なくとも1個のヘテロ原子（例えば、O、N、P、Si、およびS）を含む安定した直鎖もしくは分岐鎖、またはそれらの組み合わせを意味し、窒素原子および硫黄原子は、任意に酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、任意に四級化されていてもよい。ヘテロ原子（複数可）（例えば、O、N、S、Si、またはP）は、ヘテロアルキル基の任意の内部位置またはアルキル基が分子の残り部分に結合している位置に配置されていてもよい。ヘテロアルキルは、非環化鎖である。ヘテロアルキル部分は、1個のヘテロ原子（例えば、O、N、S、Si、またはP）を含み得る。ヘテロアルキル部分は、2個の任意に異なるヘテロ原子（例えば、O、N、S、Si、またはP）を含み得る。ヘテロアルキル部分は、3個の任意に異なるヘテロ原子（例えば、O、N、S、Si、またはP）を含み得る。ヘテロアルキル部分は、4個の任意に異なるヘテロ原子（例えば、O、N、S、Si、またはP）を含み得る。ヘテロアルキル部分は、5個の任意に異なるヘテロ原子（例えば、O、N、S、Si、またはP）を含み得る。ヘテロアルキル部分は、最大8個の任意に異なるヘテロ原子（例えば、O、N、S、Si、またはP）を含み得る。「ヘテロアルケニル」という用語は、単独で、または別の用語と組み合わせて、別途明記されない限り、少なくとも1つの二重結合を含むヘテロアルキルを意味する。ヘテロアルケニルは、1つ以上の二重結合に加えて、1つより多くの二重結合および／または1つ以上の三重結合を任意に含み得る。「ヘテロアルキニル」という用語は、単独で、または別の用語と組み合わせて、別途明記されない限り、少なくとも1つの三重結合を含むヘテロアルキルを意味する。ヘテロアルキニルは、1つ以上の三重結合に加えて、1つより多くの三重結合および／または1つ以上の二重結合を任意に含み得る。

【0019】

同様に、「ヘテロアルキレン」という用語は、単独で、または別の置換基の一部として、別途明記されない限り、ヘテロアルキルに由来する二価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基については、ヘテロ原子はまた、鎖の末端のいずれかまたは両方を占有し得る（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。なおさらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基の場合、連結基の配向は、連結基の式が書かれた方向によって暗示されない。例えば、式 $-C(O)_2R'-$ は、 $-C(O)_2R'-$ および $-R'C(O)_2-$ の両方を表す。「ヘテロアルキル」が列举された後に特定のヘテロアルキル基、例えば、 $-NR'R''$ 等が列举される場合、ヘテロアルキルおよび $-NR'R''$ という用語が冗長でも相互排他的でもないことが理解されよう。むしろ、特定のヘテロアルキル基が明確化のために列举される。したがって、「ヘテロアルキル」という用語は、本明細書において、特定のヘテロアルキル基、例えば、 $-NR'R''$ 等を除外するものと解釈されるべきではない。

【0020】

「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」という用語は、それ自体でまたは他の用語と組み合わせて、特に明記しない限り、それぞれ「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環式バージョンを意味する。シクロアルキルおよびヘテロシクロアルキルは、芳香族ではない。加えて、ヘテロシクロアルキルの場合、ヘテロ原子は、複素環が分子の残り部分に結合している位置を占有し得る。「シクロアルキレン」および「ヘテロシクロアルキレン」とは、単独で、または別の置換基の一部として、それぞれ、シクロアルキルおよびヘテロシクロアルキルに由来する二価ラジカルを意味する。

【0021】

実施形態では、「シクロアルキル」という用語は、単環式、二環式または多環式シクロアルキル環系を意味する。実施形態では、単環式環系は、3～8個の炭素原子を含む環状炭化水素基であり、そのような基は、飽和または不飽和であり得るが、芳香族ではない。

実施形態では、シクロアルキル基は完全に飽和している。実施形態では、架橋単環式環は、単環式環の2つの隣接していない炭素原子が1～3個の追加の炭素原子の間のアルキレン架橋（すなわち、形態 $(CH_2)_w$ の架橋基であり、式中、 w は1、2または3である）によって結合されている単環式シクロアルキル環を含む。実施形態では、架橋または縮合二環式シクロアルキルは、単環式シクロアルキル環内に含まれる任意の炭素原子を介して親分子部分に結合している。実施形態では、多環式シクロアルキルは、塩基環内に含まれる任意の炭素原子を介して親分子部分に結合している。

【0022】

実施形態では、シクロアルキルはシクロアルケニルである。「シクロアルケニル」という用語は、その単純な通常の意味に従って使用される。実施形態では、シクロアルケニルは、単環式、二環式または多環式シクロアルケニル環系である。実施形態では、単環式シクロアルケニル環系は、3～8個の炭素原子を含む環状炭化水素基であり、そのような基は不飽和である（すなわち、少なくとも1つの環状炭素炭素二重結合を含む）が、芳香族ではない。実施形態では、二環式シクロアルケニル環は、架橋単環式環または縮合二環式環である。実施形態では、架橋単環式環は、単環式環の2つの隣接していない炭素原子が1～3個の追加の炭素原子の間のアルキレン架橋（すなわち、形態 $(CH_2)_w$ の架橋基であり、式中、 w は1、2または3である）によって結合されている単環式シクロアルケニル環を含む。実施形態では、架橋または縮合二環式シクロアルケニルは、単環式シクロアルケニル環内に含まれる任意の炭素原子を介して親分子部分に結合している。実施形態では、多環式シクロアルケニルは、塩基環内に含まれる任意の炭素原子を介して親分子部分に結合している。

【0023】

実施形態では、ヘテロシクロアルキルはヘテロシクリルである。本明細書で使用される場合、「ヘテロシクリル」という用語は、単環式、二環式または多環式複素環を意味する。ヘテロシクリル単環式複素環は、環が飽和または不飽和であるが芳香族ではない、O、NおよびSからなる群から独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含む3、4、5、6または7員環である。3または4員環には、O、N、およびSからなる群から選択された1個のヘテロ原子が含まれる。5員環には、0または1つの二重結合と、O、NおよびSからなる群から選択される1、2または3個のヘテロ原子とが含まれ得る。6または7員環には、0、1または2つの二重結合と、O、NおよびSからなる群から選択される1、2または3個のヘテロ原子とが含まれ得る。ヘテロシクリル単環式複素環は、ヘテロシクリル単環式複素環内に含まれる任意の炭素原子または任意の窒素原子を介して親分子部分に接続されている。ヘテロシクリル二環式複素環は、二環式環系の単環式複素環部分内に含まれる任意の炭素原子または任意の窒素原子を介して親分子部分に接続されている。多環式ヘテロシクリルは、塩基環内に含まれる任意の炭素原子または窒素原子を介して親分子部分に結合している。

【0024】

「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、それ自体でまたは別の置換基の一部として、特に明記しない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むよう意図されている。例えば、「ハロ $(C_1 - C_4)$ アルキル」という用語は、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-ブロモプロピル等を含むが、これらに限定されない。

【0025】

「アシル」という用語は、特に明記しない限り、 $-C(O)R$ を意味し、式中、 R は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。

【0026】

「アリール」という用語は、特に明記しない限り、多価不飽和芳香族炭化水素置換基を

意味し、これらは、単一の環、または一緒に縮合している（すなわち縮合環アリール）もしくは共有結合している多環（好ましくは1～3環）であり得る。縮合環アリールは、縮合環のうちの少なくとも1つがアリール環である、一緒に縮合した複数の環を指す。「ヘテロアリール」という用語は、N、O、またはS等の少なくとも1個のヘテロ原子を含むアリール基（または環）を指し、窒素原子および硫黄原子は任意に酸化され、窒素原子（複数可）は任意に四級化される。したがって、「ヘテロアリール」という用語は、縮合環ヘテロアリール基（すなわち、縮合環のうちの少なくとも1つが芳香族複素環である、一緒に縮合している複数の環）を含む。ヘテロアリール基は、炭素原子またはヘテロ原子を介して分子の残りの部分に結合することができる。「アリーレン」および「ヘテロアリーレン」とは、単独で、または別の置換基の一部として、それぞれ、アリールおよびヘテロアリールに由来する二価ラジカルを意味する。ヘテロアリール基置換基は、環ヘテロ原子窒素に-O-結合していてもよい。

10

【0027】

スピロ環式環は、隣接する環が単一の原子を介して結合している2つ以上の環である。スピロ環式環内の個々の環は、同一であり得るか、または異なり得る。スピロ環式環内の個々の環は、置換であっても非置換であってもよく、一組のスピロ環式環内の他の個々の環とは異なる置換基を有してもよい。スピロ環式環内の個々の環の可能な置換基は、スピロ環式環の一部ではない場合、同じ環の可能な置換基（例えば、シクロアルキル環またはヘテロシクロアルキル環の置換基）である。スピロ環式環系について言及するとき、複素環式スピロ環式環とは、少なくとも1つの環が複素環式環であり、各環が異なる環であり得る、スピロ環式環を意味する。スピロ環式環系について言及するとき、置換スピロ環式環とは、少なくとも1つの環が置換されており、各置換基が任意に異なってもよいことを意味する。

20

【0028】

記号「

【化2】

~~~~~

」は、分子または化学式の残りの部分への化学部分の結合点を示す。

30

【0029】

本明細書で使用される「オキソ」という用語は、炭素原子に二重結合している酸素を意味する。

【0030】

上記の用語（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「シクロアルキル」、「ヘテロシクロアルキル」、「アリール」、および「ヘテロアリール」）のそれぞれは、示されたラジカル置換および非置換形態の両方を含む。各々の種類のラジカル置換基が以下に提供される。

【0031】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカル（しばしば、アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルと称されるそれらの基を含む）のための置換基は、0から $(2m' + 1)$ （式中、 $m'$ が、そのようなラジカル中の炭素原子の総数である）の範囲の数で、限定されないが、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-H$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''R'''$ 、 $-NR'_2C(O)-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''R'''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'R''R'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-NR'NR'R''R'''$ 、 $-ONR'R''$ 、 $-NR'C(O)NR'R''NR'''$ 、 $CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR'SO_2R''$ 、 $-NR'C(O)R''$ 、 $-NR'C(O)-OR''$ 、50-

40

N R' , O R' ' , から選択される、様々な基のうちの1つ以上であり得る。R、R'、R' '、R' ' '、およびR' ' ' 'は各々好ましくは独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール（例えば、1～3個のハロゲンで置換されたアリール）、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシ、もしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本明細書に記載の化合物が1つより多くのR基を含む場合、例えば、これらの基のうちの1個より多くが存在する場合、R基は各々独立して、各R'、R' '、R' ' '、およびR' ' ' '基として選択される。R'およびR' 'が同素原子に結合している場合、それらは、窒素原子と組み合わせられて、4、5、6、または7員環を形成してもよい。置換基についての上記の議論から、当業者であれば、「アルキル」という用語が、ハロアルキル（例えば、 $-CF_3$ および $-CH_2CF_3$ ）およびアシル（例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ 等）等の水素基以外の基に結合している炭素原子を含む基を含むよう意図されていることを理解するであろう。

**【 0 0 3 2 】**

アルキルラジカルについて記載した置換基と同様に、アリールおよびヘテロアリール基のための置換基は変化し、例えば、芳香環系上の0から開放原子価の総数までの範囲の数において、 $-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(OR')$ 、 $-C(OR')$ 、 $-C_2OR'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R'R''$ 、 $-NR_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R'R'')$ 、 $-NR-C(NR'R'R'')$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-S(O)(O)_2NR'R''$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR'NR'R'R''$ 、 $-ONR'R''$ 、 $-NR'C(O)NR'R'NR'R'R'R''$ 、 $-C_2N-R-N-O-N_2$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ( $C_1-C_4$ )アルコキシ、フルオロ( $C_1-C_4$ )アルキル、 $-NR'SQR'$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-NR'C(O)-OR'$ 、 $-NR'OR'$ 、から選択され、式中、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R$ 、および $R'''$ は、好ましくは独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから選択される。本明細書に記載の化合物が1つより多くのR基を含む場合、例えば、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、および $R''''$ 基のうちの1個より多くが存在する場合、R基は各々独立して、各 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、および $R''''$ 基として選択される。

**【 0 0 3 3 】**

環（例えば、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリアル、ヘテロアリアル、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、またはヘテロアリーレン）の置換基は、環の特定の原子上ではなく、環上の置換基（一般に浮遊置換基と称される）として示すことができる。このような場合、置換基は、（化学原子価の規則に従って）環原子のいずれかに結合されてもよく、縮合環またはスピロ環式環の場合、縮合環またはスピロ環式環の1員と結合されるものとして示される置換基（単環上の浮遊置換基）は、縮合環またはスピロ環式環のいずれか上の置換基（多環上の浮遊置換基）であり得る。置換基が特定の原子（浮遊置換基）ではなく環に結合しており、置換基の下付き文字が1より大きい整数である場合、複数の置換基は、同じ原子、同じ環、異なる原子、異なる縮合環、異なるスピロ環式環上にあってもよく、各置換基は任意に異なってもよい。分子の残り部分への環の結合点が単一の原子（浮遊置換基）に限定されない場合、結合点は、その環の任意の原子であってもよく、縮合環またはスピロ環式環の場合、化学原子価の規則に従って、縮合環またはスピロ環式環のうちのいずれかの任意の原子であってもよい。環、縮合環、またはスピロ環式環が1つ以上の環ヘテロ原子を含み、環、縮合環、またはスピロ環式環がもう1つの浮遊置換基（分子の残り部分への結合点を含むが、これに限定されない）とともに示される場合、浮遊置換基は、ヘテロ原子に結合してもよい。環ヘテロ原子が浮遊置換基を有する構造または式において1つ以上の水素に結合していることが示される場合（例えば、環原子への2つの結合および水素への第3の結合を有する環窒素）、ヘテロ

原子が浮遊置換基に結合している場合、置換基は、化学原子価の規則に従って、水素を置き換えると理解されよう。

#### 【0034】

2つ以上の置換基が、任意に結合して、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクロアルキル基を形成し得る。このようないわゆる環形成置換基は、典型的には、必ずしもそうとは限らないが、環状塩基構造に結合していることが見出される。一実施形態では、環形成置換基は、その基礎構造の隣接する員に結合している。例えば、環状基礎構造の隣接する員に結合している2つの環形成置換基は、縮合環構造を形成する。別の実施形態では、環形成置換基は、その基礎構造の単一の員に結合している。例えば、環状基礎構造の単一の員に結合している2つの環形成置換基は、スピロ環式構造を形成する。さらに別の実施形態では、環形成置換基は、その基礎構造の隣接していない員に結合している。

10

#### 【0035】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ原子」または「環ヘテロ原子」という用語は、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)、リン(P)、およびケイ素(Si)を含むよう意図されている。

#### 【0036】

本明細書で使用される「置換基」は、以下の部分から選択される基を意味する。

(A) オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ アルキル、 $C_1-C_6$ アルキル、または $C_1-C_4$ アルキル）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル）、非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、または $C_5-C_6$ シクロアルキル）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル）、非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ アリール、 $C_{10}$ アリール、またはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール）、および

20

30

(B) 以下から選択される少なくとも1個の置換基で置換されている、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール：

(i) オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ アルキル、 $C_1-C_6$ アルキル、または $C_1-C_4$ アルキル）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル）、非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、または $C_5-C_6$ シクロアルキル）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル）、非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ アリール、 $C_{10}$ アリール、またはフェニル）、または

40

50

非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール）、および

(i i) 以下から選択される少なくとも1個の置換基で置換されている、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール：

(a) オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ アルキル、または $\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキル）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル）、非置換シクロアルキル（例えば、 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ シクロアルキル、または $\text{C}_5-\text{C}_6$ シクロアルキル）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル）、非置換アリール（例えば、 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、 $\text{C}_{10}$ アリール、またはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール）、および

(b) 以下から選択される少なくとも1個の基で置換されている、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール：オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ アルキル、または $\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキル）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル）、非置換シクロアルキル（例えば、 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ シクロアルキル、または $\text{C}_5-\text{C}_6$ シクロアルキル）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル）、非置換アリール（例えば、 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、 $\text{C}_{10}$ アリール、またはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール）。

【0037】

実施形態では、本明細書で使用される場合、「置換基」は、以下の部分から選択される基を意味する。

(A) オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ アルキル、または $\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキル）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員ヘテ



ロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル)、非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、または $C_5-C_6$ シクロアルキル)、非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル)、非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ アリール、 $C_{10}$ アリール、またはフェニル)、または非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール)、および

(B) 以下から選択される少なくとも1個の置換基で置換されたアルキル(例えば、 $C_1-C_{20}$ 、 $C_1-C_{12}$ 、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ )、ヘテロアルキル(例えば、2～20員、2～12員、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員)、シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_{10}$ 、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、ヘテロシクロアルキル(例えば、3～10員、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員)、アリール(例えば、 $C_6-C_{12}$ 、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル)、またはヘテロアリール(例えば、5～12員、5～10員、5～9員、もしくは5～6員)：

(i) オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、非置換アルキル(例えば、 $C_1-C_8$ アルキル、 $C_1-C_6$ アルキル、または $C_1-C_4$ アルキル)、非置換ヘテロアルキル(例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル)、非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、または $C_5-C_6$ シクロアルキル)、非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル)、非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ アリール、 $C_{10}$ アリール、またはフェニル)、または非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール)、および

(ii) 以下から選択される少なくとも1個の置換基で置換されたアルキル(例えば、 $C_1-C_{20}$ 、 $C_1-C_{12}$ 、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ )、ヘテロアルキル(例えば、2～20員、2～12員、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員)、シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_{10}$ 、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、ヘテロシクロアルキル(例えば、3～10員、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員)、アリール(例えば、 $C_6-C_{12}$ 、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル)、またはヘテロアリール(例えば、5～12員、5～10員、5～9員、もしくは5～6員)：

(a) オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、非置換アルキル(例えば、 $C_1-C_8$ アルキル、 $C_1-C_6$ アルキル、または $C_1-C_4$ アルキル)、非置換ヘテロアルキル(例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、または2～4員ヘテロアルキル)、非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、または $C_5$

10

20

30

40

50

ーC<sub>6</sub>シクロアルキル)、非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、または5～6員ヘテロシクロアルキル)、非置換アリール(例えば、C<sub>6</sub>ーC<sub>10</sub>アリール、C<sub>10</sub>アリール、またはフェニル)、または非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、または5～6員ヘテロアリール)、および

(b) 以下から選択される少なくとも1つの置換基で置換されているアルキル(例えば、C<sub>1</sub>ーC<sub>20</sub>、C<sub>1</sub>ーC<sub>12</sub>、C<sub>1</sub>ーC<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>ーC<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>ーC<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>ーC<sub>2</sub>)、ヘテロアルキル(例えば、2～20員、2～12員、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員)、シクロアルキル(例えば、C<sub>3</sub>ーC<sub>10</sub>、C<sub>3</sub>ーC<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>ーC<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>ーC<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>ーC<sub>6</sub>)、ヘテロシクロアルキル(例えば、3～10員、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員)、アリール(例えば、C<sub>6</sub>ーC<sub>12</sub>、C<sub>6</sub>ーC<sub>10</sub>、もしくはフェニル)、またはヘテロアリール(例えば、5～12員、5～10員、5～9員、もしくは5～6員): オキソ、ハロゲン、ーC<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>、ーCBr<sub>3</sub>、ーCF<sub>3</sub>、ーCI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、ーCHBr<sub>2</sub>、ーCHF<sub>2</sub>、ーCHI<sub>2</sub>、ーCH<sub>2</sub>Cl、ーCH<sub>2</sub>Br、ーCH<sub>2</sub>F、ーCH<sub>2</sub>I、ーCN、ーOH、ーNH<sub>2</sub>、ーCOOH、ーCONH<sub>2</sub>、ーNO<sub>2</sub>、ーSH、ーSO<sub>3</sub>H、ーSO<sub>4</sub>H、ーSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、ーNHNH<sub>2</sub>、ーONH<sub>2</sub>、ーNHC(O)NHNH<sub>2</sub>、ーNHC(O)NH<sub>2</sub>、ーNH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、ーNHC(O)H、ーNHC(O)OH、ーNHOH、ーOCCl<sub>3</sub>、ーOCF<sub>3</sub>、ーOCBr<sub>3</sub>、ーOCI<sub>3</sub>、ーOCHCl<sub>2</sub>、ーOCHBr<sub>2</sub>、ーOCHI<sub>2</sub>、ーOCHF<sub>2</sub>、ーOCH<sub>2</sub>Cl、ーOCH<sub>2</sub>Br、ーOCH<sub>2</sub>I、ーOCH<sub>2</sub>F、ーN<sub>3</sub>、非置換アルキル(例えば、C<sub>1</sub>ーC<sub>8</sub>アルキル、C<sub>1</sub>ーC<sub>6</sub>アルキル、もしくはC<sub>1</sub>ーC<sub>4</sub>アルキル)、非置換ヘテロアルキル(例えば、2～8員ヘテロアルキル、2～6員ヘテロアルキル、もしくは2～4員ヘテロアルキル)、非置換シクロアルキル(例えば、C<sub>3</sub>ーC<sub>8</sub>シクロアルキル、C<sub>3</sub>ーC<sub>6</sub>シクロアルキル、もしくはC<sub>5</sub>ーC<sub>6</sub>シクロアルキル)、非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員ヘテロシクロアルキル、3～6員ヘテロシクロアルキル、もしくは5～6員ヘテロシクロアルキル)、非置換アリール(例えば、C<sub>6</sub>ーC<sub>10</sub>アリール、C<sub>10</sub>アリール、もしくはフェニル)、または非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員ヘテロアリール、5～9員ヘテロアリール、もしくは5～6員ヘテロアリール)。

#### 【0038】

本明細書で使用される「サイズ限定置換基(size-limited substituent)」または「サイズ限定置換基(size-limited substituent group)」は、「置換基」について上述される全ての置換基から選択される基を意味し、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>ーC<sub>20</sub>アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換2～20員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換C<sub>3</sub>ーC<sub>8</sub>シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アリールは、置換もしくは非置換C<sub>6</sub>ーC<sub>10</sub>アリールであり、各置換もしくは非置換ヘテロアリールは、置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールである。

#### 【0039】

本明細書で使用される「低級置換基(lower substituent)」または「低級置換基(lower substituent group)」は、「置換基」について上述される全ての置換基から選択される基を意味し、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>ーC<sub>8</sub>アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換C<sub>3</sub>ーC<sub>7</sub>シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換3～7員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アリールは、置換もしくは非置換C<sub>6</sub>ーC<sub>10</sub>アリールであり、各置換もしくは非置換ヘテロアリールは、置換もしくは非置換5～9員ヘテロアリールである。

## 【0040】

本明細書で化合物の他の実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換  $C_1 - C_{20}$  アルキルであり得、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換 2 ～ 20 員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換  $C_3 - C_8$  シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換 3 ～ 8 員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アリールは、置換もしくは非置換  $C_6 - C_{10}$  アリールであり、および／または各置換もしくは非置換ヘテロアリールは、置換もしくは非置換 5 ～ 10 員ヘテロアリールである。本明細書の化合物のいくつかの実施形態では、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換  $C_1 - C_{20}$  アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換 2 ～ 20 員ヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換  $C_3 - C_8$  シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換 3 ～ 8 員ヘテロシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換アリーレンは、置換もしくは非置換  $C_6 - C_{10}$  アリーレンであり、および／または各置換もしくは非置換ヘテロアリーレンは、置換もしくは非置換 5 ～ 10 員ヘテロアリーレンである。

10

## 【0041】

いくつかの実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換  $C_1 - C_8$  アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換 2 ～ 8 員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換  $C_3 - C_7$  シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換 3 ～ 7 員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アリールは、置換もしくは非置換  $C_6 - C_{10}$  アリールであり、および／または各置換もしくは非置換ヘテロアリールは、置換もしくは非置換 5 ～ 9 員ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換  $C_1 - C_8$  アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換 2 ～ 8 員ヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換  $C_3 - C_7$  シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換 3 ～ 7 員ヘテロシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換アリーレンは、置換もしくは非置換  $C_6 - C_{10}$  アリーレンであり、および／または各置換もしくは非置換ヘテロアリーレンは、置換もしくは非置換 5 ～ 9 員ヘテロアリーレンである。いくつかの実施形態では、化合物は、以下の実施例の項、図、または表に記載の化学種である。

20

30

## 【0042】

実施形態では、置換もしくは非置換部分（例えば、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、および／または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン）は、非置換である（例えば、それぞれ、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、非置換アルキレン、非置換ヘテロアルキレン、非置換シクロアルキレン、非置換ヘテロシクロアルキレン、非置換アリーレン、および／または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン）は、置換である（例え

40

50

ば、それぞれ、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレンである）。

【0043】

実施形態では、置換部分（例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの置換基で置換され、置換部分が、複数の置換基で置換されている場合、各置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、置換部分が複数の置換基で置換されている場合、各置換基は異なる。

10

【0044】

実施形態では、置換部分（例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換され、置換部分が、複数の置換基で置換されている場合、各サイズ限定置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、置換部分が複数のサイズ限定置換基で置換されている場合、各サイズ限定置換基は異なる。

20

【0045】

実施形態では、置換部分（例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの低級置換基で置換され、置換部分が、複数の低級置換基で置換されている場合、各低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、置換部分が複数の低級置換基で置換されている場合、各低級置換基は異なる。

【0046】

実施形態では、置換部分（例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換部分が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、置換部分が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は異なる。

30

【0047】

本開示のある特定の化合物は、不斉炭素原子（光学中心もしくはキラル中心）または二重結合を有し、絶対立体化学の観点から（R）－もしくは（S）－またはアミノ酸に関して（D）－もしくは（L）－と定義され得るエナンチオマー、ラセミ体、ジアステレオマー、互変異性体、幾何異性体、立体異性体形態、および個々の異性体は、本開示の範囲内に包含される。本開示の化合物は、合成および／または単離するには不安定すぎるのが当該技術分野で知られている化合物を含まない。本開示は、ラセミ体および光学的に純粋な形態の化合物を含むよう意図されている。光学的に活性な（R）－および（S）－または（D）－および（L）－異性体は、キラルシントロンもしくはキラル試薬を使用して調製されても、従来の技法を使用して分解されてもよい。本明細書に記載の化合物がオレフィン結合または他の幾何不斉中心を含む場合、別途指定されない限り、化合物がE幾何異性体およびZ幾何異性体の両方を含むよう意図されている。

40

50

## 【0048】

本明細書で使用される場合、「異性体」という用語は、同じ数および種類の原子、ひいては同じ分子量を有するが、原子の構造配置または立体配置に関しては異なる化合物を指す。

## 【0049】

本明細書で使用される「互変異性体」という用語は、平衡状態で存在し、ある異性体形態から別の異性体形態に容易に変換される、2つ以上の構造異性体の1つを指す。本開示のある特定の化合物が互変異性体形態で存在してもよく、化合物の全てのかかる互変異性体形態が開示の範囲内であることは、当業者には明らかであろう。

## 【0050】

特に明記しない限り、本明細書に示される構造はまた、その構造の全ての立体化学形態、すなわち、各非対称中心に対するRおよびS配置を含むことも意図する。したがって、本化合物の単一の立体化学異性体、ならびにエナンチオマーおよびジアステレオマー混合物は、本開示の範囲内である。特に明記しない限り、本明細書に示される構造はまた、1個以上の同位体濃縮原子の存在においてのみ異なる化合物を含むようにも意図されている。例えば、重水素もしくは三重水素による水素の置き換え、または $^{13}\text{C}$ もしくは $^{14}\text{C}$ 濃縮炭素による炭素の置き換えを除く、本構造を有する化合物は、本開示の範囲内である。本開示の化合物もまた、そのような化合物を構成する原子のうちの1個以上において非天然の割合の原子同位体も含み得る。例えば、化合物は、例えば、三重水素( $^3\text{H}$ )、ヨウ素-125( $^{125}\text{I}$ )、または炭素-14( $^{14}\text{C}$ )等の放射性同位体で放射性標識され得る。本発明の化合物のすべての同位体変種は、放射性であるか否かにかかわらず、本発明の範囲内に包含される。

## 【0051】

本出願を通じて、選択肢、例えば、1つより多くの可能なアミノ酸を含有する各アミノ酸位置は、マーカッシュの群で記載されることに留意すべきである。マーカッシュ群の各メンバーが別個に考慮されるべきであり、それにより、別の実施形態を含み、マーカッシュ群が単一の単位として読まれるべきではないことが特に企図される。

## 【0052】

本明細書で使用される場合、「バイオコンジュゲート反応性部分」および「バイオコンジュゲート反応性基」という用語は、バイオコンジュゲート反応性基の原子または分子間の会合の結果としてバイオコンジュゲート（例えば、共有結合リンカー）を形成することができる部分または基を指す。会合は、直接的または間接的であり得る。例えば、本明細書で提供される、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{N}$ -ヒドロキシスクシンイミド、もしくは $-\text{マレイミド}$ ）と第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、スルフヒドリル、硫黄含有アミノ酸、アミン、アミノ酸を含むアミン側鎖、もしくはカルボキシレート）との間のコンジュゲートは、例えば、共有結合もしくはリンカー（例えば、第2のリンカーの第1のリンカー）による直接的、または、例えば、非共有結合（例えば、静電相互作用（例えば、イオン結合、水素結合、ハロゲン結合）、ファンデルワールス相互作用（例えば、双極子-双極子、双極子誘起双極子、ロンドン分散）、リングスタッキング（ $\pi$ 効果）、疎水性相互作用）による間接的であり得る。実施形態では、バイオコンジュゲートあるいはバイオコンジュゲートリンカーは、求核置換（例えば、アミンおよびアルコールと、ハロゲン化アシル、活性エステルとの反応）、求電子置換（例えば、エナミン反応）、ならびに炭素-炭素および炭素-ヘテロ原子の多重結合への付加（例えば、マイケル反応、ディールス-アルダー付加）を含むがこれらに限定されないバイオコンジュゲート化学（すなわち、2つのバイオコンジュゲート反応性基の会合）を使用して形成される。これらおよび他の有用な反応は、例えば、March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; および Feeney et al., MODIFICATION OF

10

20

30

40

50

PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D. C., 1982において論じられている。実施形態では、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、マレイミド部分）は、第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、スルフヒドリル）に共有結合している。実施形態では、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、ハロアセチル部分）は、第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、スルフヒドリル）に共有結合している。実施形態では、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、ピリジル部分）は、第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、スルフヒドリル）に共有結合している。実施形態では、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、 $-N-$ ヒドロキシスクシンイミド部分）は、第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、アミン）に共有結合している。実施形態では、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、マレイミド部分）は、第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、スルフヒドリル）に共有結合している。実施形態では、第1のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、 $-スルホ-N-$ ヒドロキシスクシンイミド部分）は、第2のバイオコンジュゲート反応性基（例えば、アミン）に共有結合している。

#### 【0053】

本明細書のバイオコンジュゲート化学に使用される有用なバイオコンジュゲート反応性部分の例としては、(a) カルボキシル基、ならびに $N$ -ヒドロキシスクシンイミドエステル、 $N$ -ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、 $p$ -ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステルを含むがこれらに限定されないその様々な誘導体、(b) エステル、エーテル、アルデヒドなどに変換できるヒドロキシル基、(c) ハロゲン化物が、例えば、アミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核基で後に置換され、それによりハロゲン原子の部位に新しい基が共有結合され得るハロアルキル基、(d) 例えば、マレイミドまたはマレイミド基などのディールス・アルダー反応に関与することができるジエノフィル基、(e) 例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンまたはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成を介して、またはグリニャール付加またはアルキルリチウム付加などのメカニズムを介して、その後の誘導体化が可能であるようなアルデヒドまたはケトン基、(f) 例えば、その後にアミンと反応してスルホンアミドを形成するハロゲン化スルホニル基、(g) ジスルフィドに変換されたり、ハロゲン化アシルと反応したり、金などの金属に結合したり、マレイミドと反応し得るチオール基、(h) 例えば、アシル化、アルキル化、または酸化され得るアミンまたはスルフヒドリル基（例えば、システインに存在する）、(i) 例えば、付加環化、アシル化、マイケル付加などを受ける可能性があるアルケン、(j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応することができるエポキシド、(k) 核酸合成に有用なホスホルアミダイトおよび他の標準的な官能基、(l) 金属酸化ケイ素結合、(m) 反応性リン基（例えばホスフィン）に結合して、例えば、リン酸ジエステル結合を形成する金属、(n) 銅触媒による付加環化クリック化学を使用してアルキンに結合したアジド、(o) アビジンまたはストレプトアビジンと反応して、アビジン-ビオチン複合体またはストレプトアビジン-ビオチン複合体を形成することができるビオチンコンジュゲートが挙げられる。バイオコンジュゲート反応性基は、それらが本明細書に記載のコンジュゲートの化学的安定性に関与しない、または干渉しないように選択することができる。あるいは、反応性官能基は、保護基の存在によって架橋反応に関与することから保護することができる。実施形態では、バイオコンジュゲートは、マレイミドなどの不飽和結合とスルフヒドリル基との反応から得られる分子実体を含む。

#### 【0054】

「類似体 (Analog)」または「類似体 (analogue)」は、Chemistry and Biology内のその平易な通常の意味に従って使用され、別の化合物（すなわち、いわゆる「参照」化合物）と構造的に類似しているが、組成、例えば、異なる元素の原子による1つの原子の置き換え、または特定の官能基の存在下、または別の官

10

20

30

40

50

能基による1つの官能基の置き換え、または参照化合物の1つ以上のキラル中心の絶対立体化学が異なる化合物を指す。したがって、類似体は、参照化合物と機能および外観の点で同様または同等であるが、構造または起源の点では異なる化合物である。

#### 【0055】

本明細書で使用される「a」または「an」という用語は、1つ以上を意味する。さらに、本明細書で使用される「a[n]で置換される」という語句は、特定の基が指定された置換基のうちのいずれかまたは全てのうちの1つ以上で置換され得ることを意味する。例えば、アルキル基またはヘテロアリール基等の基が、「非置換 $C_1-C_{20}$ アルキルまたは非置換2~20員ヘテロアルキルで置換されている」場合、その基は、1つ以上の非置換 $C_1-C_{20}$ アルキルおよび／または1つ以上の非置換2~20員ヘテロアルキルを含み得る。さらに、ある部分がR置換基で置換される場合、その基は、「R置換」と称され得る。ある部分がR置換されている場合、その部分は、少なくとも1つのR置換基で置換され、各R置換基は、任意に異なる。特定のR基が化学種（式（I）など）の説明中に存在する場合、ローマアルファベット記号が、その特定のR基の各外観を区別するために使用することができる。例えば、複数の $R^{13}$ 置換基が存在する場合、各 $R^{13}$ 置換基は、 $R^{13A}$ 、 $R^{13B}$ 、 $R^{13C}$ 、 $R^{13D}$ 等と区別され得、 $R^{13A}$ 、 $R^{13B}$ 、 $R^{13C}$ 、 $R^{13D}$ 等は各々、 $R^{13}$ の定義の範囲内で定義され、任意に異なる。

#### 【0056】

「検出可能な薬剤」または「検出可能な部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、磁気共鳴画像法または他の物理的手段などの適切な手段によって検出可能な物質、化合物、元素、分子または組成物である。例えば、有用な検出可能な薬剤には、 $^{18}F$ 、 $^{32}P$ 、 $^{33}P$ 、 $^{45}Ti$ 、 $^{47}Sc$ 、 $^{52}Fe$ 、 $^{59}Fe$ 、 $^{62}Cu$ 、 $^{64}Cu$ 、 $^{67}Cu$ 、 $^{67}Ga$ 、 $^{68}Ga$ 、 $^{77}As$ 、 $^{86}Y$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{89}Sr$ 、 $^{89}Zr$ 、 $^{94}Tc$ 、 $^{94}Tc$ 、 $^{99m}Tc$ 、 $^{99}Mo$ 、 $^{105}Pd$ 、 $^{105}Rh$ 、 $^{111}Ag$ 、 $^{111}In$ 、 $^{123}I$ 、 $^{124}I$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 、 $^{142}Pr$ 、 $^{143}Pr$ 、 $^{149}Pm$ 、 $^{153}Sm$ 、 $^{154-158}Gd$ 、 $^{161}Tb$ 、 $^{166}Dy$ 、 $^{166}Ho$ 、 $^{169}Er$ 、 $^{175}Lu$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{186}Re$ 、 $^{188}Re$ 、 $^{189}Re$ 、 $^{194}Ir$ 、 $^{198}Au$ 、 $^{199}Au$ 、 $^{211}At$ 、 $^{211}Pb$ 、 $^{212}Bi$ 、 $^{212}Pb$ 、 $^{213}Bi$ 、 $^{223}Ra$ 、 $^{225}Ac$ 、 $Cr$ 、 $V$ 、 $Mn$ 、 $Fe$ 、 $Co$ 、 $Ni$ 、 $Cu$ 、 $La$ 、 $Ce$ 、 $Pr$ 、 $Nd$ 、 $Pm$ 、 $Sm$ 、 $Eu$ 、 $Gd$ 、 $Tb$ 、 $Dy$ 、 $Ho$ 、 $Er$ 、 $Tm$ 、 $Yb$ 、 $Lu$ 、 $^{32}P$ 、フルオロフォア（蛍光色素など）、高電子密度試薬、酵素（例えば、ELISAで一般的に使用されるもの）、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、超小型超常磁性酸化鉄（「USPIO」）ナノ粒子、USPIOナノ粒子凝集体、超常磁性酸化鉄（「SPIO」）ナノ粒子、SPIOナノ粒子凝集体、単結晶酸化鉄ナノ粒子、単結晶酸化鉄、ナノ粒子造影剤、リポソーム、またはガドリニウムキレートを含むその他の送達媒体（「Gd-キレート」）分子、ガドリニウム、放射性同位元素、放射性核種（例えば、炭素-11、窒素-13、酸素-15、フッ素-18、ルビジウム-82）、フルオロデオキシグルコース（例えば、フッ素-18標識）、任意のガンマ線放出放射性核種、陽電子放出放射性核種、放射性標識グルコース、放射性標識水、放射性標識アンモニア、生体コロイド、マイクロバブル（例えば、アルブミン、ガラクトース、脂質、および／またはポリマーを含むマイクロバブルシェル、空気、重ガス（複数可）、パーフルオロカーボン、窒素、オクタフルオロプロパン、パーフレクサン（perflexane）脂質ミクロスフェア、パーフルトレンなどを含むマイクロバブルガスコア）、ヨード造影剤（例、イオヘキソール、イोजキシナール、イオベルソール、イオパミドール、イオキシラン、イオプロミド、ジアトリゾエート、メトリゾエート、イオキサグレート）、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、またはハプテンおよびタンパク質、または、例えば、標的ペプチドと特異的に反応するペプチドまたは抗体に放射性標識を組み込むことによって検出可能にすることができる他の実体、が含まれる。検出可能な部分は、一価の検出可能な薬剤または別の組成物と結合を形成することができる検出可能な薬剤である。

## 【0057】

本開示の態様による造影剤および／または標識剤として使用され得る放射性物質（例えば、放射性同位体）には、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ が含まれるが、これらに限定されない。 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{105}\text{Pd}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{175}\text{Lu}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{194}\text{Ir}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{211}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ および $^{225}\text{Ac}$ 、が含まれる。本開示の態様に従って追加の造影剤として使用することができる常磁性イオンとしては、遷移金属およびランタニド金属（例えば、原子番号が21～29、42、43、44、または57～71である金属）のイオンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの金属には、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、Luのイオンが含まれる。

## 【0058】

本開示の化合物の記載は、当業者に既知である化学結合の原理によって制限される。したがって、基がいくつかの置換基のうちの1つ以上で置換され得る場合、そのような置換は、化学結合の原理に従うように、および本質的に不安定ではない、ならびに／または水性、中性、およびいくつかの既知の生理学的条件などの周囲条件下では不安定である可能性が高いと当業者に知られている化合物をもたらすように、選択される。例えば、ヘテロシクロアルキルまたはヘテロアリアルは、当業者に公知の化学結合の原理に従って、環ヘテロ原子を介して分子の残りの部分に結合し、それによって本質的に不安定な化合物が回避される。

## 【0059】

当業者であれば、化合物または化合物属（例えば、本明細書に記載の属）の変数（例えば、部分またはリンカー）が、全ての原子価が満たされた独立型化合物の名称または式によって記載される場合、その変数の満たされていない原子価は、変数が使用される状況によって決定されることを理解するであろう。例えば、本明細書に記載の化合物の変数が単結合を介して化合物の残りの部分に接続（例えば、結合）される場合、その変数は、独立型化合物の一価形態（すなわち、満たされていない原子価に起因して単結合を形成することができる）を表すと理解される（例えば、変数がある実施形態では「メタン」と名付けられているが、その変数が単結合によって化合物の残りの部分に結合していることが知られている場合、当業者であれば、その変数が実際にはメタンの一価形態、つまり、メチルまたは $-\text{CH}_3$ であることを理解するであろう）。同様に、リンカー変数（例えば、本明細書に記載の $\text{L}^1$ 、 $\text{L}^2$ または $\text{L}^3$ ）の場合、当業者であれば、その変数が独立型化合物の二価形態であることを理解するであろう（例えば、変数がある実施形態では「PEG」または「ポリエチレングリコール」に割り当てられるが、その変数が2つの別個の結合によって化合物の残りの部分に接続されている場合、当業者であれば、その変数が、独立型化合物PEGではなく、PEGの二価（すなわち、2つの満たされていない原子価を介して2つの結合を形成することができる）形態であることを理解するであろう。

## 【0060】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に記載の化合物に見られる特定の置換基に応じて、比較的非毒性の酸または塩基を用いて調製される活性化合物の塩を含むよう意図されている。本開示の化合物が比較酸的性の官能基を含む場合、かかる化合物の中性形態を、無溶媒でまたは好適な不活性溶媒中のいずれかで、十分な量の所望の塩基と接触させることによって、塩基付加塩が得られ得る。薬学的に許容される塩基付加塩の例としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、もしくはマグネシウム塩、または同様の塩が挙げられる。本開示の化合物が比較塩基性の官能基を含む場合、かかる化合物の中性形態を、無溶媒でまたは好適な不活性溶媒中のいずれかで、



十分な量の所望の酸と接触させることによって、酸付加塩が得られ得る。薬学的に許容される酸付加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸、リン酸、一水素リン酸、二水素リン酸、硫酸、一水素硫酸、ヨウ化水素酸、または亜リン酸等の無機酸に由来する塩、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、メタンスルホン酸等の比較的非毒性の有機酸に由来する塩が挙げられる。アミノ酸塩、例えば、アルギニン酸塩等、および有機酸塩、例えば、グルクロン酸またはガラクトン酸等も含まれる（例えば、Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19を参照のこと）。本開示のある特定の化合物は、化合物が塩基付加塩または酸付加塩のいずれかに変換されることを可能にする塩基性および酸性官能基の両方を含む。したがって、本開示の化合物は、薬学的に許容される酸等との塩として存在し得る。本開示は、そのような塩を含む。かかる塩の非限定的な例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩（例えば、（+）-酒石酸塩、（-）-酒石酸塩、またはラセミ混合物を含むそれらの混合物）、コハク酸塩、安息香酸塩、およびアミノ酸を有する塩、例えば、グルタミン酸、ならびに第四級アンモニウム塩（例えば、ヨウ化メチル、ヨウ化エチル等）が挙げられる。これらの塩は、当業者に既知の方法によって調製され得る。中性形態の化合物は、好ましくは、塩を塩基または酸と接触させて、従来の様式で親化合物を単離することによって再生される。化合物の親形態は、極性溶媒中での溶解性等のある特定の物理的特性の点で様々な塩形態とは異なり得る。

#### 【0061】

塩形態に加えて、本開示は、プロドラッグ形態の化合物を提供する。本明細書に記載の化合物のプロドラッグは、生理学的条件下で容易に化学変化を受けて本開示の化合物をもたらす化合物である。本明細書に記載の化合物のプロドラッグは、投与後にインビボで変換され得る。加えて、プロドラッグは、例えば、好適な酵素または化学試薬と接触したとき等に、エクスピボ環境下で化学的または生化学的方法によって本開示の化合物に変換され得る。

#### 【0062】

本開示のある特定の化合物は、非溶媒和形態、および水和形態を含む溶媒和形態で存在し得る。一般に、溶媒和形態は、非溶媒和形態と同等であり、本開示の範囲内に包含される。本開示のある特定の化合物は、複数の結晶形態または非晶形態で存在し得る。一般に、全ての物理的形態が本開示によって企図される使用について同等であり、本開示の範囲内であるよう意図されている。

#### 【0063】

「薬学的に許容される賦形剤」および「薬学的に許容される担体」は、活性薬剤の対象への投与および対象による吸収を助け、患者に重大な有害毒性作用を引き起こすことなく本開示の組成物中に含まれ得る物質を指す。薬学的に許容される賦形剤の非限定的な例としては、水、NaCl、標準生理食塩水、乳酸化リンガー液、標準スクロース、標準グルコース、結合剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、食塩水（リンガー溶液等）、アルコール、油、ゼラチン、炭水化物、例えば、ラクトース、アミロース、またはデンプン、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリジン、および着色剤等が挙げられる。かかる調製物は、滅菌され得、所望の場合、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、および／または本開示の化合物と有害に反応しない芳香族物質等の助剤と混合され得る。当業者であれば、他の薬学的賦形剤が本開示において有用であることを認識するであろう。

#### 【0064】

「調製」という用語は、活性化合物と、カプセルを提供する担体としてのカプセル化材

10

20

30

40

50

料との配合を含むことが意図され、カプセル中で他の担体を含むかまたは含まない活性成分は担体に取り囲まれており、したがってそれと会合している。同様に、カシェ剤およびトローチ剤が含まれる。錠剤、粉末剤、カプセル剤、丸剤、カシェ剤、およびトローチ剤は、経口投与に好適な固体剤形として使用され得る。

#### 【0065】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定の値を含む値の範囲を意味し、当業者は、特定の値に合理的に類似しているを見なすであろう。実施形態では、約は、当該技術分野で一般に許容される測定値を使用する標準偏差内を意味する。実施形態では、約は、特定の値の $+/-10\%$ に及ぶ範囲を意味する。実施形態では、約は、特定の値を含む。

10

#### 【0066】

「接触させること」とは、その平易な通常の意味に従って使用され、少なくとも2つの異なる種（例えば、生体分子または細胞を含む化学化合物）が反応、相互作用、または物理的接触に十分近位になることを可能にするプロセスを指す。しかしながら、結果として生じた反応生成物が、添加された試薬間の反応から直接、または反応混合物中に生成され得る添加された試薬のうちの1つ以上由来の中間体から生成され得ることを理解されたい。「接触させること」という用語は、2つの種が反応、相互作用、または物理的接触を可能にすることを含むことができ、2つの種は、本明細書に記載の化合物およびタンパク質または酵素であり得る。いくつかの実施形態では、接触させることは、本明細書に記載の化合物がシグナル伝達経路に参与するタンパク質または酵素と相互作用することを可能にするを含む。

20

#### 【0067】

本明細書で定義されるように、タンパク質-阻害剤相互作用に関して「活性化」、「活性化する」、「活性化すること」、「活性化因子」等の用語は、活性化因子の不在下でのタンパク質の活性または機能と比較して、タンパク質の活性または機能に良い影響を及ぼすこと（例えば、それを増加させること）を意味する。実施形態では、活性化とは、活性化因子の不在下でのタンパク質濃度またはレベルと比較してタンパク質濃度またはレベルにプラスの影響を与えること（例えば、それを増加させること）を意味する。これらの用語は、シグナル伝達または酵素活性またはある疾患において減少したタンパク質の量を、活性化、または活性化すること、感作させること、または上方調節することを指し得る。したがって、活性化は、少なくとも部分的に、刺激を部分的にまたは完全に増加させること、シグナル伝達または酵素活性またはある疾患に関連するタンパク質（例えば、罹患していない対照と比較してある疾患において減少したタンパク質）の量を、増加させること、または活性化を可能にすること、または活性化すること、感作させること、または上方調節することを含み得る。活性化は、少なくとも部分的に、刺激を部分的にまたは完全に増加させること、シグナル伝達または酵素活性またはタンパク質の量を、増加させること、または活性化を可能にすること、または活性化すること、感作させること、または上方調節することを含み得る。

30

#### 【0068】

「アゴニスト」、「活性化因子」、「上方調節因子」などの用語は、所与の遺伝子またはタンパク質の発現または活性を検出可能に増大させることができる物質を指す。アゴニストは、アゴニストの不在下の対照と比較して、発現または活性を10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上増加させることができる。ある特定の例では、発現または活性は、アゴニストの不在下での発現または活性よりも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、またはそれ以上高い。

40

#### 【0069】

本明細書で定義されるように、タンパク質-阻害剤相互作用に関して「阻害」、「阻害する」、「阻害すること」等の用語は、阻害剤の不在下でのタンパク質の活性または機能と比較してタンパク質の活性または機能に悪影響を及ぼすこと（例えば、それを低減させること）を意味する。実施形態では、阻害とは、阻害剤の不在下でのタンパク質濃度また

50

はレベルと比較してタンパク質濃度またはレベルにマイナスの影響を与えること（例えば、それを減少させること）を意味する。実施形態では、阻害とは、疾患または疾患の症状の軽減を指す。実施形態では、阻害とは、特定のタンパク質標的の活性の低下を指す。したがって、阻害は、少なくとも部分的に、刺激を部分的にまたは完全に遮断すること、シグナル伝達または酵素活性またはタンパク質の量を、減少させること、阻止すること、または活性化を遅延させること、または不活性化すること、脱感作させること、または下方調節することを含む。実施形態では、阻害とは、直接相互作用に起因する標的タンパク質の活性の低下を指す（例えば、阻害剤は、標的タンパク質に結合する）。実施形態では、阻害とは、間接相互作用に起因する標的タンパク質の活性の低下を指す（例えば、阻害剤は、標的タンパク質を活性化するタンパク質に結合し、それにより、標的タンパク質の活性化を阻止する）。

10

【0070】

「阻害剤」、「抑制因子」、または「アンタゴニスト」、または「下方調節因子」という用語は、同義に、所与の遺伝子またはタンパク質の発現または活性を検出可能に低減させることができる物質を指す。アンタゴニストは、アンタゴニストの不在下での対照と比較して、発現または活性を10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上減少させることができる。ある特定の例では、発現または活性は、アンタゴニストの不在下での発現または活性よりも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、またはそれ以上低い。

【0071】

20

「RNF4」および「RINGフィンガータンパク質4」という用語は、E3リガーゼタンパク質（ホモログ、アイソフォーム、およびそれらの機能的断片を含む）を指す。この用語は、（例えば、野生型RNF4と比較して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%活性の範囲内で）RNF4活性を維持するRNF4またはそのバリエーションの任意の組換え形態または天然に存在する形態を含む。実施形態では、RNF4遺伝子によってコードされるRNF4タンパク質は、Entrez 6047、UniProt P78317、RefSeq（タンパク質）NP\_002929、RefSeq（タンパク質）NP\_001171939、またはRefSeq（タンパク質）NP\_001171938に記載されているか、またはそれに対応するアミノ酸配列を有する。実施形態では、アミノ酸配列または核酸配列は、本出願の出願時に既知の配列である。実施形態では、RNF4は、RNF4をもたらすヒト癌などのヒトRNF4である。実施形態では、RNF4は、以下の配列を有する：

30

MSTRKR RRGGA INSRQAQKRTREATSTPEISLEAEPIELVE  
TAGDEIVDLTCESELPVVVD  
LTHNDSVVIVDERRRPRRNARRLPQDHADSCVVSSDDEEL  
SRDRDVYVTTHTPRNARDEG  
ATGLRPSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFC  
SQCLRDSLKNANTCPTCRKKI  
NHKRYHP IYI（配列番号1）。

【0072】

40

「RNF114」および「RINGフィンガータンパク質114」および「ZNF228」および「ZNF313」という用語は、E3リガーゼタンパク質（ホモログ、アイソフォーム、およびそれらの機能的断片を含む）を指す。この用語は、（例えば、野生型RNF114と比較して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%活性の範囲内で）RNF114活性を維持するRNF4またはそのバリエーションの任意の組換え形態または天然に存在する形態を含む。実施形態では、RNF4遺伝子によってコードされるRNF114タンパク質は、Entrez 55905、UniProt Q9Y508、またはRefSeq（タンパク質）NP\_061153に記載されているか、またはそれに対応するアミノ酸配列を有する。実施形態では、アミノ酸配列または核酸配列は、本出願の出願時に既知の配列である。実施形態では

50

、RNF114は、RNF114をもたらすヒト癌などのヒトRNF114である。実施形態では、RNF114は、以下の配列を有する：

MAAQQRDCGGAAQLAGPAAEADPLGRFTCPVCLEVYEKPV  
QVPCGHVFCACLQECLKPK  
KPVCGVCRSALAPGVRAVELERQIESTETSCHGCRKNFFL  
SKIRSHVATCSKYQNYIMEG  
VKATIKDASLQPRNVPNRYTFPCPYCPEKNFDQEGLEVEHC  
KLFHSTDTKSVVCPICASMP  
WGDPNYRSANFREHIQRRHRFSYDTFVDYDVDEEDMMNQV  
LQRSIIDQ（配列番号2）。

【0073】

「BRD4」および「プロモドメイン含有タンパク質4」という用語は、有糸分裂中に染色体と会合し、細胞分裂および転写調節を介したエピジェネティックな記憶の伝達において重要な役割を果たすタンパク質を指す。実施形態では、BRD4遺伝子によってコードされるBRD4タンパク質は、Entrez 23476、UniProt O60885、RefSeq（タンパク質）NP\_001317313.1、RefSeq（タンパク質）NP\_055114.1、またはRefSeq（タンパク質）NP\_490597.1に記載されているか、またはそれに対応するアミノ酸配列を有する。実施形態では、アミノ酸配列または核酸配列は、本出願の出願時に既知の配列である。実施形態では、BRD4は、以下の配列を有する：

MSAESGPGTRLRNLPVMGDGLETSQMSTTQAQAQPQPANA  
ASTNPPPPETSNPNKPKRQT  
NQLQYLLRVVLKTLWKHQFAWPFQQPVDAVKLNLPDYKYI  
IKTPMDMGTIKKRLNNYYW  
NAQECIQDFNTMFTNCYIYNKPGDDIVLMAEAELEKLFQK  
INELPTEETEIMIVQAKGRG  
RGRKETGTAKPGVSTVPNTTQASTPPQTQTPQPNPPPVQA  
TPHPFPAVTPDLIVQTPVMT  
VVPPQPLQTTPPVPPQPQPPAPAPQPVQSHPPPIAATPQ  
PVKTKKGVKRKADTTTPTTI  
DPIHEPPSLPPEPKTTKLGRRESSRPVKPPKKDVPDSQQ  
HPAPEKSSKVSEQLKCCSGI  
LKEMFAKKHAAAWPFYKPV DVEALGLHDYCDIIKHPMDM  
STIKSKLEAREYRDAQEFGA  
DVRLMFSNCYKYNPPDHEVVAMARKLQDVFEMRFAKMPDE  
PEEPVVAVSSPAVPPPTKV  
APPSSSDSSSDSSSDSDSSTDDSEEEERAQRLAELQEQLKA  
VHEQLAALSQPQQNKPKKKE  
KDKKEKKKEKHKRKEEVEENKKS KAKEPPP KKT KKNSSN  
SNVSKKEPAPMKSKPPPTYE  
SEEEEDKCKPMSYEEKRQLSLDINKLPGEKLGRVVHIIQSR  
EPSLKNSNPDEIEIDFETLK  
PSTLRELERYVTSCLRKKRKPKQAEKV DVIAGSSSKMKGFSS  
SESESSSESSSSSDSE DSETE  
MAPKSKKKGHPGREQKKHHHHHHQMQQAPAPVPQQPPPP  
PQQPPPPPPPPQQQQQPPPPP  
PPPSMPQQAAPAMKSSPPPFIAATQVPVLEPQLPGSVFDPI  
GHFTQPIILHLPQPELPPHLP  
QPPEHSTPPHLNQHAVVSPPALHNALPQQPSRPSNRAAAL  
PPKPARPPAVSPALTQTPLL

PQPPMAQPPQV LLEDEEPPAPPLTSMQMQLYLQQLQKVQP  
PTPLLP SVKVQSQPPPLPP  
PPHPSVQQQLQQQPPPPPPPPQPPPPQQQHQP PPRPVHLQ  
PMQFSTHIQQPPPPQGGQPP  
HPPPGQQPPPPQPAKPKQQVIQH HHS PRH HKSDPYSTGHLR  
EAPSP LMIHSPQMSQFQSLT  
HQSPPQQNVQP K KQELRAASVVQPQLVVVKEEKIHSPII  
RSEPFSPSLRPEPPKHPESI  
KAPVHLPQRPEMKPVDVGRPVIRPPEQNAPPPGAPDKDKQ  
KQEPKTPVAPKKDLKIKNMG  
SWASLVQKHPTTPSSTAKSSSDSFEQFRRAAREKEEREKA  
LKAQAEHAEKEKERLRQERM  
RSREDEDALEQARRAHEEARRRQEQQQQQRQEQQQQQQQQ  
AAAVAAAATPQAQSSQPQS  
MLDQQRELARKREQERRRREAMAATIDMNFQSDLLSIFEE  
NLF (配列番号3)。

## 【0074】

「発現」という用語は、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、および分泌を含むが、これらに限定されない、ポリペプチドの産生に参与する任意のステップを含む。発現は、タンパク質を検出するための従来の技法（例えば、ELISA、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学等）を使用して検出され得る。

## 【0075】

「調節因子」という用語は、標的分子のレベルまたは標的分子の機能または分子の標的の物理的状態を、調節因子の不在下と比較して増加または減少させる組成物を指す。「調節する」という用語は、その平易な通常の意味に従って使用され、1つ以上の特性を変化または変動させる作用を指す。「調節」とは、1つ以上の特性を変化または変動させるプロセスを指す。

## 【0076】

疾患に関連する物質または物質の活性もしくは機能の文脈において、「関連した」または「に関連する」という用語は、その疾患が（全体的にまたは部分的に）引き起こされるか、あるいはその疾患の症状が（全体的にまたは部分的に）物質または物質の活性もしくは機能によって引き起こされることを意味する。

## 【0077】

本明細書で使用される「異常な」という用語は、正常とは異なることを指す。酵素活性またはタンパク質機能を説明するために使用される場合、異常とは、正常な対照または正常な非疾患対照サンプルの平均よりも大きいまたはそれより小さい活性または機能を指す。異常な活性とは、疾患をもたらす活性の量を指してもよく、（例えば、化合物を投与するか、または本明細書に記載の方法を使用することによって）異常な活性を正常なまたは非疾患関連量に戻すことにより、疾患または1つ以上の病徴の軽減がもたらされる。

## 【0078】

本明細書で使用される「シグナル伝達経路」という用語は、1つの成分の変化を1つ以上の他の成分に伝達することができ、次いで、これが追加の成分に変化を伝達することができ、これが他のシグナル伝達経路成分に任意に伝播される、細胞成分および任意に細胞外成分（例えば、タンパク質、核酸、小分子、イオン、脂質）間の一連の相互作用を指す。

## 【0079】

本開示において、「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含有する (containing)」および「有する (having)」などは、米国特許法においてそれらに帰する意味を有することができ、「含む (includes)」、「含む (including)」などを意味することができる。「本質的に～からなる (consisting essentially of)」または「本質的に構成され

10

20

30

40

50

る (consists essentially)」も同様に、米国特許法に帰する意味を有し、この用語は制限がなく、記載されているものの基本的または新規の特性が、記載されているものより多くの存在によって変化しない限り、記載されているものより多くの存在を可能にするが、先行技術の実施形態を含まない。

#### 【0080】

「疾患」または「状態」という用語は、本明細書で提供される化合物または方法で治療することができる患者または対象の存在状態または健康状態を指す。疾患は、癌であり得る。疾患は、自己免疫疾患であり得る。疾患は、炎症性疾患であり得る。疾患は、感染症であり得る。いくつかのさらなる例では、「癌」とは、ヒト癌および癌腫、肉腫、腺癌、リンパ腫、白血病等、例えば、固形およびリンパ球系癌、腎臓癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、結腸癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、脳癌、頭頸部癌、皮膚癌、子宮癌、精巣癌、神経膠腫、食道癌、および肝臓癌、例えば、肝細胞癌、リンパ腫、例えば、B急性リンパ芽球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、バーキット、小細胞、および大細胞リンパ腫）、ホジキンリンパ腫、白血病（AML、ALL、およびCMLを含む）、または多発性骨髄腫を指す。

#### 【0081】

本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、白血病、リンパ腫、癌腫、および肉腫を含む、哺乳動物（例えば、ヒト）に見出される全ての種類の癌、新生物、または悪性腫瘍を指す。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る例示的な癌には、脳癌、神経膠腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、髄芽細胞腫、黒色腫、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、頭部癌、ホジキン病、および非ホジキンリンパ腫が挙げられる。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る例示的な癌には、甲状腺癌、内分泌系癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、頭頸部癌、肝臓癌、腎臓癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、直腸癌、胃癌、および子宮癌が挙げられる。さらなる例としては、甲状腺癌、胆管癌、膵臓腺癌、皮膚の皮膚黒色腫、結腸腺癌、直腸腺癌、胃腺癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌、乳房浸潤癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、非小細胞肺癌、中皮腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、多形性膠芽細胞腫、卵巣癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、悪性膵インスリノーマ（insulinoma）、悪性カルチノイド、膀胱癌、前悪性皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、泌尿生殖器癌、悪性高カルシウム血症、子宮内膜癌、副腎皮質癌、内分泌もしくは外分泌膵臓新生物、甲状腺髄様癌、甲状腺髄様癌腫、黒色腫、結腸直腸癌、甲状腺乳頭癌、肝細胞癌、または前立腺癌が挙げられる。

#### 【0082】

「白血病」という用語は、造血器官の進行性の悪性疾患を広く指し、一般に血液および骨髄中での白血球およびそれらの前駆細胞の歪んだ増殖および発達により特徴付けられる。白血病は、一般に、（１）疾患の持続期間および特徴（急性または慢性）、（２）関与する細胞の種類（骨髄（骨髄性）、リンパ（リンパ行性）、または単球性、ならびに（３）血液白血性または非白血性（亜白血性）中の異常細胞数の増加または非増加に基づいて臨床的に分類される。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る例示的な白血病としては、例えば、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞性白血病、非白血性白血病（aleukemic leukemia）、白血球性白血病、好塩基球性白血病、芽細胞白血病、ウシ白血病、慢性骨髄球性白血病、皮膚白血病、胎児性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリー細胞白血病、血芽球性白血病、血球芽細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ行性白血病、リンパ球系白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞性白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーゲリ白血病、形質細胞白血病、多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、亜白血性白血病（subl

eukemic leukemia)、または未分化細胞白血病が挙げられる。

【0083】

本明細書で使用される場合、「リンパ腫」という用語は、造血組織およびリンパ系組織に影響を及ぼす癌の群を指す。これは、主にリンパ節、脾臓、胸腺、および骨髓に見られる血球であるリンパ球で発症する。2つの主要な種類のリンパ腫は、非ホジキンリンパ腫およびホジキン病である。ホジキン病は、診断された全てのリンパ腫のおよそ15%に相当する。これは、リードスタンバーク悪性Bリンパ球に関連する癌である。非ホジキンリンパ腫(NHL)は、癌が増殖する速度および関与する細胞の種類に基づいて分類され得る。NHLには、急速進行型(高悪性度)および緩徐進行型(低悪性度)のNHLがある。関与する細胞に基づいて、NHLには、B細胞およびT細胞NHLがある。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る例示的なB細胞リンパ腫としては、小リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、節外性(MALT)リンパ腫、節性(単球性B細胞)リンパ腫、脾リンパ腫、びまん性大細胞Bリンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、免疫芽球性大細胞リンパ腫、または前駆体Bリンパ芽球性リンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る例示的なT細胞リンパ腫としては、皮膚T細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、菌状息肉腫、および前駆体Tリンパ芽球性リンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

「肉腫」という用語は、一般に、胚生結合組織のような物質から構成され、一般に、線維性または均質な物質中に埋め込まれた緊密に詰め込まれた細胞から構成される腫瘍を指す。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る肉腫としては、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アベメシー肉腫、脂肪性肉腫、脂肪肉腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色肉腫、絨毛癌、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍性肉腫、子宮内膜肉腫、間質肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞性肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞免疫芽球性肉腫、リンパ腫、T細胞免疫芽球性肉腫、イエセン肉腫、カボジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉腫肉腫、傍骨性骨肉腫、網赤血球性肉腫、ラウス肉腫、漿液囊腫性肉腫、滑膜肉腫、または毛細血管拡張性肉腫が挙げられる。

【0085】

「黒色腫」という用語は、皮膚および他の臓器のメラニン細胞系から生じる腫瘍を意味すると解釈される。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る黒色腫としては、例えば、末端性黒子性黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、ハーディング・パッセー黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、結節性黒色腫、爪下黒色腫、または表在拡大型黒色腫が挙げられる。

【0086】

「癌腫」という用語は、周囲組織に浸潤し、転移を生じる傾向のある上皮細胞から構成される悪性新生物を指す。本明細書に提供される化合物または方法で治療され得る例示的な癌腫としては、例えば、甲状腺髄様癌、家族性甲状腺髄様癌、細葉細胞癌、腺房細胞癌、腺細胞癌、腺様嚢胞癌、腺腫性癌(carcinoma adenomatousum)、副腎皮質癌、肺癌、肺胞細胞癌、基底細胞癌、基底細胞癌(carcinoma basocellulare)、類基底細胞癌、基底有棘細胞癌、細気管支肺癌、細気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌(cerebriform carcinoma)、胆管細胞癌、絨毛細胞癌、コロイド状癌、コメド癌、体癌(corpus carcinoma)、篩状癌、鑑状癌、皮膚癌、円筒状癌、円筒細胞癌、腺管癌、緻密性癌(carcinoma durum)、胎児性癌、脳様癌、類表皮癌、咽頭扁桃上皮癌、外方増殖性癌、潰瘍癌、繊維状癌、ゼラチン状癌、コロイド腺癌、巨細胞癌、巨細胞性癌、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛母癌、血液様癌、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、ガラス様癌、副腎様癌、乳児性胎児性癌、上皮内癌(carcinoma in situ)、表皮内癌、上皮内癌、

Krompecher癌 (Krompecher's carcinoma)、Kulchitzky細胞癌、大細胞癌、レンズ状癌、レンズ性癌、脂肪腫性癌、リンパ上皮癌、髄様癌 (carcinoma medullare)、髄様癌 (medullary carcinoma)、黒色癌、軟性癌 (carcinoma molle)、粘液性癌、粘液分泌性癌 (carcinoma muciparum)、粘液細胞性癌、粘液性類表皮癌、粘液性癌 (carcinoma mucosum)、粘膜癌、粘液腫様癌、上咽頭癌、燕麦細胞癌、骨化性癌、骨様癌、乳頭状癌、門脈周辺癌、前浸潤癌、有棘細胞癌、糊状癌、腎臓の腎細胞癌、貯蔵細胞癌、肉腫様癌、シュナイダー癌、硬性癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、ソラノイド癌 (solanoïd carcinoma)、球状細胞癌、紡錘体細胞癌、多孔性癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、ストリング癌 (string carcinoma)、毛細血管拡張性癌、毛細血管拡張様癌、移行上皮癌、結節性癌 (carcinoma tuberosum)、結節状癌、疣状癌、および絨毛性癌が挙げられる。

#### 【0087】

本明細書で使用される場合、「転移」、「転移性」、および「転移性癌」という用語は、互換的に使用することができ、ある臓器もしくは別の隣接しない臓器または身体の一部からの、増殖性疾患または障害、例えば、癌の広がりを目指す。「転移性癌」は、「ステージⅣ癌」とも呼ばれる。

#### 【0088】

「治療すること」または「治療」という用語は、損傷、疾患、病理、または状態の治療または改善における成功の任意の兆候を指し、任意の客観的または主観的パラメータ、例えば、寛解、緩解；症状を低減すること、または患者にとって損傷、病理、もしくは状態をより許容できるものにすること；変性もしくは減退の速度を遅延させること；変性の最終点をより衰弱的でないものにすること；患者の肉体的もしくは精神的な福祉を改善することを含む。症状の治療または改善は、客観的または主観的パラメータに基づくことができ、それらは、身体検査、神経精神病学検査、および／または精神病学評価の結果を含む。「治療すること」という用語およびその活用は、損傷、病変、状態、または疾患の予防を含み得る。実施形態では、治療することは、予防することである。実施形態では、治療することは、予防することを含まない。本明細書で使用される（かつ当該技術分野で十分に理解されている）「治療すること」または「治療」は、臨床結果を含む、対象の状態における有益なまたは所望の結果を得るための任意のアプローチも広範に含む。有益なまたは所望の臨床結果としては、部分的であるか全体であるか、かつ検出可能であるか検出不可可能であるかにかかわらず、1つ以上の症状または状態の緩和または改善、疾患の程度の低減、病状の安定化（すなわち、悪化させない）、疾患の感染または拡大の予防、疾患増悪の遅延または減速、病状の改善または軽減、疾患再発の減少、および寛解が挙げられ得るが、これらに限定されない。言い換えれば、本明細書で使用される「治療」は、疾患の任意の治療、改善、または予防を含む。治療は、疾患が発症するのを防ぐか、疾患の拡散を抑制するか、疾患の症状（例えば、眼痛、光周辺で後光を見ること、目の充血、非常に高い眼圧）を軽減するか、疾患の根本原因を完全にもしくは部分的に除去するか、疾病の継続期間を短縮するか、またはこれらの組み合わせを行い得る。本明細書で使用される「治療すること」および「治療」には、予防的治療が含まれる。治療方法は、対象に、治療有効量の活性薬剤を投与することを含む。投与するステップは、単回投与からなり得るか、または一連の投与を含み得る。治療期間の長さは、状態の重症度、患者の年齢、活性薬剤の濃度、治療に使用される組成物の活性、またはそれらの組み合わせ等の様々な要因に依存する。治療または予防のために使用される薬剤の有効投薬量が特定の治療または予防計画の間に増加または減少し得ることも理解されよう。投薬量の変更は、当該技術分野で知られている標準的な診断アッセイによってもたらされ得るか、それによって明らかにされ得る。場合によっては、長期投与が必要とされ得る。例えば、組成物は、患者を治療するのに十分な量でおよび持続時間、対象に投与される。実施形態では、治療することまたは治療は、予防的治療ではない。

10

20

30

40

50



## 【0089】

「予防する」という用語は、患者における病徴の発生の減少を指す。上述のように、予防は、治療なしで発症する可能性が高いであろうものよりも少ない症状が観察されるように、完全（検出可能な症状なし）または部分的であり得る。

## 【0090】

「患者」または「それを必要とする対象」は、本明細書に提供されるような薬学的組成物の投与によって治療することができる疾患または状態に罹患しているかまたは罹患しやすい生物を指す。非限定的な例には、ヒト、他の哺乳動物、ウシ、ラット、マウス、イヌ、サル、ヤギ、ヒツジ、ウシ、シカ、および他の非哺乳動物が含まれる。いくつかの実施形態では、患者は、ヒトである。

## 【0091】

「有効量」とは、化合物なしと比較して、化合物が規定の目的を達成する（例えば、それが投与される対象の効果を達成するか、疾患を治療するか、酵素活性を減少させるか、酵素活性を増加させるか、シグナル伝達経路を減少させるか、または疾患もしくは状態の1つ以上の症状を軽減する）のに十分な量である。「有効量」の一例は、疾患の症状または症状の治療、予防、または軽減に寄与するのに十分な量であり、「治療有効量」とも称され得る。症状（複数可）の「軽減」（およびこの語句の文法的等価物）は、症状（複数可）の重症度もしくは頻度の低下、または症状（複数可）の排除を意味する。薬物の「予防有効量」とは、対象に投与されると、意図された予防効果をもたらすであろう薬物の量、例えば、損傷、疾患、病変、もしくは状態の発症（もしくは再発）を予防もしくは遅延するか、または損傷、疾患、病変、もしくは状態、またはそれらの症状の発症（もしくは再発）の可能性を低減させる薬物の量である。完全な予防効果は、必ずしも1回用量の投与によって生じるとは限らず、一連の用量の投与後にのみ生じ得る。したがって、予防有効量は、1回以上の投与で投与され得る。本明細書で使用される「活性を減少させる量」とは、アンタゴニストなしと比較して酵素の活性を減少させるのに必要なアンタゴニストの量を指す。本明細書で使用される「機能を破壊させる量」とは、アンタゴニストなしと比較して酵素またはタンパク質の機能を破壊させるのに必要なアンタゴニストの量を指す。正確な量は、治療の目的に依存し、既知の技法を使用して当業者によって解明可能であろう（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992)、Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999)、Pickar, Dosage Calculations (1999)、およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkinsを参照のこと）。

## 【0092】

本明細書に記載の任意の化合物については、治療有効量は、最初に細胞培養アッセイから決定され得る。標的濃度は、本明細書に記載の方法または当該技術分野で既知の方法を使用して測定される、本明細書に記載の方法を達成することが可能である活性化化合物（複数可）の濃度であろう。当該技術分野で周知であるように、ヒトでの使用の治療有効量は、動物モデルからも決定され得る。例えば、ヒトに対する用量は、動物において有効であることが見出されている濃度を達成するように製剤化され得る。ヒトにおける投薬量は、上記のように、化合物の有効性を監視し、投薬量を上方または下方調整することによって調整され得る。上記の方法および他の方法に基づいてヒトにおける最大有効性を達成するように用量を調整することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

## 【0093】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、上記のように、障害を改善するのに十分な治療薬の量を指す。例えば、所与のパラメータについて、治療有効量は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、または少なくとも100%の増加または減少を示すであろう。治療有効性は、

10

20

30

40

50

「倍」増加または減少としても表され得る。例えば、治療有効量は、対照よりも少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、またはそれ以上効果的であり得る。

【0094】

投与量は、患者の必要条件および使用される化合物に応じて異なり得る。本開示との関連で、患者に投与される用量は、有益な治療応答を患者に経時的にもたらすのに十分であるべきである。用量のサイズは、任意の有害な副作用の存在、性質、および程度によっても決定されるであろう。特定の状況に対する適切な投薬量の決定は、当業者の能力の範囲内である。一般に、治療は、化合物の最適な用量未満のより少ない投薬量で開始される。その後、投薬量は、環境下で最適な効果に達するまでわずかな増分だけ増加する。投薬量および間隔は、治療される特定の臨床的適応に有効な投与された化合物のレベルを提供するように個別に調整され得る。これにより、個体の病状の重症度にふさわしい治療レジメンが提供されるであろう。

10

【0095】

本明細書で使用される場合、「投与すること」という用語は、対象への、経口投与、坐薬としての投与、局所接触、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内、もしくは皮下投与、または徐放デバイス、例えば、小型浸透圧ポンプの移植を意味する。投与は、非経口および経粘膜（例えば、口腔、舌下、口蓋、歯肉、経鼻、膣内、直腸内、または経皮）を含む、任意の経路による。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内投与が含まれる。他の送達様式としては、リボソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチ等の使用が挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、投与は、列挙された活性薬剤以外のいかなる活性薬剤の投与も含まない。

20

【0096】

「同時投与」とは、本明細書に記載の組成物が、1つ以上のさらなる治療剤の投与と同時に、その直前に、またはその直後に投与されることを意味する。本明細書で提供される化合物は、単独で投与され得るか、または患者に同時投与され得る。同時投与は、個別にまたは組み合わせて（1つより多くの化合物）化合物の同時投与または順次投与を含むよう意図されている。したがって、調製物は、所望の場合、（例えば、代謝分解を減少させるために）他の活性物質と組み合わせられる場合もある。本開示の組成物は、局所経路によって経皮送達され得るか、またはアプリケータスティック、溶液、懸濁液、乳剤、ゲル、クリーム、軟膏、ペースト、ゼリー、塗料、粉末、およびエアロゾルとして製剤化され得る。

30

【0097】

本明細書で使用される「細胞」は、そのゲノムDNAを保存または複製するのに十分な代謝または他の機能を果たす細胞を指す。細胞は、例えば、無傷の膜の存在、特定の染料による染色、子孫を産生する能力、または配偶子の場合、第2の配偶子と組み合わせて、生存能力のある子孫を生み出す能力を含む、当該技術分野で周知の方法によって特定され得る。「幹細胞」は、有糸分裂細胞の分裂による自己複製の能力と、組織または器官に分化する可能性とを特徴とする細胞である。哺乳動物幹細胞の中で、胚性幹細胞（ES細胞）と体性幹細胞（例えば、HSC）とは区別され得る。胚性幹細胞は胚盤胞に存在し、胚組織を生じさせるが、体性幹細胞は組織の再生および修復を目的として成体組織に存在する。

40

【0098】

「対照」または「対照実験」は、その平易な通常の意味に従って使用され、実験の対象、試薬、または変数を省略する以外は、並行実験などの場合、実験の対象または試薬が処理される実験を指す。場合によっては、対照は、実験的効果を評価する際の比較の基準として使用される。いくつかの実施形態では、対照は、本明細書（実施形態および実施例を含む）に記載の化合物の不在下でのタンパク質の活性の測定値である。

【0099】

「抗癌剤（Anti-cancer agent）」および「抗癌剤（antican

50

cer agent)」は、それらの平易な通常の意味に従って使用され、抗新生物特性または細胞の成長もしくは増殖を阻害する能力を有する組成物、化合物、薬物、アンタゴニスト、阻害剤、調節因子、ペプチド、タンパク質、核酸または分子を指す。いくつかの実施形態では、抗癌剤は、化学療法薬である。いくつかの実施形態では、抗癌剤は、癌を治療する方法に有用な本明細書で特定される薬剤である。いくつかの実施形態では、抗癌剤は、癌を治療するためにFDAまたは米国以外の国の同様の規制機関によって承認された薬剤である。抗癌剤の例としては、抗アンドロゲン（例えば、カソデックス、フルタミド、MDV3100、またはARN-509）、MEK（例えば、MEK1、MEK2、またはMEK1およびMEK2）阻害剤（例えば、XL518、CI-1040、PD035901、セルメチニブ／AZD6244、GSK1120212／トラメチニブ、GDC-0973、ARRY-162、ARRY-300、AZD8330、PD0325901、U0126、PD98059、TAK-733、PD318088、AS703026、BAY869766）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イフォスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン、チオテパ、ニトロソウレア、窒素マスタード（例えば、メクロロエタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メイファラン）、エチレンイミンおよびメチルメラミン（例えば、ヘキサメチルメラミン、チオテパ）、アルキルスルホネート（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムシテン、セムスチン、ストレプトゾシン）、トリアゼン（デカルバジン）、抗代謝物（例えば、5-アザチオプリン、ロイコボリン、カペシタビン、フルダラビン、ゲムシタビン、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、葉酸類似体（例えば、メトトレキサート）、ピリミジン類似体（例えば、フルオロウラシル、フロキソウリジン、シタラビン）、プリン類似体（例えば、メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンなど）、植物アルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、ポドフィロトキシン、パクリタキセル、ドセタキセルなど）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド（VP16）、リン酸エトポシド、テニポシドなど）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシンなど）、白金系化合物（例えば、シスプラチン、オキサロプラチン、カルボプラチン）、アントラセンジオン（例えば、ミトキサントロン）、置換尿素（例えば、ヒドロキシ尿素）、メチルヒドラジン誘導体（例えば、プロカルバジン）、副腎皮質抑制剤（例えば、ミトタン、アミノグルテチミド）、エピポドフィロトキシン（例えば、エトポシド）、抗生物質（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン）、酵素（例えば、L-アスパラギナーゼ）、マイトジェン活性化プロテインキナーゼシグナル伝達阻害剤（例えば、U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY43-9006、ウォルトマンニン、またはLY294002）、mTOR阻害剤、抗体（例えば、リツキサン）、5-アザ-2'-デオキシシチジン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、エトポシド、ゲムシタビン、イマチニブ（Gleevec、RTM.）、ゲルダナマイシン、17-N-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン（17-AAG）、ボルテゾミブ、トラスツズマブ、アナストロゾール；血管新生阻害剤；抗アンドロゲン、抗エストロゲン；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アポトーシス遺伝子調節因子；アポトーシス調節因子；アルギニンデアミナーゼ；BCR／ABLアンタゴニスト；ベータラクタム誘導体；bFGF阻害剤；ビカルタミド；カンプトテシン誘導体；カゼインキナーゼ阻害剤（ICOS）；クロミフェン類似体；シタラビンダクリキシマブ；デキサメタゾン；エストロゲンアゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトポシドホスフェート；エキセメスタン；ファドロゾール；フィナステリド；フルダラビン；フルオロダウノルニシン塩酸塩；ガドリニウムテクサフィリン；硝酸ガリウム；ゼラチナーゼ阻害剤；ゲムシタビン；グルタチオン阻害剤；ヘプスルファム；免疫刺激剤ペプチド（immunostimulant peptide）；インスリン様成長因子1受容体阻害剤；インター

10

20

30

40

50

フェロンアゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；レトロゾール；白血病阻害因子；白血球アルファインターフェロン；ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン；リユープロレリン；マトリライシン阻害剤；マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤；MIF阻害剤；ミフェプリストン；ミスマッチ二本鎖RNA；モノクローナル抗体；マイコバクテリア細胞壁抽出物；一酸化窒素調節因子；オキサリプラチン；パノミフェン；ペントロゾール；ホスファターゼ阻害剤；プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤；白金錯体；白金化合物；プレドニゾン；プロテアソーム阻害剤；タンパク質Aベースの免疫調節因子；プロテインキナーゼC阻害剤；タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤；rasファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；ras阻害剤；ras-GAP阻害剤；リボザイム；シグナル伝達阻害剤；シグナル伝達調節因子；一本鎖抗原結合タンパク質；幹細胞阻害剤；幹細胞分裂阻害剤；ストロメリシン阻害剤；合成グリコサミノグリカン；タモキシフェンメチオダイド；テロメラゼ阻害剤；甲状腺刺激ホルモン；翻訳阻害剤；チロシンキナーゼ阻害剤；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；ステロイド（例えば、デキサメタゾン）、フィナステリド、アロマターゼ阻害剤、ゴセレリンまたはロイプロリドなどのゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（GnRH）、アドレノコルチコステロイド（例えば、プレドニゾン）、プロゲステン（例えば、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート、酢酸メゲストロール、酢酸メドロキシプロゲステロン）、エストロゲン（例えば、ジェスリルスチルベストロール、エチニルエストラジオール）、抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）、アンドロゲン（例えば、プロピオン酸テストステロン、フルオキシメステロン）、抗アンドロゲン（例えば、フルタミド）、免疫刺激剤（例えば、バチルスカルメットゲリン（BCG）、レバミソール、インターロイキン-2、アルファインターフェロンなど）、モノクローナル抗体（例えば、抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR、および抗VEGFモノクローナル抗体）、免疫毒素（例えば、抗CD33モノクローナル抗体-カリケアマイシンコンジュゲート、抗CD22モノクローナル抗体-シュードモナスエキソトキシンコンジュゲートなど）、放射線免疫療法（例えば、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、または $^{131}\text{I}$ にコンジュゲートした抗CD20モノクローナル抗体など）、トリプトリド、ホモハリントンニン、ダクチノマイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、トポテカン、イトラコナゾール、ビンデシン、セリバスタチン、ピンクリスチン、デオキシアデノシン、セルトラリン、ピタバスタチン、イリノテカン、クロファジミン、5-ノニルオキシトリプタミン、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、EGFR阻害剤、表皮成長因子受容体（EGFR）を標的とした治療または治療（例えば、Iressa（商標）、エルロチニブ（Tarceva（商標））、セツキシマブ（Erbix（商標））、ラパチニブ（Tykerb（商標））、パニツムマブ（Vectibix（商標））、バンデタニブ（Caprelsa（商標））、アフアチニブ/BIBW2992、CI-1033/カネルチニブ、ネラチニブ/HKI-272、CP-724714、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、ARRY-380、AG-1478、ダコミチニブ/PF299804、OSI-420/デスメチルエルロチニブ、AZD8931、AEE788、ペリチニブ/EKB-569、CUDC-101、WZ8040、WZ4002、WZ3146、AG-490、XL647、PD153035、BMS-599626）、ソラフェニブ、イマチニブ、スニチニブ、ダサチニブ、ピロロベンゾジアゼピン（例えば、トマイマイシン）、カルボプラチン、CC-1065およびCC-1065類似体（アミノ-CBIを含む）、窒素マスタード（クロラムブシルおよびメルファランなど）、ドラスタチンおよびドラスタチン類似体（オーリスタチンを含む：例えば、モノメチルオーリスタチンE）、アントラサイクリン系抗生物質（ドキシソルピシン、ダウノルビシンなど）、デュオカルマイシンおよびデュオカルマイシン類似体、エンジン（ネオカルジノスタチンおよびカリケアマイシンなど）、レプトマイシン誘導体、メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体（例えば、メルタンシン）、メトトレキサート、マイトマイシンC、タキソイド、ピンカアルカロイド（ピンブラスチンおよびピンクリスチンなど）、エポチロン（例えば、エポチロンB）、カンプトデシンならび

10

20

30

40

50

にその臨床類似体であるトポテカンおよびイリノテカンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

化合物の「特異的」、「特異的に」、「特異性」などは、細胞内の他のタンパク質に対する作用が最小限であるか全くない状態で、特定の分子標的に対して阻害などの特定の作用を引き起こす化合物の能力を指す。

【0101】

「求電子化学部分」または「求電子部分」という用語は、その平易な通常の化学的意味に従って使用され、求電子性である化学基（例えば、一価の化学基）を指す。

【0102】

「不可逆的共有結合」という用語は、当該技術分野におけるその平易な通常の意味に従って使用され、解離の可能性が低い（例えば求電子性化学部分および求核性部分）の原子または分子の間で得られた会合を指す。実施形態では、不可逆的共有結合は、通常の生物学的条件下では容易に解離しない。実施形態では、不可逆的共有結合は、2つの種（例えば、求電子性化学部分および求核性部分）の間の化学反応を通して形成される。

【0103】

本明細書で使用される場合、「結合することができる」という用語は、標的に測定可能に結合することができる部分（例えば、本明細書に記載の化合物）を指す（例えば、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼのシステインと共有結合を形成することができる）。ある部分が標的に結合することができる実施形態では、当該部分は、約10  $\mu$ M、5  $\mu$ M、1  $\mu$ M、500 nM、250 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、15 nM、10 nM、5 nM、1 nM、または約0.1 nM未満のK<sub>d</sub>と結合することができる。

【0104】

本明細書で使用される場合、「標的タンパク質分解剤」という用語は、標的タンパク質（例えば、目的のタンパク質）上でタンパク質分解を誘導することができる薬剤（例えば、化合物または組成物）を指す。通常、標的タンパク質分解剤は、E3 リガーゼを特定のタンパク質標的に動員して、プロテアソーム依存的に標的をユビキチン化させ、分解することができる。標的の機能的阻害は分解剤の効力にとって必要ではないので、この戦略は、リガンドが存在するプロテオーム中の任意のタンパク質を標的にして分解する可能性がある（例えば、標的タンパク質結合剤または標的タンパク質分解剤）。

【0105】

「標的タンパク質結合剤」という用語は、タンパク質（例えば、標的タンパク質）に結合することができる部分を指す。実施形態では、標的タンパク質結合剤は、タンパク質（例えば、標的タンパク質）と複合体を形成する分子または物質である。実施形態では、標的タンパク質結合剤は、タンパク質（例えば、標的タンパク質）と複合体を形成する分子または物質の一価形態である。

【0106】

「結合剤リンカー」という用語は、標的タンパク質結合剤およびE3 ユビキチンリガーゼ結合剤に結合する共有結合リンカーを指す。

【0107】

本明細書で使用される場合、「E3 ユビキチンリガーゼ結合剤」という用語は、E3 ユビキチンリガーゼ（E3 リガーゼ）（例えば、RNF4またはRNF114）に測定可能に結合することができる一価の薬剤（例えば、本明細書に記載の一価の化合物）を指す。例えば、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、以下の式を有する化合物の部分または一価形態である：

10

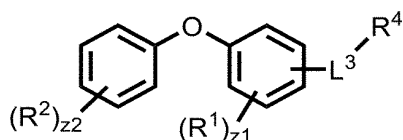
20

30

40

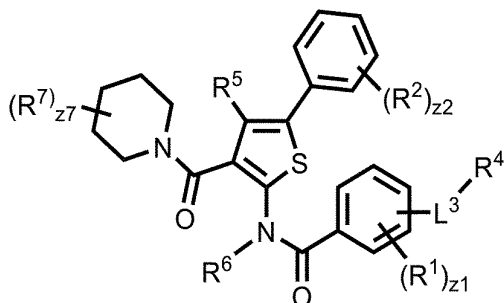
50

## 【化 3】



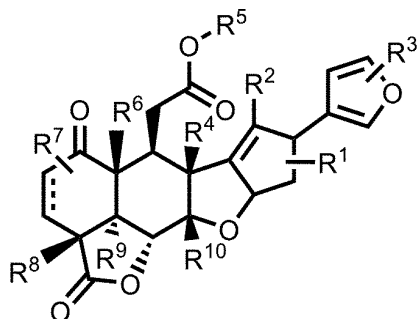
(I) 式中、 $R^2$ 、 $z_2$ 、 $R^1$ 、 $z_1$ 、 $L^3$ 、および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである、

## 【化 4】



(II) 式中、 $R^7$ 、 $z_7$ 、 $R^5$ 、 $R^2$ 、 $z_2$ 、 $L^3$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^1$ 、および  $z_1$  は、本明細書に記載されている通りである、または

## 【化 5】



(III) 式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、および  $R^{10}$  は、本明細書に記載されている。

## 【0108】

本明細書で使用される「共有結合システイン修飾因子部分」という用語は、システインアミノ酸に測定可能に結合することができる一価の求電子性部分を指す。実施形態では、共有結合システイン修飾因子部分は、不可逆的な共有結合を介して結合する。実施形態では、共有結合システイン修飾因子部分は、約 10  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、500 nM、250 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、15 nM、10 nM、5 nM、1 nM、または約 0.1 nM 未満の  $K_d$  と結合することができる。

## 【0109】

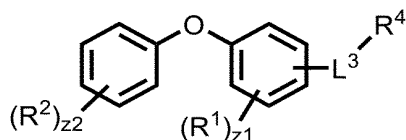
## II. 化合物

一態様では、1) 標的タンパク質結合剤および 2) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤を含む標的タンパク質分解剤であって、E3 ユビキチンリガーゼが、ヒト RNF4 またはヒト RNF114 である、標的タンパク質分解剤が提供される。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼはヒト RNF4 である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼは、ヒト RNF114 である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼのシステインと共有結合を形成することができる。実施形態では、標的タンパク質結合剤および E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、結合剤リンカーによって共有結合している。

## 【0110】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 6】

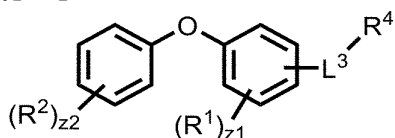


(I) を有する化合物の部分である。

## 【0111】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 7】

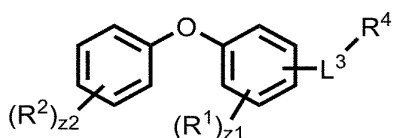


(I) を有する一価の化合物である。

## 【0112】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 8】



(I) の一価形態である。

## 【0113】

$R^1$  は独立して、ハロゲン、 $-CX^1_3$ 、 $-CHX^1_2$ 、 $-CH_2X^1$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{1D}$ 、 $-C(O)R^{1C}$ 、 $-C(O)-OR^{1C}$ 、 $-C(O)NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-N(O)_m$ 、 $-SO_{n1}R^{1D}$ 、 $-SO_{v1}NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-NHC(O)NR^{1A}R^{1B}$ 、 $-NR^{1A}SO_2R^{1D}$ 、 $-NR^{1A}C(O)R^{1C}$ 、 $-NR^{1A}C(O)OR^{1C}$ 、 $-NR^{1A}OR^{1C}$ 、 $-OCX^1_3$ 、 $-OCH_2X^1$ 、 $-OCHX^1_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。 $R^2$  は独立して、ハロゲン、 $-CX^2_3$ 、 $-CHX^2_2$ 、 $-CH_2X^2$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{2D}$ 、 $-C(O)R^{2C}$ 、 $-C(O)-OR^{2C}$ 、 $-C(O)NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-N(O)_m$ 、 $-SO_{n2}R^{2D}$ 、 $-SO_{v2}NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-NHC(O)NR^{2A}R^{2B}$ 、 $-NR^{2A}SO_2R^{2D}$ 、 $-NR^{2A}C(O)R^{2C}$ 、 $-NR^{2A}C(O)OR^{2C}$ 、 $-NR^{2A}OR^{2C}$ 、 $-OCX^2_3$ 、 $-OCH_2X^2$ 、 $-OCHX^2_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。 $L^3$  は、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは

10

20

30

40

50

非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。 $R^3$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CX^3_3$ 、 $-CHX^3_2$ 、 $-CH_2X^3$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{3D}$ 、 $-C(O)R^{3C}$ 、 $-C(O)-OR^{3C}$ 、 $-C(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-N(O)_m3$ 、 $-SON_3R^{3D}$ 、 $-SO_{v3}NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NHC(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}SO_2R^{3D}$ 、 $-NR^{3A}C(O)R^{3C}$ 、 $-NR^{3A}C(O)OR^{3C}$ 、 $-NR^{3A}OR^{3C}$ 、 $-OCX^3_3$ 、 $-OCH_2X^3$ 、 $-OCHX^3_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。 $R^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CX^4_3$ 、 $-CHX^4_2$ 、 $-CH_2X^4$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{4D}$ 、 $-C(O)R^{4C}$ 、 $-C(O)-OR^{4C}$ 、 $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-N(O)_m4$ 、 $-SON_4R^{4D}$ 、 $-SO_{v4}NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NHC(O)NR^{4A}R^{4B}$ 、 $-NR^{4A}SO_2R^{4D}$ 、 $-NR^{4A}C(O)R^{4C}$ 、 $-NR^{4A}C(O)OR^{4C}$ 、 $-NR^{4A}OR^{4C}$ 、 $-OCX^4_3$ 、 $-OCH_2X^4$ 、 $-OCHX^4_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEである。Eは求電子性部分である。 $z1$ は、0～4の整数である。 $z2$ は、0～5の整数である。 $R^{1A}$ 、 $R^{1B}$ 、 $R^{1C}$ 、 $R^{1D}$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{2B}$ 、 $R^{2C}$ 、 $R^{2D}$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{3B}$ 、 $R^{3C}$ 、 $R^{3D}$ 、 $R^{4A}$ 、 $R^{4B}$ 、 $R^{4C}$ 、および $R^{4D}$ は各々独立して、水素、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CHX_2$ 、 $-CH_2X$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、同じ窒素原子に結合している $R^{1A}$ 置換基と $R^{1B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、同じ窒素原子に結合している $R^{2A}$ 置換基と $R^{2B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、同じ窒素原子に結合している $R^{3A}$ 置換基と $R^{3B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、同じ窒素原子に結合している $R^{4A}$ 置換基と $R^{4B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。各 $X$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、および $X^4$ は独立して、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ である。 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、および $n4$ は独立して、0～4の整数である。 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $v1$ 、 $v2$ 、 $v3$ 、および $v4$ は独立して、1または2である。唯1つの $R^1$ 、または1つの $R^2$ 、または1つの $R^3$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^1$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^2$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^3$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、1つの $R^1$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、1つの $R^2$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、1つの $R^3$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。1つの $R^1$ 、または1つの $R^2$ 、または1つの $R^3$ は、結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0114】

実施形態において、 $R^3$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CX^3_3$ 、 $-CHX^3_2$ 、 $-CH_2X^3$ 、 $-CN$ 、 $-OR^{3D}$ 、 $-C(O)R^{3C}$ 、 $-C(O)-OR^{3C}$ 、 $-C(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-N(O)_m3$ 、 $-SON_3R^{3D}$ 、 $-SO_{v3}NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NHC(O)NR^{3A}R^{3B}$ 、 $-NR^{3A}SO_2R^{3D}$ 、 $-NR^{3A}C(O)R^{3C}$ 、 $-NR^{3A}C(O)OR^{3C}$ 、 $-NR^{3A}OR^{3C}$ 、 $-OCX^3_3$ 、 $-OCH_2X^3$ 、 $-OCHX^3_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEである。Eは求電子性部分である。 $z1$ は、0～4の整数である。 $z2$ は、0～5の整数である。 $R^{1A}$ 、 $R^{1B}$ 、 $R^{1C}$ 、 $R^{1D}$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{2B}$ 、 $R^{2C}$ 、 $R^{2D}$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{3B}$ 、 $R^{3C}$ 、 $R^{3D}$ 、 $R^{4A}$ 、 $R^{4B}$ 、 $R^{4C}$ 、および $R^{4D}$ は各々独立して、水素、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CHX_2$ 、 $-CH_2X$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、同じ窒素原子に結合している $R^{1A}$ 置換基と $R^{1B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、同じ窒素原子に結合している $R^{2A}$ 置換基と $R^{2B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、同じ窒素原子に結合している $R^{3A}$ 置換基と $R^{3B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、同じ窒素原子に結合している $R^{4A}$ 置換基と $R^{4B}$ 置換基は任意に結合して、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。各 $X$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、および $X^4$ は独立して、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ である。 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、および $n4$ は独立して、0～4の整数である。 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $v1$ 、 $v2$ 、 $v3$ 、および $v4$ は独立して、1または2である。唯1つの $R^1$ 、または1つの $R^2$ 、または1つの $R^3$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^1$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^2$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^3$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、1つの $R^1$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、1つの $R^2$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、1つの $R^3$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。1つの $R^1$ 、または1つの $R^2$ 、または1つの $R^3$ は、結合剤リンカーへの結合である。



ル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。 $R^3A$ 、 $R^3B$ 、 $R^3C$ 、 $R^3D$ 、 $X^3$ 、 $n3$ 、 $m3$ 、および $v3$ は、実施形態を含む本明細書に記載されている通りである。

#### 【0115】

実施形態において、 $R^4$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CX^4_3$ 、 $-CHX^4_2$ 、 $-CH_2X^4$ 、 $-CN$ 、 $-OR^4D$ 、 $-C(O)R^4C$ 、 $-C(O)-OR^4C$ 、 $-C(O)NR^4AR^4B$ 、 $-N(O)m4$ 、 $-SON_4R^4D$ 、 $-SO_{v4}NR^4AR^4B$ 、 $-NR^4AR^4B$ 、 $-NHC(O)NR^4AR^4B$ 、 $-NR^4ASO_2R^4D$ 、 $-NR^4AC(O)R^4C$ 、 $-NR^4AC(O)OR^4C$ 、 $-NR^4AOR^4C$ 、 $-OCX^4_3$ 、 $-OCH_2X^4$ 、 $-OCHX^4_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEである。Eは、求電子性部分である。 $R^4A$ 、 $R^4B$ 、 $R^4C$ 、 $R^4D$ 、 $X^4$ 、 $n4$ 、 $m4$ 、および $v4$ は、実施形態を含む本明細書に記載されている通りである。

#### 【0116】

実施形態では、 $R^1$ は独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。実施形態では、 $R^2$ は独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。実施形態では、 $L^3$ は、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2N$

10

20

30

40

50

$H_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEである。Eは求電子性部分である。 $z_1$ は、0～4の整数である。 $z_2$ は、0～5の整数である。唯一つの $R^1$ または1つの $R^2$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^1$ は、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^2$

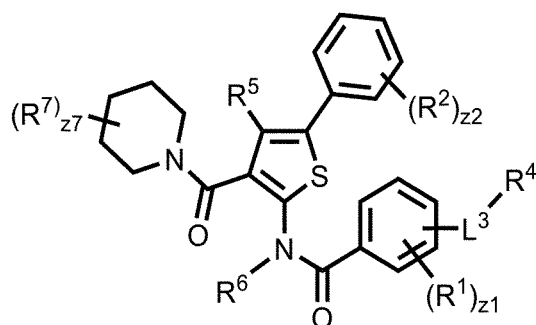
10

20

【0117】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化9】



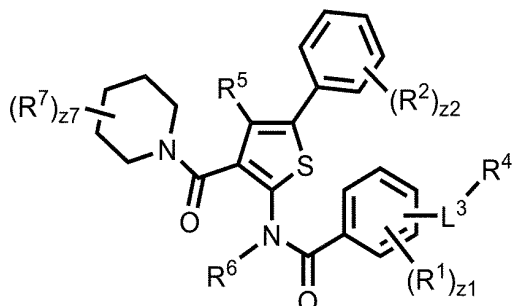
30

(II)を有する化合物の部分である。

【0118】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化10】



40

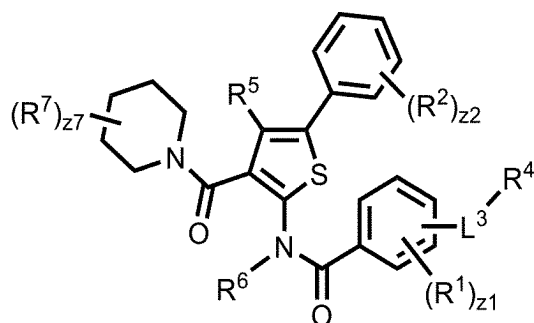
(II)を有する一価の化合物である。

【0119】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

## 【化 11】



10

(II) の一価形態である。

## 【0120】

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $L^3$ 、 $z1$ 、 $z2$  および  $R^4$  は、本明細書に記載の通りである。

## 【0121】

$R^5$  および  $R^6$  は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。 $R^7$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの  $R^7$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。記号  $z7$  は、0～10の整数である。実施形態では、唯一つの  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  または  $R^7$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^1$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^3$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^5$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^6$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^7$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。

20

30

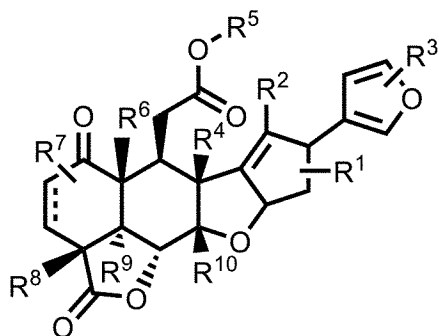
40

## 【0122】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

## 【化 1 2】



10

(III) を有する化合物の部分である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、本明細書に記載の通りである。R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は独立して、水素、ハロゲン、  
 -CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>  
 、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、  
 -NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-S  
 O<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH  
 2、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>  
 、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI  
 2、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N  
 3、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換  
 もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしく  
 は非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカー  
 への結合である。唯一つのR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>またはR<sup>10</sup>は、結合剤リンカーへの結合であり、

20

## 【化 1 3】



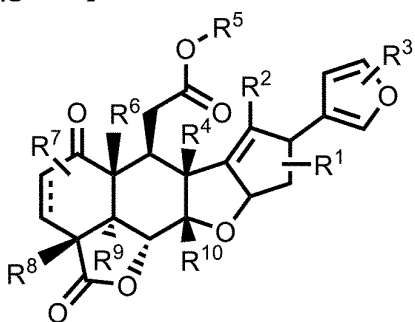
30

は、単結合または二重結合である。

## 【0 1 2 3】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 1 4】



40

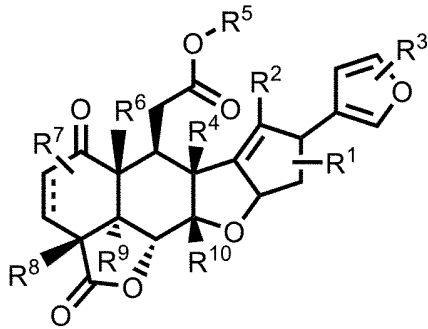
(III) を有する一価の化合物である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載の通りである。

## 【0 1 2 4】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

## 【化 15】



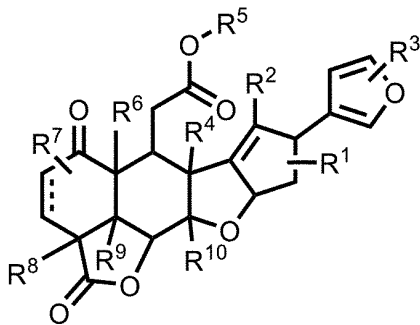
10

(I II) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載の通りである。

## 【0125】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 16】



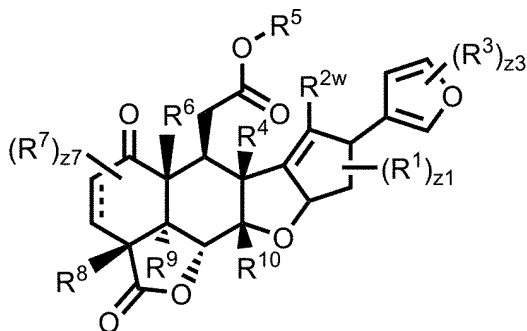
20

(I III a) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載の通りである。

## 【0126】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 17】



40

(I III-1) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、z<sub>1</sub>およびz<sub>7</sub>は、本明細書に記載の通りである。R<sup>2w</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F

50

、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。記号 $z_3$ は、0～3の整数である。唯一つの $R^1$ 、 $R^{2w}$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ または $R^{10}$ は、結合剤リンカーへの結合であり、

【化18】

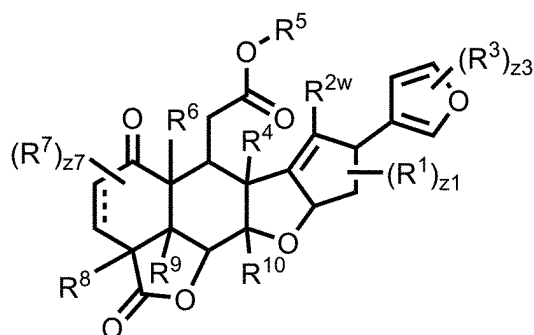


は、単結合または二重結合である。

【0127】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化19】



(IIIa-1)の一価形態である。 $R^1$ 、 $R^{2w}$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $z_1$ 、 $z_3$ および $z_7$ は、本明細書に記載の通りである。

【0128】

実施形態では、 $R^3$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^8$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^9$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、 $R^{10}$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。

【0129】

実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員

)、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル)、または $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール(例えば、5~10員、5~9員、もしくは5~6員)、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0130】

実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換シクロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アリール、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0131】

実施形態では、置換 $R^{2w}$ (例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および/または置換ヘテロアリール)は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換され、置換 $R^{2w}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および/または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{2w}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{2w}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{2w}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0132】

実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、水素、または置換もしくは非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、水素である。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換 $n$ -プロピルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換 $n$ -ブチルである。実施形態では、 $R^{2w}$ は独立して、非置換tert-ブチルである。

#### 【0133】

実施形態では、 $R^3$ は独立して、置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換 $n$ -プロピルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換 $n$ -ブチルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、非置換tert-ブチルである。

#### 【0134】

実施形態では、 $z_3$ は、0である。実施形態では、 $z_3$ は、1である。実施形態では、 $z_3$ は、2である。実施形態では、 $z_3$ は、3である。

## 【0135】

実施形態では、 $R^7$ は独立して、置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換 $n$ -プロピルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換 $n$ -ブチルである。実施形態では、 $R^7$ は独立して、非置換tert-ブチルである。

## 【0136】

実施形態では、 $R^8$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

## 【0137】

実施形態では、 $R^8$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

## 【0138】

実施形態では、置換 $R^8$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^8$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $R^8$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^8$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイ



ズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^8$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

【0139】

実施形態では、 $R^8$ は独立して、水素、または置換もしくは非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、水素である。実施形態では、 $R^8$ は独立して、置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換 $n$ -プロピルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換 $n$ -ブチルである。実施形態では、 $R^8$ は独立して、非置換tert-ブチルである。

10

【0140】

実施形態では、 $R^9$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

20

【0141】

実施形態では、 $R^9$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

30

40

【0142】

実施形態では、置換 $R^9$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換

50

R<sup>9</sup>が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっているいてもよい。実施形態では、R<sup>9</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、R<sup>9</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、R<sup>9</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0143】

実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、水素、または置換もしくは非置換C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルキルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、水素である。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、置換または非置換C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルキルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルキルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換メチルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換エチルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換n－プロピルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換n－ブチルである。実施形態では、R<sup>9</sup>は独立して、非置換tert－ブチルである。

#### 【0144】

実施形態では、R<sup>10</sup>は独立して、水素、ハロゲン、－CCl<sub>3</sub>、－CBr<sub>3</sub>、－CF<sub>3</sub>、－CI<sub>3</sub>、－CHCl<sub>2</sub>、－CHBr<sub>2</sub>、－CHF<sub>2</sub>、－CHI<sub>2</sub>、－CH<sub>2</sub>Cl、－CH<sub>2</sub>Br、－CH<sub>2</sub>F、－CH<sub>2</sub>I、－CN、－OH、－NH<sub>2</sub>、－COOH、－CONH<sub>2</sub>、－NO<sub>2</sub>、－SH、－SO<sub>3</sub>H、－SO<sub>4</sub>H、－SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、－NHNH<sub>2</sub>、－ONH<sub>2</sub>、－NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、－NHC(O)NH<sub>2</sub>、－NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、－NHC(O)H、－NHC(O)OH、－NHOH、－OCCl<sub>3</sub>、－OCF<sub>3</sub>、－OCBr<sub>3</sub>、－OCI<sub>3</sub>、－OCHCl<sub>2</sub>、－OCHBr<sub>2</sub>、－OCHI<sub>2</sub>、－OCHF<sub>2</sub>、－OCH<sub>2</sub>Cl、－OCH<sub>2</sub>Br、－OCH<sub>2</sub>I、－OCH<sub>2</sub>F、－N<sub>3</sub>、－SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>－C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>－C<sub>2</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>－C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>－C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>－C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>－C<sub>6</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>－C<sub>10</sub>、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0145】

実施形態では、R<sup>10</sup>は独立して、水素、ハロゲン、－CCl<sub>3</sub>、－CBr<sub>3</sub>、－CF<sub>3</sub>、－CI<sub>3</sub>、－CHCl<sub>2</sub>、－CHBr<sub>2</sub>、－CHF<sub>2</sub>、－CHI<sub>2</sub>、－CH<sub>2</sub>Cl、－CH<sub>2</sub>Br、－CH<sub>2</sub>F、－CH<sub>2</sub>I、－CN、－OH、－NH<sub>2</sub>、－COOH、－CONH<sub>2</sub>、－NO<sub>2</sub>、－SH、－SO<sub>3</sub>H、－SO<sub>4</sub>H、－SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、－NHNH<sub>2</sub>、－ONH<sub>2</sub>、－NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、－NHC(O)NH<sub>2</sub>、－NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、－NHC(O)H、－NHC(O)OH、－NHOH、－OCCl<sub>3</sub>、－OCF<sub>3</sub>、－OCBr<sub>3</sub>、－OCI<sub>3</sub>、－OCHCl<sub>2</sub>、－OCHBr<sub>2</sub>、－OCHI<sub>2</sub>、－OCHF<sub>2</sub>、－OCH<sub>2</sub>Cl、－OCH<sub>2</sub>Br、－OCH<sub>2</sub>I、－OCH<sub>2</sub>F、－N<sub>3</sub>、－SF<sub>5</sub>、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

## 【0146】

実施形態では、置換  $R^{10}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換  $R^{10}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $R^{10}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{10}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{10}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

10

## 【0147】

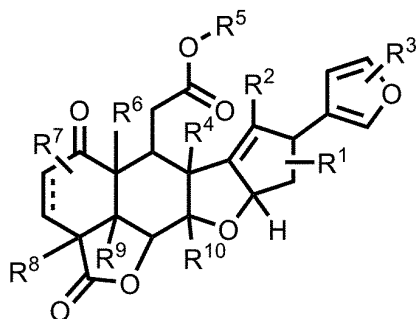
実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、水素、または置換もしくは非置換  $C_1 - C_4$  アルキルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、水素である。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、置換または非置換  $C_1 - C_4$  アルキルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換  $C_1 - C_4$  アルキルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換  $n$ -プロピルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換  $n$ -ブチルである。実施形態では、 $R^{10}$  は独立して、非置換  $tert$ -ブチルである。

20

## 【0148】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

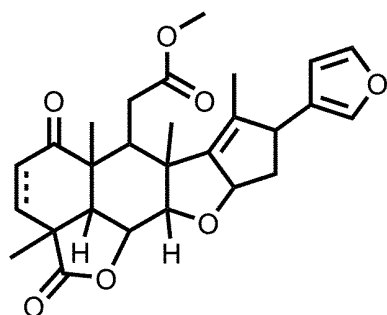
## 【化20】



30

の一価形態であり、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  および  $R^{10}$  は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化21】

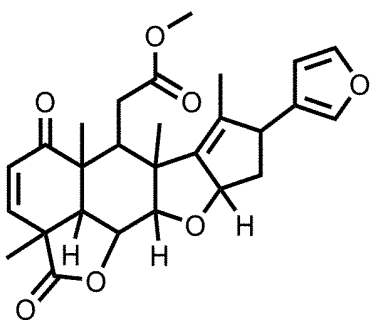


40

の一価形態である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

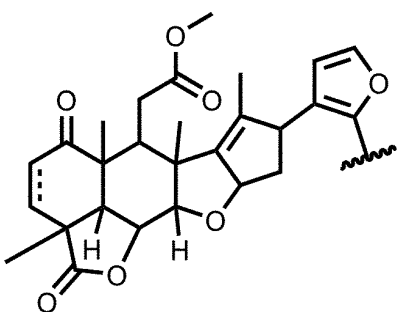
【化 2 2】



10

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

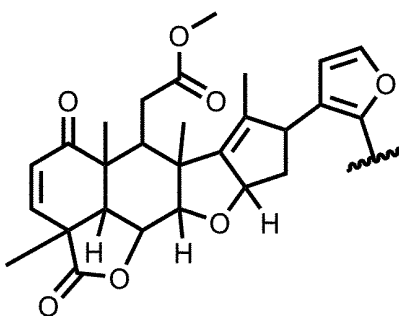
【化 2 3】



20

を有する。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 2 4】



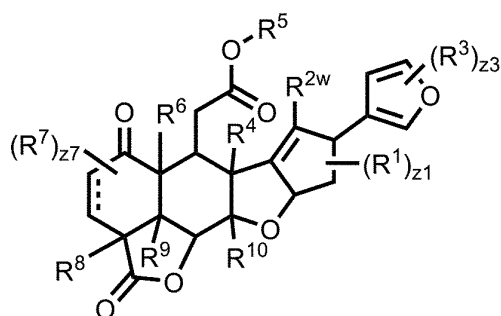
30

を有する。

【0 1 4 9】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 2 5】

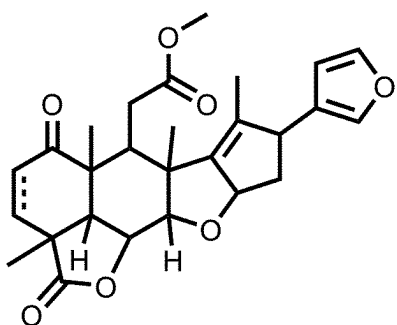


40

の一価形態であり、式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2w</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、z<sub>1</sub>、z<sub>3</sub>およびz<sub>7</sub>は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E

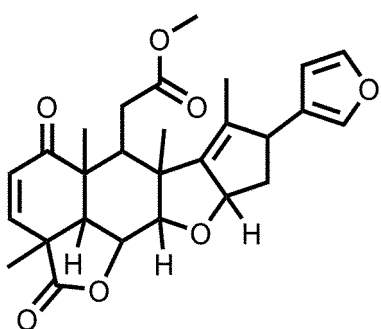
50

3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：  
【化 2 6】



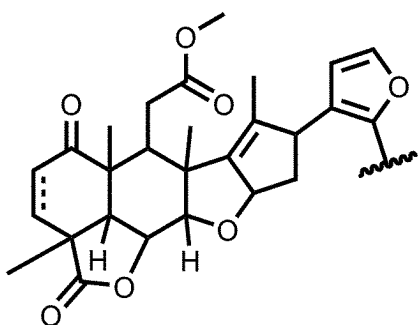
10

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：  
【化 2 7】



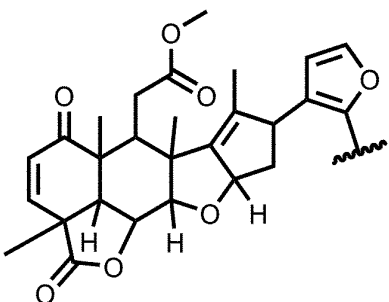
20

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：  
【化 2 8】



30

を有する。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：  
【化 2 9】



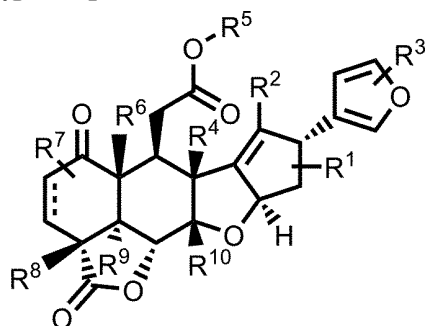
40

を有する。  
【0 1 5 0】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

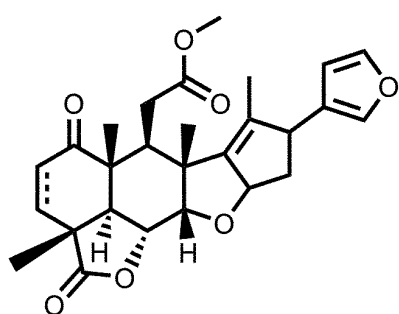
【化 3 0】



10

の一価形態であり、式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

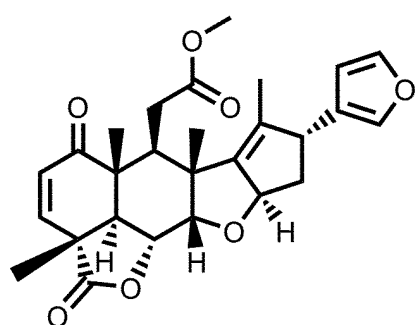
【化 3 1】



20

の一価形態である。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

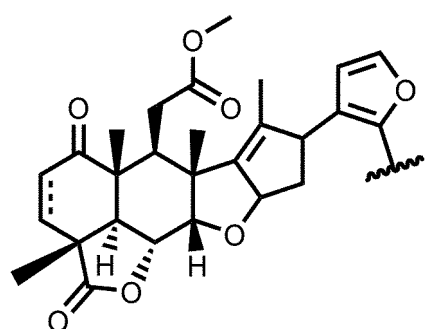
【化 3 2】



30

の一価形態である。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 3 3】

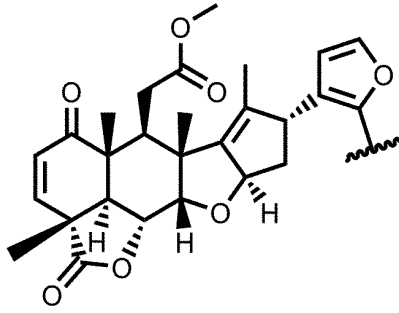


40

を有する。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

【化 3 4】



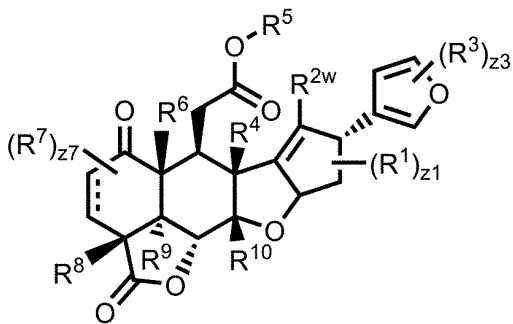
10

を有する。

【 0 1 5 1】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

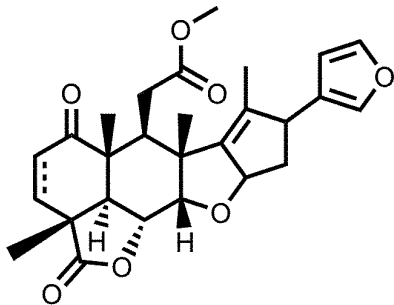
【化 3 5】



20

の一価形態であり、式中、 $R^1$ 、 $R^{2w}$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $z_1$ 、 $z_3$ および $z_7$ は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

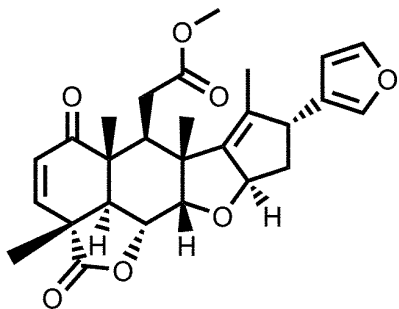
【化 3 6】



30

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 3 7】

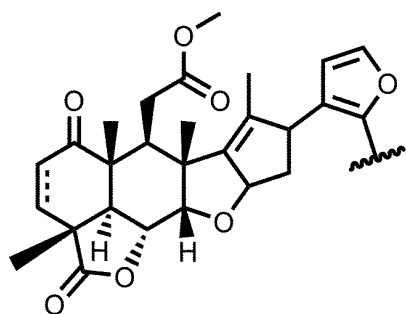


40

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

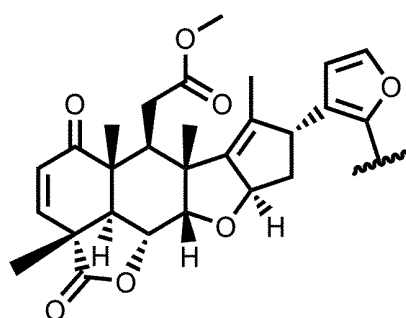
【化 3 8】



10

を有する。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 3 9】



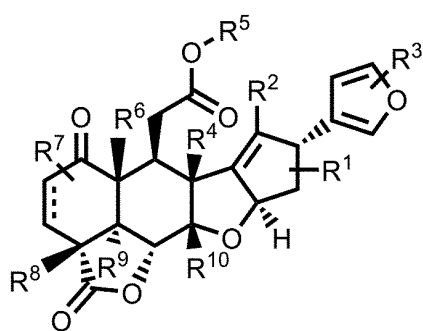
20

を有する。

【0 1 5 2】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

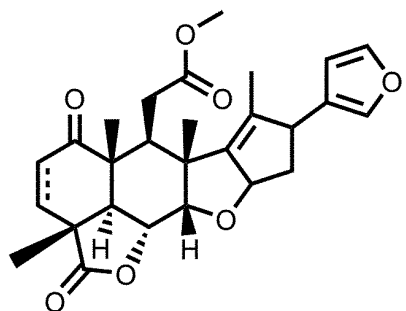
【化 4 0】



30

の一価形態を有する化合物の部分であり、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 4 1】



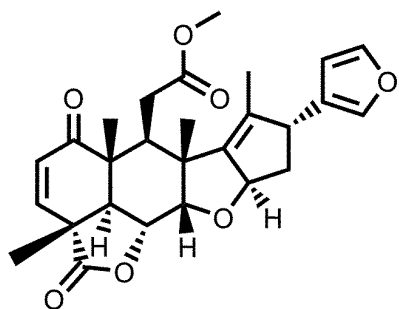
40

50



の一価形態を有する化合物の部分である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

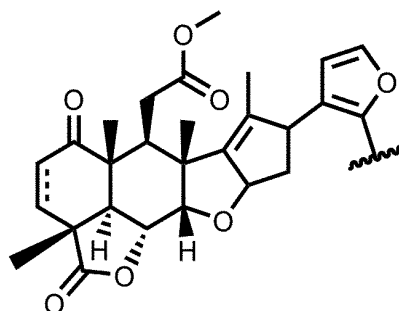
【化 4 2】



10

の一価形態を有する化合物の部分である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

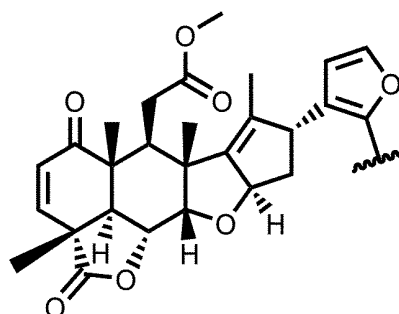
【化 4 3】



20

を有する。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 4 4】



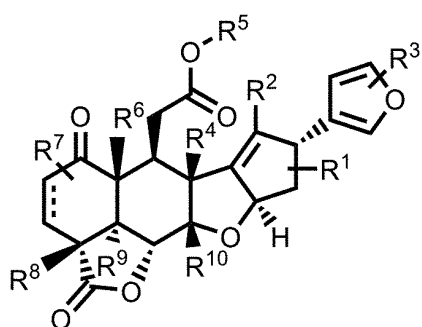
30

を有する。

【0 1 5 3】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

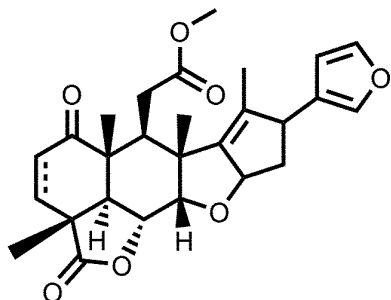
【化 4 5】



50

の一価形態を有する化合物の部分であり、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

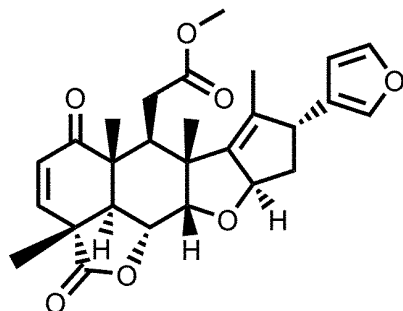
【化46】



10

の一価形態を有する化合物の部分である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

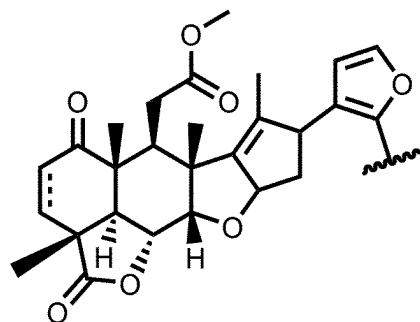
【化47】



20

の一価形態を有する化合物の部分である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

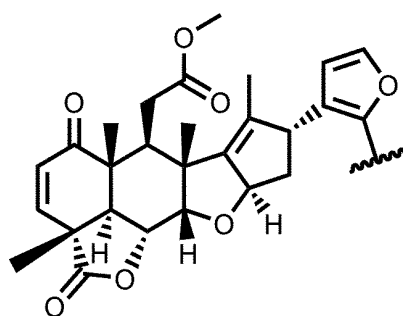
【化48】



30

を有する。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化49】



40

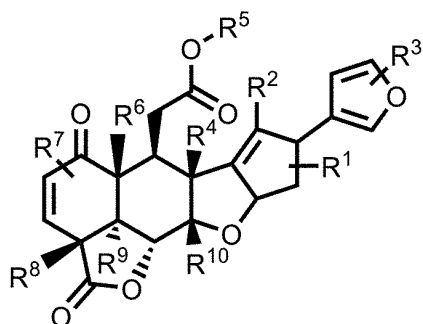
50

を有する。

【0154】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化50】



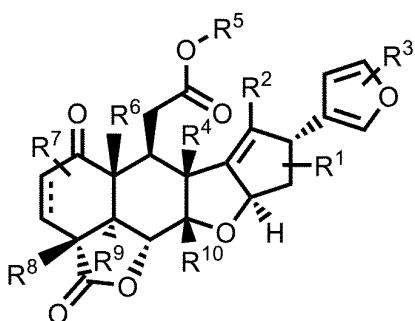
10

を有する化合物の部分である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載の通りである。

【0155】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

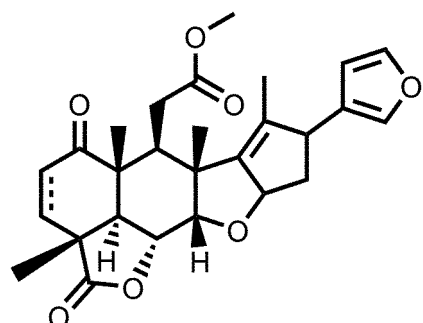
【化51】



20

を有する一価の化合物であり、式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載されている通りである。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化52】



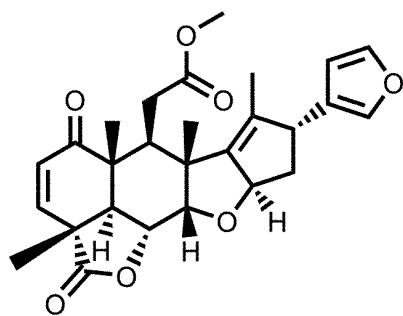
30

40

を有する一価の化合物である。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

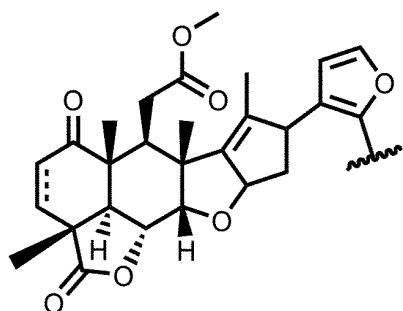
【化 5 3】



10

を有する一価の化合物である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

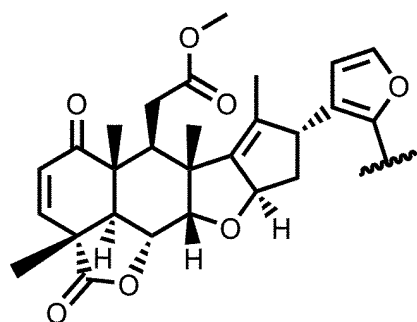
【化 5 4】



20

を有する。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 5 5】



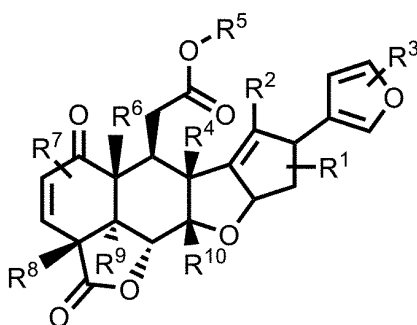
30

を有する。

【 0 1 5 6】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 5 6】



40

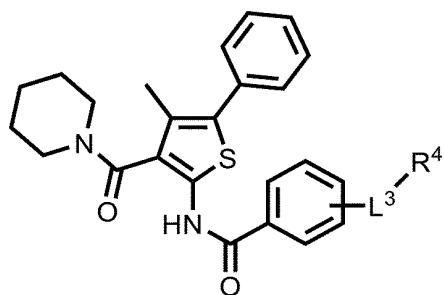
を有する一価の化合物である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は、本明細書に記載の通りである。

50

【 0 1 5 7 】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 5 7】



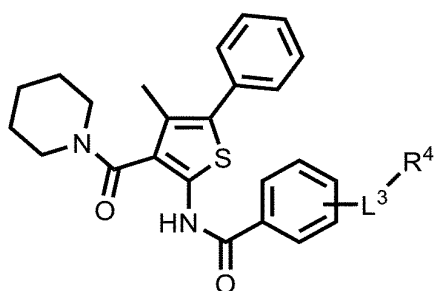
10

の一価形態であり、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 1 5 8 】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 5 8】



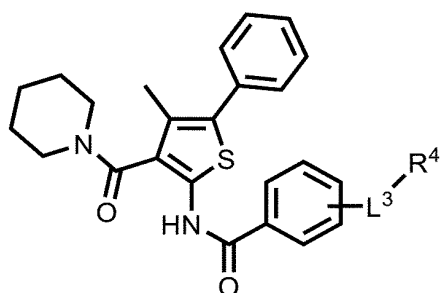
20

を有する化合物の部分であり、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 1 5 9 】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 5 9】



30

を有する一価の化合物であり、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

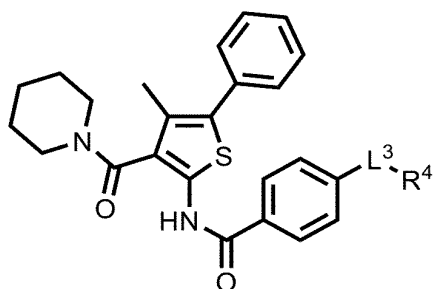
【 0 1 6 0 】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

40

50

【化 6 0】



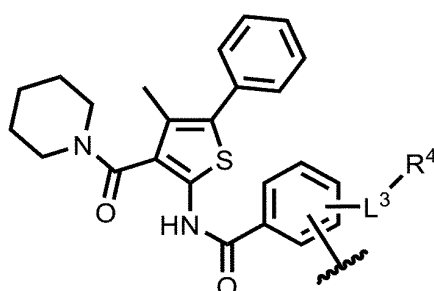
10

の一価形態であり、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 1 6 1】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 6 1】



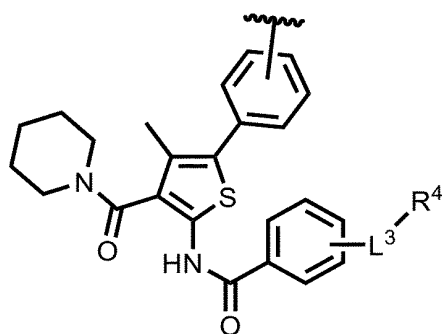
20

を有し、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 1 6 2】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 6 2】



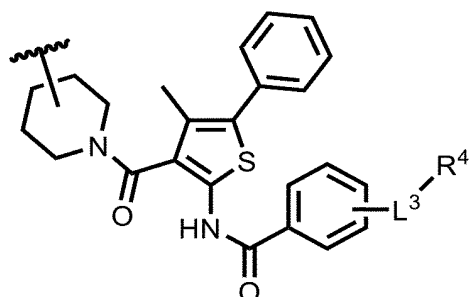
30

を有し、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 1 6 3】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 6 3】



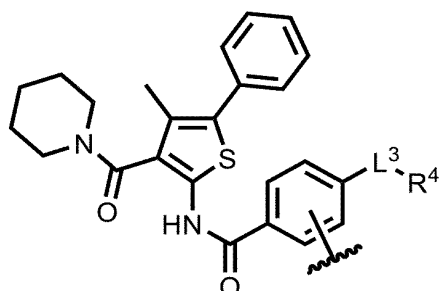
50

を有し、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0164】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化64】



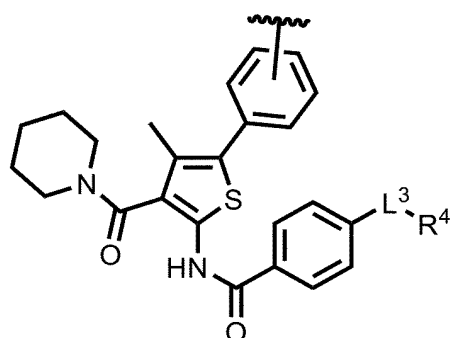
10

を有し、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0165】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化65】



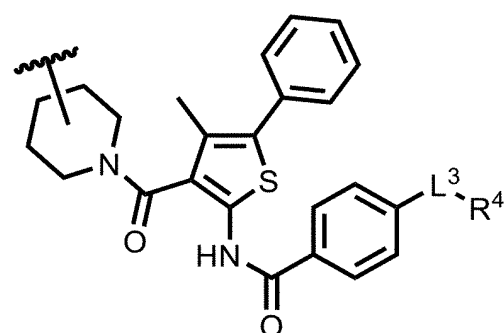
20

を有し、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0166】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化66】



40

を有し、式中、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0167】

実施形態では、 $R^1$  は独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OC$

50

H<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0168】

実施形態では、R<sup>1</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0169】

実施形態では、置換R<sup>1</sup>（例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換R<sup>1</sup>が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、R<sup>1</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、R<sup>1</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、R<sup>1</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0170】

実施形態では、R<sup>1</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>11</sup>置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、R<sup>11</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、R<sup>11</sup>置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、R<sup>11</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、R<sup>11</sup>



置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基は、任意に結合して、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）を形成してもよい。

#### 【0171】

実施形態では、 $R^1$ は独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基は、任意に結合して、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールを形成してもよい。

#### 【0172】

実施形態では、 $R^1$ は独立して、ハロゲンである。実施形態では、 $R^1$ は独立して、非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0173】

実施形態では、 $R^1$ は独立して、ハロゲンである。実施形態では、 $R^1$ は、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0174】

$R^{11}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0175】

実施形態では、 $R^{11}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0176】

実施形態では、 $R^{11}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0177】

実施形態では、置換 $R^{11}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^{11}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{11}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{11}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{11}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0178】

実施形態では、 $R^{11}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、またはR<sup>12</sup>置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。実施形態では、R<sup>11</sup>は、非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0179】

実施形態では、R<sup>11</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>12</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>12</sup>置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールである。実施形態では、R<sup>11</sup>は、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0180】

R<sup>12</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0181】

実施形態では、R<sup>12</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CON

10

20

30

40

50

H<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

【0182】

実施形態では、R<sup>12</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールである。

【0183】

実施形態では、R<sup>2</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2~8員、2~6員、4~6員、2~3員、もしくは4~5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3~8員、3~6員、4~6員、4~5員、もしくは5~6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5~10員、5~9員、もしくは5~6員）である。

【0184】

実施形態では、R<sup>2</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、も

しくは低級置換基で置換)もしくは非置換アリール、または置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアリールである。

【0185】

実施形態では、置換 $R^2$ (例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および/または置換ヘテロアリール)は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^2$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および/または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $R^2$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^2$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^2$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

【0186】

実施形態では、 $R^2$ は独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換アルキル(例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ )、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル(例えば、2~8員、2~6員、4~6員、2~3員、もしくは4~5員)、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3~8員、3~6員、4~6員、4~5員、もしくは5~6員)、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル)、または $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール(例えば、5~10員、5~9員、もしくは5~6員)であり、2つの $R^2$ 置換基は、任意に結合して、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3~8員、3~6員、4~6員、4~5員、もしくは5~6員)、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル)、または $R^{21}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール(例えば、5~10員、5~9員、もしくは5~6員)を形成してもよい。

【0187】

実施形態では、 $R^2$ は独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{21}$ 置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基は、任意に結合して、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリ

ール、または  $R^{21}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリールを形成してもよい。

【0188】

実施形態では、 $R^2$  は独立して、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $R^{21}$  置換もしくは非置換  $C_1-C_3$  アルキル、非置換 2～3 員ヘテロアルキル、または結合剤リンカーへの結合であり、2つの  $R^2$  置換基は、任意に結合して、非置換フェニルを形成してもよい。

【0189】

実施形態では、 $R^2$  は独立して、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $R^{21}$  置換もしくは非置換  $C_1-C_3$  アルキル、非置換 2～3 員ヘテロアルキル、または結合剤リンカーへの結合であり、2つの  $R^2$  置換基は、任意に結合して、非置換フェニルを形成してもよく、 $R^{21}$  は独立して  $-OH$  である。

【0190】

実施形態では、 $R^2$  は独立して、ハロゲンである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-Cl$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-Br$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-I$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-F$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-CF_3$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-NO_2$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $R^{21}$  置換  $C_1-C_4$  アルキルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $R^{21}$  置換  $C_1-C_4$  アルキルであり、 $R^{21}$  は独立して、 $-OH$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-CH_2OH$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換  $C_1-C_4$  アルキルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換  $n$ -プロピルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換  $n$ -ブチルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換  $tert$ -ブチルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、非置換 2～4 員ヘテロアルキルである。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-OCH_3$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、 $-OCH_2CH_3$  である。実施形態では、 $R^2$  は独立して、結合剤リンカーへの結合である。実施形態では、2つの  $R^2$  置換基は、任意に結合して、非置換フェニルを形成してもよい。

【0191】

$R^{21}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。

【0192】

実施形態では、 $R^{21}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは  $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8 員、2～6 員、4～6 員、2～3 員、も

10

20

30

40

50

しくは4～5員)、置換もしくは非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員)、置換もしくは非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル)、または置換もしくは非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員)である。

#### 【0193】

実施形態では、 $R^{21}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換シクロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アリール、または置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0194】

実施形態では、置換 $R^{21}$ (例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および/または置換ヘテロアリール)は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^{21}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および/または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{21}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{21}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{21}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0195】

実施形態では、 $R^{21}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換アルキル(例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ )、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル(例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員)、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員)、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル)、または $R^{22}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員)である。実施形態では、 $R^{21}$ は、非置換アルキル(例えば、 $C_1-C_8$ 、

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0196】

実施形態では、R<sup>21</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>22</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>22</sup>置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、R<sup>22</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>22</sup>置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>22</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>22</sup>置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールである。

#### 【0197】

R<sup>22</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0198】

実施形態では、R<sup>22</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0199】

実施形態では、R<sup>22</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-O



NH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0200】

実施形態では、R<sup>22</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールである。

#### 【0201】

実施形態では、L<sup>3</sup>は、結合、-N(R<sup>3</sup>)-、-C(O)-、-C(O)N(R<sup>3</sup>)-、-N(R<sup>3</sup>)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、置換もしくは非置換アルキレン（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2~8員、2~6員、4~6員、2~3員、もしくは4~5員）、置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3~8員、3~6員、4~6員、4~5員、もしくは5~6員）、置換もしくは非置換アリーレン（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニレン）、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5~10員、5~9員、もしくは5~6員）である。

#### 【0202】

実施形態では、L<sup>3</sup>は結合、-N(R<sup>3</sup>)-、-C(O)-、-C(O)N(R<sup>3</sup>)-、-N(R<sup>3</sup>)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、置換（例えば、少なくとも置換1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキレン、置換された（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリーレン、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは低級置換基）もしくは非置換ヘテロアリーレンである。

#### 【0203】

実施形態では、置換L<sup>3</sup>（例えば、置換アルキレン、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換され、置換L<sup>3</sup>が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、L<sup>3</sup>は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、L<sup>3</sup>は、置換されている場合、少なくと

10

20

30

40

50

も1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $L^3$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

【0204】

実施形態では、 $L^3$ は、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $R^3$ 置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^3$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^3$ 置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^3$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^3$ 置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または $R^3$ 置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

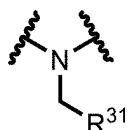
【0205】

実施形態では、 $L^3$ は、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリーレン、または $R^3$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレンである。

【0206】

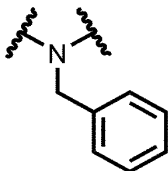
実施形態では、 $L^3$ は、 $-N(R^3)-$ である。実施形態では、 $L^3$ は $-N(R^3)-$ であり、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換メチル、非置換フェニル、もしくは非置換5～6員ヘテロアリールであり、 $R^{31}$ は独立して、非置換フェニルもしくは非置換5～6員ヘテロアリールである。実施形態では、 $L^3$ は、

【化67】



である。実施形態では、 $L^3$ は、

【化68】

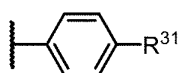


である。実施形態では、 $L^3$ は、 $-CH_2NH-$ である。

【0207】

実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換メチルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換エチルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換プロピルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換ブチルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、ハロゲンである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $-F$ である。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $-Cl$ である。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $-Br$ である。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $-I$ である。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換または非置換フェニルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して、 $R^{31}$ 置換フェニルである。実施形態では、 $R^3$ は独立して

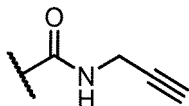
## 【化 6 9】



である。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、 $-C(O)H$ 、 $-COOH$ 、または $R^{32}$ 置換もしくは非置換2～6員ヘテロアルキルである。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、 $-C(O)H$ である。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、 $-COOH$ である。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、 $R^{32}$ 置換2～6員ヘテロアルキルである。実施形態では $R^{31}$ は独立して、非置換2～6員ヘテロアルキルである。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、

10

## 【化 7 0】



である。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、 $R^{32}$ 置換または非置換フェニルである。実施形態では、 $R^{31}$ は独立して、非置換フェニルである。実施形態では、 $R^{32}$ は独立して、オキソである。

## 【0 2 0 8】

実施形態では、 $R^3$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。

20

## 【0 2 0 9】

実施形態では、 $R^3$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

30

40

## 【0 2 1 0】

実施形態では、 $R^3$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH$

50

2、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0211】

実施形態では、置換 $\text{R}^3$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $\text{R}^3$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $\text{R}^3$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $\text{R}^3$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $\text{R}^3$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0212】

実施形態では、 $\text{R}^3$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 、もしくは $\text{C}_1-\text{C}_2$ ）、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $\text{C}_3-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_4-\text{C}_6$ 、もしくは $\text{C}_5-\text{C}_6$ ）、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換アリール（例えば、 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ 、もしくはフェニル）、または $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0213】

実施形態では、 $\text{R}^3$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{31}$ 置換も

しくは非置換  $C_1-C_8$  アルキル、 $R^{31}$  置換もしくは非置換 2～8 員ヘテロアルキル、 $R^{31}$  置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキル、 $R^{31}$  置換もしくは非置換 3～8 員ヘテロシクロアルキル、 $R^{31}$  置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または  $R^{31}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリールである。

【0214】

$R^{31}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。

【0215】

実施形態では、 $R^{31}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは  $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8 員、2～6 員、4～6 員、2～3 員、もしくは 4～5 員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは  $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8 員、3～6 員、4～6 員、4～5 員、もしくは 5～6 員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10 員、5～9 員、もしくは 5～6 員）である。

【0216】

実施形態では、 $R^{31}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも 1 つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも 1 つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも 1 つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも 1 つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも 1 つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも 1 つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

## 【0217】

実施形態では、置換  $R^{31}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換  $R^{31}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $R^{31}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{31}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{31}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

10

## 【0218】

実施形態では、 $R^{31}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{32}$  置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^{32}$  置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^{32}$  置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{32}$  置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^{32}$  置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$  もしくはフェニル）、または  $R^{32}$  置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

20

## 【0219】

実施形態では、 $R^{31}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{32}$  置換もしくは非置換  $C_1-C_8$  アルキル、 $R^{32}$  置換もしくは非置換 2～8 員ヘテロアルキル、 $R^{32}$  置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキル、 $R^{32}$  置換もしくは非置換 3～8 員ヘテロシクロアルキル、 $R^{32}$  置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または  $R^{32}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリールである。

30

40

## 【0220】

$R^{32}$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または

50

非置換ヘテロアリールである。

【0221】

実施形態では、 $R^{32}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

10

【0222】

実施形態では、 $R^{32}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

20

【0223】

実施形態では、 $R^{32}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである。

30

【0224】

実施形態では、 $R^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員

40

50

、もしくは4～5員)、置換もしくは非置換シクロアルキル(例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ )、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル(例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員)、置換もしくは非置換アリール(例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル)、または置換もしくは非置換ヘテロアリール(例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員)、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

【0225】

実施形態では、 $R^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換シクロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アリール、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

【0226】

実施形態では、置換 $R^4$ (例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および/または置換ヘテロアリール)は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^4$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および/または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $R^4$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^4$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^4$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

【0227】

実施形態では、 $R^4$ は独立して、水素、または置換もしくは非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、水素である。実施形態では、 $R^4$ は独立して、置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換n-プロピルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換n-ブチルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、非置換tert-ブチルである。実施形態では、 $R^4$ は独立して、Eであり、Eは、実施形態を含む本明細書に記載される通りである。

【0228】

実施形態では、 $R^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NH$



C(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、またはR<sup>41</sup>置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいはEである。

10

## 【0229】

実施形態では、R<sup>4</sup>は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>41</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>41</sup>置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいはEである。

20

## 【0230】

R<sup>41</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。

30

## 【0231】

実施形態では、R<sup>41</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換

40

50

アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0232】

実施形態では、 $R^{41}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0233】

実施形態では、置換 $R^{41}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^{41}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{41}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{41}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{41}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0234】

実施形態では、 $R^{41}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または $R^{42}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0235】

実施形態では、 $R^{41}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-$

CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>42</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールである。

#### 【0236】

R<sup>42</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0237】

実施形態では、R<sup>42</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2~8員、2~6員、4~6員、2~3員、もしくは4~5員）、非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3~8員、3~6員、4~6員、4~5員、もしくは5~6員）、非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5~10員、5~9員、もしくは5~6員）である。

#### 【0238】

実施形態では、R<sup>42</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールである。

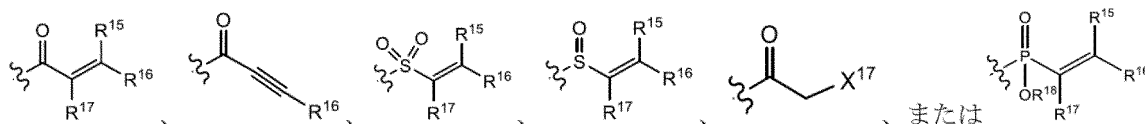
#### 【0239】

実施形態では、Eは、共有結合システイン修飾因子部分である。

## 【0240】

実施形態では、Eは、

## 【化71】

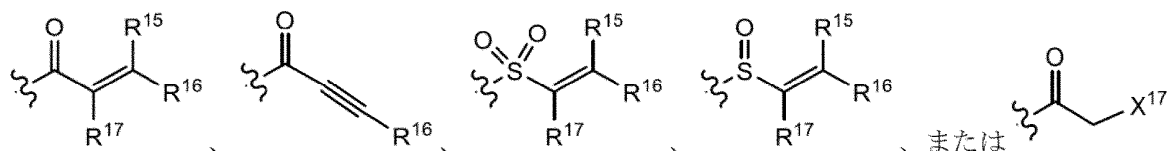


である。R<sup>15</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>17</sup>およびR<sup>18</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、  
-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、  
-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHSSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、  
-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。X<sup>17</sup>は、ハロゲンである。実施形態では、X<sup>17</sup>は、-Fである。実施形態では、X<sup>17</sup>は、-Clである。

## 【0241】

実施形態では、Eは、

## 【化72】



である。R<sup>15</sup>、R<sup>16</sup>およびR<sup>17</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHSSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。X<sup>17</sup>は、ハロゲンである。実施形態では、X<sup>17</sup>は、-Fである。実施形態では、X<sup>17</sup>は、-Clである。

## 【0242】

実施形態では、R<sup>15</sup>、R<sup>16</sup>、およびR<sup>17</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHSSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくは

は $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0243】

実施形態では、 $R^{18}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0244】

実施形態では、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ および $R^{18}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

#### 【0245】

実施形態では、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$

、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、または置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリールである。

【0246】

実施形態では、置換  $R^{15}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換  $R^{15}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{15}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{15}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{15}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

10

【0247】

実施形態では、置換  $R^{16}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換  $R^{16}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{16}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{16}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{16}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

20

【0248】

実施形態では、置換  $R^{17}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換  $R^{17}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{17}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{17}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{17}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

30

【0249】

実施形態では、置換  $R^{18}$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換  $R^{18}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^{18}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{18}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^{18}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

40

【0250】

実施形態では、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$  および  $R^{18}$  は独立して、水素、ハロゲン、-C

50

$\text{Cl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 、もしくは $\text{C}_1-\text{C}_2$ ）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、 $\text{C}_3-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_4-\text{C}_6$ 、もしくは $\text{C}_5-\text{C}_6$ ）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

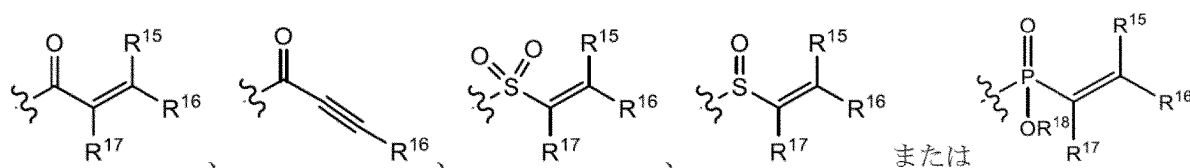
#### 【0251】

実施形態では、 $\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$ および $\text{R}^{17}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0252】

実施形態では、Eは、

#### 【化73】

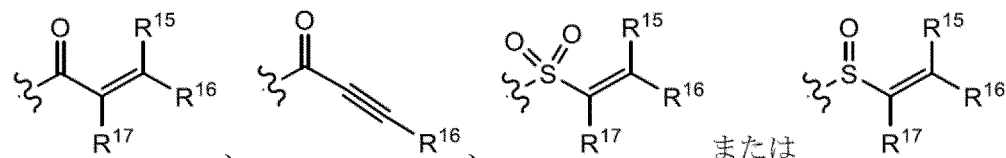


であり、 $\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$ 、 $\text{R}^{17}$ および $\text{R}^{18}$ は独立して、水素である。

#### 【0253】

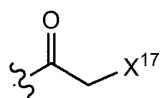
実施形態では、Eは、

#### 【化74】



であり、 $\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$ および $\text{R}^{17}$ は独立して、水素である。実施形態では、Eは、

#### 【化75】

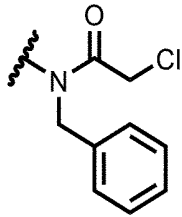


であり、 $R^{17}$ は独立して、 $-C$ である。

【0254】

実施形態では、 $-L^3-R^4$ は、

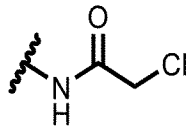
【化76】



10

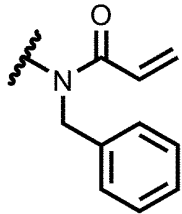
である。実施形態では、 $-L^3-R^4$ は、

【化77】



である。実施形態では、 $-L^3-R^4$ は、

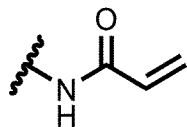
【化78】



20

である。実施形態では、 $-L^3-R^4$ は、

【化79】



30

である。

【0255】

実施形態では、 $z_1$ は、0～2の整数である。実施形態では、 $z_2$ は、0～2の整数である。実施形態では、 $z_1$ は、0である。実施形態では、 $z_1$ は、1である。実施形態では、 $z_1$ は、2である。実施形態では、 $z_1$ は、3である。実施形態では、 $z_1$ は、4である。実施形態では、 $z_2$ は、0である。実施形態では、 $z_2$ は、1である。実施形態では、 $z_2$ は、2である。実施形態では、 $z_2$ は、3である。実施形態では、 $z_2$ は、4である。実施形態では、 $z_2$ は、5である。

40

【0256】

実施形態では、 $z_2$ は1であり、 $R^2$ は、結合剤リンカーへの結合である。

【0257】

実施形態では、 $R^7$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)$

50



) H、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 、もしくは $\text{C}_1-\text{C}_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $\text{C}_3-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_4-\text{C}_6$ 、もしくは $\text{C}_5-\text{C}_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0258】

実施形態では、 $\text{R}^7$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0259】

実施形態では、置換 $\text{R}^7$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $\text{R}^7$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっている。実施形態では、 $\text{R}^7$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $\text{R}^7$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $\text{R}^7$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0260】

実施形態では、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^7$ は独立して、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員

ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または  $R^{51}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの  $R^1$  置換基、または2つの  $R^2$  置換基、または2つの  $R^7$  置換基は、任意に結合して、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換 3～8 員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または  $R^{51}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリールを形成してもよい。

#### 【0261】

実施形態では、 $R^7$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$  置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$  もしくは  $C_1-C_2$ ）、 $R^{51}$  置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8 員、2～6 員、4～6 員、2～3 員、もしくは 4～5 員）、 $R^{51}$  置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは  $C_5-C_6$ ）、 $R^{51}$  置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8 員、3～6 員、4～6 員、4～5 員、もしくは 5～6 員）、 $R^{51}$  置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$  もしくはフェニル）、または  $R^{51}$  置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10 員、5～9 員、もしくは 5～6 員）、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの  $R^7$  置換基は、任意に結合して、 $R^{51}$  置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは  $C_5-C_6$ ）、 $R^{51}$  置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8 員、3～6 員、4～6 員、4～5 員、もしくは 5～6 員）、 $R^{51}$  置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$  もしくはフェニル）、または  $R^{51}$  置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10 員、5～9 員、もしくは 5～6 員）を形成してもよい。

#### 【0262】

実施形態では、 $R^7$  は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_1-C_8$  アルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換 2～8 員ヘテロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換 3～8 員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または  $R^{51}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの  $R^7$  置換基が、任意に結合して、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換 3～8 員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$  置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または  $R^{51}$  置換もしくは非置換 5～10 員ヘテロアリールを形成してもよい。

#### 【0263】

実施形態では、 $R^5$  は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$

、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $\text{C}_1-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 、もしくは $\text{C}_1-\text{C}_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $\text{C}_3-\text{C}_8$ 、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ 、 $\text{C}_4-\text{C}_6$ 、もしくは $\text{C}_5-\text{C}_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0264】

実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0265】

実施形態では、置換 $\text{R}^5$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $\text{R}^5$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なっていてよい。実施形態では、 $\text{R}^5$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $\text{R}^5$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $\text{R}^5$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0266】

実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、水素、または置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、水素である。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、置換または非置換 $\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換メチルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換 $n$ -プロピルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換 $n$ -ブチルである。実施形態では、 $\text{R}^5$ は独立して、非置換 $t$ er $t$ -ブチルである。

## 【0267】

実施形態では、 $R^6$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ 、もしくはフェニル）、または置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

10

## 【0268】

実施形態では、 $R^6$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリール、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合である。

20

30

## 【0269】

実施形態では、置換 $R^6$ （例えば、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、および／または置換ヘテロアリール）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $R^6$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $R^6$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $R^6$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $R^6$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

40

## 【0270】

実施形態では、 $R^6$ は独立して、水素、または置換もしくは非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、水素である。実施形態では、 $R^6$ は独立して、置換または非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、非置換 $C_1-C_4$ アルキルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、非置換メチルである。実施形態で

50

は、 $R^6$ は独立して、非置換エチルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、非置換  $n$  - プロピルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、非置換イソプロピルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、非置換  $n$  - ブチルである。実施形態では、 $R^6$ は独立して、非置換 *tert* - ブチルである。

#### 【0271】

実施形態では、 $R^5$ および $R^6$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0272】

実施形態では、 $R^5$ および $R^6$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。

#### 【0273】

$R^{51}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

#### 【0274】

実施形態では、 $R^{51}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-O$

NH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

10

## 【0275】

実施形態では、R<sup>51</sup>は独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-Cl<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである。

20

## 【0276】

実施形態では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-Cl<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換シクロアルキル（例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>、もしくはC<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>）、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換アリール（例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>またはフェニル）、もしくはR<sup>51</sup>置換もしくは非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、または結合剤リンカーへの結合であり、唯一つのR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>またはR<sup>10</sup>は、結合剤リンカーへの結合であり、R<sup>51</sup>は独立してオキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-Cl<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCl<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換アルキル（例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、もしくはC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>）、非置換ヘテロアルキル（例

30

40

50

例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

【0277】

実施形態では、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、もしくは $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、または結合剤リンカーへの結合であり、唯一つの $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ または $R^{10}$ は、結合剤リンカーへの結合であり、 $R^{51}$ は独立してオキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである。

【0278】

実施形態では、結合剤リンカーは、 $L^{11}-L^{12}-L^{13}-L^{14}$ である。 $L^{11}$ は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤に直接接続されている。

【0279】

$L^{11}$ は、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

【0280】

$L^{12}$ 、 $L^{13}$ および $L^{14}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

【0281】

10

20

30

40

50

実施形態では、 $L^{11}$ は、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0282】

実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0283】

実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0284】

実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または $R^{61}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロ

10

20

30

40

50



アルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0285】

実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_{20}$ アルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換2～20員ヘテロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリーレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーである。実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、非置換アルキレン、非置換ヘテロアルキレン、非置換シクロアルキレン、非置換ヘテロシクロアルキレン、非置換アリーレン、非置換ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0286】

実施形態では、 $L^{11}$ は、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリーレン、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0287】

実施形態では、置換 $L^{11}$ （例えば、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $L^{11}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $L^{11}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{11}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{11}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0288】

実施形態では、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$ および $L^{14}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、 $R^{61}$

置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または $R^{61}$ 置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0289】

実施形態では、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$ および $L^{14}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_{20}$ アルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換2～20員ヘテロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリーレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーである。実施形態では、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$ および $L^{14}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、非置換アルキレン、非置換ヘテロアルキレン、非置換シクロアルキレン、非置換ヘテロシクロアルキレン、非置換アリーレン、非置換ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0290】

実施形態では、 $L^{12}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0291】

実施形態では、置換 $L^{12}$ （例えば、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $L^{12}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $L^{12}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{12}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{12}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0292】

実施形態では、 $L^{13}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイ

ズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換シクロアルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0293】

実施形態では、置換 $L^{13}$ (例えば、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン)は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $L^{13}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $L^{13}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{13}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{13}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0294】

実施形態では、 $L^{14}$ は独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換シクロアルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換(例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換)もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである。

#### 【0295】

実施形態では、置換 $L^{14}$ (例えば、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン)は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換され、置換 $L^{14}$ が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $L^{14}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{14}$ は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{14}$ は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0296】

$R^{61}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置

10

20

30

40

50

換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、または非置換ヘテロアリールである。

【0297】

実施形態では、 $R^{61}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換アルキル（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、非置換ヘテロアルキル（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、非置換シクロアルキル（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、非置換ヘテロシクロアルキル（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、非置換アリール（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニル）、または非置換ヘテロアリール（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

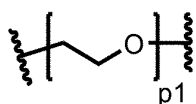
【0298】

実施形態では、 $R^{61}$ は独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである。

【0299】

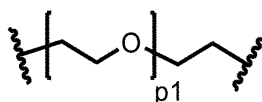
実施形態では、結合剤リンカーは式：

【化80】



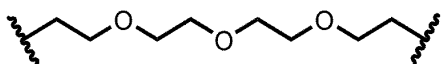
を有し、 $p_1$ は1～6の整数である。実施形態では、結合剤リンカーは式：

【化81】



を有し、 $p_1$ は1～6の整数である。実施形態では、 $p_1$ は、3である。実施形態では、結合剤リンカーは、式：

【化82】



を有する。実施形態では、結合剤リンカーは、式：

10

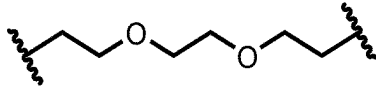
20

30

40

50

## 【化 8 3】



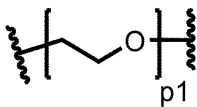
を有する。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_{12}$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_{10}$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_8$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_2-C_{10}$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_2-C_6$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_4$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_2$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_3$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_4$  アルキレンである。

10

## 【0300】

実施形態では、結合剤リンカーは式：

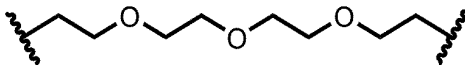
## 【化 8 4】



20

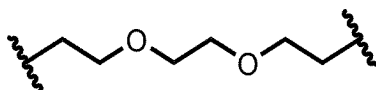
を有し、 $p_1$  は 1 ~ 6 の整数である。実施形態では、 $p_1$  は、3 である。実施形態では、結合剤リンカーは、式：

## 【化 8 5】



を有する。実施形態では、結合剤リンカーは、式：

## 【化 8 6】



30

を有する。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_{12}$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_{10}$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_8$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_2-C_{10}$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_2-C_6$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1-C_4$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_1$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_2$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_3$  アルキレンである。実施形態では、結合剤リンカーは、非置換  $C_4$  アルキレンである。

40

## 【0301】

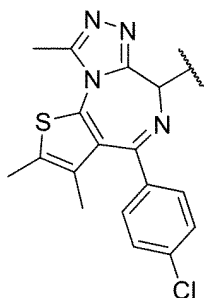
実施形態では、 $z_7$  は、0 ~ 2 の整数である。実施形態では、 $z_7$  は、0 である。実施形態では、 $z_7$  は、1 である。実施形態では、 $z_7$  は、2 である。実施形態では、 $z_7$  は、3 である。実施形態では、 $z_7$  は、4 である。実施形態では、 $z_7$  は、5 である。実施形態では、 $z_7$  は、6 である。実施形態では、 $z_7$  は、7 である。実施形態では、 $z_7$  は、8 である。実施形態では、 $z_7$  は、9 である。実施形態では、 $z_7$  は、10 である。

## 【0302】

実施形態では、標的タンパク質結合剤は、疾患に関連する標的タンパク質に結合するこ

50

とができる。実施形態では、標的タンパク質結合剤は、  
【化 8 7】



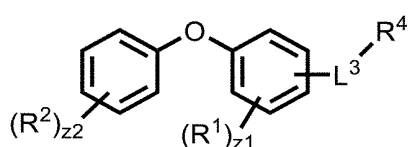
10

であり、標的タンパク質結合剤は、B R D 4 に結合する。

【 0 3 0 3 】

一態様では、式：

【化 8 8】



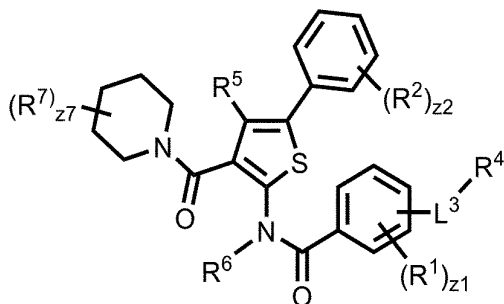
20

を有する化合物が提供され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $z1$ 、 $z2$ 、 $L^3$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 3 0 4 】

一態様では、式：

【化 8 9】



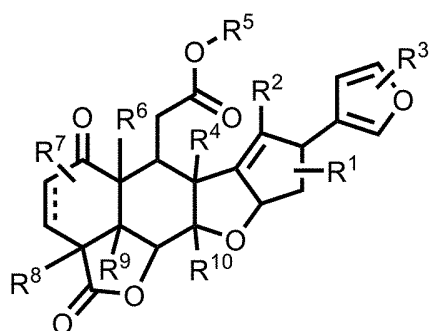
30

を有する化合物が提供され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $L^3$ 、 $z1$ 、 $z2$ 、 $z7$  および  $R^4$  は、本明細書に記載されている通りである。

【 0 3 0 5 】

一態様では、式：

【化 9 0】



40

を有する化合物が提供され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  およ

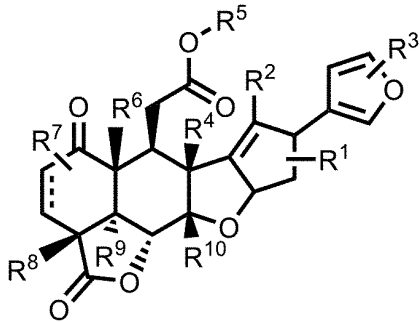
50

び  $R^{10}$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0306】

一態様では、式：

【化91】



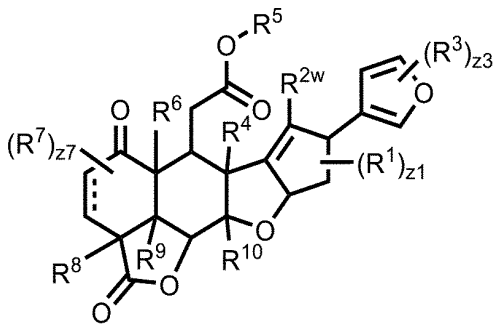
10

を有する化合物が提供され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および  $R^{10}$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0307】

一態様では、式：

【化92】



20

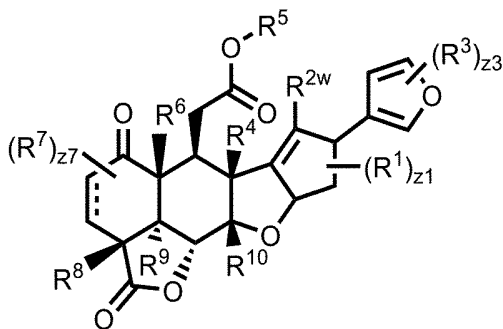
を有する化合物が提供され、 $R^1$ 、 $R^{2w}$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $z1$ 、 $z3$ および  $z7$  は、本明細書に記載されている通りである。

30

【0308】

一態様では、式：

【化93】



40

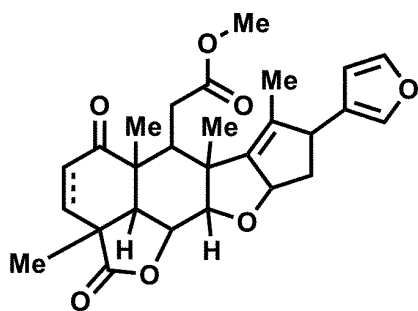
を有する化合物が提供され、 $R^1$ 、 $R^{2w}$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $z1$ 、 $z3$ および  $z7$  は、本明細書に記載されている通りである。

【0309】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

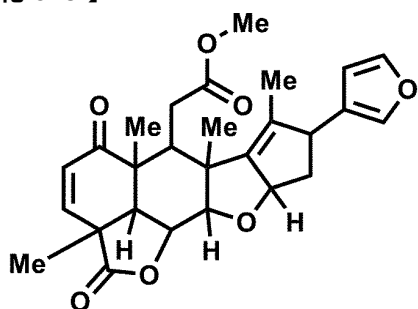
【化 9 4】



10

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

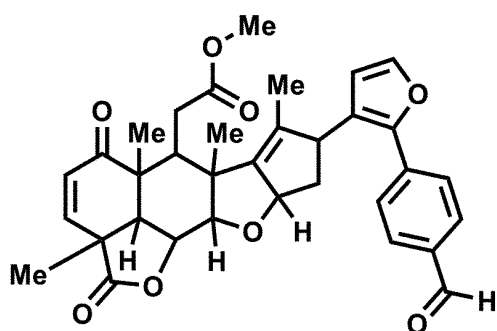
【化 9 5】



20

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

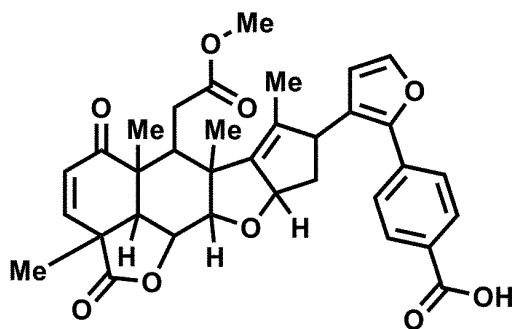
【化 9 6】



30

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 9 7】



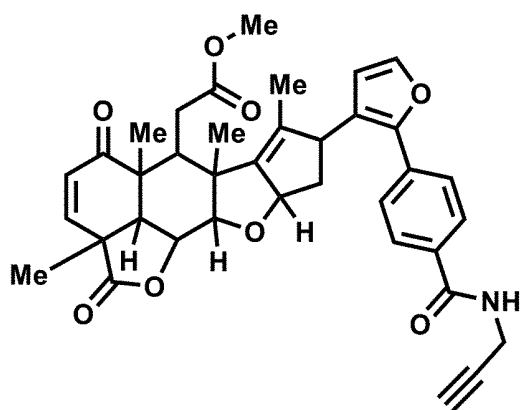
40

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50



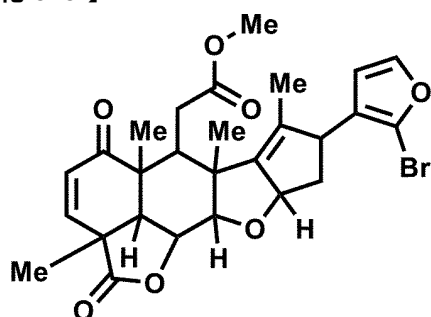
【化 9 8】



10

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 9 9】



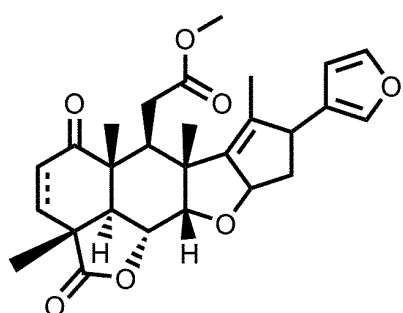
20

の一価形態である。

【 0 3 1 0】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

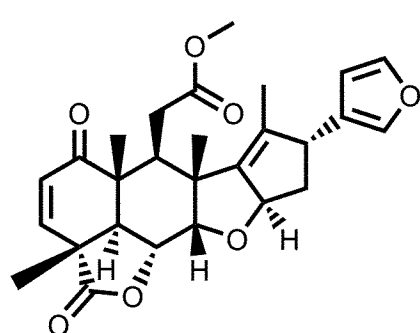
【化 1 0 0】



30

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 0 1】

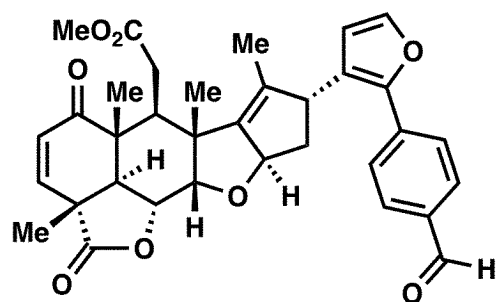


40

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

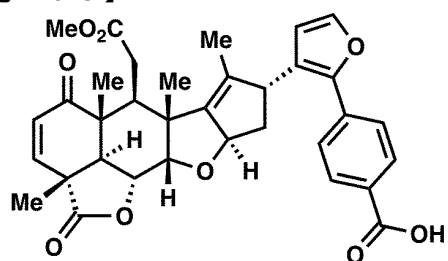
【化 1 0 2】



10

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

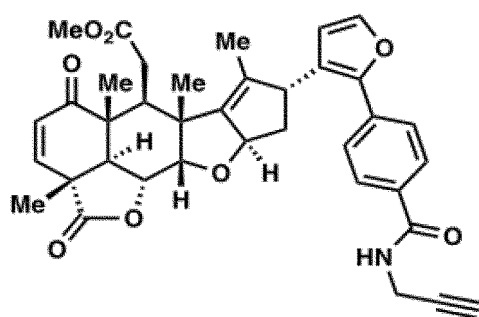
【化 1 0 3】



20

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

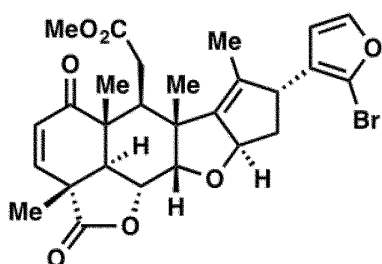
【化 1 0 4】



30

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 0 5】



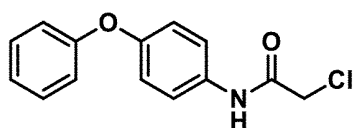
40

の一価形態である。

【 0 3 1 1】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

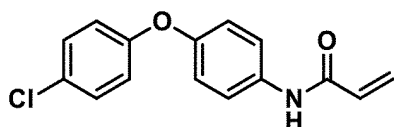
【化 1 0 6】



50

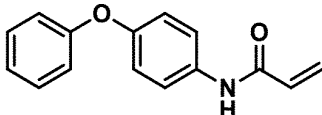
の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 0 7】



の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

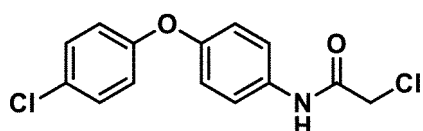
【化 1 0 8】



10

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

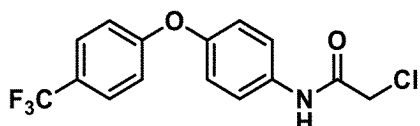
【化 1 0 9】



20

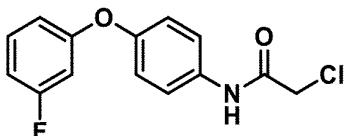
の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 1 0】



の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

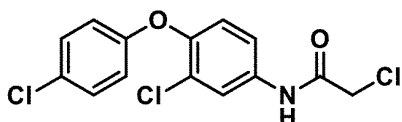
【化 1 1 1】



30

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

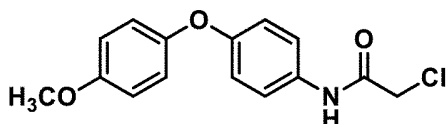
【化 1 1 2】



40

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

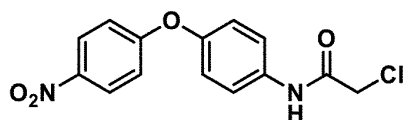
【化 1 1 3】



の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

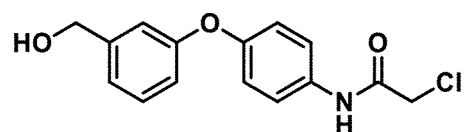
50

【化 1 1 4】



の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

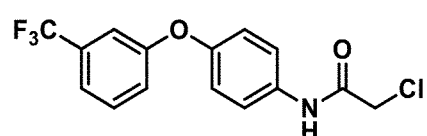
【化 1 1 5】



10

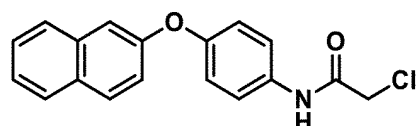
の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 1 6】



の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

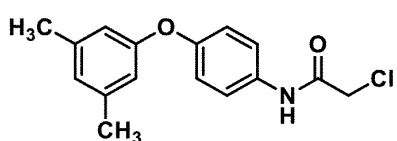
【化 1 1 7】



20

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

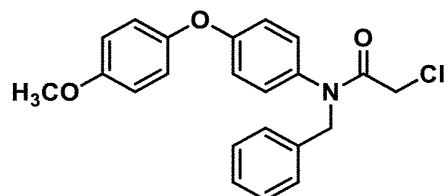
【化 1 1 8】



30

の一価形態である。実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 1 9】



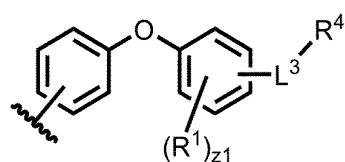
40

の一価形態である。

【0 3 1 2】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 2 0】



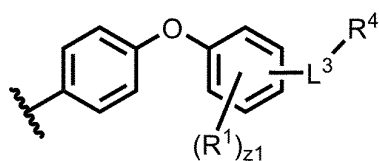
50

を有する。実施形態では、 $R^4$ は独立して、Eであり、Eは、実施形態を含む本明細書に記載される通りである。

【0313】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化121】



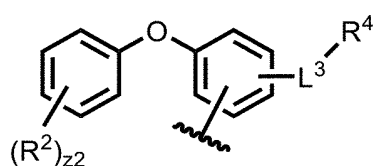
10

を有する。実施形態では、 $R^4$ は独立して、Eであり、Eは、実施形態を含む本明細書に記載される通りである。

【0314】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化122】



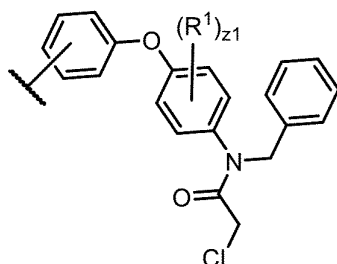
20

を有する。実施形態では、 $R^4$ は独立して、Eであり、Eは、実施形態を含む本明細書に記載される通りである。

【0315】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化123】



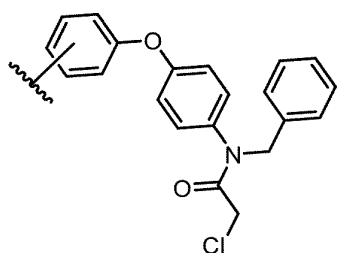
30

を有する。

【0316】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化124】



40

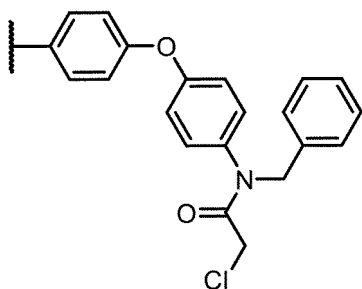
を有する。

【0317】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

【化 1 2 5】



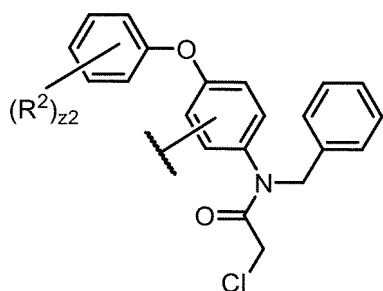
10

を有する。

【0 3 1 8】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 2 6】



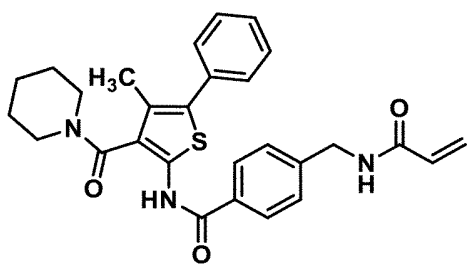
20

を有する。

【0 3 1 9】

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、以下の式の一価形態である：

【化 1 2 7】



30

。

【0 3 2 0】

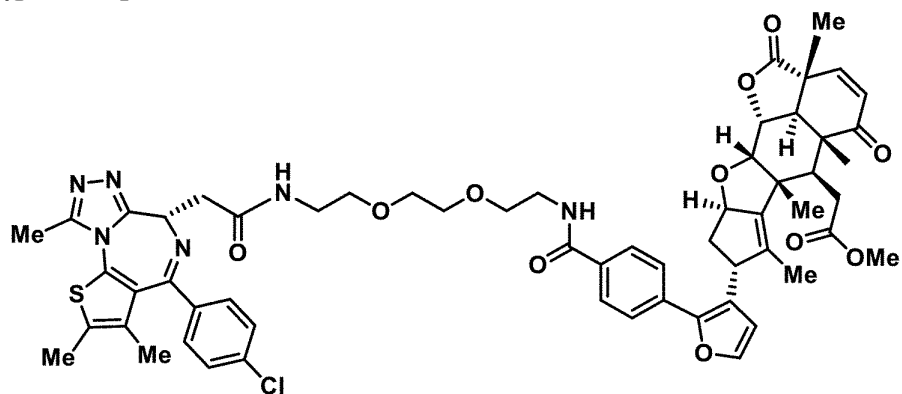
実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

40

50



【化 1 3 1】

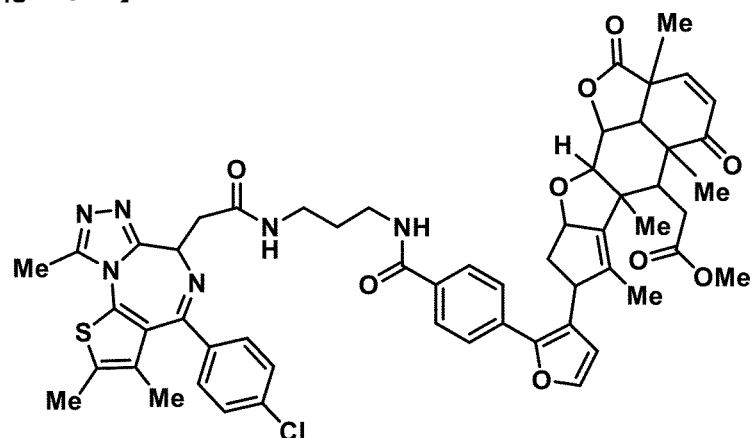


10

【 0 3 2 4】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

【化 1 3 2】

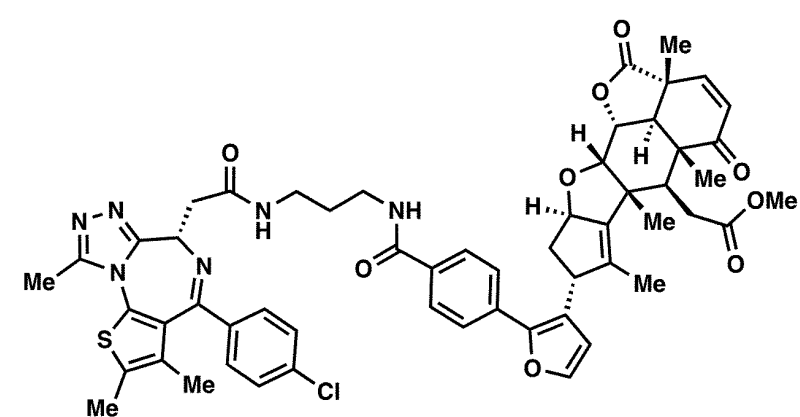


20

【 0 3 2 5】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

【化 1 3 3】



40

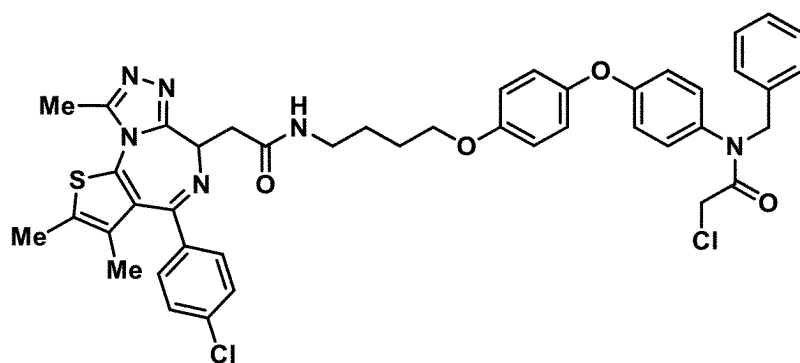
【 0 3 2 6】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

50



【化 1 3 4】

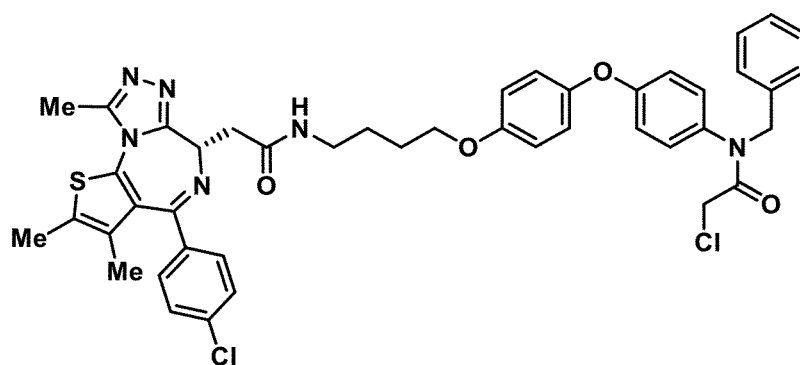


10

【 0 3 2 7】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

【化 1 3 5】

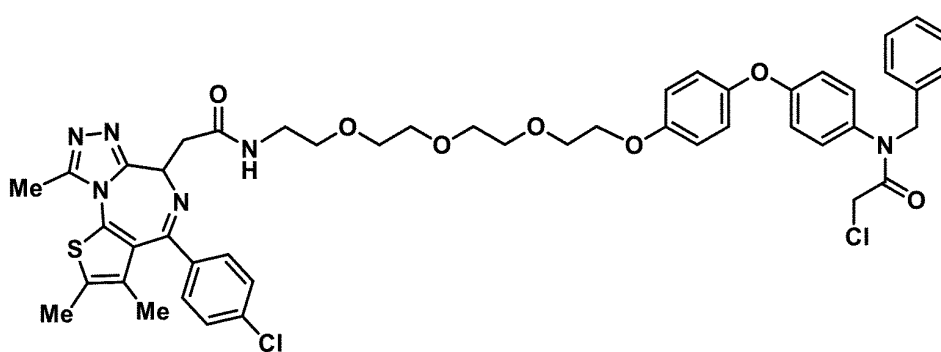


20

【 0 3 2 8】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

【化 1 3 6】



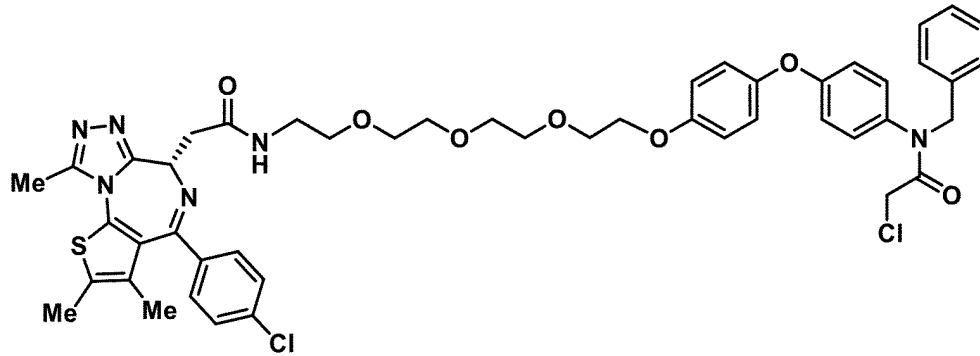
40

【 0 3 2 9】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

50

【化 1 3 7】

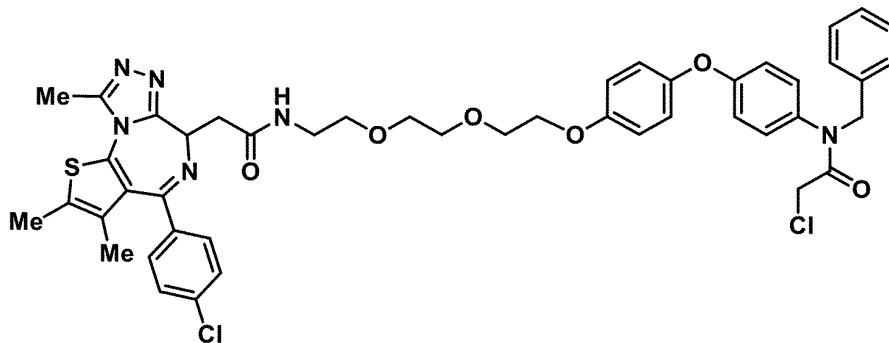


10

【 0 3 3 0】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

【化 1 3 8】

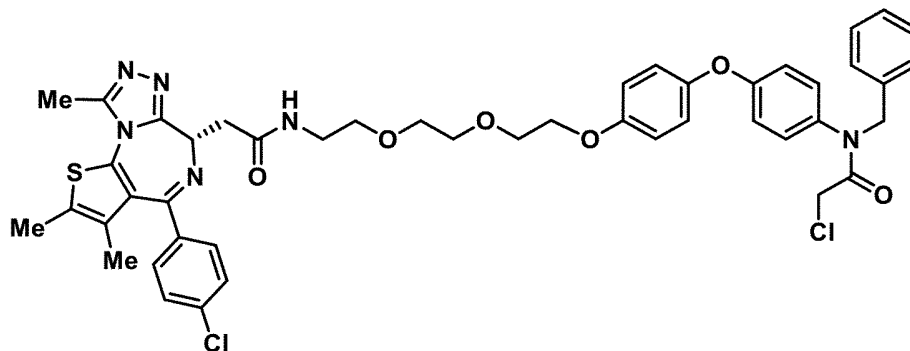


20

【 0 3 3 1】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、以下の式を有する：

【化 1 3 9】



30

【 0 3 3 2】

実施形態では、標的タンパク質分解剤は、本明細書（例えば、一態様では、実施形態、実施例、表、図、または特許請求の範囲）に記載の化合物である。実施形態では、化合物は、本明細書（例えば、一態様では、実施形態、実施例、表、図、または特許請求の範囲）に記載の化合物である。実施形態では、化合物は、本明細書（例えば、一態様では、実施形態、実施例、表、図、または特許請求の範囲）に記載の標的タンパク質分解剤である。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、本明細書（例えば、一態様では、実施形態、実施例、表、図、または特許請求の範囲）に記載の化合物の一価形態である。実

50

施形態では、標的タンパク質結合剤は、本明細書（例えば、一態様では、実施形態、実施例、表、図、または特許請求の範囲）に記載の化合物の一態様である。

【0333】

III. 薬学的組成物

一態様では、実施形態を含む本明細書に記載されるような化合物（本明細書に記載されるような標的タンパク質分解剤）と、薬学的に許容される賦形剤と、を含む薬学的組成物が提供される。実施形態では、本明細書に記載されるような化合物は、治療有効量で含まれる。

【0334】

薬学的組成物の実施形態では、化合物またはその薬学的に許容される塩は、治療有効量で含まれる。

【0335】

薬学的組成物の実施形態では、薬学的組成物は、第2の薬剤（例えば、治療薬）を含む。薬学的組成物の実施形態では、薬学的組成物は、第2の薬剤（例えば、治療薬）を治療有効量で含む。薬学的組成物の実施形態では、第2の薬剤は、癌を治療するために薬剤である。実施形態では、第2の薬剤は、抗癌剤である。実施形態では、第2の薬剤は、化学療法薬である。実施形態では、第2の薬剤は、抗炎症剤である。実施形態では、投与することは、列挙される活性薬剤（例えば、本明細書に記載の化合物）以外のいずれの活性薬剤の投与も含まない。

【0336】

薬学的組成物は、本明細書に開示される調節因子の光学異性体、ジアステレオマー、または薬学的に許容される塩を含み得る。薬学的組成物に含まれる化合物は、担体部分に共有結合していてもよい。あるいは、薬学的組成物に含まれる化合物は、担体部分に共有結合していない。

【0337】

一態様では、標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載されるようなもの、または本明細書に記載される化合物）と、薬学的に許容される賦形剤と、を含む薬学的組成物が提供される。

【0338】

実施形態では、薬学的組成物は、有効量の標的タンパク質分解剤を含む。実施形態では、薬学的組成物は、治療有効量の標的タンパク質分解剤を含む。実施形態では、薬学的組成物は、第2の薬剤を含む。薬学的組成物の実施形態では、薬学的組成物は、第2の薬剤を治療有効量で含む。

【0339】

IV. 使用方法

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる（例えば、対照と比較して低下させる）方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法が提供される。実施形態では、標的タンパク質分解剤は、本明細書に記載の化合物である。

【0340】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる（例えば、対照と比較して低下させる）方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載のE3ユビキチンリガーゼ結合剤）と接触させることを含む、方法が提供される。実施形態では、標的タンパク質分解剤は、本明細書に記載の化合物である。

【0341】

実施形態では、この方法は、（A）標的タンパク質分解剤に接触する細胞タンパク質をユビキチン化させ、それによってユビキチン化細胞タンパク質を形成するステップと、（B）ユビキチン化細胞タンパク質をプロテアソームと接触させ、それによってユビキチン化細胞タンパク質-プロテアソーム複合体を形成するステップと、プロテアソームにより

10

20

30

40

50

細胞タンパク質をタンパク質分解するステップと、をさらに含む。

【0342】

一態様では、癌を治療する方法であって、癌に関連する細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載の化合物）と接触させることを含む、方法が提供される。

【0343】

一態様では、癌を治療する方法であって、癌に関連する細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載の化合物または本明細書に記載の E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤）と接触させることを含む、方法が提供される。

【0344】

一態様では、癌を治療する方法であって、実施形態を含む明細書に記載の標的タンパク質分解剤の治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法が提供される。

【0345】

実施形態では、癌は、乳癌である。実施形態では、癌は、トリプルネガティブ乳癌である。実施形態では、癌は、腎細胞癌である。実施形態では、癌は、濾胞性リンパ腫である。実施形態では、癌は、膠芽細胞腫である。実施形態では、癌は、結腸直腸癌である。実施形態では、癌は、子宮内膜癌である。実施形態では、癌は、肺癌である。実施形態では、癌は、膵臓癌である。実施形態では、癌は、黒色腫である。実施形態では、癌は、急性骨髄性白血病である。実施形態では、癌は、子宮内膜癌である。実施形態では、癌は、非ホジキンリンパ腫である。実施形態では、癌は、マントル細胞リンパ腫である。実施形態では、この方法は、免疫調節を含む。実施形態では、この方法は、癌免疫療法（例えば、免疫刺激剤、免疫毒素、または放射免疫療法）を含む。

【0346】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤-細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤と、(ii) 標的タンパク質結合剤と、(iii) E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤および標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

【0347】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤-細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) 一価の E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤と、(ii) 一価の標的タンパク質結合剤と、(iii) 一価の E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤および一価の標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補 E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

【0348】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤-細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の E 3 ユビキチンリガーゼ

10

20

30

40

50

結合剤)と、(i i) 標的タンパク質結合剤と、(i i i) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤および標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

#### 【0349】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤-細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) 一価のE3 ユビキチンリガーゼ結合剤(例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載のE3 ユビキチンリガーゼ結合剤)と、(i i) 一価の標的タンパク質結合剤と、(i i i) 一価のE3 ユビキチンリガーゼ結合剤および一価の標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

#### 【0350】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤と、(i i) 標的タンパク質結合剤と、(i i i) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤および標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

#### 【0351】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) 一価のE3 ユビキチンリガーゼ結合剤と、(i i) 一価の標的タンパク質結合剤と、(i i i) 一価のE3 ユビキチンリガーゼ結合剤および一価の標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

#### 【0352】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤(例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載のE3 ユビキチンリガーゼ結合剤)と、(i i) 標的タンパク質結合剤と、(i i i) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤および標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させ

て、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

【0353】

一態様では、細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、(i)一価のE3ユビキチンリガーゼ結合剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載のE3ユビキチンリガーゼ結合剤）と、(ii)一価の標的タンパク質結合剤と、(iii)一価のE3ユビキチンリガーゼ結合剤および一価の標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法が提供される。実施形態では、この方法は、接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成されることをさらに含む。実施形態では、この方法は、合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤から同定されることをさらに含む。

10

【0354】

実施形態では、この方法は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、(i)E3ユビキチンリガーゼタンパク質を候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤の混合物と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するステップと、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体から、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤を、E3ユビキチンリガーゼ結合剤として同定するステップと、を含む方法によって同定されることをさらに含む。

20

【0355】

実施形態では、この方法は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、(i)E3ユビキチンリガーゼタンパク質を候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤を含む化合物の混合物と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するステップと、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体から、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤を含む化合物を、E3ユビキチンリガーゼ結合剤を含む化合物として同定するステップと、を含む方法によって同定されることをさらに含む。

30

【0356】

実施形態では、この方法は、(i)E3ユビキチンリガーゼタンパク質を複数のE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するステップと、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体から、E3ユビキチンリガーゼ結合剤を、E3ユビキチンリガーゼ結合剤として同定するステップと、をさらに含む。

【0357】

実施形態では、この方法は、(i)E3ユビキチンリガーゼタンパク質を複数の候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するステップと、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体から、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤を、E3ユビキチンリガーゼ結合剤として同定するステップと、をさらに含む。

40

【0358】

実施形態では、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、共有結合システイン修飾因子部分を含み、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するための、E3ユビキチンリガーゼ結合剤のE3ユビキチンリガーゼタンパク質への共有結合の検出により、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤として同定される。

【0359】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複

50

合体の検出は、検出可能な標識または質量分析の使用を含む。実施形態では、標的タンパク質結合剤は、合成の前に同定される。

#### 【0360】

実施形態では、標的タンパク質結合剤は、(i) 細胞タンパク質を候補標的タンパク質結合剤のライブラリーと混合させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成するステップと、(ii) 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する標的タンパク質結合剤を同定するステップと、を含む方法によって同定される。実施形態では、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する候補標的タンパク質結合剤は、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出により、標的タンパク質結合剤として同定される。実施形態では、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出は、検出可能な標識または質量分析の使用を含む。実施形態では、合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤を修飾して、共有結合システイン修飾因子部分を除去する（例えば、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、化学反応を受けて、共有結合システイン修飾因子部分を除去する）。

10

#### 【0361】

実施形態では、標的タンパク質結合剤は、(i) 細胞タンパク質を候補標的タンパク質結合剤を含む化合物のライブラリーと混合させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成するステップと、(ii) 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する標的タンパク質結合剤を含む化合物を同定するステップと、を含む方法によって同定される。実施形態では、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する候補標的タンパク質結合剤を含む化合物は、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出により、標的タンパク質結合剤を含む化合物として同定される。実施形態では、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出は、検出可能な標識または質量分析の使用を含む。実施形態では、合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤を修飾して、共有結合システイン修飾因子部分を除去する（例えば、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、化学反応を受けて、共有結合システイン修飾因子部分を除去する）。

20

#### 【0362】

実施形態では、細胞タンパク質は、BRD4である。実施形態では、BRD4のレベルは、標的タンパク質分解剤が存在しない場合と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000を超えて、または10,000倍を超えて低下する。実施形態では、BRD4のレベルは、標的タンパク質分解剤が存在しない場合と比較して、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、または約10,000倍低下する。実施形態では、BRD4のレベルは、標的タンパク質分解剤が存在しない場合と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、または10,000倍低下する。

30

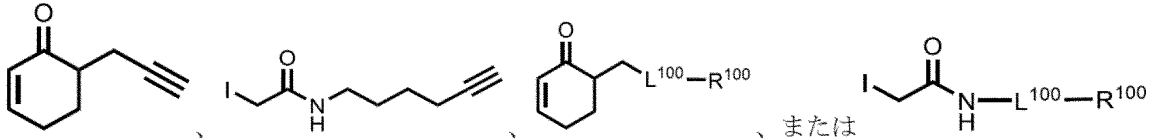
40

#### 【0363】

一態様では、標的タンパク質結合剤が接触する細胞タンパク質を同定する方法であって、(A) 細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルを標的タンパク質結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することと、(B) 得られたステップAの細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルと、標的タンパク質結合剤と接触していない細胞プロテオームまたは細胞の第2のサンプルの両方を、式：

50

## 【化 1 4 0】



(式中、 $L^{100}$ は、共有結合リンカー（例えば、結合、 $-S(O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン）であり、 $R^{100}$ は、検出可能な部分である）を有する化合物と接触させることと、(C)得られたステップBの第1のサンプルを第1の検出可能な薬剤と接触させ、得られたステップBの第2のサンプルを第2の検出可能な薬剤と接触させることと、(D)選択されたタンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルを測定することと、(E)細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することができる細胞タンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルの差を測定することにより、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体中の細胞タンパク質を同定することと、を含む方法が提供される。実施形態では、この方法は、(A)第1または第2の検出可能な薬剤のうちの一方が、原子の軽い同位体を含み、第1または第2の検出可能な薬剤のうちの他方が、原子の重い同位体を含み、(B)選択されたタンパク質の第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルが、液体クロマトグラフィー質量分析によって測定され、(C)標的タンパク質結合剤に結合することができる細胞タンパク質が、第1の検出可能な薬剤に結合した細胞タンパク質のレベルと第2の検出可能な薬剤に結合した細胞タンパク質のレベルとの差によって同定されることをさらに含む。

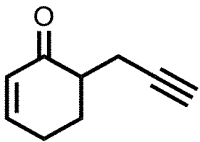
## 【0364】

実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。実施形態では、細胞は、疾患細胞である。実施形態では、細胞は、癌細胞である。実施形態では、細胞は、乳癌細胞である。実施形態では、細胞は、トリプルネガティブ乳癌細胞である。実施形態では、細胞は、231MFP細胞である。実施形態では、細胞は、HCC38細胞である。

## 【0365】

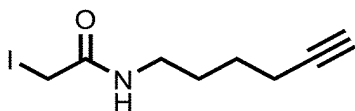
実施形態では、化合物は、

## 【化 1 4 1】



である。実施形態では、化合物は、

## 【化 1 4 2】



である。実施形態では、化合物は、

10

20

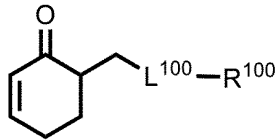
30

40

50

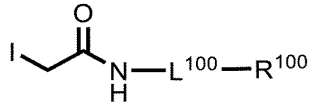


## 【化 1 4 3】



である。実施形態では、化合物は、

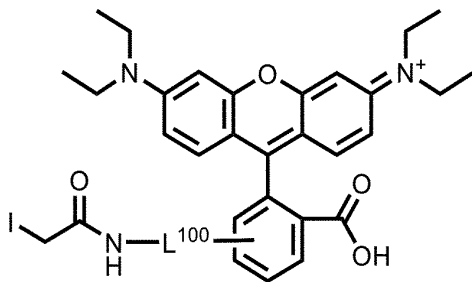
## 【化 1 4 4】



10

である。実施形態では、 $L^{100}$ は、結合、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。実施形態では、 $R^{100}$ は、ローダミン部分である。実施形態では、化合物は、

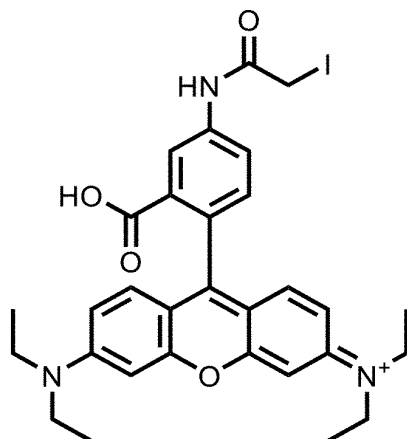
## 【化 1 4 5】



20

であり、 $L^{100}$ は、本明細書に記載の通りである。実施形態では、 $L^{100}$ は、結合、置換もしくは非置換  $C_1 - C_4$  アルキレンである。実施形態では、化合物は、

## 【化 1 4 6】



30

40

である。

## 【0 3 6 6】

実施形態では、 $L^{100}$ は、結合、 $-S(O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1 - C_8$ 、 $C_1 - C_6$ 、 $C_1 - C_4$ 、もしくは  $C_1 - C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば

50

、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。

#### 【0367】

実施形態では、 $L^{100}$ は、結合、 $-S(O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリーレン、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリーレンである。

#### 【0368】

実施形態では、 $L^{100}$ は、置換もしくは非置換アルキレン（例えば、 $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 、 $C_1-C_4$ 、もしくは $C_1-C_2$ ）、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン（例えば、2～8員、2～6員、4～6員、2～3員、もしくは4～5員）、置換もしくは非置換シクロアルキレン（例えば、 $C_3-C_8$ 、 $C_3-C_6$ 、 $C_4-C_6$ 、もしくは $C_5-C_6$ ）、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン（例えば、3～8員、3～6員、4～6員、4～5員、もしくは5～6員）、置換もしくは非置換アリーレン（例えば、 $C_6-C_{10}$ もしくはフェニレン）、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン（例えば、5～10員、5～9員、もしくは5～6員）である。実施形態では、 $L^{100}$ は、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリーレン、または置換（例えば、置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリーレンである。実施形態では、 $L^{100}$ は、非置換アルキレン、非置換ヘテロアルキレン、非置換シクロアルキレン、非置換ヘテロシクロアルキレン、非置換アリーレン、または非置換ヘテロアリーレンである。実施形態では、 $L^{100}$ は、結合である。

#### 【0369】

実施形態では、 $L^{100}$ は、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換シクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、もしくは低級置換基で置換）もしくは非置換アリーレン、または置換（例えば、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で置換）もしくは非置換ヘテロアリーレンである。

#### 【0370】

実施形態では、置換 $L^{100}$ （例えば、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン、および／または置換ヘテロアリーレン）は、少なくとも1つの置換基、サイズ限定置換基、または低級置換基で

置換され、置換  $L^{100}$  が、置換基、サイズ限定置換基、および低級置換基から選択される複数の基で置換されている場合、各置換基、サイズ限定置換基、および／または低級置換基は、任意に異なってもよい。実施形態では、 $L^{100}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{100}$  は、置換されている場合、少なくとも1つのサイズ限定置換基で置換されている。実施形態では、 $L^{100}$  は、置換されている場合、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

#### 【0371】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼシステイン残基（例えば、ヒト RNF4 のシステインアミノ酸またはヒト RF114 のシステインアミノ酸）と接触する。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼシステイン残基（例えば、ヒト RNF4 のシステインアミノ酸またはヒト RF114 のシステインアミノ酸）と接触する。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼは、ヒト RNF4 である。実施形態では、システイン残基は、ヒト RNF4 の C132 である。実施形態では、システイン残基は、ヒト RNF4 の C135 である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼは、ヒト RNF114 である。実施形態では、システイン残基は、ヒト RNF114 の C8 である。

#### 【0372】

一態様では、E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤ー細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、(A) E3 ユビキチンリガーゼを標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤複合体を形成することと、(B) E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤ー細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法である。

#### 【0373】

一態様では、E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤ー細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、(A) E3 ユビキチンリガーゼを標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の標的タンパク質分解剤）と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤複合体を形成することと、(B) E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼー標的タンパク質分解剤ー細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法である。

#### 【0374】

一態様では、細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤ーE3 ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、(A) 細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤複合体を形成することと、(B) 細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤複合体を E3 ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤ーE3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法が提供される。

#### 【0375】

一態様では、細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤ーE3 ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、(A) 細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の標的タンパク質分解剤）と接触させ、それにより細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤複合体を形成することと、(B) 細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤複合体を E3 ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質ー標的タンパク質分解剤ーE3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法が提供される。

#### 【0376】

一態様では、E3 ユビキチンリガーゼーE3 ユビキチンリガーゼ結合剤ー細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、(A) E3 ユビキチンリガーゼを E3 ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼーE3 ユビキチンリガーゼ結

10

20

30

40

50

合剤複合体を形成することと、(B) E3 ユビキチンリガーゼ-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼ-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法である。

【0377】

一態様では、E3 ユビキチンリガーゼ-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、(A) E3 ユビキチンリガーゼを E3 ユビキチンリガーゼ結合剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の E3 ユビキチンリガーゼ結合剤）と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼ-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、(B) E3 ユビキチンリガーゼ-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼ-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法である。

10

【0378】

一態様では、細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-E3 ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、(A) 細胞タンパク質を E3 ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、(B) 細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を E3 ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法が提供される。

【0379】

一態様では、細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-E3 ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、(A) 細胞タンパク質を E3 ユビキチンリガーゼ結合剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の E3 ユビキチンリガーゼ結合剤）と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、(B) 細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を E3 ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ結合剤-E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法が提供される。

20

【0380】

一態様では、細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害する方法であって、E3 ユビキチンリガーゼを E3 ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害することを含む、方法が提供される。

30

【0381】

一態様では、細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害する方法であって、E3 ユビキチンリガーゼを E3 ユビキチンリガーゼ結合剤（例えば、本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の E3 ユビキチンリガーゼ結合剤）と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害することを含む、方法が提供される。

【0382】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼのシステインを共有結合する。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤の不在下で細胞タンパク質に接触して細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することができる E3 ユビキチンリガーゼのアミノ酸で E3 ユビキチンリガーゼに接触する。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼは、ヒト RNF4 である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼは RNF4 であり、システインはヒト RNF4 の C132 である。実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼは RNF4 であり、システインはヒト RNF4 の C135 である。

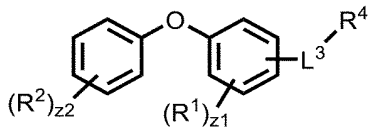
40

【0383】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

## 【化 1 4 7】

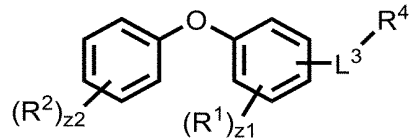


(I) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、z<sub>1</sub>およびz<sub>2</sub>は、実施形態を含む本明細書に記載の通りである。

## 【0 3 8 4】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 1 4 8】



(I) の一価形態である。R<sup>1</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>1</sup>置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。R<sup>2</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>2</sup>置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。L<sup>3</sup>は、結合、-N(R<sup>3</sup>)-、-C(O)-、-C(O)N(R<sup>3</sup>)-、-N(R<sup>3</sup>)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。R<sup>3</sup>は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>

10

20

30

40

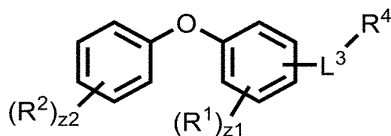
50

、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。 $\text{R}^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEである。Eは求電子性部分である。 $z_1$ は、0～4の整数である。 $z_2$ は、0～5の整数である。唯一つの $\text{R}^1$ または1つの $\text{R}^2$ は、結合剤リンカーへの結合である。

【0385】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化149】



(I)を有する。 $\text{R}^1$ は独立して、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $\text{R}^1$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。 $\text{R}^2$ は独立して、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。

換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。 $L^3$ は、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。 $R^3$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。 $R^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEである。Eは求電子性部分である。 $z_1$ は、0～4の整数である。 $z_2$ は、0～5の整数である。唯1つの $R^1$ または1つの $R^2$ は、結合剤リンカーへの結合である。

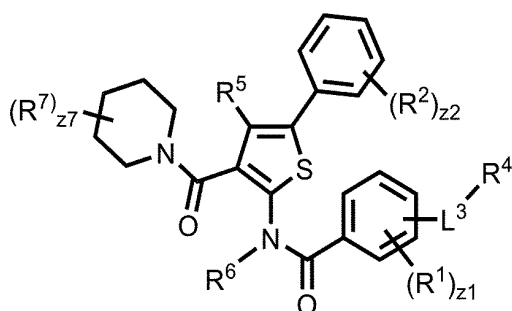
【0386】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼは、ヒトRNF114である。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼはヒトRNF114であり、システインはヒトRNF114のC8である。実施形態では、細胞タンパク質は、p21である。

【0387】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化150】



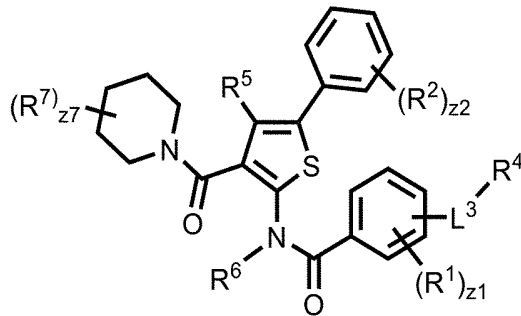
(II)の一価形態である。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $L^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $z_1$ 、 $z_2$ およ

び z 7 は、実施形態を含む本明細書に記載されている通りである。

【0388】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化151】



(II) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>7</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHHSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>1</sup>置換基または2つのR<sup>2</sup>置換基、または2つのR<sup>4</sup>置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHHSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。L<sup>3</sup>は、結合、-N(R<sup>3</sup>)-、-C(O)-、-C(O)N(R<sup>3</sup>)-、-N(R<sup>3</sup>)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。R<sup>3</sup>は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHHSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-O

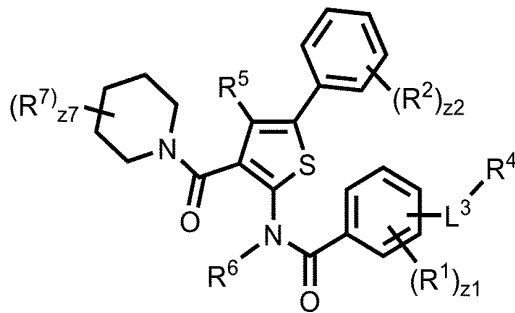


CHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、  
 -N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、  
 置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換  
 もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。R<sup>4</sup>は独立  
 して、水素、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、  
 -CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、  
 -CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH  
 、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)  
 NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHHSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)  
 OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>  
 、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-  
 OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは  
 非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテ  
 ロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリ  
 ール、あるいはEである。Eは求電子性部分である。z<sub>1</sub>は、0～4の整数である。z<sub>2</sub>  
 は、0～5の整数である。z<sub>7</sub>は、0～10の整数である。唯1つのR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>  
 またはR<sup>7</sup>は独立して、結合剤リンカーへの結合である。

【0389】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化152】



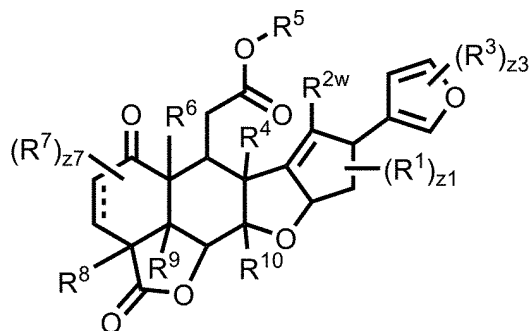
(II)を有する。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>7</sup>は独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、  
 -CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、  
 -CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、  
 -CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、  
 -ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHHSO<sub>2</sub>H、  
 -NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OC  
 Br<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、  
 -OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換も  
 しくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロ  
 アルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、ま  
 たは置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つ  
 のR<sup>1</sup>置換基または2つのR<sup>2</sup>置換基、または2つのR<sup>4</sup>置換基は、任意に結合して、置換  
 もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしく  
 は非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。R<sup>5</sup>お  
 よびR<sup>6</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、  
 -CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-C  
 H<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、  
 -SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC  
 (O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHHSO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC  
 (O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OC  
 HCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>B

$r$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。 $\text{L}^3$ は、結合、 $-\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^3)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。 $\text{R}^3$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。 $\text{R}^4$ は独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはEである。Eは求電子性部分である。 $z_1$ は、0～4の整数である。 $z_2$ は、0～5の整数である。 $z_7$ は、0～10の整数である。唯一つの $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ または $\text{R}^7$ は独立して、結合剤リンカーへの結合である。

【0390】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化153】



(IIIa-1)の一価形態である。 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^{2w}$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 、 $\text{R}^{10}$ 、 $z_1$ 、 $z_3$ および $z_7$ は、本明細書に記載の通りである。

【0391】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

10

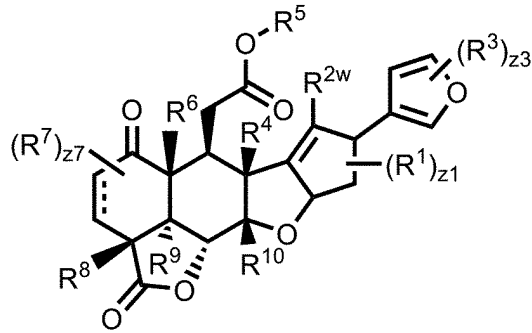
20

30

40

50

## 【化 1 5 4】



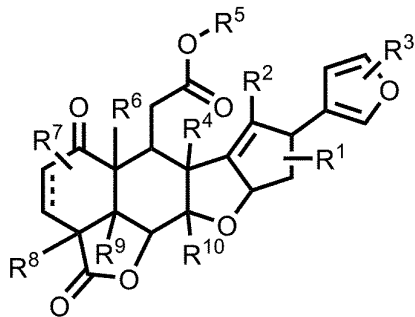
10

(III) の一価形態である。 $R^1$ 、 $R^{2w}$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $z_1$ 、 $z_3$ および $z_7$ は、本明細書に記載の通りである。

## 【0 3 9 2】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 1 5 5】



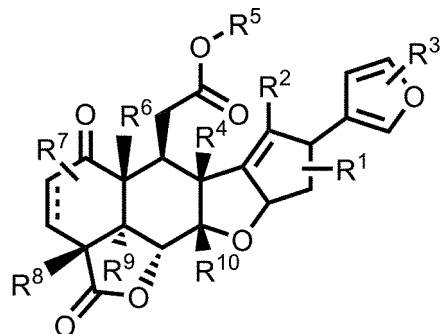
20

(III) の一価形態である。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ は、実施形態を含む本明細書に記載されている通りである。

## 【0 3 9 3】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

## 【化 1 5 6】



40

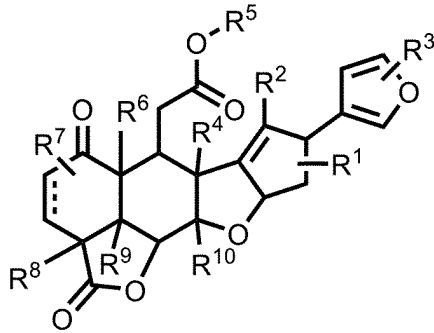
(III) の一価形態である。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ は、実施形態を含む本明細書に記載されている通りである。

## 【0 3 9 4】

実施形態では、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

50

【化 1 5 7】



10

(I I I) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。唯一つのR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>またはR<sup>10</sup>は、結合剤リンカーへの結合である。

20

【化 1 5 8】



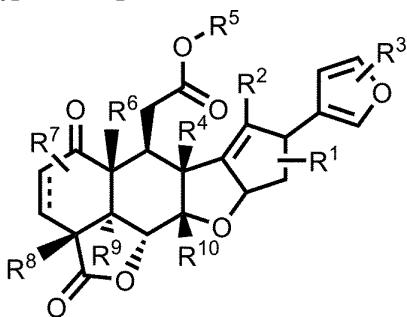
は、単結合または二重結合である。

【0 3 9 5】

30

実施形態では、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化 1 5 9】



40

(I I I) の一価形態である。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>およびR<sup>10</sup>は独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置

50

換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。唯1つの $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ または $R^{10}$ は、結合剤リンカーへの結合である。

【化160】

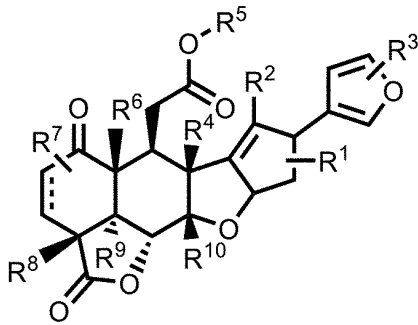


は、単結合または二重結合である。

【0396】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、式：

【化161】



(III)を有する。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ は独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合である。唯1つの $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ または $R^{10}$ は、結合剤リンカーへの結合である。

【化162】



は、単結合または二重結合である。

【0397】

実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤の不在で安定な二次または三次立体配座構造を欠くE3ユビキチンリガーゼのアミノ酸と接触する。実施形態では、E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触するアミノ酸は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触すると、安定な二次または三次立体配座構造をとる。

【0398】

本明細書に記載の実施例および実施形態は例示目的のみのためであり、それを考慮した様々な修正または変更が当業者に示唆され、本出願および添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲内に含まれるべきである。本明細書で引用される全ての刊行物、特許、および特許出願は、全ての目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0399】

## V. 実施形態

実施形態 P 1. 1) 一価の標的タンパク質結合剤および 2) 一価の E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤を含む標的タンパク質分解剤であって、E 3 ユビキチンリガーゼが、ヒト R N F 4 またはヒト R N F 1 1 4 である、標的タンパク質分解剤。

【0400】

実施形態 P 2. E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、E 3 ユビキチンリガーゼのシステインと共有結合を形成することができる、実施形態 P 1 の標的タンパク質分解剤。

【0401】

実施形態 P 3. 標的タンパク質結合剤および E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、結合剤リンカーによって共有結合している、実施形態 P 1 または P 2 の標的タンパク質分解剤。

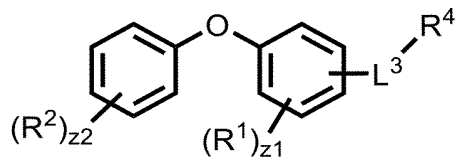
【0402】

実施形態 P 4. E 3 ユビキチンリガーゼが、ヒト R N F 4 である、実施形態 P 1 ~ P 3 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0403】

実施形態 P 5. E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化 1 6 3】



(I) を有する一価の化合物であり、

式中、

$R^1$  が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2 つの  $R^1$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^2$  が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2 つの  $R^2$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$L^3$ が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

$z_1$ が、0～4の整数であり、

$z_2$ が、0～5の整数であり、

唯1つの $R^1$ または1つの $R^2$ が、結合剤リンカーへの結合である、実施形態P1～P4のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0404】

実施形態P6.

$R^1$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基が、任意に結合して、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^{11}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、-

CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>1 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>1 2</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>1 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>1 2</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>1 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>1 2</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールであり、

10

R<sup>1 2</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールであり、

20

R<sup>2</sup>が独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>2</sup>置換基が、任意に結合して、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>2 1</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールを形成してもよく、

30

R<sup>2 1</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>2 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>2 2</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>2 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>2 2</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>2 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>2 2</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールであり、

40

R<sup>2 2</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-

50



CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールであり、

10

L<sup>3</sup>が、結合、-N(R<sup>3</sup>)-、-C(O)-、-C(O)N(R<sup>3</sup>)-、-N(R<sup>3</sup>)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、R<sup>3</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキレン、R<sup>3</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキレン、R<sup>3</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキレン、R<sup>3</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキレン、R<sup>3</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリーレン、またはR<sup>3</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリーレンであり、

R<sup>3</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>3 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>3 1</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>3 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>3 1</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>3 1</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>3 1</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールであり、

20

R<sup>3 1</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>3 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>3 2</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>3 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>3 2</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>3 2</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>3 2</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールであり、

30

R<sup>3 2</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールであり、

40

50

、  
 $R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{41}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{41}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{41}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{41}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{41}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{41}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいはEであり、

$R^{41}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{42}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{42}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$R^{42}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである、実施形態P1～P5のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0405】

実施形態P7。 $R^2$ が独立して、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_3$ アルキル、非置換2～3員ヘテロアルキル、または結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して、非置換フェニルを形成してもよく、 $R^{21}$ が独立して、 $-OH$ である、実施例P6の標的タンパク質分解剤。

【0406】

実施形態P8。 $Z_2$ が1であり、 $R^2$ が結合剤リンカーへの結合である、実施形態P6またはP7の標的タンパク質分解剤。

【0407】

実施形態P9。 $R^1$ が独立して、ハロゲンである、実施形態P6～P8のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0408】

実施形態P10。 $z_1$ が0である、実施形態P6～P9のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

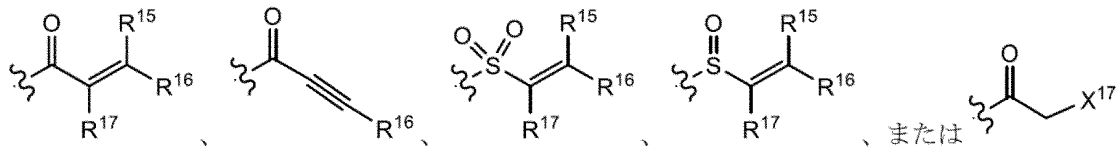
## 【0409】

実施形態P11.  $L^3$ が、 $-N(R^3)-$ であり、  
 $R^3$ が独立して、 $R^{31}$ 置換メチル、非置換フェニル、または非置換5～6員ヘテロアリールであり、  
 $R^{31}$ が独立して、非置換フェニル、または非置換5～6員ヘテロアリールである、実施形態P6～P10のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

## 【0410】

実施形態P12. Eが、

## 【化164】



10

であり、

$R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

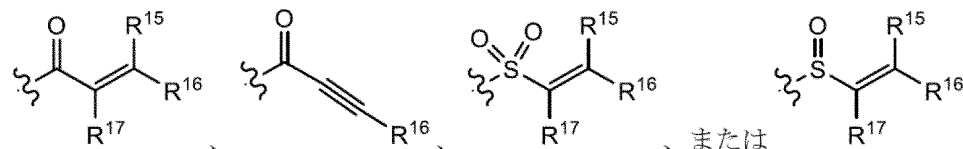
20

$X^{17}$ が、ハロゲンである、実施形態P6～P11のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

## 【0411】

実施形態P13. Eが、

## 【化165】



30

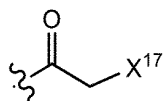
であり、

$R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ が独立して、水素である、実施形態P6～P12のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

## 【0412】

実施形態P14. Eが、

## 【化166】



40

であり、 $X^{17}$ が独立して、 $-Cl$ である、実施形態P6～P12のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

## 【0413】

実施形態P15. E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF114である、実施形態P1

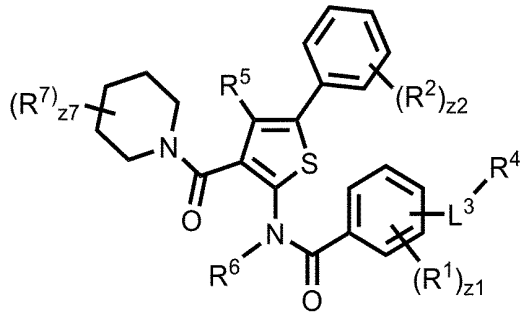
50

～P 3のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0414】

実施形態P 16．E 3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化167】



10

(I I)を有する一価の化合物であり、

式中、

$R^1$ および $R^2$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基または2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

20

30

$R^5$ および $R^6$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

40

$R^7$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

50

テロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^7$ 置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、 $L^3$ が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

$z_1$ が、0～4の整数であり、

$z_2$ が、0～5の整数であり、

$z_7$ が、0～10の整数であり、

唯一つの $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ または $R^7$ が独立して、結合剤リンカーへの結合である、実施形態P1～P3、およびP15のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

#### 【0415】

実施形態P17.

$R^1$ 、 $R^2$ および $R^7$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5

～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基または2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^5$ および $R^6$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

$R^7$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^7$ 置換基が、任意に結合して、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^{51}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$L^3$ が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリーレン、または $R^3$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CH$

10

20

30

40

50



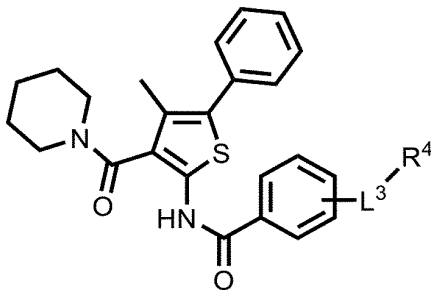
O)  $\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$\text{R}^{42}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである、実施形態P16の標的タンパク質分解剤。

【0416】

実施形態P18．E3コピキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化168】



を有する一価の化合物である、実施形態P17の標的タンパク質分解剤。

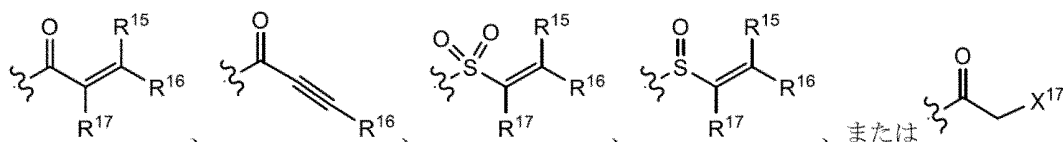
【0417】

実施形態P19． $\text{L}^3$ が $-\text{CH}_2\text{NH}-$ である、実施形態P17またはP18の標的タンパク質分解剤。

【0418】

実施形態P20．Eが、

【化169】



であり、

$\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$ および $\text{R}^{17}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、

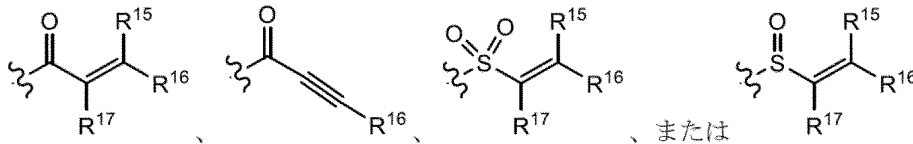


$-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、  
 $\text{X}^{17}$  が、ハロゲンである、実施形態 P 1 7 ~ P 1 9 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0419】

実施形態 P 2 1 . E が、

【化170】



10

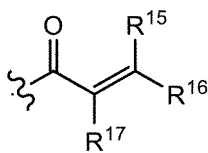
であり、

$\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$  および  $\text{R}^{17}$  が独立して、水素である、実施形態 P 1 7 ~ P 2 0 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0420】

実施形態 P 2 2 . E が、

【化171】



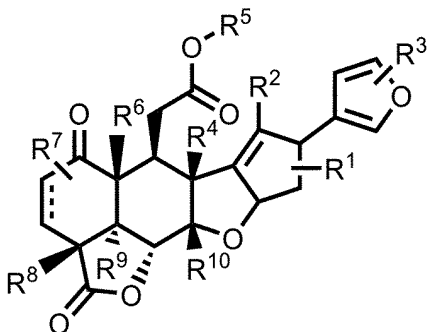
20

であり、 $\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$  および  $\text{R}^{17}$  が独立して、水素である、実施形態 P 1 7 ~ P 2 1 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0421】

実施形態 P 2 3 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式を有する一価の化合物であり、

【化172】



30

40

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$  および  $\text{R}^{10}$  が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、  
 $\text{X}^{17}$  が、ハロゲンである、実施形態 P 1 7 ~ P 1 9 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

50

$\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

唯一つの $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ または $\text{R}^{10}$ が、結合剤リンカーへの結合であり、

【化173】



10

が、単結合または二重結合である、実施形態P1～P3およびP15のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0422】

実施形態P24.

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ および $\text{R}^{10}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $\text{R}^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

20

唯一つの $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ または $\text{R}^{10}$ が、結合剤リンカーへの結合であり、

30

$\text{R}^{51}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである、実施形態P23の標的タンパク質分解剤。

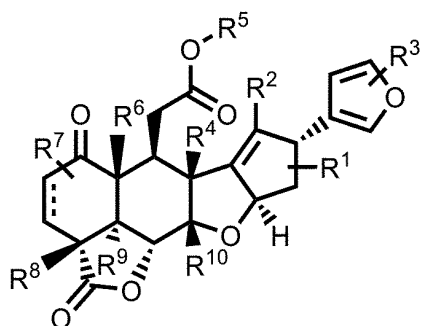
40

【0423】

実施形態P25. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

50

【化 1 7 4】



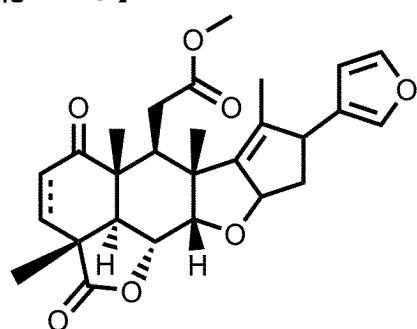
10

を有する一価の化合物である、実施形態 P 2 3 の標的タンパク質分解剤。

【 0 4 2 4】

実施形態 P 2 6 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化 1 7 5】



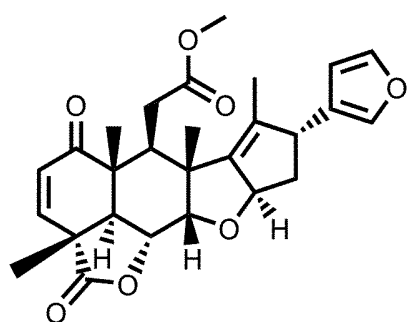
20

を有する一価の化合物である、実施形態 P 2 4 の標的タンパク質分解剤。

【 0 4 2 5】

実施形態 P 2 7 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化 1 7 6】



30

を有する一価の化合物である、実施形態 P 2 4 の標的タンパク質分解剤。

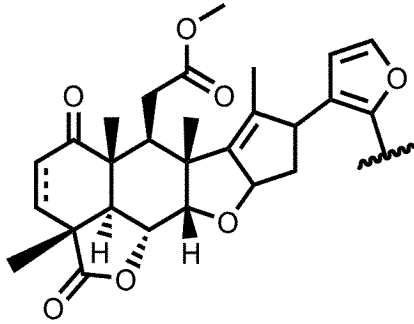
【 0 4 2 6】

実施形態 P 2 8 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

40

50

【化 1 7 7】



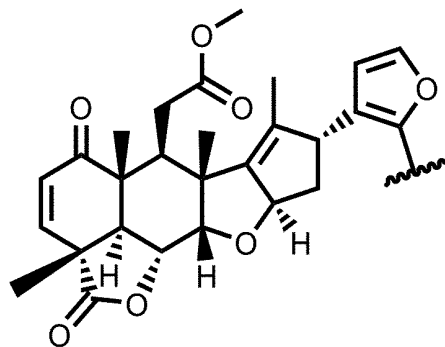
10

を有する、実施形態 P 2 4 の標的タンパク質分解剤。

【 0 4 2 7】

実施形態 P 2 9 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化 1 7 8】



20

を有する、実施形態 P 2 4 の標的タンパク質分解剤。

【 0 4 2 8】

実施形態 P 3 0 . 結合剤リンカーが、 $L^{11} - L^{12} - L^{13} - L^{14}$ であり、 $L^{11}$ が、E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤に直接接続し、 $L^{11}$ が、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーであり、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$ および $L^{14}$ が独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである、実施形態 P 3 ~ P 2 9 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

30

40

【 0 4 2 9】

実施形態 P 3 1 .

$L^{11}$ が、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)$

50

) NH-、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換  $C_1-C_{20}$  アルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 2～20員ヘテロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリーレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 5～10員ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーであり、

$L^{12}$ 、 $L^{13}$  および  $L^{14}$  が独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換  $C_1-C_{20}$  アルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 2～20員ヘテロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換  $C_6-C_{10}$  アリーレン、 $R^{61}$ 置換もしくは非置換 5～10員ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーであり、

$R^{61}$  が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換  $C_1-C_8$  アルキル、非置換 2～8員ヘテロアルキル、非置換  $C_3-C_8$  シクロアルキル、非置換 3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または非置換 5～10員ヘテロアリールである、実施形態 P 30 の標的タンパク質分解剤。

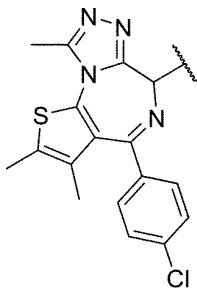
【0430】

実施形態 P 32 . 標的タンパク質結合剤が、疾患に関連する標的タンパク質に結合することができる、実施形態 P 1～P 31 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0431】

実施形態 P 33 . 標的タンパク質結合剤が

【化 179】



であり、標的タンパク質結合剤が、BRD 4 に結合する、実施形態 P 1～P 32 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0432】

実施形態 P 34 . 実施形態 P 1～P 33 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤と、薬学的に許容される賦形剤と、を含む、薬学的組成物。

【0433】

実施形態 P 35 . 細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法。

【0434】

実施形態 P 36 . 細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を実施形態 P 1～P 33 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方

法。

【0435】

実施形態P37.

A) 標的タンパク質分解剤に接触する細胞タンパク質をユビキチン化させ、それによってユビキチン化細胞タンパク質を形成するステップと、

B) ユビキチン化細胞タンパク質をプロテアソームと接触させ、それによってユビキチン化細胞タンパク質-プロテアソーム複合体を形成するステップと、

C) プロテアソームにより細胞タンパク質をタンパク質分解するステップと、をさらに含む、実施形態P35またはP36の方法。

【0436】

実施形態P38. 癌を治療する方法であって、癌に関連する細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法。

【0437】

実施形態P39. 癌を治療する方法であって、実施形態P1~P33のうちの1つの標的タンパク質分解剤の治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【0438】

実施形態P40. 細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤-細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、

i) 一価のE3ユビキチンリガーゼ結合剤と、

ii) 一価の標的タンパク質結合剤と、

iii) 一価のE3ユビキチンリガーゼ結合剤および一価の標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法。

【0439】

実施形態P41. 接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成される、実施形態P40の方法。

【0440】

実施形態P42. 合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤から同定される、実施形態P41の方法。

【0441】

実施形態P43. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、

i) E3ユビキチンリガーゼタンパク質を候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤の混合物と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するステップと、

ii) E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体から、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤を、E3ユビキチンリガーゼ結合剤として同定するステップと、を含む方法によって同定される、実施形態P42の方法。

【0442】

実施形態P44. 候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、共有結合システイン修飾因子部分を含み、E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するための、E3ユビキチンリガーゼ結合剤のE3ユビキチンリガーゼタンパク質への共有結合の検出により、候補E3ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3ユビキチンリガーゼ結合剤として同定される、実施形態P43の方法。

【0443】

実施形態P45. E3ユビキチンリガーゼタンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体の検出は、検出可能な標識または質量分析の使用を含む、実施形態P44の方法。

【0444】

実施形態P46. 合成の前に、標的タンパク質結合剤が同定される、実施形態P40の方法。

10

20

30

40

50

## 【0445】

実施形態P47. 標的タンパク質結合剤が、

i) 細胞タンパク質を候補標的タンパク質結合剤の混合物と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成するステップと、

ii) 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する標的タンパク質結合剤を同定するステップと、を含む方法によって同定される、実施形態46の方法。

## 【0446】

実施形態P48. 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する候補標的タンパク質結合剤が、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出により、標的タンパク質結合剤として同定される、実施形態P47の方法。

## 【0447】

実施形態P49. 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出が、検出可能な標識または質量分析の使用を含む、実施形態P48の方法。

## 【0448】

実施形態P50. 合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤を修飾して、共有結合システイン修飾因子部分を除去する、実施形態P40の方法。

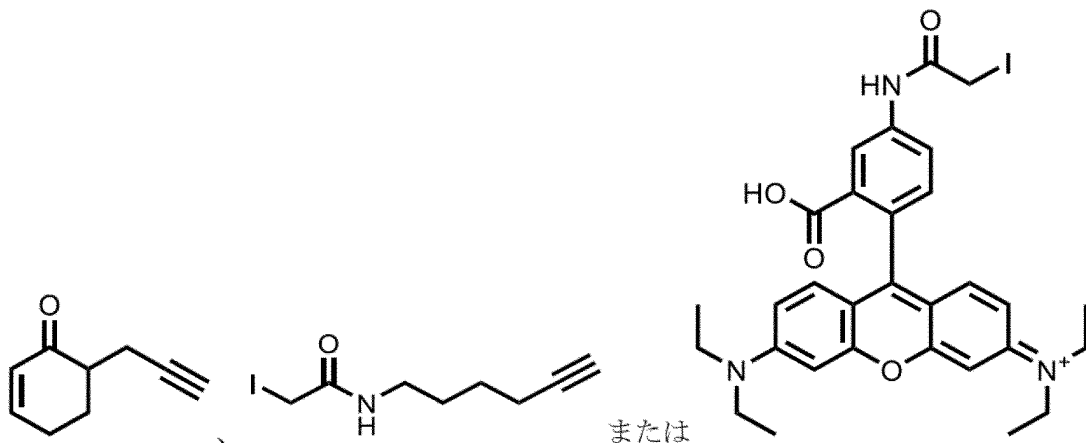
## 【0449】

実施形態P51. 標的タンパク質結合剤が接触する細胞タンパク質を同定する方法であって、

A) 細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルを標的タンパク質結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することと、

B) 得られたステップAの細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルと、標的タンパク質結合剤と接触していない細胞プロテオームまたは細胞の第2のサンプルの両方を、式：

## 【化180】



を有する化合物と接触させることと、

C) 得られたステップBの第1のサンプルを第1の検出可能な薬剤と接触させ、得られたステップBの第2のサンプルを第2の検出可能な薬剤と接触させることと、

D) 選択されたタンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルを測定することと、

E) 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することができる細胞タンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルの差を測定することにより、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体中の細胞タンパク質を同定することと、を含む、方法。

## 【0450】

実施形態P52.

A) 第1または第2の検出可能な薬剤のうちの一方が、原子の軽い同位体を含み、第1または第2の検出可能な薬剤のうちの他方が、原子の重い同位体を含み、

B) 選択されたタンパク質の第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルが、液体クロマトグラフィー質量分析によって測定され、

C) 標的タンパク質結合剤に結合することができる細胞タンパク質が、第1の検出可能な薬剤に結合した細胞タンパク質のレベルと第2の検出可能な薬剤に結合した細胞タンパク質のレベルとの差によって同定される、実施形態51に記載の方法。

【0451】

実施形態P53. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼシステイン残基と接触する、実施形態P35～P52のうちの1つの方法。

【0452】

実施形態P54. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼシステイン残基と共有結合する、実施形態P53の方法。

【0453】

実施形態P55. E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF4である、実施形態P53またはP54の方法。

【0454】

実施形態P56. システイン残基が、ヒトRNF4のC132である、実施形態P55の方法。

【0455】

実施形態P57. システイン残基が、ヒトRNF4のC135である、実施形態P55の方法。

【0456】

実施形態P58. E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF114である、実施形態P53またはP54の方法。

【0457】

実施形態P59. システイン残基が、ヒトRNF114のC8である、実施形態P58の方法。

【0458】

実施形態P60. E3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、

A) E3ユビキチンリガーゼをE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、

B) E3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法。

【0459】

実施形態P61. 細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-E3ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、

A) 細胞タンパク質をE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、

B) 細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体をE3ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-E3ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法。

【0460】

実施形態P62. 細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害する方法であって、E3ユビキチンリガーゼをE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害することを含む、方法。

【0461】

10

20

30

40

50



実施形態 P 6 3 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、E 3 ユビキチンリガーゼのシステインを共有結合する、実施形態 P 6 0 ~ P 6 2 のうちの 1 つの方法。

【0462】

実施形態 P 6 4 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、細胞タンパク質と接触して E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤の不在下で細胞タンパク質-E 3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することができる E 3 ユビキチンリガーゼのアミノ酸で E 3 ユビキチンリガーゼと接触する、実施形態 P 6 2 または P 6 3 の方法。

【0463】

実施形態 P 6 5 . E 3 ユビキチンリガーゼが、ヒト R N F 4 である、実施形態 P 6 0 ~ P 6 4 のうちの 1 つの方法。

【0464】

実施形態 P 6 6 . E 3 ユビキチンリガーゼが R N F 4 であり、システインがヒト R N F 4 の C 1 3 2 である、実施形態 P 6 3 または P 6 4 の方法。

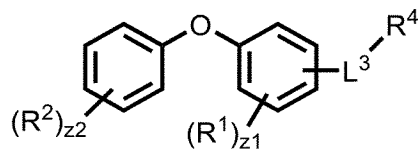
【0465】

実施形態 P 6 7 . E 3 ユビキチンリガーゼが R N F 4 であり、システインがヒト R N F 4 の C 1 3 5 である、実施形態 P 6 3 または P 6 4 の方法。

【0466】

実施形態 P 6 8 . E 3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化 1 8 1】



(I) を有し、

式中、

R<sup>1</sup> が独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>F、-OCH<sub>2</sub>I、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの R<sup>1</sup> 置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

R<sup>2</sup> が独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>F、-OCH<sub>2</sub>I、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール

であり、2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$L^3$ が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

$z_1$ が、0～4の整数であり、

$z_2$ が、0～5の整数である、実施形態P65～P67のうちの1つの方法。

【0467】

実施形態P69．E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF114である、実施形態P60～P64のうちの1つの方法。

【0468】

実施形態P70．E3ユビキチンリガーゼがヒトRNF114であり、システインがヒトRNF114のC8である、実施形態P63またはP64の方法。

【0469】

実施形態P71．細胞タンパク質が、p21である、実施形態P69またはP70の方法。

【0470】

実施形態P72．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式を有し、

10

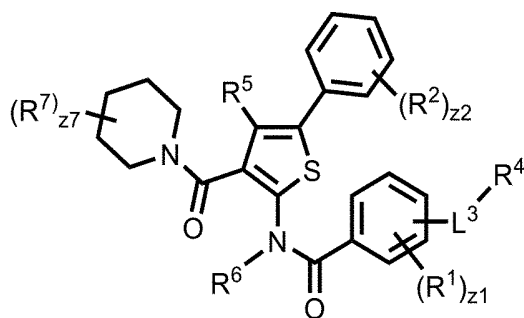
20

30

40

50

## 【化 1 8 2】



10

$R^1$  および  $R^2$  が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの  $R^1$  置換基または2つの  $R^2$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

20

$R^5$  および  $R^6$  が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

30

$R^7$  が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの  $R^7$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

40

$L^3$  が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O$

50

一、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

$z_1$ が、0～4の整数であり、

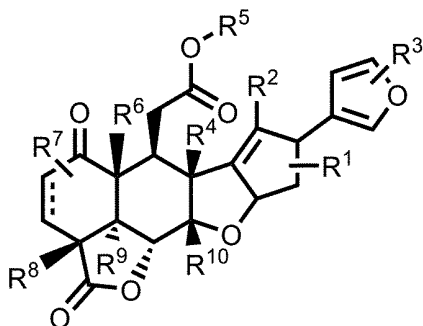
$z_2$ が、0～5の整数であり、

$z_7$ が、0～10の整数である、実施形態P69～P71のうちの1つの方法。

【0471】

実施形態P73．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式を有し、

【化183】



$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2$

F、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、  
【化184】



が、単結合または二重結合である、実施形態P69～P71のうちの1つの方法。

【0472】

実施形態P74．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼ結合剤の不在で安定な二次または三次立体配座構造を欠くE3ユビキチンリガーゼのアミノ酸と接触する、実施形態P35～P73のうちの1つの方法。

【0473】

実施形態P75．E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触するアミノ酸が、E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触すると、安定な二次または三次立体配座構造をとる、実施形態P74の方法。

【0474】

VI．追加の実施形態

実施形態1．1) 標的タンパク質結合剤および2) E3ユビキチンリガーゼ結合剤を含む標的タンパク質分解剤であって、E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF4またはヒトRNF114である、標的タンパク質分解剤。

【0475】

実施形態2．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼのシステインと共有結合を形成することができる、実施形態1の標的タンパク質分解剤。

【0476】

実施形態3．標的タンパク質結合剤およびE3ユビキチンリガーゼ結合剤が、結合剤リンカーによって共有結合している、実施形態1または2の標的タンパク質分解剤。

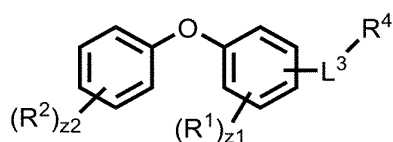
【0477】

実施形態4．E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF4である、実施形態1～3のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0478】

実施形態5．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化185】



(I) の一価形態であり、  
式中、

$R^1$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール

、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^2$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$L^3$ が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

$z_1$ が、0～4の整数であり、

$z_2$ が、0～5の整数であり、

唯1つの $R^1$ または1つの $R^2$ が、結合剤リンカーへの結合である、実施形態1～4のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0479】

実施形態6。

$R^1$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基が、任意に結合して、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{11}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{11}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^{11}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{12}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{12}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{12}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{12}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{12}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{12}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$R^{12}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$R^2$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{21}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して

、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{21}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{21}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^{21}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{22}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{22}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$R^{22}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、非置換 $C_1-C_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$L^3$ が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $R^3$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリーレン、または $R^3$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、 $R^{31}$ 置換もしくは非置換 $C_1-C_8$ アルキル、 $R^{31}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{31}$ 置換もしくは非置換 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $R^{31}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{31}$ 置換もしくは非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、または $R^{31}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$R^{31}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCH$

10

20

30

40

50



R<sup>3</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールであり

R<sup>41</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>42</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>42</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールであり、

R<sup>42</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシク

ロアルキル、非置換  $C_6-C_{10}$  アリール、または非置換 5～10 員ヘテロアリールである、実施形態 1～5 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0480】

実施形態 7.  $R^2$  が独立して、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $R^{21}$  置換もしくは非置換  $C_1-C_3$  アルキル、非置換 2～3 員ヘテロアルキル、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2 つの  $R^2$  置換基が、任意に結合して、非置換フェニルを形成してもよく、 $R^{21}$  が独立して、 $-OH$  である、実施形態 6 の標的タンパク質分解剤。

【0481】

実施形態 8.  $Z_2$  が 1 であり、 $R^2$  が結合剤リンカーへの結合である、実施形態 6 または 7 の標的タンパク質分解剤。

【0482】

実施形態 9.  $R^1$  が独立して、ハロゲンである、実施形態 6～8 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0483】

実施形態 10.  $z_1$  が 0 である、実施形態 6～9 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

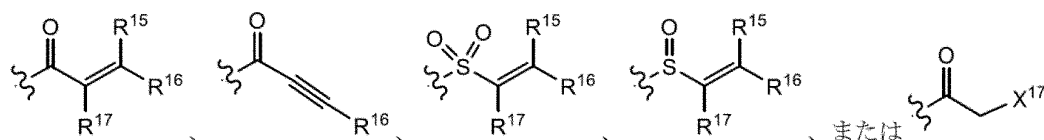
【0484】

実施形態 11.  $L^3$  が、 $-N(R^3)-$  であり、 $R^3$  が独立して、 $R^{31}$  置換メチル、非置換フェニル、もしくは非置換 5～6 員ヘテロアリールであり、 $R^{31}$  が独立して、非置換フェニル、もしくは非置換 5～6 員ヘテロアリールである、実施形態 6～10 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0485】

実施形態 12.  $E$  が、

【化 186】



であり、

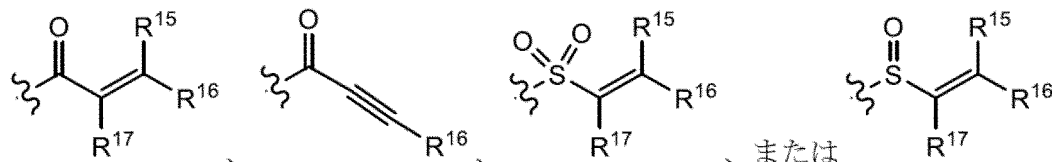
$R^{15}$ 、 $R^{16}$  および  $R^{17}$  が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$X^{17}$  が、ハロゲンである、実施形態 6～11 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0486】

実施形態 13.  $E$  が、

【化 187】



10

20

30

40

50

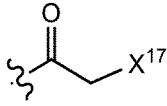
であり、

$R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ が独立して、水素である、実施形態6～12のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0487】

実施形態14．Eが、

【化188】



であり、 $X^{17}$ が独立して、 $-Cl$ である、実施形態6～12のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

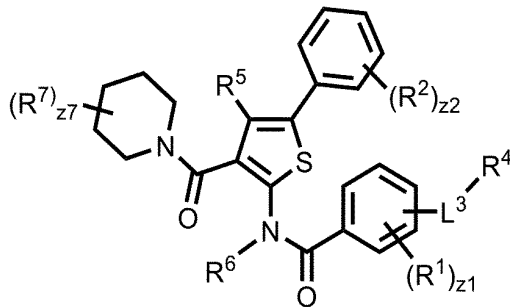
【0488】

実施形態15．E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF114である、実施形態1～3のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0489】

実施形態16．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化189】



(II)の一価形態であり、

式中、

$R^1$ および $R^2$ が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つの $R^1$ 置換基または2つの $R^2$ 置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^5$ および $R^6$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OC$

H<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

R<sup>7</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>7</sup>置換基は、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、L<sup>3</sup>が、結合、-N(R<sup>3</sup>)-、-C(O)-、-C(O)N(R<sup>3</sup>)-、-N(R<sup>3</sup>)C(O)-、-N(H)-、-C(O)N(H)-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-

、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、R<sup>3</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R<sup>4</sup>が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

z<sub>1</sub>が、0～4の整数であり、

z<sub>2</sub>が、0～5の整数であり、

z<sub>7</sub>が、0～10の整数であり、

唯1つのR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>またはR<sup>7</sup>が独立して、結合剤リンカーへの結合である、実施形態1～3および15のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

## 【0490】

## 実施形態17.

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>7</sup>が独立して、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>51</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>1</sup>置換基または2つのR<sup>2</sup>置換基が、任意に結合して、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>51</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールを形成してもよく、

R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>が独立して、水素、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>51</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

R<sup>7</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換2~8員ヘテロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>51</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、2つのR<sup>7</sup>置換基が、任意に結合して、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、R<sup>51</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、またはR<sup>51</sup>置換もしくは非置換5~10員ヘテロアリールを形成してもよく、

R<sup>51</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、-CCl<sub>3</sub>、-CBr<sub>3</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CI<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC

10

20

30

40

50

(O) OH、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$\text{L}^3$ が、結合、 $-\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^3)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $\text{R}^3$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキレン、 $\text{R}^3$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキレン、 $\text{R}^3$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキレン、 $\text{R}^3$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、 $\text{R}^3$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリーレン、または $\text{R}^3$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレンであり、

$\text{R}^3$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $\text{R}^{31}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$\text{R}^{31}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{32}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{32}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{32}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{32}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $\text{R}^{32}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $\text{R}^{32}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$\text{R}^{32}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$\text{R}^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$

10

20

30

40

50

、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{41}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{41}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{41}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{41}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $\text{R}^{41}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $\text{R}^{41}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいはEであり、

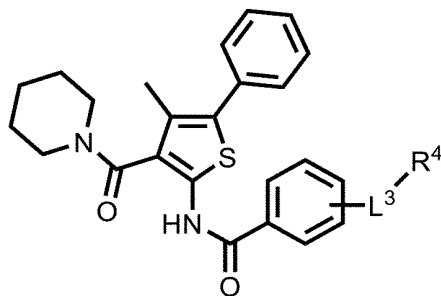
$\text{R}^{41}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $\text{R}^{42}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリールであり、

$\text{R}^{42}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである、実施形態16の標的タンパク質分解剤。

【0491】

実施形態18。E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化190】



の一価形態である、実施形態17の標的タンパク質分解剤。

【0492】

実施形態19。 $\text{L}^3$ が $-\text{CH}_2\text{NH}-$ である、実施形態17または18の標的タンパク質分解剤。

【0493】

実施形態20。Eが、

10

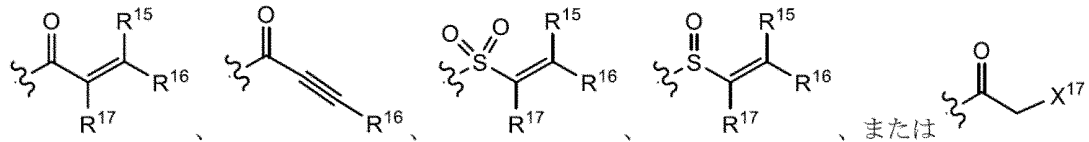
20

30

40

50

## 【化 1 9 1】



であり、

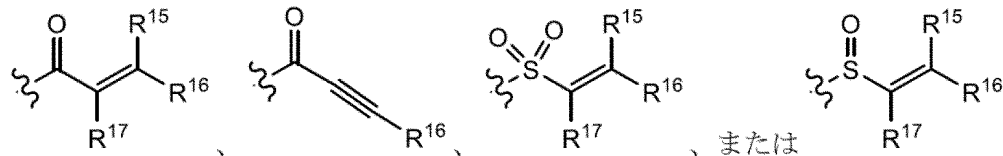
$R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCl_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$X^{17}$ が、ハロゲンである、実施形態 17～19 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

## 【0 4 9 4】

実施形態 21. E が、

## 【化 1 9 2】



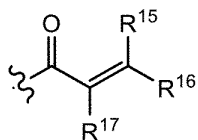
であり、

$R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ が独立して、水素である、実施形態 17～20 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

## 【0 4 9 5】

実施形態 22. E が、

## 【化 1 9 3】



であり、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ および $R^{17}$ が独立して、水素である、実施形態 17～21 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

## 【0 4 9 6】

実施形態 23. E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

10

20

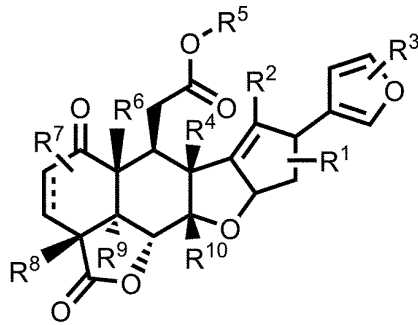
30

40

50



## 【化194】



10

の一価形態であり、

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

20

唯一つの $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ または $R^{10}$ が、結合剤リンカーへの結合であり、

## 【化195】



30

が、単結合または二重結合である、実施形態1～3および15のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

## 【0497】

実施形態24.

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換2～8員ヘテロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_3-\text{C}_8$ シクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、 $R^{51}$ 置換もしくは非置換 $\text{C}_6-\text{C}_{10}$ アリール、または $R^{51}$ 置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリール、あるいは結合剤リンカーへの結合であり、

40

唯一つの $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ または $R^{10}$ が、結合剤リンカーへの結合であり、

$R^{51}$ が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、-

50

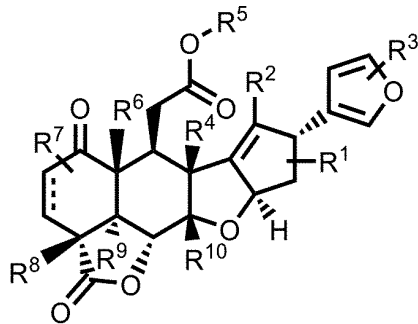
CHCl<sub>2</sub>、-CHBr<sub>2</sub>、-CHF<sub>2</sub>、-CHI<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>Cl、-CH<sub>2</sub>Br、-CH<sub>2</sub>F、-CH<sub>2</sub>I、-CN、-OH、-NH<sub>2</sub>、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SH、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>4</sub>H、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-NHNH<sub>2</sub>、-ONH<sub>2</sub>、-NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、-NHC(O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCCl<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCBr<sub>3</sub>、-OCI<sub>3</sub>、-OCHCl<sub>2</sub>、-OCHBr<sub>2</sub>、-OCHI<sub>2</sub>、-OCHF<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>Cl、-OCH<sub>2</sub>Br、-OCH<sub>2</sub>I、-OCH<sub>2</sub>F、-N<sub>3</sub>、-SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、非置換2~8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3~8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール、または非置換5~10員ヘテロアリールである、実施形態23の標的タンパク質分解剤。

10

【0498】

実施形態25．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化196】



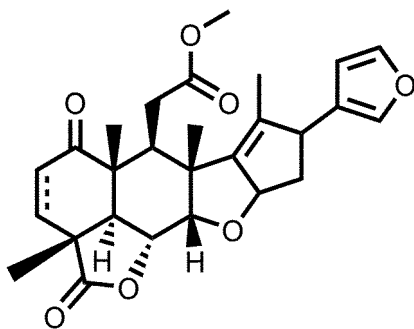
20

の一価形態である、実施形態23の標的タンパク質分解剤。

【0499】

実施形態26．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化197】



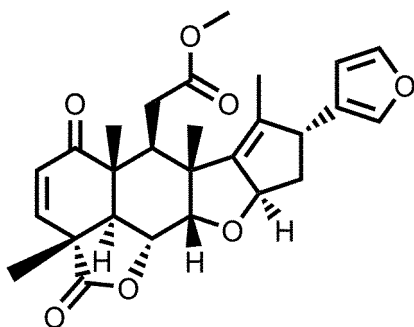
30

の一価形態である、実施形態24の標的タンパク質分解剤。

【0500】

実施形態27．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化198】



40

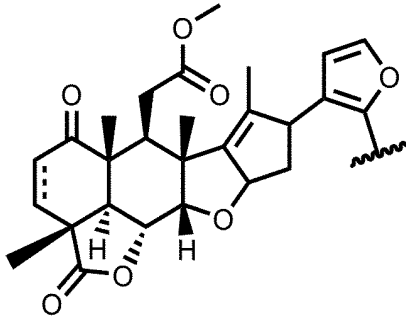
50

の一価形態である、実施形態 24 の標的タンパク質分解剤。

【0501】

実施形態 28. E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化199】



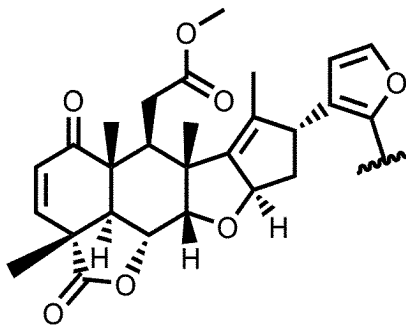
10

を有する、実施形態 24 の標的タンパク質分解剤。

【0502】

実施形態 29. E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化200】



20

を有する、実施形態 24 の標的タンパク質分解剤。

【0503】

実施形態 30. 結合剤リンカーが、 $L^{11}-L^{12}-L^{13}-L^{14}$  であり、

$L^{11}$  が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤に直接接続し、

$L^{11}$  が、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーであり、

$L^{12}$ 、 $L^{13}$  および  $L^{14}$  が独立して、結合、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレン、あるいはバイオコンジュゲートリンカーである、実施形態 3~29 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤。

【0504】

実施形態 31.

$L^{11}$  が、 $-N(R^{61})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{61})-$ 、 $-N(R^{61})$

30

40

50

C(O)－、－N(H)－、－C(O)N(H)－、－N(H)C(O)－、－C(O)O－、－OC(O)－、－S(O)<sub>2</sub>－、－S(O)－、－O－、－S－、－NHC(O)NH－、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>－C<sub>20</sub>アルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換2～20員ヘテロアルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>－C<sub>8</sub>シクロアルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>－C<sub>10</sub>アリーレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーであり、

L<sup>12</sup>、L<sup>13</sup>およびL<sup>14</sup>が独立して、結合、－N(R<sup>61</sup>)－、－C(O)－、－C(O)N(R<sup>61</sup>)－、－N(R<sup>61</sup>)C(O)－、－N(H)－、－C(O)N(H)－、－N(H)C(O)－、－C(O)O－、－OC(O)－、－S(O)<sub>2</sub>－、－S(O)－、－O－、－S－、－NHC(O)NH－、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換C<sub>1</sub>－C<sub>20</sub>アルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換2～20員ヘテロアルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換C<sub>3</sub>－C<sub>8</sub>シクロアルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換3～8員ヘテロシクロアルキレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換C<sub>6</sub>－C<sub>10</sub>アリーレン、R<sup>61</sup>置換もしくは非置換5～10員ヘテロアリーレン、またはバイオコンジュゲートリンカーであり、

R<sup>61</sup>が独立して、オキソ、ハロゲン、－CCl<sub>3</sub>、－CBr<sub>3</sub>、－CF<sub>3</sub>、－CI<sub>3</sub>、－CHCl<sub>2</sub>、－CHBr<sub>2</sub>、－CHF<sub>2</sub>、－CHI<sub>2</sub>、－CH<sub>2</sub>Cl、－CH<sub>2</sub>Br、－CH<sub>2</sub>F、－CH<sub>2</sub>I、－CN、－OH、－NH<sub>2</sub>、－COOH、－CONH<sub>2</sub>、－NO<sub>2</sub>、－SH、－SO<sub>3</sub>H、－SO<sub>4</sub>H、－SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、－NHNH<sub>2</sub>、－ONH<sub>2</sub>、－NHC(O)NHNH<sub>2</sub>、－NHC(O)NH<sub>2</sub>、－NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H、－NHC(O)H、－NHC(O)OH、－NHOH、－OCCl<sub>3</sub>、－OCF<sub>3</sub>、－OCBr<sub>3</sub>、－OCI<sub>3</sub>、－OCHCl<sub>2</sub>、－OCHBr<sub>2</sub>、－OCHI<sub>2</sub>、－OCHF<sub>2</sub>、－OCH<sub>2</sub>Cl、－OCH<sub>2</sub>Br、－OCH<sub>2</sub>I、－OCH<sub>2</sub>F、－N<sub>3</sub>、－SF<sub>5</sub>、非置換C<sub>1</sub>－C<sub>8</sub>アルキル、非置換2～8員ヘテロアルキル、非置換C<sub>3</sub>－C<sub>8</sub>シクロアルキル、非置換3～8員ヘテロシクロアルキル、非置換C<sub>6</sub>－C<sub>10</sub>アリール、または非置換5～10員ヘテロアリールである、実施形態30の標的タンパク質分解剤。

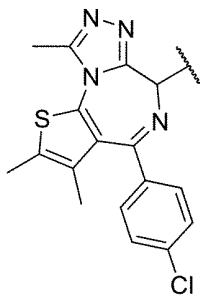
【0505】

実施形態32．標的タンパク質結合剤が、疾患に関連する標的タンパク質に結合することができる、実施形態1～31のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0506】

実施形態33．標的タンパク質結合剤が

【化201】



であり、標的タンパク質結合剤が、BRD4に結合する、実施形態1～32のうちの1つの標的タンパク質分解剤。

【0507】

実施形態34．実施形態1～33のうちの1つの標的タンパク質分解剤と、薬学的に許容される賦形剤と、を含む、薬学的組成物。

【0508】

実施形態35．細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法。

【0509】

10

20

30

40

50

実施形態 36. 細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を実施形態 1～33 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法。

【0510】

実施形態 37.

A) 標的タンパク質分解剤に接触する細胞タンパク質をユビキチン化させ、それによってユビキチン化細胞タンパク質を形成するステップと、

B) ユビキチン化細胞タンパク質をプロテアソームと接触させ、それによってユビキチン化細胞タンパク質－プロテアソーム複合体を形成するステップと、

C) プロテアソームにより細胞タンパク質をタンパク質分解するステップと、をさらに含む、実施形態 35 または 36 の方法。

10

【0511】

実施形態 38. 癌を治療する方法であって、癌に関連する細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させることを含む、方法。

【0512】

実施形態 39. 癌を治療する方法であって、実施形態 1～33 のうちの 1 つの標的タンパク質分解剤の治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【0513】

実施形態 40. 細胞タンパク質のレベルを低下させる方法であって、細胞タンパク質を標的タンパク質分解剤と接触させ、それにより標的タンパク質分解剤－細胞タンパク質複合体を形成することを含み、標的タンパク質分解剤が、

20

i) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤と、

ii) 標的タンパク質結合剤と、

iii) E3 ユビキチンリガーゼ結合剤および標的タンパク質結合剤に直接結合した結合剤リンカーと、を含む、方法。

【0514】

実施形態 41. 接触の前に、標的タンパク質分解剤が、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤、結合剤リンカーおよび標的タンパク質結合剤を共有結合的に反応させて、標的タンパク質分解剤を生成することによって合成される、実施形態 40 の方法。

【0515】

実施形態 42. 合成の前に、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、候補 E3 ユビキチンリガーゼ結合剤から同定される、実施形態 41 の方法。

30

【0516】

実施形態 43. E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、

i) E3 ユビキチンリガーゼタンパク質を候補 E3 ユビキチンリガーゼ結合剤の混合物と接触させ、それにより E3 ユビキチンリガーゼタンパク質－E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するステップと、

ii) E3 ユビキチンリガーゼタンパク質－E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体から、候補 E3 ユビキチンリガーゼ結合剤を、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤として同定するステップと、を含む方法によって同定される、実施形態 42 の方法。

【0517】

40

実施形態 44. 候補 E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、共有結合システイン修飾因子部分を含み、E3 ユビキチンリガーゼタンパク質－E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成するための、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤の E3 ユビキチンリガーゼタンパク質への共有結合の検出により、候補 E3 ユビキチンリガーゼ結合剤は、E3 ユビキチンリガーゼ結合剤として同定される、実施形態 43 の方法。

【0518】

実施形態 45. E3 ユビキチンリガーゼタンパク質－E3 ユビキチンリガーゼ結合剤複合体の検出は、検出可能な標識または質量分析の使用を含む、実施形態 44 の方法。

【0519】

実施形態 46. 合成の前に、標的タンパク質結合剤が同定される、実施形態 40 の方法。

50

## 【0520】

実施形態47. 標的タンパク質結合剤が、

i) 細胞タンパク質を候補標的タンパク質結合剤の混合物と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成するステップと、

ii) 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する標的タンパク質結合剤を同定するステップと、を含む方法によって同定される、実施形態46の方法。

## 【0521】

実施形態48. 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成する候補標的タンパク質結合剤は、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出により、標的タンパク質結合剤として同定される、実施形態47の方法。

## 【0522】

実施形態49. 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体の検出が、検出可能な標識または質量分析の使用を含む、実施形態48の方法。

## 【0523】

実施形態50. 合成の前に、E3ユビキチンリガーゼ結合剤を修飾して、共有結合システイン修飾因子部分を除去する、実施形態40の方法。

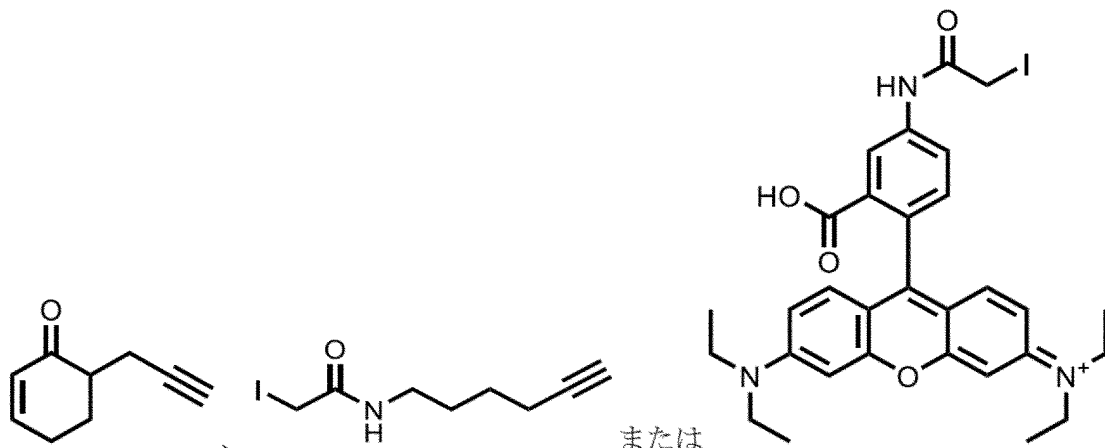
## 【0524】

実施形態51. 標的タンパク質結合剤が接触する細胞タンパク質を同定する方法であって、

A) 細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルを標的タンパク質結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することと、

B) 得られたステップAの細胞プロテオームまたは細胞の第1のサンプルと、標的タンパク質結合剤と接触していない細胞プロテオームまたは細胞の第2のサンプルの両方を、式：

## 【化202】



を有する化合物と接触させることと、

C) 得られたステップBの第1のサンプルを第1の検出可能な薬剤と接触させ、得られたステップBの第2のサンプルを第2の検出可能な薬剤と接触させることと、

D) 選択されたタンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルを測定することと、

E) 細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体を形成することができる細胞タンパク質に結合した第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルの差を測定することにより、細胞タンパク質-標的タンパク質結合剤複合体中の細胞タンパク質を同定することと、を含む、方法。

## 【0525】

実施形態52.

A) 第1または第2の検出可能な薬剤のうちの一方が、原子の軽い同位体を含み、第1または第2の検出可能な薬剤のうちの他方が、原子の重い同位体を含み、

B) 選択されたタンパク質の第1の検出可能な薬剤および第2の検出可能な薬剤のレベルが、液体クロマトグラフィー質量分析によって測定され、

C) 標的タンパク質結合剤に結合することができる細胞タンパク質が、第1の検出可能な薬剤に結合した細胞タンパク質のレベルと第2の検出可能な薬剤に結合した細胞タンパク質のレベルとの差によって同定される、実施形態51に記載の方法。

【0526】

実施形態53. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼシステイン残基と接触する、実施形態35～52のうちの1つの方法。

10

【0527】

実施形態54. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼシステイン残基と共有結合する、実施形態53の方法。

【0528】

実施形態55. E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF4である、実施形態53または54の方法。

【0529】

実施形態56. システイン残基が、ヒトRNF4のC132である、実施形態55の方法。

【0530】

実施形態57. システイン残基が、ヒトRNF4のC135である、実施形態55の方法。

20

【0531】

実施形態58. E3ユビキチンリガーゼが、ヒトRNF114である、実施形態53または54の方法。

【0532】

実施形態59. システイン残基が、ヒトRNF114のC8である、実施形態58の方法。

【0533】

実施形態60. E3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を作製する方法であって、

30

A) E3ユビキチンリガーゼをE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、

B) E3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を細胞タンパク質と接触させ、それによりE3ユビキチンリガーゼ-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-細胞タンパク質複合体を形成することと、を含む、方法。

【0534】

実施形態61. 細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-E3ユビキチンリガーゼ複合体を作製する方法であって、

A) 細胞タンパク質をE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体を形成することと、

40

B) 細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤複合体をE3ユビキチンリガーゼと接触させ、それにより細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ結合剤-E3ユビキチンリガーゼ複合体を形成することと、を含む、方法。

【0535】

実施形態62. 細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害する方法であって、E3ユビキチンリガーゼをE3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触させ、それにより細胞タンパク質-E3ユビキチンリガーゼ複合体の形成を阻害することを含む、方法。

【0536】

実施形態63. E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼのシステイ

50

ンを共有結合する、実施形態 60～62 のうちの 1 つの方法。

【0537】

実施形態 64. E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、細胞タンパク質と接触して E3 ユビキチンリガーゼ結合剤の不在下で細胞タンパク質-E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することができる E3 ユビキチンリガーゼのアミノ酸で E3 ユビキチンリガーゼと接触する、実施形態 62 または 63 の方法。

【0538】

実施形態 65. E3 ユビキチンリガーゼが、ヒト RNF4 である、実施形態 60～64 のうちの 1 つの方法。

【0539】

実施形態 66. E3 ユビキチンリガーゼが RNF4 であり、システインがヒト RNF4 の C132 である、実施形態 63 または 64 の方法。

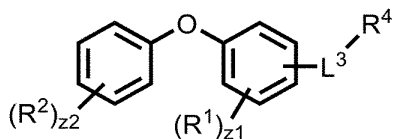
【0540】

実施形態 67. E3 ユビキチンリガーゼが RNF4 であり、システインがヒト RNF4 の C135 である、実施形態 63 または 64 の方法。

【0541】

実施形態 68. E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、式：

【化203】



(I) の一価形態であり、

式中、

$R^1$  が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの  $R^1$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$R^2$  が独立して、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NH_2SO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの  $R^2$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もし



くは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

$L^3$  が、結合、 $-N(R^3)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^3)-$ 、 $-N(R^3)C(O)-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$  が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$  が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-CCl_3$ 、 $-CBr_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CI_3$ 、 $-CHCl_2$ 、 $-CHBr_2$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CHI_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH_2Br$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH_2I$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(O)NHNH_2$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHHSO_2H$ 、 $-NHC(O)H$ 、 $-NHC(O)OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCCl_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCBr_3$ 、 $-OCI_3$ 、 $-OCHCl_2$ 、 $-OCHBr_2$ 、 $-OCHI_2$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-OCH_2Cl$ 、 $-OCH_2Br$ 、 $-OCH_2I$ 、 $-OCH_2F$ 、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいは E であり、

E が、求電子性部分であり、

$z_1$  が、0～4 の整数であり、

$z_2$  が、0～5 の整数である、実施形態 65～67 のうちの 1 つの方法。

【0542】

実施形態 69．E3 ユビキチンリガーゼが、ヒト RNF114 である、実施形態 60～64 のうちの 1 つの方法。

【0543】

実施形態 70．E3 ユビキチンリガーゼがヒト RNF114 であり、システインがヒト RNF114 の C8 である、実施形態 63 または 64 の方法。

【0544】

実施形態 71．細胞タンパク質が、p21 である、実施形態 69 または 70 の方法。

【0545】

実施形態 72．E3 ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式の一価形態であり、

10

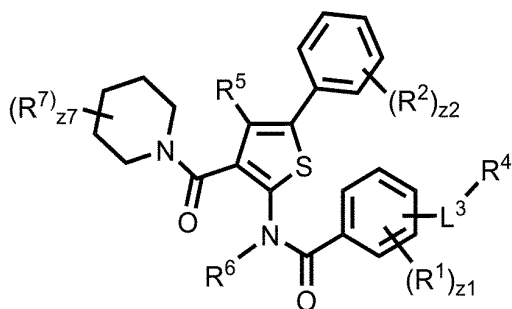
20

30

40

50

【化 2 0 4】



10

$R^1$  および  $R^2$  が独立して、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの  $R^1$  置換基または2つの  $R^2$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

20

$R^5$  および  $R^6$  が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

30

$R^7$  が独立して、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、2つの  $R^7$  置換基が、任意に結合して、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールを形成してもよく、

40

$L^3$  が、結合、 $-\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^3)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^3)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$

50

一、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであり、

$R^3$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

$R^4$ が独立して、水素、オキソ、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SF}_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、あるいはEであり、

Eが、求電子性部分であり、

$z_1$ が、0～4の整数であり、

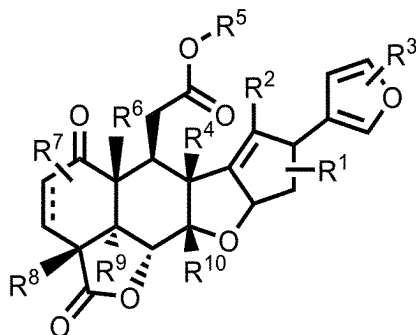
$z_2$ が、0～5の整数であり、

$z_7$ が、0～10の整数である、実施形態69～71のうちの1つの方法。

【0546】

実施形態73．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、以下の式の一価形態であり、

【化205】



$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ および $R^{10}$ が独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CI}_3$ 、 $\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHI}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCCl}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCBr}_3$ 、 $-\text{OCI}_3$ 、 $-\text{OCHCl}_2$ 、 $-\text{OCHBr}_2$ 、 $-\text{OCHI}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2$

F、 $-N_3$ 、 $-SF_5$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、  
【化206】



が、単結合または二重結合である、実施形態69～71のうちの1つの方法。

【0547】

実施形態74．E3ユビキチンリガーゼ結合剤が、E3ユビキチンリガーゼ結合剤の不在で安定な二次または三次立体配座構造を欠くE3ユビキチンリガーゼのアミノ酸と接触する、実施形態35～73のうちの1つの方法。

【0548】

実施形態75．E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触するアミノ酸が、E3ユビキチンリガーゼ結合剤と接触すると、安定な二次または三次立体配座構造をとる、実施形態74の方法。

【実施例】

【0549】

実施例1：共有結合リガンドスクリーニングは、標的タンパク質分解用途のためのRNF4 E3リガーゼリクルーターを明らかにする

標的タンパク質分解は、プロテアソーム分解のためのアンドラッグブルなタンパク質の標的化を可能にする創薬のための強力な戦略として生まれた。このアプローチでは、E3リガーゼを特定のタンパク質基質に結合してプロテアソーム依存的にこれらの基質をユビキチン化させ、分解するE3リガーゼリクルーターに結合したタンパク質標的化リガンドからなる二官能性分解剤を使用する。しかしながら、このアプローチの1つの課題は、ヒトゲノムに数百の既知のE3リガーゼがあるにもかかわらず、標的タンパク質分解用途に現在存在するE3リガーゼリクルーターが比較的少ないことである。ここで、E3ユビキチンリガーゼRNF4と反応するシステイン反応性小分子を同定するために、活性ベースタンパク質プロファイリング(ABPP)に基づく共有結合リガンドスクリーニングアプローチを使用した。このスクリーンからのリード共有結合リガンドは、RINGドメインの2つの垂鉛配位システインC132およびC135のうちの1つと反応するが、RNF4活性には影響しない。このリードの効力をさらに最適化し、この潜在的なRNF4リクルーターを、BRD4阻害剤JQ1：CCW28-3に結合した二官能性分解剤に組み込んだ。CCW28-3がプロテアソーム依存的にBRD4を分解することができること、およびこの分解がRNF4ノックアウト細胞で弱められることを示す。ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニングプラットフォームを使用して、標的タンパク質分解用途に利用できるE3リガーゼリクルーターの範囲を拡大することの実現可能性を示す。

【0550】

標的タンパク質分解は、細胞タンパク質分解機構を利用して標的タンパク質を選択的に排除することにより、アンドラッグブルなプロテオームに取り組むための画期的な創薬プラットフォームである<sup>1, 2</sup>。この技術には、E3リガーゼリクルーターに結合したタンパク質標的化リガンドからなる「分解剤」と呼ばれる二官能性分子の利用が含まれる。これらの分解剤は、E3リガーゼを特定のタンパク質標的に動員して、プロテアソーム依存的に標的をユビキチン化させ、分解することができる。標的の機能的阻害は分解剤の有効性に必要ではないため、この戦略は、リガンドが存在するプロテオーム内のいずれかのタンパク質を標的にして分解する可能性がある。しかしながら、この技術の適用における主要な課題は、E3リガーゼリクルーターの数が比較的少ないことである。約600種類のE3リガーゼがあるが、セレブロン、VHL、MDM2、およびcIAP用の小分子リクルーターなど、E3リガーゼリクルーターはごくわずかである<sup>2, 3</sup>。E3リガーゼに結合す

るリガンドを発見するための簡単な戦略を特定することは、標的タンパク質分解用途に利用できる E3 リガーゼリクルーターのセットを拡大するために依然として重要なままである。

#### 【0551】

活性ベースタンパク質プロファイリング (ABPP) は、アンドラッグブルなタンパク質に対するリガンド発見のための強力なプラットフォームとして登場した<sup>4-10</sup>。ABPP は、反応性ベースの化学プローブを利用して、プロテオーム全体の反応性およびリガンド結合可能なホットスポットを複雑な生物学的システムに直接マッピングする<sup>11, 12</sup>。競合的に使用すると、共有結合で作用する小分子を反応性ベースのプローブの結合と競合させて、目的のタンパク質に対する共有結合リガンドの発見を促進することができる<sup>4-7, 9, 13-15</sup>。E3 ユビキチンリガーゼと反応する可能性のある共有結合リガンドの発見に向けて、代表的な市販の E3 リガーゼをシステイン反応性ヨードアセトアミドローダミン (IA-ローダミン) 反応性ベースのプローブで標識できるかどうかを最初に調査した。IA-ローダミンは、用量反応的に MDM2、RNF4 および UBE3A を標識することができた (図 1A)。以前の研究で既に MDM2 および UBE3A 小分子モジュレータを明らかにしているが<sup>16-18</sup>、SUMO 化タンパク質を認識し、これらのタンパク質をユビキチン化させて、後続のプロテアソーム分解を行う E3 ユビキチンリガーゼ RNF4 のための化学ツールは存在しない<sup>19, 20</sup>。したがって、RNF4 の潜在的な E3 リガーゼリクルーターの開発に注力した。

#### 【0552】

RNF4 共有結合リガンドを検索するために、ゲルベース ABPP を使用して純粋なヒト RNF4 の IA-ローダミン標識に対してシステイン反応性共有結合リガンドライブラリーをスクリーニングした (図 1B、表 1)。このスクリーンから、TRH1-74、YP1-44、DKM2-76、TRH1-23 および TRH1-163 など、いくつかの潜在的なヒットを同定した。これらから、YP1-44、TRH1-163 および TRH1-23 は、RNF4 の IA-ローダミン標識の再現性のある用量反応性阻害を示した (図 1D、図 5)。これらの実験における RNF4 の対応する銀染色に基づいて、TRH1-163 がタンパク質の沈殿を引き起こしている可能性があることを発見した。231MFP 溶解物における一般的なシステイン反応性のゲルベース ABPP 分析に基づく、YP1-44 は TRH1-23 と比較して選択性ははるかに低かった (図 5)。したがって、TRH1-23 は最も有望な RNF4 ヒットであるように見えた (図 1D)。

#### 【0553】

次に、RNF4 内の TRH1-23 の修飾部位を同定しようとした。TRH1-23 で処理した RNF4 純粋タンパク質からのトリプシン消化物の液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 分析を実施し、TRH1-23 が、RNF4 のRING ドメインの 2 つの亜鉛配位システイン C132 および C135 の両方ではなくいずれかを共有結合的に修飾することを発見した (図 2A、2B)。機能的な RNF4 リクルーターとしてのその有用性を支持して、以前の研究がこれらのシステインのセリンへの変異が RNF4 機能を阻害することを示したので、TRH1-23 が RNF4 自己ユビキチン化活性に何らかの影響を与えたかどうかを見たかった<sup>21-23</sup>。驚くべきことに、TRH1-23 処理は、インビトロで再構成されたアッセイにおいて RNF4 自己ユビキチン化活性を阻害しない (図 2C)。TRH1-23 治療による RNF4 阻害の欠如を説明する根本的なメカニズムはまだ理解されていないが、3 つのシステインが TRH1-23 によって修飾されていないため、おそらく亜鉛がまだ配位部位に結合している可能性があるか、または TRH1-23 が、RNF4 活性を維持するために、通常亜鉛が占める空間を埋めることがあると仮定する。それにもかかわらず、この RNF4 阻害の欠如は、E3 リガーゼリクルーターとしてのその潜在的な用途にとって理想的であった。

#### 【0554】

RNF4 に対する有望な非機能的リガンドである一方で、TRH1-23 は、RNF4 リクルーターとして有用であるのに十分な効力を示さなかった。したがって、いくつかの

TRH1-23類似体を合成し、ゲルベースABPPを使用して、RNF4に対するそれらの効力および構造活性関係を試験した(図3A~3B)。これらの類似体の中で、クロロアセトアミド足場にN-ベンジルおよび4-メトキシフェノキシフェニル置換を有するCCW16が、1  $\mu$ Mまで観察されたRNF4のIA-ローダミン標識が減少した類似体の中で最も強力であることが分かった。さらなる確認研究により、CCW16の50%阻害濃度(IC50)が1.8  $\mu$ Mであることが明らかになった(図3C)。TRH1-23類似体で観察された構造活性関係に基づいて、CCW16の4-メトキシ基がリンカーを拡大してRNF4ベースの分解剤を作製するための理想的な位置になると考えた。

#### 【0555】

CCW16を標的タンパク質分解用途のための潜在的なRNF4リクルーターとして使用できることを示すために、CCW16をBRD4阻害剤JQ1に結合する二官能性分解剤であるCCW-28-3を合成した(図4A)。CCW-28-3は、CCW16よりもRNF4に対して高い効力を示し、IC50は0.54  $\mu$ Mであった(図4B)。説得力のあることに、CCW28-3による処理は、231MFP乳癌細胞において用量反応的にBRD4を分解し(図4C)、この分解は、細胞をプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)、BRD4阻害剤JQ1、ならびにE1ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243で前処理することによって防止される(図4D~4E)。

#### 【0556】

次に、同位体タンデム直交タンパク質分解対応ABPP(iSoTOP-ABPP)プラットフォームを使用して、CCW28-3のプロテオーム全体の選択性を評価した<sup>4, 6, 7, 12</sup>(図6)。231MFP細胞をビヒクルもしくはCCW28-3で処理し、得られたプロテオームをシステイン反応性ヨードアセトアミド-アルキン(IA-アルキン)プローブで標識した後、同位体的に軽いまたは重いTEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグを、ビヒクル処理群およびCCW-28-3処理群それぞれのプローブ標識タンパク質に付加した。iSoTOP-ABPPについて先に記載した方法を使用して、プローブ修飾ペプチドを濃縮し、溶出させ、分析した<sup>4, 6, 7, 12</sup>。この実験では、おそらく他のIA-アルキン標識タンパク質と比較して存在量が少ないためにRNF4のプローブ修飾ペプチドを観察できなかったが、同位体的に軽い対重い比が4を超える標的は、同定された1114の総定量化プローブ修飾ペプチドのうち7つしかないことを示した。最も注目すべきことに、CCW28-3のこれらのオフターゲットはいずれもユビキチン-プロテアソーム系の一部ではない(図6)。

#### 【0557】

CCW-28-3は完全に選択的ではなく、E3リガーゼのRINGファミリー全体で保存された亜鉛配位システインを標的にしていたため、CCW-28-3を介したBRD4分解に対するRNF4の寄与を確認したかった。したがって、対照およびRNF4ノックアウトHeLa細胞におけるCCW28-3を介したBRD4分解を比較した。説得力のあることに、HeLa対照細胞で観察されたBRD4のCCW28-3を介した分解は、RNF4ノックアウト細胞では明らかではなかった(図4F、図7)。これらのデータはさらに、CCW28-3がRNF4の動員を通じてBRD4を分解することを示している。

#### 【0558】

本発明者らの研究は、ABPPに基づく共有結合リガンドスクリーニングアプローチを使用して、E3リガーゼを標的とするエントリーポイントを迅速に発見することの実現可能性、および、これらの共有結合リガンドヒットを同定し、最適化して、標的タンパク質分解用途のための分解剤に組み込むことができることを示している。CCW16およびCCW-28-3は、細胞内のRNF4に対してまだ完全に選択的ではないが、RNF4依存的にBRD4を分解できることを示している。CCW28-3が、BRD4だけでなく、JQ1<sup>24</sup>に結合したVHLリクルーターを利用するMZ1などの以前に報告された他のBRD4分解剤も分解しないことに留意されたい。将来の医薬品化学の努力を利用して、RNF4に対するCCW16の効力および選択性を最適化し、CCW28-3のリンカ

一配置および組成を最適化することにより、タンパク質基質のより良い分解を促進することができる。それにもかかわらず、CCW16は、セレブロン、VHL、MDM2およびcIAP<sup>2</sup>を標的とする、以前に報告された他の4つのE3リガーゼリクルーターを超える、RNF4に対する新規の小分子E3リガーゼリクルーターとなる。ここで説明するアプローチは、E3リガーゼリクルーターまたは調節因子の範囲を拡大する上で、将来の用途に利用できると確信している。

#### 【0559】

実施例2：共有結合リガンドのスクリーニングおよび合成に関連する方法およびアッセイ  
初期スクリーンで使用される共有結合リガンドライブラリー。RNF4に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの多くの合成および特徴付けは、以前に報告されている4-6, 13。

#### 【0560】

ゲルベースABPP。ゲルベースABPP方法を、以前に記載されたように実施した<sup>5, 6, 25, 26</sup>。純粋な組換えヒトRNF4は、Boston Biochem (K-220) から購入した。RNF4 (0.25 μg) を50 μLのPBSおよび1 μLのDMSO (ビヒクル) または共有結合的に作用する小分子のいずれかに希釈して、目的の濃度を達成した。室温で30分後、サンプルを250 nM IA-ローダミン (Setareh Biotech, 6222、無水DMSO中で調製) で室温で1時間処理した。次に、サンプルを20 μLの4×還元Laemmli SDSサンプルローディング緩衝液 (Alfa Aesar) で希釈し、90℃で5分間加熱した。サンプルを、プレキャスト4~20% Criterion TGXゲル (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で分離した。ChemIDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で蛍光イメージングを実施し、ImageJを使用したデンシトメトリーによって標的標識の阻害を評価した。

#### 【0561】

RNF4のLC-MS/MS分析。精製したRNF4 (10 μg) を80 μLのPBSで希釈し、DMSOまたは化合物 (50 μM) で30分間処理した。次に、DMSO対照を軽いヨードアセトアミド (IA) で処理しつつ、化合物で処理したサンプルを重いIAと室温でそれぞれ1時間インキュベートした (100 μM, Sigma-Aldrich, 721328)。サンプルは、20 μLの100% (w/v) TCAを加えて沈殿させ、ペアごとに組み合わせてから、-80℃で1時間冷却した。次に、合わせたサンプルを最高速度にて4℃で20分間回転させ、上澄みを注意深く除去し、サンプルを氷冷した0.01 M HCl/90%アセトン溶液で洗浄する。次に、サンプルを、100 mMの重碳酸アンモニウム緩衝液に0.1%のProtease Max (Promega Corp., V2071) を含有する2.4 Mの尿素に再懸濁した。サンプルを、60℃で30分間10 mMのTCEPで還元させた。次に、サンプルをPBSで50%希釈した後、シーケンシンググレードのトリプシン (サンプルあたり1 μg, Promega Corp., V5111) を加えて、37℃で一晩インキュベートした。翌日、サンプルを13200 rpmで30分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、最終濃度が5%ギ酸になるように酸性化し、MS分析まで-80℃で保存した。

#### 【0562】

RNF4ユビキチン化アッセイ。インビトロ自己ユビキチン化アッセイのために、15 μLユビキチン化アッセイ緩衝液 (50 mMのTris、150 mMのNaCl、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、5 mMのDTT (pH 7.4)) 中の200 nM RNF4を、DMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する化合物と室温で30分間ブレインキュベートした。続いて、UBE1 (50 nM, Boston Biochem, E-305)、UBE2D1 (400 nM Boston Biochem, E2-615)、Flag-ユビキチン (4000 nM, Boston Biochem, U-120) およびATP (200 μM) をユビキチン化アッセイ緩衝液に加えて、総量を30 μLにした。混合物を室温で30分間インキュベートした後、10 μLの4×Laemmli緩衝液でクエンチした。ユ

ビキチン化活性は、前述のようにSDS-PAGEゲル上での分離およびウエスタンブロッティングによって測定した。

#### 【0563】

細胞培養。231MFP細胞は、Benjamin Cravatt教授から入手し、前述のようにMDA-MB-231細胞の外植腫瘍異種移植片から生成された<sup>27</sup>。RNF4ノックアウトHeLa細胞は、EdiGene USA (CL0033025003A) から購入した。RNF4野生型HeLa細胞は、EdiGene USAまたはUC Berkeley Cell Culture Facilityから提供された。231MFP細胞を、10% (v/v) のウシ胎児血清 (FBS) を含有するL-15培地 (Corning) で培養し、0%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。HeLa細胞を、10% (v/v) のウシ胎児血清 (FBS) を含有するDMEM培地 (Corning) で培養し、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。

#### 【0564】

細胞ベースの分解剤アッセイ。分解剤活性をアッセイするために、細胞を、2.0~2.5 mLの培地中の6 cm組織培養皿 (Corning) に播種し (231MFP細胞は500,000個、HeLa細胞は300,000個)、一晚接着させた。翌朝、培地を、DMSO中の1000×ストックから希釈した所望の濃度の化合物を含有する完全培地と交換した。指定された時点で、細胞を氷上でPBSで1回洗浄した後、150 µLの溶解緩衝液をプレートに加えた (10 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.1% SDS、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、1% Triton X100)。細胞を溶解緩衝液中で5分間インキュベートした後、掻き取り、マイクロ遠心チューブに移した。次に、溶解物を-80℃で凍結するか、または直ちにウエスタンブロッティングのために処理した。ウエスタンブロッティングの準備として、溶解物を20,000 gのスピンで10分間清澄化し、得られた上清をBCAアッセイにより定量した。溶解物は、PBSで希釈することによって標準化し、最低濃度の溶解物および適切な量の4×Laemmli還元緩衝液を加えた。

#### 【0565】

ウエスタンブロッティングRNF4 (Proteintech、17810-1-AP、1:1000)、GAPDH (Proteintech、60004-1-IG、1:5000)、BRD4 (Abcam、Ab128874、1:1000)、およびベータアクチン (Proteintech Group Inc.、6609-1-IG、1:7000) は、指定された商業的供給源から入手し、希釈液は、指定された希釈率にて5% BSA/TBST中で調製した。タンパク質をSDS/PAGEによって分離し、iBlotシステムを使用してニトロセルロース膜に移した。プロットを、Tween 20 (TBST) 溶液を含有するTris緩衝生理食塩水中の5% BSAを用いて室温で1時間ブロックし、TBST中で洗浄し、製造元が推奨する希釈剤で希釈した一次抗体を用いて4℃で一晩プローブした。TBSTで洗浄した後、プロットを、Lycorから購入した二次抗体と共に暗所でインキュベートし、TBST中の5% BSA中に1:10,000の希釈で室温にて使用した。さらに洗浄した後、Odyssey Li-Corスキャナーを使用してプロットを可視化した。追加の一次抗体のインキュベーションが必要な場合は、ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (EMD Millipore、2504) を使用して膜をストリッピングし、洗浄して再度ブロックしてから、一次抗体と再インキュベートした。

#### 【0566】

IsoTOP-ABPP化学プロテオーム研究。IsoTOP-ABPP研究は、以前に報告されたように行われた<sup>4, 6, 7, 12</sup>。簡単に説明すると、細胞をPBS中でプローブ超音波処理して溶解し、タンパク質濃度をBCAアッセイで測定した<sup>28</sup>。インサイチュ実験では、DMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子 (1000×DMSOストックから) のいずれかで細胞を90分間処理してから、細胞を収集して溶解した。インビトロ実験では、PBSで希釈したプロテオームサンプル (生物学的複製あたり4 m

10

20

30

40

50



gのプロテオーム)をDMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子で室温にて30分間処理した。続いて、プロテオームをIA-アルキン(100 μM、Chess GmbH、3187)で室温にて1時間処理した。CuAACは、tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)(1mM)、tris[(1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン(TBTA)(34 μM)、硫酸銅(II)(1mM、Sigma)、およびビオチン-リンカー-アジドを順次加えることによって実施し、リンカーを、対照または処理プロテオームの処理のために同位体的に軽いまたは重いバリオンと共にTEVプロテアーゼ認識配列で官能化した。CuAAC後、プロテオームを、6500×gでの遠心分離によって沈殿させ、氷冷メタノール中で洗浄し、1:1の対照/処理比で混合し、再び洗浄し、次いで、変性し、1.2%SDS/PBS中で80℃まで5分間加熱することによって再可溶化した。不溶性成分を、6500×gでの遠心分離によって沈殿させ、可溶性プロテオームを5mlの0.2%SDS/PBS中に希釈した。4℃で一晩回転させながら、標識タンパク質を、アビジン-アガロースビーズ(170 μLの再懸濁ビーズ/サンプル、Thermo Pierce)に結合させた。ビーズ結合タンパク質を、PBSおよび水でそれぞれ3回洗浄することにより濃縮し、次いで、6M尿素/PBS(Sigma)に再懸濁し、TCEP(1mM、Sigma)中で還元し、ヨードアセトアミド(IA)(18mM、Sigma)でアルキル化し、次いで、洗浄し、2M尿素に再懸濁し、2 μg/サンプルのシーケンシンググレードのトリプシン(Promega)で一晩トリプシン処理した。トリプシンペプチドを溶出した。ビーズをPBSおよび水でそれぞれ3回洗浄し、TEV緩衝液(水、TEV緩衝液、100 μMジチオスレイトール)で洗浄し、Ac-TEVプロテアーゼ(Invitrogen)を含む緩衝液に再懸濁し、一晩インキュベートした。ペプチドを、水で希釈し、ギ酸(1.2M、Spectrum)で酸性化し、分析用に調製した。

#### 【0567】

質量分析。全てのプロテオミクス実験由来のペプチドを、4cmのAqua C18逆相樹脂(Phenomenex番号04A-4299)を充填した内径250 μmの熔融シリカ毛细管に加圧装填し、これは、10分間かけて100%緩衝液Aから100%緩衝液Bの勾配を使用したAgilent 600シリーズHPLC上で事前に平衡化し、その後、100%緩衝液Bで5分間洗浄し、100%緩衝液Aで5分間洗浄したものであった。その後、サンプルを、isoTOP-ABPP研究のために、10cmのAqua C18逆相樹脂および3cmの強カチオン交換樹脂を充填した13cmのレーザープルカラムへのMicroTee PEEK 360 μmのフィッティング(Thermo Fisher Scientific #p-888)を使用して付着させた。サンプルを、500mM酢酸アンモニウム水溶液の0%、25%、50%、80%、および100%の塩バンブを使用し、かつ緩衝液A中5~55%緩衝液Bの勾配(緩衝液A:95:5の水:アセトニトリル、0.1%ギ酸、緩衝液B:80:20のアセトニトリル:水、0.1%ギ酸)を使用した、5段階多次元タンパク質同定技術(MudPIT)プログラムを使用したQ Exactive Plus質量分析計(Thermo Fisher Scientific)を使用して分析した。データを、動的排除を有効にして(60秒)、データ依存型取得モードで収集した。1回のフルMS(MS1)スキャン(400~1800 m/z)を行い、続いて、n番目に最も豊富なイオンの15回のMS2スキャン(ITMS)を行った。加熱キャピラリー温度を200℃に設定し、ナノスプレー電圧を2.75 kVに設定した。

#### 【0568】

データは、Raw Extractor 1.9.9.2(Scripps Research Institute)を使用してMS1およびMS2ファイルの形式で抽出し、IP2 v.3(Integrated Proteomics Applications, Inc)のProLuCID検索方法論を用いてUniprotヒトデータベースに対して検索した<sup>29</sup>。システイン残基を、カルボキシアミノメチル化についての静的修飾(+57.02146)およびメチオニン酸化についての最大3つの特異的修飾、および

10

20

30

40

50

軽または重TEVタグ（それぞれ、+464.28596または+470.29977）で検索した。ペプチドは、少なくとも1つのトリプシン末端を有し、TEV修飾を含むことが必要とされた。ProLUCIDデータを、DTASelectを通してフィルター処理して、5%未満のペプチド偽陽性率を達成した。3つの生物学的複製のうち2つ全てにおいて明らかであったプローブ修飾ペプチドのみを、それらの同位体の軽対重比について解釈した。3を超える比を示すプローブ修飾ペプチドを、共有結合的に作用する小分子の潜在的な標的としてさらに分析した。3を超える比を有する修飾ペプチドの場合、これらのヒットをフィルタリングして、3つの生物学的複製全てに存在するペプチドを探した。プローブ修飾ペプチド比が3を超える場合、3つの比が3を超えるペプチドのみを解釈し、それ以外の場合は最低の比に置き換えられた。プローブ修飾ペプチド比が4を超える場合、3つの比が4を超えるペプチドのみを解釈し、それ以外の場合は最低の比に置き換えられた。次に、3を超える比を有する、得られたプローブ修飾ペプチドのMS1ピーク形状が、全ての生物学的複製にわたって解釈したペプチドに対して良好な品質であることを手動で確認した。

10

【0569】

実施例3. RNF4に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの合成および特徴付け

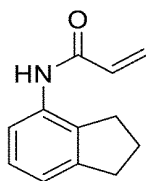
一般的手順A. アミン（1当量）をDCM（5mL/mmole）中に溶解し、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル（1.2当量）、続いて、トリエチルアミン（1.2当量）を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌した。その後、溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（および必要に応じて再結晶）により精製して、対応するアクリルアミドを得た。

20

【0570】

一般的手順B. アミン（1当量）をDCM（5mL/mmole）中に溶解し、0℃に冷却した。この溶液に、塩化クロロアセチル（1.2当量）、続いて、トリエチルアミン（1.2当量）を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌した。その後、溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（および必要に応じて再結晶）により精製して、対応するアクリルアミドを得た。

【化207】



30

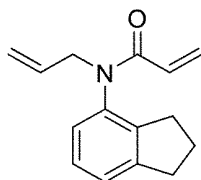
【0571】

N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド（DKM2-84）。DCM（10mL）中の4-アミノインダン（402mg、3.0mmole）の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル（379mg、4.2mmole）を加え、続いて、トリエチルアミン（379mg、3.7mmole）を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中30%の酢酸エチル）により精製して、白色固体として、59%の収率で、生成物（332mg）を得た。<sup>1</sup>H NMR（400MHz, CDCl<sub>3</sub>）：δ 7.72（d, J=7.5Hz, 1H）, 7.54（s, 1H）, 7.10（t, J=7.7Hz, 1H）, 7.01（d, J=7.2Hz, 1H）, 6.40-6.26（m, 2H）, 5.69（dd, J=1.9, 9.7Hz, 1H）, 2.91（t, J=7.4Hz, 2H）, 2.78（t, J=7.4Hz, 2H）, 2.05（五重項, J=7.4Hz, 2H）。<sup>13</sup>C NMR（100MHz, CDCl<sub>3</sub>）：163.5, 145.3, 134.4, 133.6, 131.2, 127.5, 127.2, 12.0, 19.2, 33.2, 30.1, 24.8. HRMS（+ESI）：計算値：188.1070（C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NO）。観測値：188.1069

40

50

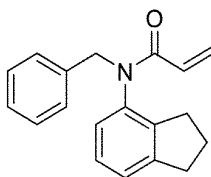
## 【化208】



## 【0572】

N-アリル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (IGA1-12)。テトラヒドロフラン (8 mL) 中の水素化ナトリウム (96 mg、4.0 mmol) の溶液を窒素雰囲気下に置いた。この溶液に、テトラヒドロフラン (2 mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (187 mg、1.0 mmol) を加えた。溶液を 0℃ に冷却し、攪拌した。30 分後に 3-ブロモプロプ-1-エン (484 mg、4.0 mmol) を加え、その後、溶液を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20% の酢酸エチル) によって精製して、黄色結晶性固体として、収率 67% で、生成物 (151 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.06–7.18 (m, 2H), 6.80–6.88 (m, 1H), 6.26–6.37 (dd, J=16.8, 2.0 Hz, 1H), 5.76–5.96 (m, 2H), 5.38–5.48 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 4.98–5.08 (m, 2H), 4.40–4.52 (ddt, J=14.5, 6.3, 1.3 Hz, 1H), 4.00–4.11 (ddt, J=14.5, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 2.82–2.98 (m, 2H), 2.59–2.79 (m, 2H), 1.92–2.07 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.1, 146.5, 142.4, 137.9, 133.0, 128.4, 127.8, 127.48, 126.1, 124.3, 118.1, 51.6, 33.3, 30.9, 25.0. HRMS (+ESI): 計算値: 228.13 (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO)。観測値: 228.1381.

## 【化209】

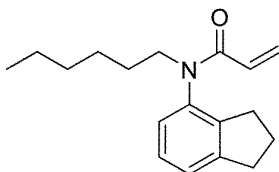


## 【0573】

N-ベンジル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (IGA1-14)。テトラヒドロフラン (8 mL) 中の水素化ナトリウム (96 mg、4.0 mmol) の溶液を窒素雰囲気下に置いた。この溶液に、テトラヒドロフラン (2 mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (187 mg、1.0 mmol) を加えた。溶液を 0℃ に冷却し、攪拌した。30 分後に臭化ベンジル (476 mg、4.0 mmol) を加え、その後、溶液を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20% の酢酸エチル) によって精製して、橙色油として、収率 63% で、生成物 (173 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.10–7.35 (m, 7H), 6.74–6.85 (dd, J=7.8, 1.1 Hz, 1H), 6.40–6.55 (dd, J=16.8, 2.1 Hz, 1H), 5.93–6.08 (dd, J=16.8, 10.3 Hz, 1H), 5.49–5.62 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 4.78–5.10 (m, 2H), 2.85–3.02 (m, 2H), 2.52–2.67 (m, 1H), 2.22–2.37 (m,

1 H), 1.83–2.01 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  146.4, 142.9, 137.7, 137.3, 129.3, 128.4, 128.3, 128.0, 127.5, 127.5, 126.0, 124.3, 52.3, 33.2, 30.6, 25.1. HRMS (+ESI): 計算値: 278.15 ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}$ ). 観測値: 278.1538.

【化210】



10

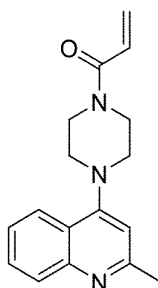
【0574】

N-アリル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) アクリルアミド (IGA1-15)。テトラヒドロフラン (8 mL) 中の水素化ナトリウム (96 mg、4.0 mmol) の溶液を窒素雰囲気下に置いた。この溶液に、テトラヒドロフラン (2 mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) アクリルアミド (187 mg、1.0 mmol) を加えた。溶液を 0°C に冷却し、攪拌した。30 分後に 1-ブロモヘキサン (660 mg、4.0 mmol) を加え、その後、溶液を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20% の酢酸エチル) によって精製して、黄色油として、収率 34% で、生成物 (92 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.11–7.25 (m, 2H), 6.86–6.96 (dd,  $J=7.5$ , 1.2 Hz, 1H), 6.30–6.40 (dd,  $J=16.8$ , 2.1 Hz, 1H), 5.86–6.00 (m, 1H), 5.41–5.51 (dd,  $J=10.3$ , 2.1 Hz, 1H), 3.82–3.96 (m, 1H), 3.42–3.56 (m, 1H), 2.90–3.04 (m, 2H), 2.65–2.85 (m, 2H), 1.98–2.16 (m, 2H), 1.47–1.63 (m, 2H), 1.20–1.36 (m, 6H), 0.80–0.90 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.16, 146.54, 142.38, 138.21, 128.59, 127.51, 127.35, 126.09, 124.13, 48.67, 33.26, 31.62, 30.85, 27.85, 26.72, 25.01, 22.59, 14.05. HRMS (+ESI): 計算値: 272.19 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}$ ). 観測値: 272.2007.

20

30

【化211】



40

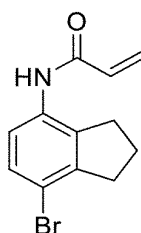
【0575】

1-(4-(2-メチルキノリン-4-イル)ピペラジン-1-イル)プロブ-2-エン-1-オン (IGA1-26)。DCM (20 mL) 中の 2-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)キノロン (455 mg、2.0 mmol) の溶液を、0°C に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (217 mg、2.4 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (243 mg、2.4 mmol) を加えた。溶液を室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで洗浄し、粗生成物を塩基性アルミナクロマトグラフィー (100%

50

酢酸エチル)により精製して、黄色油として、26%の収率で、生成物(145mg)を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.90–8.05 (m, 2H), 7.58–7.70 (ddd,  $J=8.4, 6.8, 1.5$  Hz, 1H), 7.40–7.50 (ddd,  $J=8.2, 6.8, 1.3$  Hz, 1H), 6.68–6.76 (s, 1H), 6.56–6.67 (dd,  $J=16.8, 10.5$  Hz, 1H), 6.30–6.40 (dd,  $J=16.8, 2.0$  Hz, 1H), 5.70–5.80 (dd,  $J=10.5, 2.0$  Hz, 1H), 3.70–4.06 (d,  $J=54.7$  Hz, 4H), 3.10–3.30 (t,  $J=5.0$  Hz, 4H), 2.62–2.72 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.5, 159.4, 156.2, 149.2, 129.26, 129.24, 128.3, 127.3, 124.9, 123.0, 121.6, 109.8, 52.3, 51.9, 45.8, 42.0, 25.6. HRMS (+ESI): 計算値: 282.17 ( $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$ )。観測値: 282.1597.

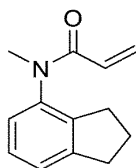
【化212】



【0576】

N-(7-ブロモ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-65)。酢酸(10mL)中のN-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド(DKM2-84、469mg、2.5mmol)の溶液に臭化アンモニウム(305mg、3.1mmol)を加え、続いて過酸化水素溶液(水中50%、1.90mL)を滴下した。反応物を一晩攪拌し、その後、飽和重炭酸ナトリウムの溶液で注意深く中和し、酢酸エチル(3×20mL)で抽出した。次に、合わせた有機物を蒸発させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中20%の酢酸エチル)によって精製して、白色固体として621mgの生成物を得た(93%)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD):  $\delta$  7.36 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J=10.2, 17.0$  Hz, 1H), 6.35 (dd,  $J=1.8, 17.0$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J=1.8, 10.2$  Hz, 1H), 2.95 (q,  $J=8.0$  Hz, 4H), 2.08 (五重項,  $J=7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, MeOD):  $\delta$  146.5, 140.2, 134.2, 132.0, 130.8, 128.1, 124.3, 116.9, 101.4, 35.8, 32.9, 24.9.

【化213】

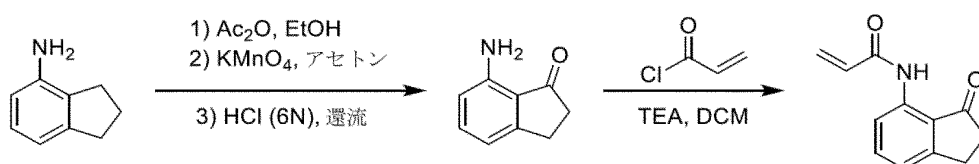


【0577】

N-メチル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-115)。窒素雰囲気下、0℃で、テトラヒドロフラン(8mL)中の水素化ナトリウム(鉱油中60%の分散液、167mg、4.0mmol)の溶液に、テトラヒドロフラン(2mL)中のN-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリ

ルアミド (DKM-2-84、188 mg、1.0 mmol) 溶液を加えた。30 分間攪拌した後、ヨウ化メチル (0.25 mL、4.0 mmol) を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機物をブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させ、得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20% の酢酸エチル) により精製して、35% の収率で、透明な油として、生成物 (71 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.19–7.13 (m, 2H), 6.90 (d, J=7.4 Hz, 1H), 6.32 (dd, J=2.0, 16.8 Hz, 1H), 5.96 (dd, J=10.3, 16.8 Hz, 1H), 5.43 (dd, J=2.0, 10.3 Hz, 1H), 3.24 (s, 3H), 2.93 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.81–2.66 (m, 2H), 2.08–2.00 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.6, 146.6, 141.7, 139.3, 128.2, 127.7, 127.4, 125.1, 124.2, 36.0, 33.2, 30.5, 24.9. HRMS (+ESI): 計算値: 202.1226 (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO). 観測値: 202.1224.

#### 【化 214】

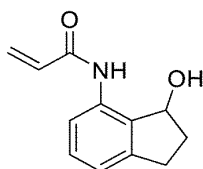


#### 【0578】

N-(3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-129)。0℃でエタノール (20 mL) 中の 4-アミノインダン (1.0 g、7.5 mmol) の溶液に無水酢酸 (1.4 mL、15.0 mmol) を加えた。溶液を室温に上げ、一晚攪拌した後、溶媒を蒸発させた。次に、残留物をアセトン (50 mL) に溶解し、それに 15% 硫酸マグネシウム水溶液 (6.75 mL の水中 1.2 g)、続いて過マンガン酸カリウム (3.4 g、17.0 mmol) を加え、得られた溶液を 24 時間攪拌した。反応物をセライトのパッドを通して濾過し、クロロホルム、次に水で溶出した。溶離液を分離し、追加のクロロホルムで水層を数回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させた。次に、残留物を 6N HCl 溶液 (20 mL) に溶解し、90℃に加熱した。5 時間攪拌した後、溶液を冷却し、少量の炭酸カリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させて、610 mg (3 ステップで 55%) の粗 7-アミノインダン-1-オンを得て、これをさらに精製することなく使用した。ジクロロメタン (15 mL) 中の 7-アミノインダン-1-オンの溶液に、塩化アクリロイル (0.39 mL、4.8 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.67 mL、4.8 mmol) を N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。反応混合物を室温まで加温させ、一晚攪拌した。溶液を 1M HCl 溶液 (2×) およびブラインで洗浄し、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 10%~20% の酢酸エチル) により精製して、390 mg の白色固体 (47% 収率、4 ステップで合わせて 26%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.64 (s, 1H), 8.45 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.55 (t, J=7.9 Hz, 1H), 7.12 (d, J=7.6 Hz, 1H), 6.45 (dd, J=1.0, 17.0 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=10.1, 17.0 Hz, 1H), 5.82 (dd, J=1.0, 10.1 Hz, 1H), 3.11 (t, J=11.5 Hz, 2H), 2.74–2.71 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 209.3, 164.4, 155.9, 138.7, 137.0, 131.7, 128.0, 123.1, 120.8, 116.9, 36.5, 25.5. HRMS (+ESI): 計算値: 202.0863 (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>). 観測値: 2

02.0860.

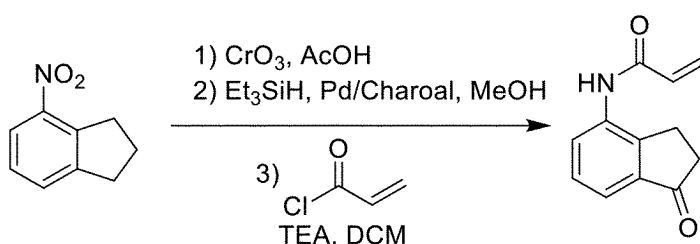
【化215】



【0579】

N-(3-ヒドロキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-133)。窒素雰囲気下、無水メタノール (7 mL) 中の N-(3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH-1-129、201 mg、1.0 mmol) の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム (46.1 mg、1.2 mmol) を加えた。30 分間攪拌した後、反応物を飽和重炭酸ナトリウム溶液でクエンチし、DCM で 3 回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 30~50% の酢酸エチル) で精製して、190 mg の生成物を白色固体として得た (94% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.93 (s, 1H), 7.98 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 6.15 (dd, J = 10.2, 16.9 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.32 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 3.60 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 2.96 (ddd, J = 2.4, 9.0, 15.7 Hz), 2.73 (五重項, J = 8.1 Hz, 1H), 2.56-2.48 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.1, 143.7, 135.6, 132.8, 131.6, 129.5, 127.3, 121.0, 118.5, 76.2, 36.0, 29.8。HRMS (-ESI): 計算値: 202.0874 (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>)。観測値: 202.0874。

【化216】

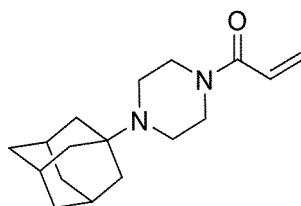


【0580】

N-(1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-134)。酢酸 (250 mL) 中の 4-ニトロインダン (5.38 g、33 mmol) の溶液に、三酸化クロム (8.95 g、90 mmol) をゆっくりと加えた。24 時間攪拌した後、反応物を 2 M NaOH で中和し、酢酸エチルで 5 回抽出した。合わせた有機物を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、次に硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 10~20% の酢酸エチル) により精製して、1.26 g (約 7.1 mmol) の 4-ニトロインダノン白色固体として得た。この中間体を、窒素バルーンの雰囲気下で無水メタノール (21 mL) に溶解した活性炭 (125 mg、10 重量%) 上のパラジウムと組み合わせた。反応物を室温の水浴の冷却下で攪拌しながら、トリエチルシラン (11.3 mL、71 mmol) を、添加漏斗によって 10 分間にわたってゆっくりと加えた。さらに 20 分間攪拌した後、反応混合物をセライトのパッドを通して濾過し、続いて濃縮して、

粗 4-アミノインダノンを得、これをさらに精製することなく使用した。次に、この最終中間体を  $N_2$  雰囲気下で DCM (21 mL) に溶解し、0℃に冷却した後、塩化アクリロイル (0.77 mL、9.5 mmol) およびトリエチルアミン (1.19 mL、8.5 mmol) をゆっくりと加えた。一晩攪拌しながら反応物を室温まで加温させ、その時点で反応物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30~50%の酢酸エチル) により精製して、989 mg の白色固体を得た (3ステップで15%収率)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.20 (d,  $J=5.8$  Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 7.39 (t,  $J=7.7$  Hz, 1H), 6.48 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 6.37 (dd,  $J=10.0$  Hz, 16.8 Hz, 1H), 5.83 (d,  $J=10.1$  Hz, 1H), 3.04 (t,  $J=5.6$  Hz, 2H), 2.70 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  206.3, 163.9, 146.0, 138.0, 135.4, 130.7, 128.8, 128.7, 127.6, 120.4, 36.1, 23.4. HRMS (−ESI): 計算値: 200.0717 ( $C_{12}H_{10}NO_2$ )。観測値: 200.0715.

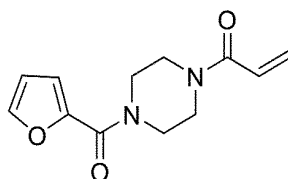
【化217】



【0581】

1-(4-((3s, 5s, 7s)-アダマンタン-1-イル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (TRH1-143)。ジクロロメタン (10 mL) 中の 1-(1-アダマンチル)ピペラジン (441 mg、2.0 mmol) 溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を  $N_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、24時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中の0%~5%のメタノール) によって精製して、131 mg の褐色固体を得た (24%収率)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.59 (dd,  $J=10.5$ , 16.8 Hz, 1H), 6.31 (dd,  $J=1.8$ , 16.8 Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J=5.77$  Hz, 1H), 4.12 (s, 4H), 3.17 (s, 4H), 2.25 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 1.71 (q,  $J=8.6$  Hz, 6H).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  165.0, 129.0, 126.4, 63.3, 44.6, 44.1, 42.9, 39.0, 36.4, 35.5, 29.3. HRMS (+ESI): 計算値: 275.2118 ( $C_{17}H_{27}N_2O$ )。観測値: 275.2113.

【化218】



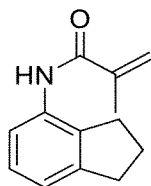
【0582】

1-(4-(フラン-2-カルボニル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1



ーオン (TRH1-145)。ジクロロメタン (10 mL) 中の 1-(2-フロイル) ピペラジン (362 mg、2.0 mmol) 溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20 分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、24 時間攪拌した。溶液をブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中の 70%~100% の酢酸エチル) によって精製して、446 mg の黄色固体を得た (95% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.53 (m, 1H), 7.06 (dd, J=0.7, 3.5 Hz, 1H), 6.61 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.52 (dd, J=1.8, 3.5 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=1.9, 16.8 Hz, 1H), 5.75 (dd, J=1.9, 10.5 Hz, 1H), 3.84-3.67 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.5, 159.1, 147.5, 144.0, 128.5, 127.1, 117.0, 111.5, 45.6, 41.9. HRMS (+ESI): 計算値: 235.1077 (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)。観測値: 235.1075.

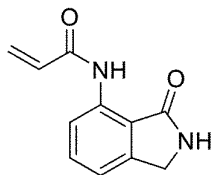
【化219】



【0583】

N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)メタクリルアミド (TRH1-149)。ジクロロメタン (10 mL) 中の 4-アミノインダン (0.24 mL、2.0 mmol) 溶液に、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で塩化メタクリロイル (0.23 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を加えた。20 分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、3.5 時間攪拌した。溶液をブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 35%~40% の酢酸エチル) によって精製して、378 mg のオフホワイト色固体を得た (94% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.72 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t, J=7.7 Hz, 1H), 7.01 (d, J=7.4 Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 2.93 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.79 (t, J=7.4 Hz, 2H), 7.12-2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166.3, 145.1, 140.6, 134.5, 133.7, 127.0, 120.7, 119.8, 118.9, 33.1, 29.9, 24.7, 18.6. HRMS (+ESI): 計算値: 202.1226 (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO)。観測値: 202.1224.

【化220】

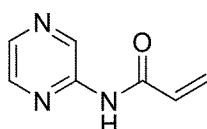


【0584】

N-(3-オキソイソインドリン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-152)。ジクロロメタン (4 mL) 中の 7-アミノイソインドリン-1-オン (99 mg、0.67 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.07 mL、0.8 mmol)、続いてト

リエチルアミン (0.11 mL、0.8 mmol) を  $N_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中50～60%の酢酸エチル) によって精製して、58 mgの白色固体を得た (43%収率)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  10.50 (s, 1H), 8.58 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.55 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.46 (dd,  $J=1.3, 17.0$  Hz, 1H), 6.36 (dd,  $J=10.0, 17.0$  Hz, 1H), 5.81 (dd,  $J=1.3, 10.0$  Hz, 1H), 4.46 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  172.9, 164.2, 143.9, 138.2, 133.8, 131.8, 127.8, 118.0, 117.7, 117.6, 45.6. HRMS (+ESI) : 計算値 : 203.0815 ( $C_{11}H_{11}N_2O_2$ )。観測値 : 203.0814.

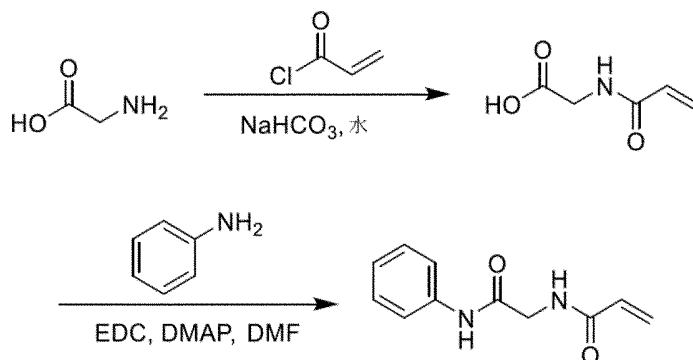
【化221】



【0585】

N-(ピラジン-2-イル) アクリルアミド (TRH1-156)。ジクロロメタン (10 mL) 中のアミノピラジン (192 mg、2.0 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を、 $N_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中50%～70%の酢酸エチル) によって精製して、22 mgの白色固体を得た (7%収率)。 $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  9.65 (d,  $J=1.3$  Hz, 1H), 8.38 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H), 8.27 (dd,  $J=1.6, 2.5$  Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.54 (dd,  $J=0.8, 16.9$  Hz, 1H), 6.33 (dd,  $J=10.3, 16.9$  Hz, 1H), 5.90 (dd,  $J=0.8, 10.3$  Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  163.5, 148.2, 142.2, 140.6, 137.4, 130.2, 129.8. HRMS (+ESI) : 計算値 : 150.0662 ( $C_7H_8N_3O$ )。観測値 : 150.0660.

【化222】

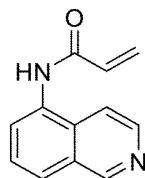


【0586】

N-(2-オキソ-2-(フェニルアミノ)エチル) アクリルアミド (TRH1-160)。水 (30 mL) 中のグリシン (1.50 g、20.0 mmol) および重炭酸ナトリウム (1.70 g、20.2 mmol) の溶液に、0℃で、塩化アクリロイル (2.4

5 mL、30.2 mmol) をゆっくりと加えた。3.5 時間攪拌した後、反応物を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮して油を得た。油をヘキサンで処理すると、白色固体が崩壊し、これを重力濾過によって収集して、124 mg の粗アクリロイルグリシンを得て、そのうち58 mg (粗物質の47%) をさらに精製することなく直ちに使用した。この固体 (約0.45 mmol) を DMF (2.5 mL) に溶解し、DMF (2.5 mL) 中の N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (104 mg、0.54 mmol) および 4-ジメチルアミノピリジン (68 mg、0.56 mmol) の溶液、続いてアニリン (0.050 mL、0.54 mmol) を加えた。溶液を一晩攪拌し、酢酸エチルで希釈し、重炭酸ナトリウムの飽和溶液およびブラインの両方で洗浄した。次に、有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30~60%の酢酸エチル) によって精製して、19 mg の表題化合物を白色固体として得た (2ステップで1%収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 7.56-7.53 (m, 2H), 7.30 (t, J=8.0 Hz, 2H), 7.08 (t, J=7.4 Hz, 1H), 6.35 (dd, J=9.9, 17.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, J=2.0, 17.1 Hz, 1H), 5.71 (dd, J=2.0, 9.9 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) : δ 169.4, 168.6, 139.5, 131.7, 129.8, 127.2, 125.3, 121.2, 44.0. HRMS (-ESI) : 計算値: 203.0826 (C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。観測値: 203.0825.

【化223】



【0587】

N-(イソキノリン-5-イル)アクリルアミド (TRH1-162)。ジクロロメタン (10 mL) 中の5-アミノイソキノリン (287 mg、2.0 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで洗浄し、得られた水層を2:1のクロロホルム:メタノール溶液で抽出した。得られた粗製物を、塩基性アルミナ (ヘキサン中50%の酢酸エチル~酢酸エチル中4%のエタノール) でのクロマトグラフィーによって精製して、43 mg の黄色固体を得た (11%収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 9.23 (s, 1H), 8.45 (d, J=6.1 Hz, 1H), 8.03 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.97 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.88 (d, J=6.1 Hz, 1H), 7.68 (t, J=7.9 Hz, 1H), 6.66 (dd, J=10.2, 17.0 Hz, 1H), 6.47 (dd, J=1.5, 17.0 Hz, 1H), 5.88 (dd, J=1.7, 10.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) : δ 167.1, 153.5, 143.0, 133.6, 132.4, 131.9, 130.6, 128.7, 127.9, 127.1, 117.2. HRMS (+ESI) : 計算値: 199.0866 (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O)。観測値: 199.0863.

10

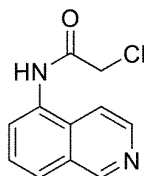
20

30

40

50

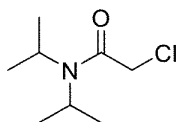
## 【化 2 2 4】



## 【0 5 8 8】

2-クロロ-N-(イソキノリン-5-イル)アセトアミド (TRH1-163)。ジクロロメタン (10 mL) 中の5-アミノイソキノリン (289 mg、2.0 mmol) 溶液に、塩化クロロアセチル (0.19 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晚攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物を塩基性アルミナ (ヘキサン中30%の酢酸エチル～酢酸エチル中4%のエタノール) でのクロマトグラフィーにより精製して、157 mgの黄色固体を得た (36%収率)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD) : δ 9.26 (s, 1H), 8.48 (d, J=6.1 Hz, 1H), 8.03 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.98 (d, J=7.4 Hz, 1H), 7.91 (d, J=6.1 Hz, 1H), 7.71 (t, J=7.9 Hz, 1H), 4.39, (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOD) : δ 167.4, 152.1, 141.7, 131.8, 131.2, 129.2, 127.3, 127.0, 126.1, 115.7, 42.3. HRMS (+ESI) : 計算値 : 221.0476 (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O)。観測値 : 221.0473.

## 【化 2 2 5】



## 【0 5 8 9】

2-クロロ-N,N-ジイソプロピルアセトアミド (TRH1-168)。ジクロロメタン (10 mL) 中のジイソプロピルアミン (0.42 mL、3.0 mmol) 溶液に、塩化クロロアセチル (0.29 mL、3.6 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.50 mL、3.6 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晚攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中0～20%の酢酸エチル) によって精製して、376 mgの白色固体を得た (70%収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 3.93 (s, 2H), 3.88–3.82 (m, 1H), 3.38–3.31 (m, 1H), 1.29 (d, J=6.5 Hz, 6H), 1.14 (d, J=6.4 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 165.0, 49.7, 46.1, 43.2, 20.7, 20.0. HRMS (+ESI) : 計算値 : 200.0813 (C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NOClNa)。観測値 : 200.0811.

10

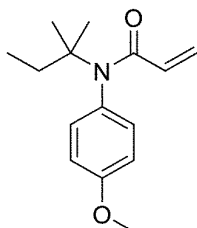
20

30

40

50

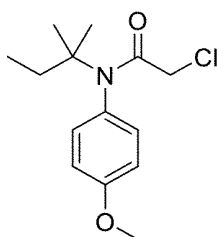
## 【化 2 2 6】



## 【0 5 9 0】

N-(4-メトキシフェニル)-N-(tert-ペンチル)アクリルアミド (TRH 1-170)。ジクロロメタン (5 mL) 中の 4-メトキシ-N-(tert-ペンチル)アニリン (94 mg、0.49 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.05 mL、0.6 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.09 mL、0.6 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。15 分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、18 時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 0%~20% の酢酸エチル) によって精製して、82 mg の淡黄色油を得た (68% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.99 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.85 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.17 (dd, J=1.9, 16.7 Hz, 1H), 5.76 (dd, J=10.3, 16.7 Hz, 1H), 5.28 (dd, J=1.9, 10.3 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (q, J=7.5 Hz, 2H), 1.20 (s, 6H), 0.91 (t, J=7.5 Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166.3, 159.0, 134.3, 131.49, 131.45, 125.6, 114.1, 61.7, 55.5, 32.0, 27.4, 9.4。HRMS (+EI): 計算値: 247.1572 (C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>)。観測値: 247.1577。

## 【化 2 2 7】

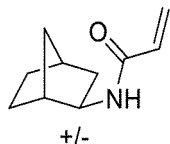


## 【0 5 9 1】

2-クロロ-N-(4-メトキシフェニル)-N-(tert-ペンチル)アセトアミド (TRH 1-171)。ジクロロメタン (5 mL) 中の 4-メトキシ-N-(tert-ペンチル)アニリン (95 mg、0.5 mmol) 溶液に、塩化クロロアセチル (0.05 mL、0.6 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.085 mL、0.6 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。15 分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晚攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~10% の酢酸エチル) によって精製して、99 mg の黄色油を得た (74% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.04 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.87 (d, J=8.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.05 (q, J=7.4 Hz, 2H), 1.16 (s, 6H), 0.90 (t, J=7.4 Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166.0, 159.5, 133.2, 131.0, 114.5, 62.5, 55.5, 44.

8, 31.8, 27.1, 9.3. HRMS (+ESI): 計算値: 270.1255 ( $C_{14}H_{21}NO_2Cl$ )。観測値: 270.1254。

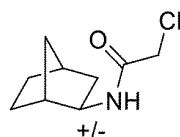
【化228】



【0592】

N-(エキソ-ノルボルン-2-イル) アクリルアミド (TRH1-176)。ジクロロメタン (10 mL) 中のエキソ-2-アミノノルボルナン (0.24 mL、2 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33 mL、2.4 mmol) を、 $N_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、18時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30%の酢酸エチル) によって精製して、271 mgの白色固体を得た (82%収率)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.42 (s, 1H), 6.25 (dd,  $J=2.3, 17.0$  Hz, 1H), 6.18 (dd,  $J=9.5, 17.0$  Hz, 1H), 5.58 (dd,  $J=2.3, 9.5$  Hz, 1H), 3.8–3.77 (m, 1H), 2.27–2.24 (m, 2H), 1.78 (ddd,  $J=2.1, 8.1, 13.0$  Hz, 1H), 1.55–1.38 (m, 3H), 1.30–1.10 (m, 4H)。 $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  165.0, 131.4, 125.8, 52.9, 42.4, 40.0, 35.7, 35.6, 28.2, 26.6. HRMS (+EI): 計算値: 165.1154 ( $C_{10}H_{15}NO$ )。観測値: 165.1155。

【化229】



【0593】

2-クロロ-N-(エキソ-ノルボルン-2-イル) アセトアミド (TRH1-177)。ジクロロメタン (10 mL) 中のエキソ-2-アミノノルボルナン (0.24 mL、2 mmol) の溶液に、塩化クロロアセチル (0.19 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33 mL、2.4 mmol) を、 $N_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中20~40%の酢酸エチル) によって精製して、345 mgの白色固体を得た (91%収率)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.48 (s, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.67–3.63 (m, 1H), 2.24–2.22 (m, 1H), 2.16–2.15 (m, 1H), 1.74 (ddd,  $J=1.9, 8.1, 13.0$  Hz, 1H), 1.50–1.36 (m, 2H), 1.30–1.26 (m, 1H), 1.21–1.14 (m, 3H), 1.09–1.03 (m, 1H)。 $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  165.0, 53.1, 42.6, 42.2, 40.0, 35.6, 35.5, 28.0, 26.3. HRMS (+ESI): 計算値: 187.0764 ( $C_9H_{14}NOCl$ )。観測値: 187.0765。

10

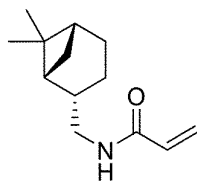
20

30

40

50

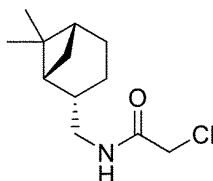
## 【化 2 3 0】



## 【0 5 9 4】

N-((1R, 2S, 5R)-6,6-ジメチルビシクロ[3.1.1]ヘプタン-2-イル)メチル)アクリルアミド (TRH1-178)。ジクロロメタン (10 mL) 中の (-)-シス-ミルタニルアミン (0.34 mL、2 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33 mL、2.4 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、21時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中20~30%の酢酸エチル) によって精製して、369 mgの白色固体を得た (89%収率)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.26 (dd, J=1.5, 17.0 Hz, 1H), 6.11 (dd, J=10.3, 17.0 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.61 (dd, J=1.5, 10.3 Hz, 1H), 3.39-3.29 (m, 2H), 2.38-2.34 (m, 1H), 2.26-2.21 (m, 1H), 1.98-1.90 (m, 4H), 1.88-1.83 (m, 1H), 1.53-1.47 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.89 (d, J=9.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.7, 131.2, 126.2, 45.3, 43.9, 41.5, 38.8, 33.3, 28.1, 26.1, 23.3, 19.9. HRMS (-ESI): 計算値: 206.1550 (C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NO)。観測値: 206.1551。

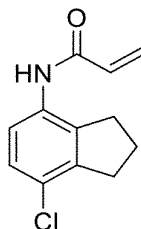
## 【化 2 3 1】



## 【0 5 9 5】

2-クロロ-N-((1R, 2S, 5R)-6,6-ジメチルビシクロ[3.1.1]ヘプタン-2-イル)メチル)アセトアミド (TRH1-179)。ジクロロメタン (10 mL) 中の (-)-シス-ミルタニルアミン (0.34 mL、2 mmol) の溶液に、塩化クロロアセチル (0.19 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33 mL、2.4 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中0~20%の酢酸エチル) によって精製して、405 mgのオフホワイト色固体を得た (88%収率)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.61 (s, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.33-3.30 (m, 2H), 2.40-2.36 (m, 1H), 2.27-2.21 (m, 1H), 1.99-1.83 (m, 5H), 1.53-1.46 (m, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.90 (d, J=9.7 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.8, 45.5, 43.8, 42.9, 41.4, 41.2, 38.8, 33.3, 28.0, 26.0, 23.3, 19.8. HRMS (-ESI): 計算値: 228.1161 (C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NOCl)。観測値: 228.1162。

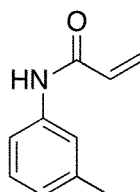
## 【化 2 3 2】



## 【0 5 9 6】

N-(7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) アクリルアミド (YP1-1)。PEG400 (5.2 mL) 中のN-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) アクリルアミド (187 mg、1.0 mmol) の溶液を0℃に冷却した。この溶液に、N-クロロスクシンイミド (140 mg、1.0 mmol) を加えた。溶液を30分後に室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液を酢酸エチルで希釈し、ブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30%の酢酸エチル) により精製した。得られた異性体の混合物を再結晶により分離し、白色固体として、22%の収率で、生成物 (47 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.15-7.11 (m, 2H), 6.42 (dd, J=1.4, 16.8 Hz, 1H), 6.26 (dd, J=10.2, 16.8 Hz, 1H), 5.77 (dd, J=1.4, 10.2 Hz, 1H), 2.98 (t, J=7.6 Hz, 2H), 2.87 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.12 (五重項, J=7.5 Hz, 2H)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.4, 143.1, 136.1, 132.2, 131.0, 128.0, 127.2, 126.7, 120.9, 32.7, 31.1, 24.0。HRMS (+ESI): 計算値: 220.0535 (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClNO)。観測値: 220.0533。

## 【化 2 3 3】

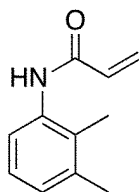


## 【0 5 9 7】

N-(m-トリル) アクリルアミド (YP1-16)。DCM (10 mL) 中のo-トリルイジン (107 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を40分後に室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中20~40%の酢酸エチル) によって精製して、白色固体として、収率86%で、生成物 (139 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.82 (d, J=7.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.21-7.17 (m, 2H), 7.10-7.06 (m, 1H), 6.43-6.38 (m, 1H), 6.29 (dd, J=10.2, 17.1 Hz, 1H), 5.75-5.72 (m, 1H), 2.25 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 135.5, 131.2, 130.5, 127.5, 126.8, 125.5, 123.4, 17.8。HRMS (+ESI): 計算値: 162.0913 (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>NO)。観測値: 162.0912。



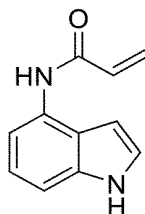
## 【化 2 3 4】



## 【0 5 9 8】

N-(2,3-ジメチルフェニル)アクリルアミド (YP1-18)。DCM (10 mL) 中の2,3-ジメチルアニリン (121 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を29分後に室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30~40%の酢酸エチル) によって精製して、白色固体として、収率88%で、生成物 (154 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.49 (d, J=7.9 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.11-7.07 (m, 1H), 7.01 (d, J=7.7, 1H), 6.40 (d, J=17.1, 1H), 6.30 (dd, J=7.3, 17.1 Hz, 1H), 5.74 (d, J=10.1 Hz, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.13 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 135.1, 131.2, 127.6, 127.3, 125.9, 122.3, 20.6, 13.9. HRMS (+ESI) : 計算値 : 176.1070 (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO)。観測値 : 176.1068.

## 【化 2 3 5】



## 【0 5 9 9】

N-(1H-インドール-4-イル)アクリルアミド (YP1-19)。DCM (5 mL) およびDMF (5 mL) 中の4-アミノインドール (132 mg、1 mmol) の溶液を0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を26分後に室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物を塩基性アルミナクロマトグラフィー (ヘキサン中60%~75%の酢酸エチル) により精製して、白灰色固体として、収率30%で、生成物 (56 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD) : δ 7.51 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.24-7.22 (m, 2H), 7.08 (t, J=7.6 Hz, 1H), 6.64 (dd, J=10.1, 16.7 Hz, 2H), 6.38 (dd, J=1.7, 16.9 Hz, 1H), 5.78 (dd, J=1.7, 10.3 Hz, 1H), 4.6 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOD) : δ 165.0, 137.2, 131.1, 129.2, 126.0, 123.8, 121.5, 120.9, 112.2, 108.4, 98.5. HRMS (+ESI) : 計算値 : 187.0866 (C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O)。観測値 : 187.0865.

10

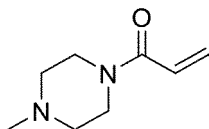
20

30

40

50

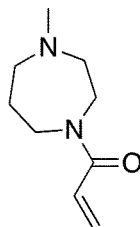
## 【化236】



## 【0600】

1-(4-メチルピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-22) 。DCM (10 mL) 中の1-メチルピペラジン (100 mg、1.0 mmol) の溶液を0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を30分後に室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中85%~100%の酢酸エチル) によって精製して、黄色ゲルとして、収率29%で、生成物 (44 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 6.56 (dd, J=10.6, 16.9 Hz, 1H), 6.29 (dd, J=2.0, 16.8 Hz, 1H), 5.69 (dd, J=2.0, 10.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.42 (t, J=5.1 Hz, 4H), 2.32 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 165.4, 127.8, 127.5, 55.2, 54.6, 46.0, 45.7, 41.9. HRMS (+ESI) : 計算値: 155.1179 (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O)。観測値: 155.1178.

## 【化237】



## 【0601】

1-(4-メチル-1,4-ジアゼパン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-23) 。DCM (10 mL) 中の1-メチルホモピペラジン (114 mg、1.0 mmol) の溶液を0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を32分後に室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中1%~10%のメタノール) によって精製して、黄色油として、収率51%で、生成物 (58 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 6.61-6.53 (m, 1H), 6.35-6.29 (m, 1H), 5.70-5.66 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.69 (t, J=6.4 Hz, 1H), 3.65-3.61 (m, 2H), 2.66-2.63 (m, 2H), 2.59-2.54 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.94 (五重項, J=6.2 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 166.4, 166.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 59.1, 58.0, 57.1, 56.8, 47.4, 47.1, 46.7, 46.6, 45.3, 44.8, 28.1, 26.9. HRMS (+ESI) : 計算値: 169.1335 (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O)。観測値: 169.1333.

10

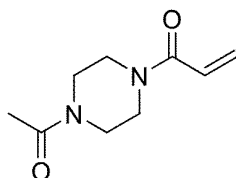
20

30

40

50

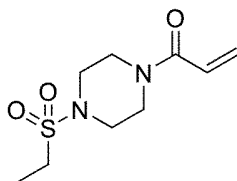
## 【化238】



## 【0602】

1-(4-アセチルピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-24)。DCM (10 mL) 中の1-アセチルピペラジン (128 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を23分後に室温に加温させ、2時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中0%~10%のメタノール) によって精製して、黄色油として、18%収率で、生成物 (40 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.57 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=1.8, 16.8 Hz, 1H), 5.75 (dd, J=1.9, 10.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.66-3.64 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.51-3.49 (m, 2H), 2.13 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.6, 128.7, 127.0, 41.9, 41.4, 21.4. HRMS (+ESI): 計算値: 183.1128 (C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 観測値: 183.1126.

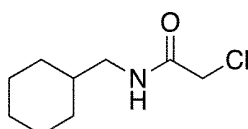
## 【化239】



## 【0603】

1-(4-(エチルスルホニル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-25)。DCM (10 mL) 中の1-(エタンスルホニル)ピペラジン (178 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を27分後に室温に加温させ、2時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中1%~10%のメタノール) によって精製して、白黄色固体として、収率70%で、生成物 (163 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.57 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.32 (dd, J=1.9, 16.8 Hz, 1H), 5.76 (dd, J=1.8, 10.5 Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.32 (t, J=5.2 Hz, 4H), 2.98 (q, J=7.5 Hz, 2H), 1.37 (t, J=7.4, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.5, 128.8, 127.0, 77.4, 45.9, 45.6, 44.2, 41.9, 7.8. HRMS (+ESI): 計算値: 233.0954 (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>1</sub>). 観測値: 233.0953.

## 【化240】



10

20

30

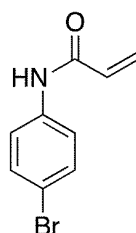
40

50

## 【0604】

2-クロロ-N-(シクロヘキシルメチル)アセトアミド(YP1-31)。一般的手順Bに従って、シクロヘキサンメチルアミン(113mg、1.0mmol)から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー(ジクロロメタン中100%のジクロロメタン～3%のメタノール)の後、白色固体として、収率60%で、生成物(112mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.70(s, 1H), 4.06(s, 2H), 3.15(t, J=6.47 Hz, 2H), 1.77-1.65(m, 5H), 1.56-1.46(m, 1H), 1.30-1.10(m, 3H), 1.00-0.90(m, 2H). <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.8, 58.1, 46.0, 42.8, 37.7, 30.7, 26.3, 25.7, 18.2. HRMS(+ESI): 計算値: 190.0993(C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>ONCl). 観測値: 190.0992.

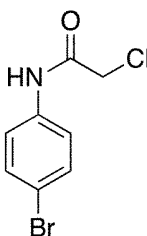
## 【化241】



## 【0605】

N-(4-ブロモフェニル)アクリルアミド(YP1-36)。一般的手順Aに従って、4-ブロモアニリン(688mg、4.0mmol)から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中30%～60%の酢酸エチル)の後、白色固体として、収率28%で、生成物(250mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.90(s, 1H), 7.60-7.56(m, 2H), 7.47-7.44(m, 2H), 6.45-6.33(m, 2H), 5.78(dd, J=2.8, 9.1 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 164.7, 137.7, 131.4, 130.9, 126.7, 121.5, 116.3, 101.1, 78.1. HRMS(+ESI): 計算値: 223.9716(C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NOBr). 観測値: 223.9719.

## 【化242】

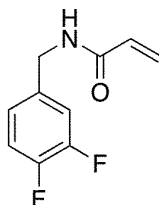


## 【0606】

N-(4-ブロモフェニル)-2-クロロアセトアミド(YP1-37)。一般的手順Bに従って、4-ブロモアニリン(688mg、4.0mmol)から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中30%～60%の酢酸エチル)の後、白色固体として、収率49%で、生成物(491mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.9(s, 1H), 7.57-7.53(m, 2H), 7.50-7.47(m, 2H), 4.17(s, 2H). <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 166.0, 137.2, 131.5, 121.6, 116.7, 99.3, 78.1, 42.6. HRMS(+ESI): 計算値: 245.9327(C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>NOBrCl)

。観測値：245.9329.

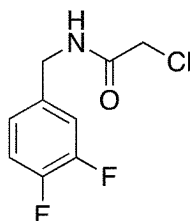
【化243】



【0607】

N-(3,4-ジフルオロベンジル)アクリルアミド (YP1-38)。一般的手順Aに従って、3,4-ジフルオロベンジルアミン (286 mg、2.0 mmol) から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中40%~80%の酢酸エチル) の後、白色固体として、収率61%で、生成物 (239 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.56 (t, J=6.2, 1H), 7.07-7.00 (m, 2H), 6.95-6.91 (m, 1H), 6.21-6.20 (m, 2H), 5.62-5.59 (m, 1H), 4.35 (d, J=6.1, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 166.1, 151.4 (d), 150.7 (d), 148.9 (d), 148.2 (d), 135.5-135.4 (m), 130.5, 126.8, 123.5-123.4 (m), 117.2 (d), 116.3 (d), 42.4. HRMS (+ESI) : 計算値: 196.0579 (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>NOF<sub>2</sub>)。観測値: 196.0582.

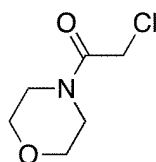
【化244】



【0608】

2-クロロ-N-(3,4-ジフルオロベンジル)アセトアミド (YP1-39)。一般的手順Aに従って、3,4-ジフルオロベンジルアミン (286 mg、2.0 mmol) から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中40%~50%の酢酸エチル) の後、白色固体として、収率82%で、生成物 (359 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.23 (s, 1H), 7.15-7.08 (m, 2H), 7.03-7.6.99 (m, 1H), 4.42 (d, J=6.1 Hz, 2H), 4.08 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 166.3, 151.5 (d), 151.0 (d), 149.1 (d), 148.5 (d), 134.7-134.6 (m), 123.7-123.6 (m), 117.5 (d), 116.6 (d), 42.6 (d). HRMS (+ESI) : 計算値: 218.0190 (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NOClF<sub>2</sub>)。観測値: 218.0192

【化245】



【0609】

10

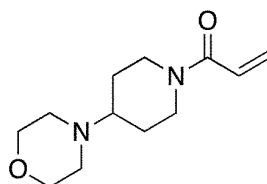
20

30

40

50

2-クロロ-1-モルホリノエタン-1-オン (YP1-40)。一般的手順Bに従って、モルホリン (174 mg、2.0 mmol) から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中85%の酢酸エチル) の後、白色固体として、収率61%で、生成物 (200 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.01 (s, 2H), 3.65–3.59 (m, 4H), 3.55–3.52 (m, 2H), 3.45 (t, J=4.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.1, 66.5 (d), 46.6, 42.4, 40.7. HRMS (+ESI): 計算値: 186.0292 (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>NClNa)。観測値: 186.0292。  
【化246】



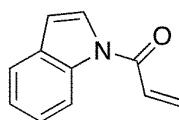
10

## 【0610】

1-(4-モルホリノピペリジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-42)。一般的手順Aに従って、4-モルホリノピペリジン (336 mg、2.0 mmol) から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中1%のメタノールおよび80%の酢酸エチル) の後、無色油として、収率58%で、生成物 (259 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.42 (dd, J=10.6, 16.8 Hz, 1H), 6.06 (dd, J=2.0, 16.8 Hz, 1H), 5.49 (dd, J=2.0, 10.6 Hz, 1H), 4.45 (d, J=12.8 Hz, 1H), 3.86 (d, J=12.8 Hz, 1H), 3.52 (t, J=4.7 Hz, 4H), 2.90 (t, J=12.8 Hz, 1H), 2.55–2.48 (m, 1H), 2.37–2.35 (m, 4H), 2.26 (tt, J=3.7, 11.0 Hz, 1H), 1.72 (d, J=12.8 Hz, 2H), 1.30–1.20 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.0, 127.7, 127.3, 67.1, 61.6, 49.6, 44.9, 41.1, 28.9, 27.8. HRMS (+ESI): 計算値: 225.1598 (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。観測値: 225.1595。  
【化247】

20

30



## 【0611】

1-(1H-インドール-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-44)。2-メチルテトラヒドロフラン (10 mL) 中のインドール (117 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、水素化ナトリウム (60 mg、2.5 mmol) を加えた。得られた中間体を一般的手順Aに供し、アルミナゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中10%~40%の酢酸エチル) の後、白色固体として、収率8%で、生成物 (14 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.48–8.46 (m, 1H), 7.82 (d, J=3.9 Hz, 1H), 7.61–7.59 (m, 1H), 7.36–7.32 (m, 1H), 7.31–7.21 (m, 2H), 6.73 (dd, J=0.8, 3.8 Hz, 1H), 6.64 (dd, J=1.7, 16.7 Hz, 1H), 6.09 (dd, J=1.7, 10.5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 164.3, 135.7, 131.0, 130.9, 128.0, 125.0, 124.4, 123.6, 120.5, 116.2, 108.。  
【化248】

40

50

9. HRMS (+ESI): 計算値: 172.0757 (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>NO)。観測値: 172.0756.

【0612】

TRH1-23類似体およびCCW28-3分解剤の合成および特徴付け。

【0613】

一般的な合成方法化学薬品および試薬を主要な商業的供給業者から購入し、さらに精製することなく使用した。別途記述されない限り、反応を、窒素雰囲気下で実施した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを、EMDまたはSigma Aldrichシリカゲル60(230~400メッシュ)を使用して実施した。プロトンおよび炭素核磁気共鳴(<sup>1</sup>H NMRおよび<sup>13</sup>C NMR)データを、the University of California, BerkeleyのBruker AVB400、AVQ400、またはAV600分光計で取得した。高分解能質量スペクトルを、ポジティブまたはネガティブエレクトロスプレーイオン化(+ESIまたは-ESI)を使用して、QB3質量分析施設から取得した。収量は、1回の実行として報告される。

【0614】

一般的なクロロアセトアミド合成方法。アミン(1当量)を、20mLシンチレーションバイアル内の無水DCM(2~10mL)に溶解した。この溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、1.2当量)、続いてトリエチルアミン(Sigma、1.2当量)を加えた。溶液を窒素下で一晩攪拌した。反応を、ニンヒドリン染色を伴うTLCによって監視した。反応が完了したら、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、粗製物をフラッシュクロマトグラフィー用のシリカゲルカラムに直接適用して、対応するクロロアセトアミドを得た。

【0615】

2-クロロ-N-(4-(4-(トリフルオロメチル)フェノキシ)フェニル)アセトアミド(CCW1)。DCM中の4-(4-(トリフルオロメチル)フェノキシ)アニリン(AK Scientific、63mg、0.25mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、34mg、0.30mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、30.4mg、0.30mmol)を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(10~40% EtOAc/ヘキサン)で精製して、65mg(78%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.25(s, 1H), 7.63-7.51(m, 4H), 7.12-6.99(m, 4H), 4.22(s, 2H). HRMS: (-ESI): C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>NF<sub>3</sub>Clの場合の計算値=328.0358、実測値: 327.0356。

【0616】

2-クロロ-N-(4-(3-フルオロフェノキシ)フェニル)アセトアミド(CCW2)。DCM中の4-(3-(フルオロフェノキシ)アニリン(AK Scientific、63mg、0.31mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、42mg、0.37mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、38mg、0.37mmol)を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(10~40% EtOAc/ヘキサン)で精製して、53mg(61%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.24(s, 1H), 7.55(dq, J=10.0, 3.5, 2.4 Hz, 2H), 7.33-7.23(m, 1H), 7.05(dq, J=10.1, 3.5, 2.6 Hz, 2H), 6.85-6.74(m, 2H), 6.69(dq, J=10.2, 2.3 Hz, 1H), 4.21(s, 2H). <sup>13</sup>C NMR(151MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.29, 163.75, 162.66, 158.85, 158.78, 153.31, 132.67, 130.51, 130.45, 121.95, 120.13, 113.71, 113.69, 109.98, 109.84, 105.92, 105.75, 77.19, 76.97, 76.76, 42.79. HRMS: (-ESI): C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>NFC lの場合の計算値=278.0390、実測値: 278.0389。

## 【0617】

2-クロロ-N-(3-クロロ-4-(4-クロロフェノキシ)フェニル)アセトアミド(CCW3)。DCM中の3-クロロ-4-(4-クロロフェノキシ)アニリン(Sigma、64mg、0.25mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、34mg、0.30mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、30.4mg、0.30mmol)を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(10~40%EtOAc/ヘキサン)で精製して、69mg(83%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.28(s, 1H), 7.83(d, J=2.6 Hz, 1H), 7.44(dd, J=8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.36-7.28(m, 3H), 7.05(d, J=8.8 Hz, 1H), 6.95-6.89(m, 2H), 4.25(s, 2H). <sup>13</sup>C NMR(151MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.85, 155.67, 148.97, 133.57, 129.72, 128.30, 126.60, 122.59, 121.48, 119.87, 118.65, 77.20, 76.98, 76.77, 42.73. HRMS: (-ESI): C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>NClの場合の計算値=327.9704、実測値:327.9702

## 【0618】

2-クロロ-N-(4-(4-メトキシフェノキシ)フェニル)アセトアミド(CCW5)。DCM中の4-(4-(メトキシフェノキシ)アニリンHCl(Astatch、63mg、0.25mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、34mg、0.30mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、60.8mg、0.60mmol)を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(10~40%EtOAc/ヘキサン)で精製して、69mg(95%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.18(s, 1H), 7.49-7.42(m, 2H), 7.00-6.84(m, 6H), 4.19(s, 2H), 3.80(s, 3H). <sup>13</sup>C NMR(151MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.67, 155.92, 155.72, 150.11, 131.22, 121.95, 120.57, 118.14, 114.87, 77.18, 76.97, 76.76, 55.63, 42.79. HRMS: (-ESI): C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>NClの場合の計算値=290.0589、実測値:290.0587。

## 【0619】

2-クロロ-N-(4-(4-ニトロフェノキシ)フェニル)アセトアミド(CCW6)。DCM中の4-(4-ニトロフェノキシ)アニリン(Sigma、50mg、0.22mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、29mg、0.26mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、26mg、0.26mmol)を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(10~40%EtOAc/ヘキサン)で精製して、62.5mg(93%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.29(s, 1H), 8.25-8.16(m, 2H), 7.67-7.59(m, 2H), 7.14-7.07(m, 2H), 7.05-6.96(m, 2H), 4.22(s, 2H). <sup>13</sup>C NMR(101MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.93, 163.27, 151.63, 142.77, 133.98, 126.01, 122.18, 121.26, 117.01, 77.36, 77.04, 76.73, 42.85. HRMS: (+ESI): C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Clの場合の計算値=305.0335、実測値:305.0332。

## 【0620】

2-クロロ-N-(4-(ナフタレン-2-イルオキシ)フェニル)アセトアミド(CCW7)。DCM中の2-(4-アミノフェノキシ)ナフタレン(TCI、118mg、0.50mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、67.8mg、0.60mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、60.8mg、0.60mmol)を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマ



トグラフィー (10~40% EtOAc / ヘキサン) で精製して、111mg (71%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.25 (s, 1H), 7.83 (dt, J=7.8, 3.3 Hz, 2H), 7.69 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.57-7.50 (m, 2H), 7.49-7.37 (m, 2H), 7.31-7.22 (m, 2H), 7.12-7.03 (m, 2H), 4.21 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.86, 155.13, 154.31, 134.30, 132.22, 130.19, 129.99, 127.77, 127.14, 126.63, 124.80, 122.10, 119.84, 119.76, 113.84, 77.39, 77.07, 76.75, 42.89. HRMS: (+ESI): C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>NCl の場合の計算値=312.0786、実測値: 312.0785. [0621]

10

2-クロロ-N-(4-(3,5-ジメチルフェノキシ)フェニル)アセトアミド (CCW8)。DCM中の4-(3,5-ジメチルフェノキシ)アニリン (Enamine、107mg、0.50mmol) の溶液に、2-クロロアセチルクロリド (Sigma、67.8mg、0.60mmol) およびトリエチルアミン (Sigma、60.8mg、0.60mmol) を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (10~40% EtOAc / ヘキサン) で精製して、60mg (41%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.22 (s, 1H), 7.53-7.46 (m, 2H), 7.03-6.96 (m, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.61 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 2.28 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.80, 157.21, 154.61, 139.67, 131.79, 125.09, 121.98, 119.55, 116.36, 77.37, 77.06, 76.74, 42.87, 21.33. HRMS: (+ESI): C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>NCl の場合の計算値=290.0942、実測値: 290.0941.

20

[0622]

N-ベンジル-4-(4-メトキシフェノキシ)アニリン (CCW14)。4-(4-メトキシフェノキシ)アニリン (Astatech、108mg、0.50mmol) を、20mL シンチレーションバイアル内の無水DCM (5mL) に溶解した。ベンズアルデヒド (Alfa Aesar、53mg、0.50mmol) を加え、溶液を窒素下で2時間攪拌した。トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (Sigma、159mg、0.75mmol) を少量ずつ加え、反応物を一晩攪拌した。TLC (20% EtOAc / ヘキサン) は出発物質の完全な変換を示した。溶液を飽和重炭酸ナトリウムで洗浄し、続いてブラインで洗浄した。水性画分を合わせ、3×5mL の EtOAc で抽出し、全ての有機画分を合わせ、濃縮し、シリカゲルカラム (10~40% EtOAc / ヘキサン) で精製して、89.7mg (58.8%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.42-7.33 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 1H), 6.94-6.81 (m, 6H), 6.64-6.59 (m, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.79 (s, 3H). HRMS: (+ESI): C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>1</sub> の場合の計算値=306.1489、実測値: 307.1481.

30

40

[0623]

N-ベンジル-2-クロロ-N-(4-(4-メトキシフェノキシ)フェニル)アセトアミド (CCW16)。DCM中のN-ベンジル-4-(4-メトキシフェノキシ)アニリン (CCW14) (25mg、0.081mmol) の溶液に、2-クロロアセチルクロリド (Sigma、11mg、0.097mmol) およびトリエチルアミン (Sigma、9.8mg、0.097mmol) を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (10~40% EtOAc / ヘキサン) で精製して、26mg (84%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.26 (s, 3H), 7.20 (dd, J=7.3, 2.3 Hz, 2H), 7.01-6.96 (m, 2H), 6.93-6.82 (m, 6H), 4.86 (s, 2H), 3

50

. 87 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  166.45, 158.95, 156.54, 148.89, 136.63, 134.71, 129.54, 129.03, 128.51, 127.71, 121.47, 117.82, 115.07, 77.36, 77.25, 77.05, 76.73, 55.69, 53.85, 42.09. HRMS: (+ESI):  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{NCl}$  の場合の計算値 = 382.1204、実測値: 307.1199。

【0624】

2-クロロ-N-(4-(4-(ヒドロキシメチル)フェノキシ)フェニル)アセトアミド (JIK1-36)。DCM中の(4-(4-アミノフェノキシ)フェニル)メタノール (Sigma、54.8 mg、0.25 mmol) の溶液に、2-クロロアセチルクロリド (Sigma、34 mg、0.30 mmol) およびトリエチルアミン (Sigma、30.4 mg、0.30 mmol) を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (10~40% EtOAc / ヘキサン) で精製して、55 mg (74%) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.21 (s, 1H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.34 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 7.05-6.96 (m, 4H), 4.67 (s, 2H), 4.20 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.70, 156.77, 154.32, 135.82, 132.01, 128.68, 121.93, 119.46, 118.71, 64.85, 42.79. HRMS: (-ESI):  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{NO}_2$  の場合の計算値 = 328.0352、実測値: 328.0358。

【0625】

2-クロロ-N-(4-(3-(トリフルオロメチル)フェノキシ)フェニル)アセトアミド (JIK1-37)。DCM中の(4-(3-トリフルオロメチル)フェニル)アニリン (Sigma、64.5 mg、0.25 mmol) の溶液に、2-クロロアセチルクロリド (Sigma、34 mg、0.30 mmol) およびトリエチルアミン (Sigma、30.4 mg、0.30 mmol) を加え、反応物を一晩攪拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (10~40% EtOAc / ヘキサン) で精製して、80 mg (95%) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.26 (s, 1H), 7.56 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.44 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.04 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 4.21 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.76, 157.81, 153.12, 132.85, 130.30, 124.51, 122.71, 122.04, 121.31, 120.10, 119.69, 115.02, 42.78. HRMS: (-ESI):  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClNO}_3$  の場合の計算値 = 290.0585、実測値: 290.0589。

【0626】

CCW-16 + JQ1 二官能性分解剤合成スキーム (CCW28-3) :

10

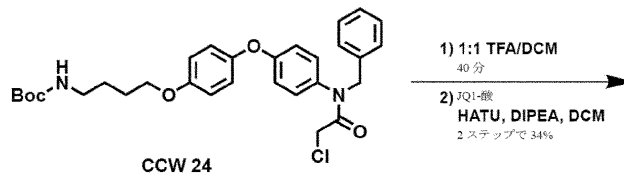
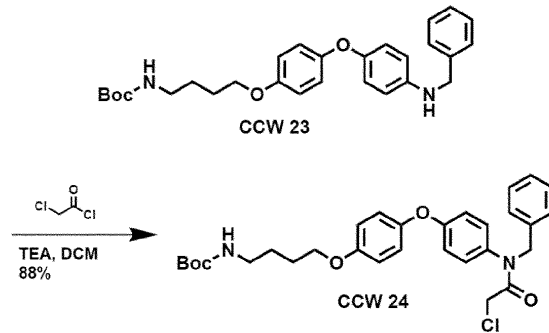
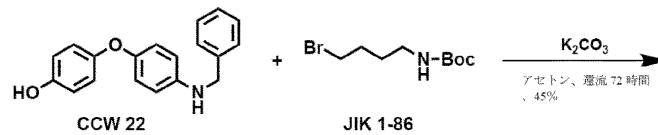
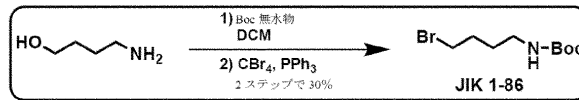
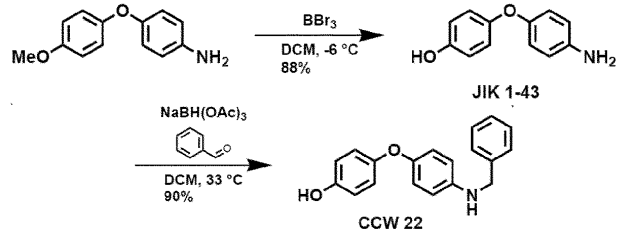
20

30

40

50

## 【化 2 4 8】



## 【0 6 2 7】

tert-ブチル (4-ブロモブチル) カルバメート (JIK 1-86)。4-アミノ-1-ブタノール (TCI; 5.0 g、56.0 mmol) を乾燥 DCM (22 mL) に溶解した。溶液に、二炭酸ジ-tert-ブチル (Chem-Impex Int'l Inc.; 17.3 g、79.4 mmol) を加えた。反応物を室温で3時間攪拌し、TLC (100% EtOAcで展開、ニンヒドリンによって可視化) によって監視した。完了したら、溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中55~100%のEtOAc) で部分的に精製して、ベースライン不純物を除去した。カラムからの溶離液は次の反応に持ち越された。DCM (22 mL、乾

10

20

30

40

50

燥) をカラム溶離液に加え、溶液を 0℃に冷却した。溶液に、四臭化炭素 (A l d r i c h ; 23.9 g、72.0 mmol) を加えて溶解し、続いてトリフェニルホスフィン (S i g m a A l d r i c h ; 22.3 g、84.9 mmol) を加えた。反応物を 1 時間攪拌し、次に室温に加温させ、一晚実行させた。24 時間後、溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 2~15% の E t O A c) で精製して、淡黄色油として 4.1 g の生成物を得た (2 回の反応で 29.6% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C D C l<sub>3</sub>) : δ 4.55 (s, 1H), 3.42 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.15 (q, J=6.8 Hz, 2H), 1.93-1.83 (m, 2H), 1.63 (m, 1H), 1.43 (s, 10H)。

【0628】

4-(4-アミノフェノキシ)フェノール (J I K 1-43)。4-(4-メトキシフェノキシ)アニリン (A s t a T e c h ; 2.5 g、11.6 mmol) を、-6℃で D C M (40 mL) に溶解した。三臭化ホウ素 (A c r o s ; 34.8 mL、D C M 中 1 M、34.8 mmol) を 3 時間かけて滴下し、T L C (40% E t O A c / H e x、K M n O<sub>4</sub>) で監視した。完了したら、溶液を 1 容量の重炭酸ナトリウムでクエンチした。二相混合物を一晚冷蔵し、生成物を結晶化し、濾過により除去した。水層を N a O H で中和し、3×25 mL の E t O A c で逆抽出した。合わせた有機層を M g S O<sub>4</sub> で乾燥させ、濃縮した。黄褐色固体として 2.33 g (88%) の生成物が得られ、これはさらなる精製を必要としなかった。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, メタノール-d<sub>4</sub>) : δ 5.22-5.09 (m, 8H), 1.73 (p, J=1.6 Hz, 3H)。H R M S : (+E S I) : C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N O<sub>2</sub> の場合の計算値=202.0863、実測値:202.0860。

【0629】

4-(4-(ベンジルアミノ)フェノキシ)フェノール (C C W 22)。4-(4-アミノフェノキシ)フェノール (J I K 1-43) (604 mg、3.0 mmol) を 33℃で無水 D C M (50 mL) に溶解し、溶解性を促進し、ベンズアルデヒド (A l f a A e s a r、240 mg、3.0 mmol) を加え、反応物を窒素下で 2 時間攪拌した。トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (S i g m a、952 mg、4.5 mmol) を加え、反応物を一晚攪拌した。混合物を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー用のシリカカラムに直接適用して、787 mg (90%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C D C l<sub>3</sub>) : δ 7.41-7.24 (m, 5H), 6.89-6.80 (m, 4H), 6.78-6.71 (m, 2H), 6.65-6.58 (m, 2H), 4.31 (s, 2H)。

【0630】

tert-ブチル (4-(4-(4-(ベンジルアミノ)フェノキシ)フェノキシ)ブチル)カルバメート (C C W 23)。4-(4-(ベンジルアミノ)フェノキシ)フェノール (C C W 22) (450 mg、1.55 mmol) および tert-ブチル (4-ブロモブチル)カルバメート (J I K 1-86) (585 mg、2.32 mmol) をアセトン (20 mL) に溶解した。炭酸カリウム (642 mg、4.65 mmol) を加え、溶液を還流させ、72 時間攪拌した。混合物を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー用のシリカカラム (10~30% E t O A c / ヘキサン) に直接適用して、325 mg (45.3%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C D C l<sub>3</sub>) : δ 7.41-7.27 (m, 5H), 6.91-6.77 (m, 6H), 6.60 (d, J=8.8 Hz, 2H), 4.62 (s, 1H), 4.30 (s, 2H), 3.93 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.19 (q, J=6.4 Hz, 2H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.66 (p, J=7.1 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)。H R M S : (+E S I) : C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub> の場合の計算値=463.2591、実測値:462.2583。

【0631】

tert-ブチル (4-(4-(4-(N-ベンジル-2-クロロアセトアミド)フェ

10

20

30

40

50

ノキシ)フェノキシ)ブチル)カルバメート(CCW24)。DCM(10mL)中のCCW23(200mg、0.43mmol)の溶液に、2-クロロアセチルクロリド(Sigma、59mg、0.52mmol)およびトリエチルアミン(Sigma、53mg、0.52mmol)を加え、反応物を一晩撹拌した。反応が完了したら、粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー(20~60%EtOAc/ヘキサン)で精製して、232mg(87.6%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.29(d, J=4.8 Hz, 2H), 7.20(dd, J=7.2, 2.2 Hz, 3H), 6.97(d, J=9.0 Hz, 2H), 6.93-6.83(m, 6H), 4.86(s, 2H), 4.61(s, 1H), 3.96(t, J=6.2 Hz, 2H), 3.87(s, 2H), 3.20(q, J=6.4 Hz, 2H), 1.87-1.77(m, 2H), 1.68(p, J=7.1 Hz, 2H), 1.45(s, 9H).

#### 【0632】

(S)-2-(4-(4-クロロフェニル)-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-イル)酢酸(JQ1-酸)。tert-ブチル(S)-2-(4-(4-クロロフェニル)-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-イル)アセテート(JQ1)は、以前の手順<sup>1</sup>に基づいて調製した。JQ1(eNovation Chemicals、204mg、0.446mmol)をギ酸(3mL)に溶解し、45℃で一晩撹拌した。混合物をDCMで希釈し、溶媒を真空中で除去した。得られた黄色油を3mLのDCMに再溶解し、プロセスで微細な黄褐色固体(178mg(99.8%))が得られるまで蒸発乾固を繰り返した。さらなる精製は必要なかった。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.46-7.40(m, 2H), 7.34(d, J=8.7 Hz, 2H), 4.59(t, J=6.8 Hz, 1H), 3.75-3.55(m, 2H), 2.68(s, 3H), 2.41(s, 3H), 1.74-1.65(m, 3H). HRMS: (-ESI): C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>ClSの場合の計算値=399.0688、実測値:399.0683.

#### 【0633】

(S)-N-ベンジル-2-クロロ-N-(4-(4-(4-(2-(4-(4-クロロフェニル)-2,3,9-トリメチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ジアゼピン-6-イル)アセトアミド)ブトキシ)フェノキシ)フェニル)アセトアミド(CCW-28-3)。トリフルオロ酢酸(Sigma-Aldrich)を20分かけてゆっくりと加え、さらに20分間撹拌することにより、CCW24(175mg、0.325mmol)を1:1のDCM/TFA(5mL)で脱保護した。TLCはアミンへの完全な変換を示し、溶媒を真空中で除去し、3mLのDCMで3回追跡して、過剰なTFAを除去した。脱保護された粗製物は、さらに精製することなくアミドカップリングに使用された。得られたTFA塩を、8mLのDCM、JQ1-酸(180mg、0.390mmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-酸化ヘキサフルオロホスフェート(HATU)(Small Molecules Inc.、201.5mg、0.530mmol)、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(Sigma-Aldrich、168mg、1.30mmol)に溶解した。一晩撹拌し、TLC(DCM中5%のMeOH、100%EtOAc)で監視した。粗製物を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー(1~5%MeOH/DCM)用のシリカカラムに直接適用した。溶出画分は純度が不十分であり、生成物を含有する画分を合わせ、濃縮し、フラッシュシリカクロマトグラフィー(100~0%EtOAc/DCM、続いて0~5%MeOH/DCM)で再度精製して、91.4mg(34.2%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36(dd, J=50.3, 8.3 Hz, 4H), 7.26(s, 2H), 7.22-7.18(m, 2H), 6.99-6.95(m, 2H), 6.92-6.83(m, 6H), 6.59(d, J=6.1 Hz, 1H)

, 4.86 (s, 2H), 4.62 (dd, J=7.9, 6.1 Hz, 1H), 3.96 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.57 (dd, J=14.1, 7.9 Hz, 1H), 3.42 (dq, J=13.3, 6.7 Hz, 1H), 3.32 (ddd, J=13.2, 11.4, 6.2 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 1.82 (td, J=13.8, 13.2, 6.9 Hz, 2H), 1.74 (p, J=6.8 Hz, 2H), 1.67 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.46, 166.38, 163.87, 158.90, 155.84, 155.63, 149.84, 148.82, 136.79, 136.58, 136.56, 134.65, 132.10, 130.87, 130.82, 130.42, 129.76, 129.46, 128.97, 128.69, 128.44, 127.63, 121.39, 117.78, 115.64, 67.84, 54.53, 53.78, 42.01, 39.60, 39.20, 29.65, 26.59, 26.26, 14.32, 13.04, 11.78. HRMS: (+ESI):  $\text{C}_{44}\text{H}_{43}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$  の場合の計算値=821.2438、実測値: 821.2426。

【0634】

表1. RNF4 に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの構造

【表1-1】

表1. RNF114 に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの構造

| DKM 2-31 | DKM 2-32 | DKM 2-33 |
|----------|----------|----------|
|          |          |          |

10

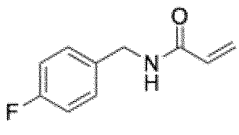
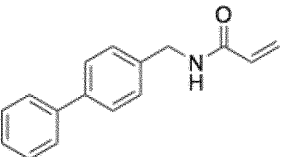
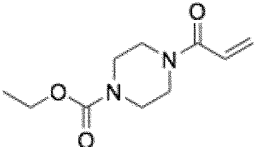
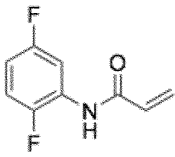
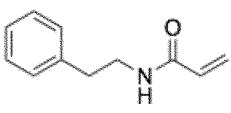
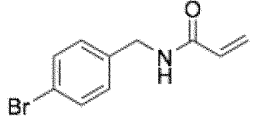
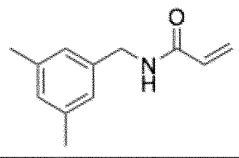
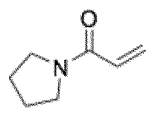
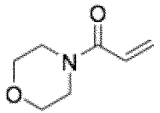
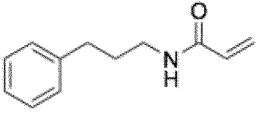
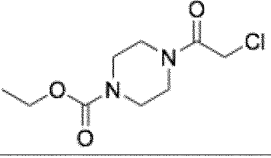
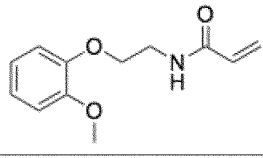
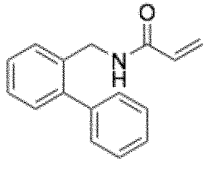
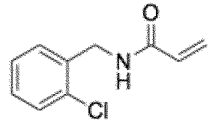
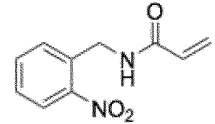
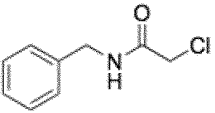
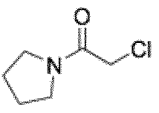
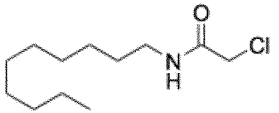
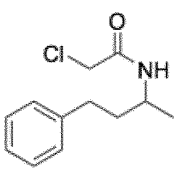
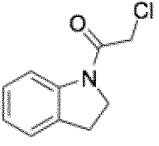
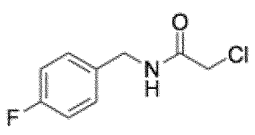
20

30

40

50

【表 1 - 2】

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 2-34<br>   | DKM 2-37<br>   | DKM 2-39<br>   |
| DKM 2-40<br>   | DKM 2-42<br>   | DKM 2-43<br>   |
| DKM 2-47<br>   | DKM 2-48<br>   | DKM 2-49<br>  |
| DKM 2-50<br>  | DKM 2-52<br>  | DKM 2-58<br>  |
| DKM 2-59<br> | DKM 2-60<br> | DKM 2-62<br> |
| DKM 2-67<br> | DKM 2-71<br> | DKM 2-72<br> |
| DKM 2-76<br> | DKM 2-79<br> | DKM 2-80<br> |

10

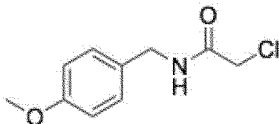
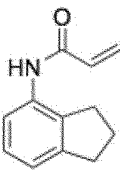
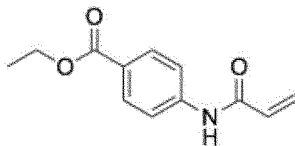
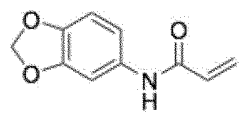
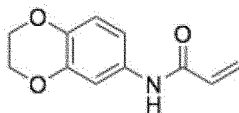
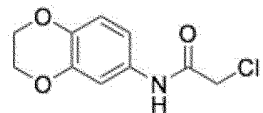
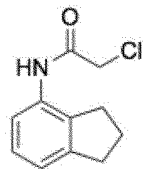
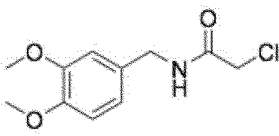
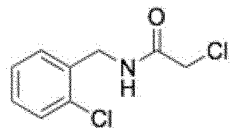
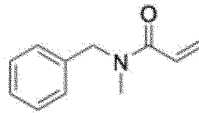
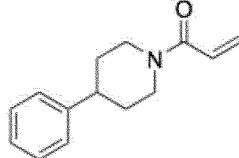
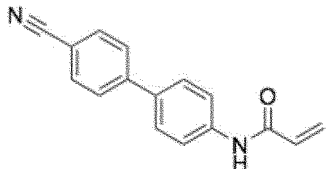
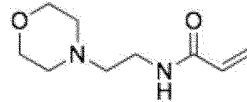
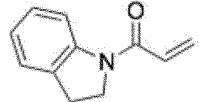
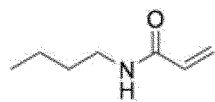
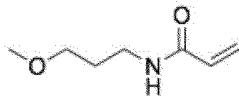
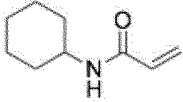
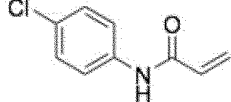
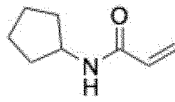
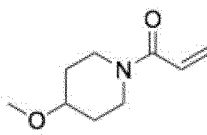
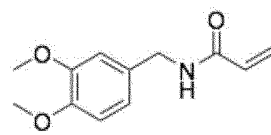
20

30

40

50

【表 1 - 3】

|                                                                                                                 |                                                                                                  |                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 2-83<br>                   | DKM 2-84<br>    | DKM 2-85<br>     |
| DKM 2-86<br>                   | DKM 2-87<br>    | DKM 2-90<br>    |
| DKM 2-91<br>                   | DKM 2-93<br>    | DKM 2-94<br>    |
| DKM 2-95<br><br>(等量の2つの回転異性体) | DKM 2-97<br>   | DKM 2-98<br>    |
| DKM 2-100<br>                | DKM 2-101<br> | DKM 2-102<br> |
| DKM 2-103<br>                | DKM 2-106<br> | DKM 2-107<br> |
| DKM 2-108<br>                | DKM 2-109<br> | DKM 2-110<br>  |

10

20

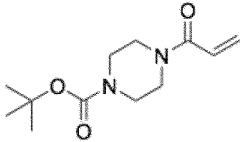
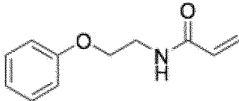
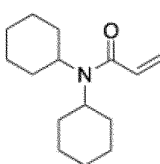
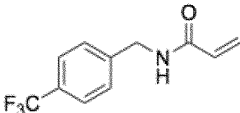
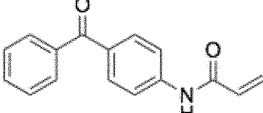
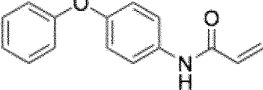
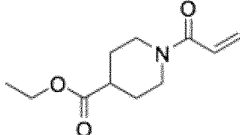
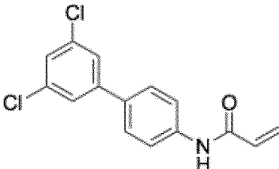
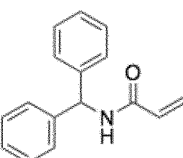
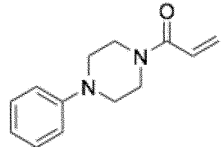
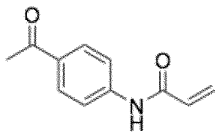
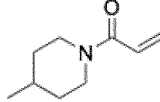
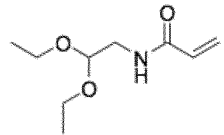
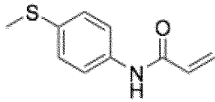
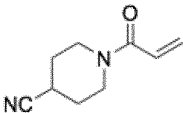
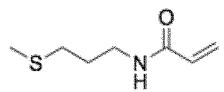
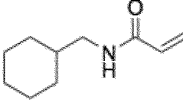
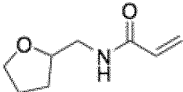
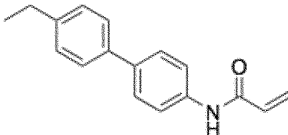
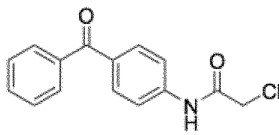
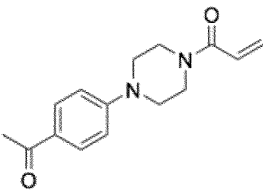
30

40

50



【表 1 - 4】

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 2-111<br>  | DKM 2-113<br>  | DKM 2-114<br>  |
| DKM 2-116<br>  | DKM 2-117<br>  | DKM 2-119<br>  |
| DKM 2-120<br>  | DKM 3-3<br>    | DKM 3-4<br>    |
| DKM 3-5<br>   | DKM 3-7<br>   | DKM 3-8<br>   |
| DKM 3-9<br>  | DKM 3-10<br> | DKM 3-11<br> |
| DKM 3-12<br> | DKM 3-13<br> | DKM 3-15<br> |
| DKM 3-16<br> | DKM 3-22<br> | DKM 3-29<br> |

10

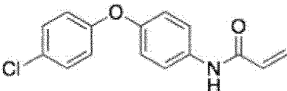
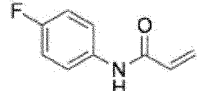
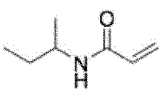
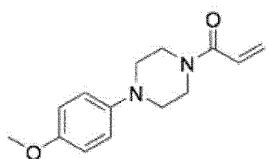
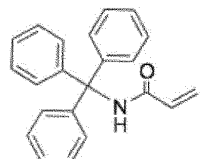
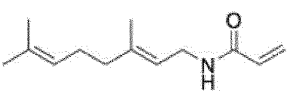
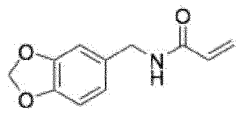
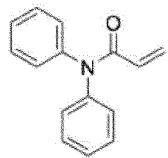
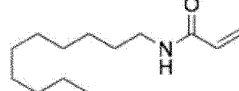
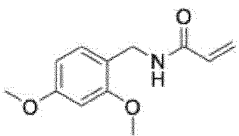
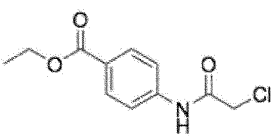
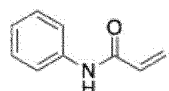
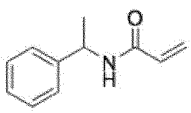
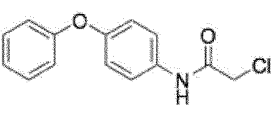
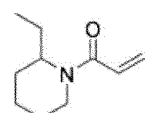
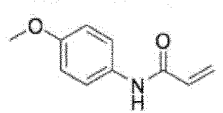
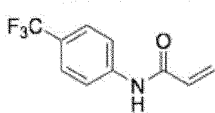
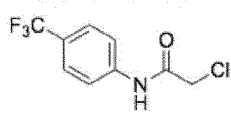
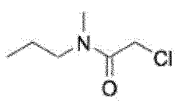
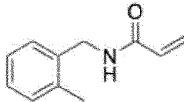
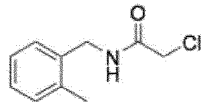
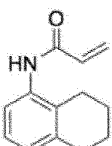
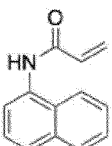
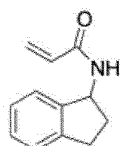
20

30

40

50

【表 1 - 5】

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 3-30<br>   | DKM 3-31<br>   | DKM 3-32<br>   |
| DKM 3-36<br>   | DKM 3-41<br>   | DKM 3-42<br>   |
| DKM 3-43<br>   | DKM 3-70<br>   | TRH 1-12<br>   |
| TRH 1-13<br>   | TRH 1-17<br>   | TRH 1-19<br>   |
| TRH 1-20<br> | TRH 1-23<br> | TRH 1-27<br> |
| TRH 1-32<br> | TRH 1-50<br> | TRH 1-51<br> |
| TRH 1-53<br> | TRH 1-54<br> | TRH 1-55<br> |
| TRH 1-56<br> | TRH 1-57<br> | TRH 1-58<br> |

10

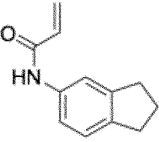
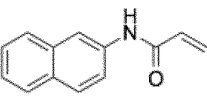
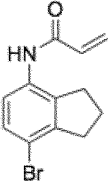
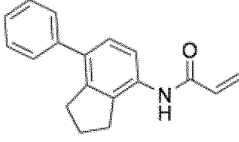
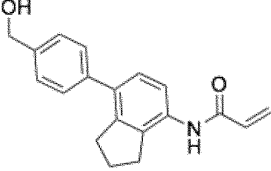
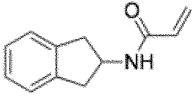
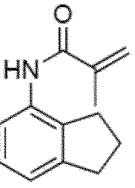
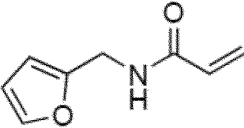
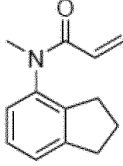
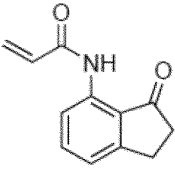
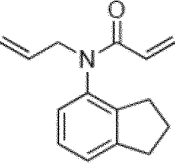
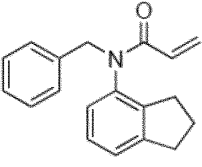
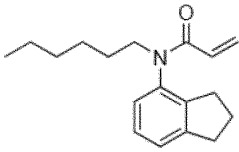
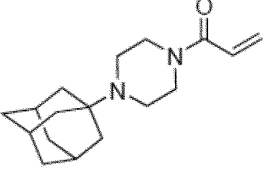
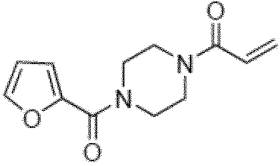
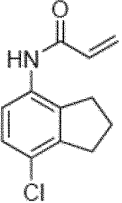
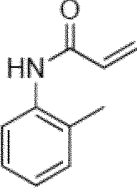
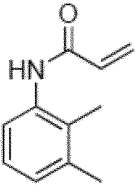
20

30

40

50

【表 1 - 6】

|                                                                                                      |                                                                                                      |                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TRH 1-59<br>        | TRH 1-60<br>        | TRH 1-65<br>         |
| TRH 1-68<br>        | TRH 1-70<br>        | TRH 1-74<br>         |
| TRH 1-149 (18)<br>  | YP 1-26<br>         | TRH 1-115<br>        |
| TRH 1-129 (13)<br> | IGA 1-12 (31)<br> | IGA 1-14<br>       |
| IGA 1-15 (32)<br> | TRH 1-143<br>     | TRH 1-145 (17)<br> |
| YP 1-1 (24)<br>   | YP 1-16<br>       | YP 1-18 (25)<br>   |

10

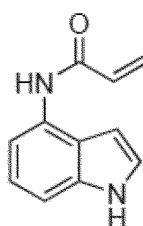
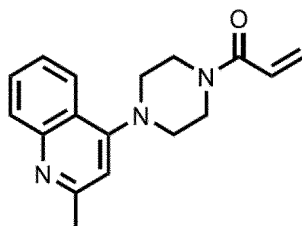
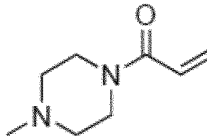
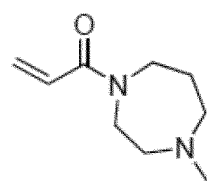
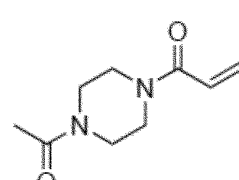
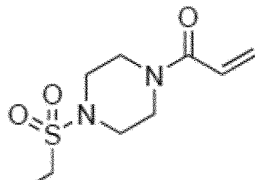
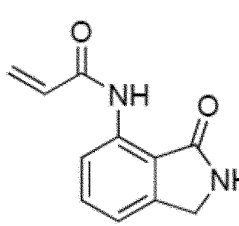
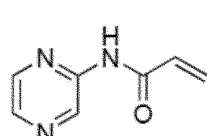
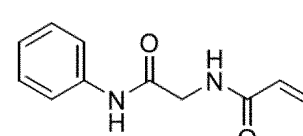
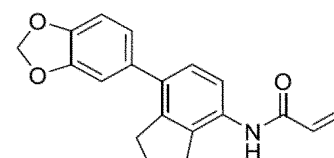
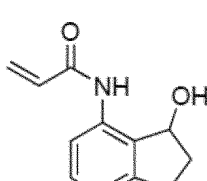
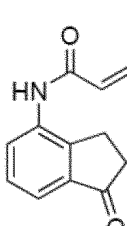
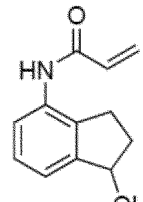
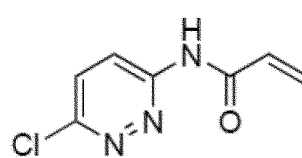
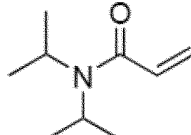
20

30

40

50

【表 1 - 7】

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| YP 1-19 (26)                                                                        | IGA 1-26                                                                            | YP 1-22                                                                               |
|    |    |    |
| YP 1-23 (27)<br>(回転異性体の混合物)                                                         | YP 1-24 (28)                                                                        | YP 1-25 (29)                                                                          |
|    |    |    |
| TRH 1-152 (19)                                                                      | TRH 1-156                                                                           | TRH 1-160                                                                             |
|   |    |     |
| TRH 1-78                                                                            | TRH 1-133 (14)                                                                      | TRH 1-134 (15)                                                                        |
|  |  |  |
| TRH 1-135 (16)                                                                      | TRH 1-155 (20)                                                                      | TRH 1-167                                                                             |
|  |  |  |

10

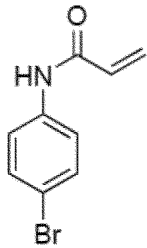
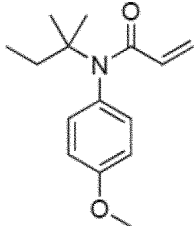
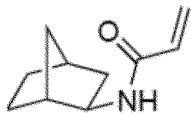
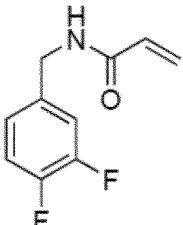
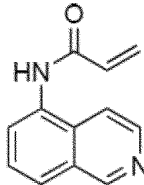
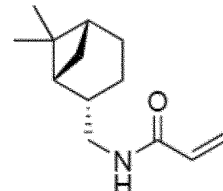
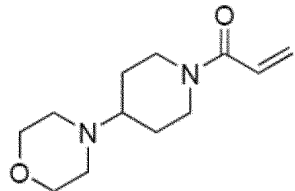
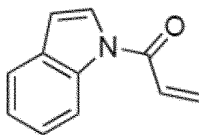
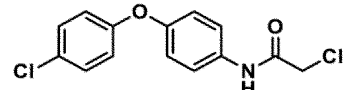
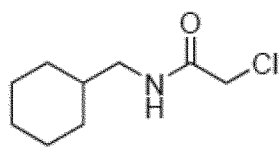
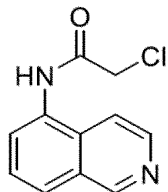
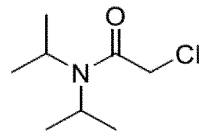
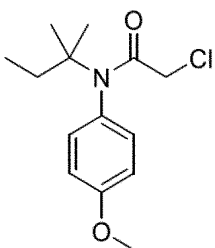
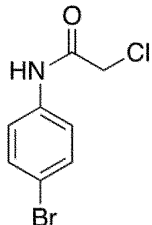
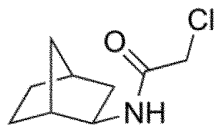
20

30

40

50

【表 1 - 8】

|                                                                                                    |                                                                                                     |                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| YP 1-36<br>       | TRH 1-170 (21)<br> | TRH 1-176 (22)<br><br>(ラセミ) |
| YP 1-38<br>       | TRH 1-162<br>      | TRH 1-178 (23)<br>          |
| YP 1-42 (30)<br> | YP 1-44<br>       | TRH 1-140<br>                |
| YP 1-31<br>     | TRH 1-163<br>    | TRH 1-168<br>             |
| TRH 1-171<br>   | YP 1-37<br>      | TRH 1-177<br><br>(ラセミ)    |

10

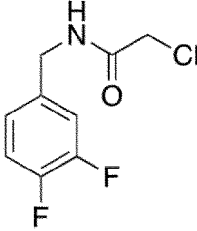
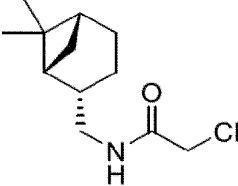
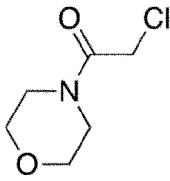
20

30

40

50

【表 1 - 9】

|                                                                                                  |                                                                                                    |                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>YP 1-39</p>  | <p>TRH 1-179</p>  | <p>YP 1-40</p>  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|

注：括弧内の番号は、実施例 9 の化合物番号に対応している。

## 【0635】

231MFP細胞をDMSOビヒクルもしくはCCW28-3 (10 μM) で1時間インサイチュで処理した後、IAーアルキン (100 μM) で1時間インビトロでプロテオームを標識した。同位体的に軽い (DMSOで処理した場合) または重い (化合物で処理した場合) TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグをCuAACにより付加して、isoTOP-ABPP分析を行った。3つの生物学的複製のうち2つに存在するプローブ修飾ペプチドのみを解釈した。それらの比が3を超える場合、全ての複製比が3を超える全ての生物学的複製に存在するペプチドのみを解釈した。それらの比が4を超える場合、全ての複製比が4を超える全ての生物学的複製に存在するペプチドのみを解釈した。MS1のピーク形状の品質を手動でキュレーションして、全ての複製について良好なピーク品質を確認した。

## 【0636】

実施例 1～3に関連する参考文献

(1) Burslem, G. M. ; Crews, C. M. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis. Chem. Rev. 2017, 117 (17), 11269-11301. (2) Lai, A. C. ; Crews, C. M. Induced Protein Degradation: An Emerging Drug Discovery Paradigm. Nat. Rev. Drug Discov. 2017, 16 (2), 101-114. (3) Rape, M. Ubiquitylation at the Crossroads of Development and Disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018, 19 (1), 59-70. (4) Grossman, E. A. ; Ward, C. C. ; Spradlin, J. N. ; Bateman, L. A. ; Huffman, T. R. ; Miyamoto, D. K. ; Kleinman, J. I. ; Nomura, D. K. Covalent Ligand Discovery against Druggable Hotspots Targeted by Anti-Cancer Natural Products. Cell Chem. Biol. 2017, 24 (11), 1368-1376. e4. (5) Counihan, J. L. ; Wiggens, A. L. ; Anderson, K. E. ; Nomura, D. K. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals ALDH3A1 as a Lung Cancer Therapy Target. ACS Chem. Biol. 2018. (6) Bateman, L. A. ; Nguyen, T. B. ; Roberts, A. M. ; Miyamoto, D. K. ; Ku, W. -M. ; Huffman, T. R. ; Petri, Y. ; Heslin, M. J. ; Contreras, C. M. ; Skibola, C. F. ; et al. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals a Cysteine Hotspot in Reticulo-4 That Impairs ER Morphology and Cancer

Pathogenicity. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 2017, 53 (53), 7234–7237. (7) Backus, K. M. ; Correia, B. E. ; Lum, K. M. ; Forli, S. ; Horning, B. D. ; Gonzalez-Paez, G. E. ; Chatterjee, S. ; Lanning, B. R. ; Teijaro, J. R. ; Olson, A. J. ; et al. Proteome-Wide Covalent Ligand Discovery in Native Biological Systems. *Nature* 2016, 534 (7608), 570–574. (8) Wang, C. ; Weerapana, E. ; Blewett, M. M. ; Cravatt, B. F. A Chemoproteomic Platform to Quantitatively Map Targets of Lipid-Derived Electrophiles. *Nat. Methods* 2014, 11 (1), 79–85. (9) Hacker, S. M. ; Backus, K. M. ; Lazar, M. R. ; Forli, S. ; Correia, B. E. ; Cravatt, B. F. Global Profiling of Lysine Reactivity and Ligandability in the Human Proteome. *Nat. Chem.* 2017, 9 (12), 1181–1190. (10) Backus, K. M. Applications of Reactive Cysteine Profiling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018. (11) Liu, Y. ; Patricelli, M. P. ; Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling: The Serine Hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96 (26), 14694–14699. (12) Weerapana, E. ; Wang, C. ; Simon, G. M. ; Richter, F. ; Khare, S. ; Dillon, M. B. D. ; Bachovchin, D. A. ; Mowen, K. ; Baker, D. ; Cravatt, B. F. Quantitative Reactivity Profiling Predicts Functional Cysteines in Proteomes. *Nature* 2010, 468 (7325), 790–795. (13) Roberts, A. M. ; Miyamoto, D. K. ; Huffman, T. R. ; Bateman, L. A. ; Ives, A. N. ; Akopian, D. ; Hsling, M. J. ; Contreras, C. M. ; Rape, M. ; Skibola, C. F. ; et al. Chemoproteomic Screening of Covalent Ligands Reveals UBA5 As a Novel Pancreatic Cancer Target. *ACS Chem. Biol.* 2017, 12 (4), 899–904. (14) Wang, C. ; Weerapana, E. ; Blewett, M. M. ; Cravatt, B. F. A Chemoproteomic Platform to Quantitatively Map Targets of Lipid-Derived Electrophiles. *Nat. Methods* 2014, 11 (1), 79–85. (15) Anderson, K. E. ; To, M. ; Olzmann, J. A. ; Nomura, D. K. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals a Thioredoxin-Caspase 3 Interaction Disruptor That Impairs Breast Cancer Pathogenicity. *ACS Chem. Biol.* 2017, 12 (10), 2522–2528. (16) Vassilev, L. T. ; Vu, B. T. ; Graves, B. ; Carvajal, D. ; Podlaski, F. ; Filipovic, Z. ; Kong, N. ; Kammlott, U. ; Lukacs, C. ; Klein, C. ; et al. In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* 2004, 303 (5659), 844–848. (17) Schneekloth, A. R. ; Pucheault, M. ; Tae, H. S. ; Crews, C. M. Target

10

20

30

40

50

ed Intracellular Protein Degradation Induced by a Small Molecule: En Route to Chemical Proteomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18 (22), 5904–5908. (18) Malecka, K. A. ; Fera, D. ; Schultz, D. C. ; Hodawadekar, S. ; Reichman, M. ; Donover, P. S. ; Murphy, M. E. ; Marmorstein, R. Identification and Characterization of Small Molecule Human Papillomavirus E6 Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* 2014, 9 (7), 1603–1612. (19) Staudinger, J. L. The Molecular Interface Between the SUMO and Ubiquitin Systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017, 963, 99–110. (20) Srimachandran, A. M. ; Dohmen, R. J. SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1843 (1), 75–85. (21) Tan, B. ; Mu, R. ; Chang, Y. ; Wang, Y. -B. ; Wu, M. ; Tu, H. -Q. ; Zhang, Y. -C. ; Guo, S. -S. ; Qin, X. -H. ; Li, T. ; et al. RNF4 Negatively Regulates NF- $\kappa$ B Signaling by down-Regulating TAB2. *FEBS Lett.* 2015, 589 (19 Pt B), 2850–2858. (22) Fryrear, K. A. ; Guo, X. ; Kerscher, O. ; Semmes, O. J. The Sumo-Targeted Ubiquitin Ligase RNF4 Regulates the Localization and Function of the HTLV-1 Oncoprotein Tax. *Blood* 2012, 119 (5), 1173–1181. (23) Bilodeau, S. ; Caron, V. ; Gagnon, J. ; Kuftedjian, A. ; Tremblay, A. A CK2-RNF4 Interplay Coordinates Non-Canonical SUMOylation and Degradation of Nuclear Receptor FXR. *J. Mol. Cell Biol.* 2017, 9 (3), 195–208. (24) Zengerle, M. ; Chan, K. -H. ; Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* 2015, 10 (8), 1770–1777. (25) Louie, S. M. ; Grossman, E. A. ; Crawford, L. A. ; Ding, L. ; Camarda, R. ; Huffman, T. R. ; Miyamoto, D. K. ; Goga, A. ; Weerapana, E. ; Nomura, D. K. GSTP1 Is a Driver of Triple-Negative Breast Cancer Cell Metabolism and Pathogenicity. *Cell Chem. Biol.* 2016, 23 (5), 567–578. (26) Medina-Cleghorn, D. ; Bateman, L. A. ; Ford, B. ; Heslin, A. ; Fisher, K. J. ; Dalvie, E. D. ; Nomura, D. K. Mapping Proteome-Wide Targets of Environmental Chemicals Using Reactivity-Based Chemoproteomic Platforms. *Chem. Biol.* 2015, 22 (10), 1394–1405. (27) Jesani, N. ; Humphrey, M. ; McDonald, W. H. ; Niesse, S. ; Masuda, K. ; Gangadharan, B. ; Yates, J. R. ; Mueller, B. M. ; Cravatt, B. F. Carcinoma and Stromal Enzyme Activity Profiles Associated with Breast Tumor Growth in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004, 101 (38), 13756–137

10

20

30

40

50



61. (28) Smith, P. K. ; Krohn, R. I. ; Hermanson, G. T. ; Mallia, A. K. ; Gartner, F. H. ; Provanzano, M. D. ; Fujimoto, E. K. ; Goetze, N. M. ; Olson, B. J. ; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchnonic Acid. *Anal. Biochem.* 1985, 150 (1), 76–85. (29) Xu, T. ; Park, S. K. ; Venable, J. D. ; Wohlschlegel, J. A. ; Diedrich, J. K. ; Cocciorda, D. ; Lu, B. ; Liao, L. ; Hewel, J. ; Han, X. ; et al. ProLuCID: An Improved SEQUEST-like Algorithm with Enhanced Sensitivity and Specificity. *J. Proteomics* 2015, 129, 16–24. 実施例3 (1) Zengerle, M. ; Chan, K. -H. ; Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* 2015, 10 (8), 1770–1777.

【0637】

実施例4. 標的タンパク質分解のための抗癌性天然物ニンボリドの利用

ニームの木に由来するテルペノイド天然物であるニンボリドは、多くの種類のヒト癌にわたって癌の病原性を低減する。しかしながら、ニンボリドの直接標的および抗癌メカニズムはよくわかっていない。ここで、活性ベースタンパク質プロファイリング (ABPP) 化学プロテオームプラットフォームを使用して、ニンボリドがE3ユビキチンリガーゼ RNF114の基質認識に重要な新規機能性システインと反応することを発見した。ニンボリドは、RNF114基質認識を破壊することにより乳癌細胞の増殖を低減し、ユビキチン化の阻害および腫瘍抑制因子p21の分解を引き起こし、その結果、急速な安定化をもたらす。さらに、RNF114におけるこの反応性ノードを利用して、標的タンパク質分解用途でE3リガーゼを動員する能力を示し、合成するのに単純な足場もこの独自の反応性部位にアクセスできることを示す。

【0638】

植物および微生物などの生物由来の天然物は、治療用リード化合物の豊富な供給源である<sup>1-5</sup>。それらの生物学的活性の特徴付けは、癌、細菌および真菌感染、炎症および糖尿病などの異なる病状のための無数の薬物療法をもたらした<sup>1-5</sup>。天然物の中には、タンパク質内の求核性アミノ酸ホットスポットと大部分が不可逆的な反応を受けてそれらの治療活性を発揮することができる求電子性部分を有する共有結合的に作用する分子のサブセットがある。これらの天然物の例としては、抗菌活性を誘導するセリントランスペプチダーゼを不可逆的に阻害するペニシリン、またはPI3-キナーゼの機能的リジンを共有結合的に修飾してその活性を阻害するワートマニンが含まれる<sup>5-7</sup>。抗癌性および共有作用のある天然物の標的となるドラッグアブルなホットスポットを発見することは、新しい抗癌剤および治療標的を生み出すだけでなく、標準的な創薬の努力ではアンドラッグアブルであるか、または取り組むのが難しいと見なされることが多いタンパク質標的の天然物がアクセスするドラッグアブルなモダリティへの独自の洞察を明らかにすることができる。先験的に予測するのが難しいドラッグアブルなモダリティの一例は、T細胞シグナル伝達を調節するための新しいFKBP12-FK506複合体に結合して、それを作製することにより、ペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を阻害するFK506またはタクロリムスである<sup>8</sup>。したがって、タンパク質標的に関与するための自然の戦略への洞察を得ることは、ドラッグビリティを管理する新しい予期しない規則へのアクセスを提供することができる。

【0639】

この例では、ニームの木 (*Azadirachta indica*) に由来するリモノイド天然物である天然物ニンボリドの抗癌作用機序を特徴付けした (図8A)<sup>9</sup>。ニンボリドは複数の治療効果を発揮することが示されており、システインと反応することができる環状エノンを含んでいる<sup>10-12</sup>。癌との関連で、ニンボリドは、広範囲の癌にわたつ

て毒性または望ましくない副作用を引き起こすことなく、腫瘍形成および転移を阻害することが示されている<sup>10, 11, 13-17</sup>。以前の研究では、ニンボリドが、生存、成長、浸潤、血管新生および炎症に関連するシグナル伝達経路および転写因子を調節することにより、また酸化ストレスに影響を与えることにより、癌の病原性を低減することが示唆されているが、ニンボリドの直接標的は依然として十分に特徴付けされていない<sup>10, 15, 18-22</sup>。

#### 【0640】

複雑な天然物の直接的なタンパク質標的を同定することは依然として困難であり、光親和性および濃縮ハンドルを有するこれらの化合物の類似体を合成する必要がある<sup>23-25</sup>。このようなプローブを生成しても、天然物が標的とする特定のアミノ酸部位を特定することは困難である。この研究では、活性ベースタンパク質プロファイリング (ABPP) 化学プロテオームアプローチを利用して、乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリドのプロテオーム全体の標的をマッピングした。ABPPプラットフォームを使用して、乳癌細胞におけるニンボリドの主要な標的の1つがE3ユビキチンリガーゼRNF114のC8であることを明らかにする。ニンボリドによるRNF114の共有結合修飾は、認識障害、ユビキチン化障害、およびその基質である腫瘍抑制因子p21の分解を引き起こし、その急速な安定化をもたらす。興味深いことに、ニンボリドはRNF114内の基質認識部位に結合するため、ニンボリドを使用してRNF114を他のタンパク質基質に動員して標的タンパク質分解用途に使用できることを実証する。ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニングプラットフォームを使用して、RNF114のC8および表現型コピーニンボリド作用と同様に反応できる、合成するのにより扱いやすい化合物も同定する。

#### 【0641】

乳癌細胞の生存および増殖に対するニンボリドの効果。ニンボリドは多くの異なるタイプのヒト癌にわたって癌の病原性を低減することが示されているが、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) におけるニンボリドの役割の解明に焦点を当てることを選択した。TNBCは、エストロゲン、プロゲステロンおよびHER2受容体を欠いており、最も予後が悪い最も攻撃的な癌の1つである<sup>26, 27</sup>。現在、TNBC患者を対象とした標的療法はほとんどない。したがって、TNBCの新しい治療法を明らかにすることは、乳癌に関連する死亡率の低下に大きく貢献する可能性がある。以前の報告と一致して、乳癌細胞における抗癌活性、231MFPおよびHCC38 TNBC細胞におけるニンボリドによる細胞増殖または無血清細胞生存の低減を示す (図8B)<sup>14, 15, 17</sup>。

#### 【0642】

ABPPプラットフォームを使用して、乳癌細胞のニンボリドが標的とする創薬可能なホットスポットをマッピングする。ニンボリドが乳癌の病原性をどのように低減するかをよりよく理解するために、同位体タンデム直交タンパク質分解対応の活性ベースタンパク質プロファイリング (isoTOP-ABPP) と呼ばれる化学プロテオームプラットフォームを適用して、ニンボリドが標的とするドラッグブルなホットスポットをマッピングした。CravattおよびWeerapanaによって開拓されたisoTOP-ABPPは、反応性ベースの化学プローブを使用して、複雑なプロテオーム内の反応性、機能性およびドラッグブルなホットスポットを直接マッピングする<sup>28-31</sup>。競合的に使用される場合、共有結合的に作用する小分子は、反応性ベースのプローブ結合と競合して、標的の同定を容易にすることができる<sup>31-38</sup> (図9A)。この研究では、インビトロで乳癌細胞プロテオームを、またはインサイチュで乳癌細胞を、ビヒクルまたはニンボリドで処理した後、システイン反応性アルキン官能化ヨードアセトアミドプローブ (IA-アルキン) でプロテオームを競合標識し、その後同位体的に軽いまたは重い切断可能な濃縮ハンドルを、isoTOP-ABPP分析のために、プローブ標識タンパク質に追加した。プローブ修飾トリプシンペプチドを液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS/MS) で分析し、対照対処理済みIA-アルキン標識部位を表す軽対重トリプシンプローブ修飾ペプチド比を定量化した。231MFP TNBCプロテオームでニンボリドが標的

とするリガンド結合可能なホットスポットの *isoTOP-ABPP* 分析は、3つの主要なインビトロ標的 (*PTOV1 C308*、*RNF114 C8* および *PFKP C123*) と1つの主要なインサイチュ標的 *RNF114 C8* を示した (図9B、2C; 表S1)。RNA干渉を使用したこれらの各標的のノックダウンは、*RNF114* ノックダウンが *231MFP* 細胞におけるニンボリドの抗増殖効果に最も類似していることを明らかにした (図9D、図S1)。 *RNF114* がニンボリド作用に関与する標的であることをさらに実証すると、*RNF114* ノックダウンは、ニンボリドを介した抗増殖効果に対して著しく高められた感受性を示した (図9E)。

#### 【0643】

*RNF114* とのニンボリド相互作用の生化学的特徴付け。 *RNF114* は、RINGファミリーのE3ユビキチンリガーゼである<sup>39, 40</sup>。ニンボリドの標的として *isoTOP-ABPP* によって同定された *RNF114* 上の部位 *C8* は、タンパク質のN末端領域内にあり、天然変性していると予測され、2つの注釈付きジンクフィンガードメインの外側に存在する (図10A)。天然物によるタンパク質の天然変性領域の明らかな選択的標的化に興味をそそられ、ニンボリドと *RNF114* との間のこの相互作用をさらに確認し、特徴付けすることを試みた。

#### 【0644】

*isoTOP-ABPP* は、共有結合的に作用する分子とより広範な反応性プローブとの間の競合アッセイであるため、潜在的なニンボリドが標的とするホットスポットの間接的な読み取りである。ニンボリドが *RNF114* を直接標的としていることを確認するために、ニンボリドから3つのステップで示されるアルキン官能化プローブを合成した (図10B)。フラン部分の選択的臭素化および4-ホルミルフェニルボロン酸との鈴木カップリングによりアルデヒド2が得られ、これはピニック酸化によって対応するカルボン酸(3)に変換された。最後に、3とプロパルギルアミン (*HATU*、*DIPEA*) のカップリングにより、標的プローブが得られた。プローブは *231MFP* 乳癌細胞プロテオームの複数のタンパク質を標識したが、これらのタンパク質のうち2つだけがニンボリド自体と競合していた。これらの競合するタンパク質の分子量は、*PTOV1* および *RNF114* の分子量と一致していた (図10C)。本発明者らはさらに、このニンボリドプローブが純粋なヒト *RNF114* と反応し、ニンボリドによっても競合し、この標識が *C8A RNF114* 突然変異体において阻害されることを実証した (図10D)。さらに、*RNF114* の *C8* へのニンボリドの直接質量付加物が、純粋なタンパク質を天然物とインキュベートした後、*LC-MS/MS* によって観察された (図10E)。まとめると、これらの発見は、ニンボリドが *C8* で *RNF114* の天然変性領域を共有結合的に修飾するという説得力のある証拠となる。

#### 【0645】

インビトロおよびインサイチュでの *RNF114* 活性および基質結合に対するニンボリドの効果。 *RNF114* は、基質の中でもとりわけ、腫瘍抑制因子 *p21* をユビキチン化させ、分解することが以前に示されている<sup>39, 41, 42</sup>。インビトロで再構成された系において、ニンボリドは、*RNF114* 自己ユビキチン化および *p21* ユビキチン化活性の両方を阻害した (図11A)。 *RNF114 C8A* 突然変異は、基本的な *RNF114* 自己ユビキチン化活性に影響を及ぼさなかったが、ニンボリド処理で観察された阻害を弱めた (図11B)。 *RNF114* の以前の特徴付けは、N末端が基質認識に関与している可能性があることを示唆していた<sup>39</sup>。この前提と一致して、本発明者らは、*p21* の *RNF114* ブルダウンがニンボリドによって阻害されることを発見し、*RNF114* の明らかな阻害は、活性の直接阻害ではなく、基質認識障害による可能性があることを示唆していた (図11C)。さらに、*231MFP* 細胞におけるニンボリド処理が、*p53* レベルが有意に変化することなく、1時間以内に *p21* タンパク質の発現を安定させることを示した (図11D、図S2)。まとめると、このデータは、ニンボリドが *RNF114* の天然変性 *C8* と反応して、*RNF114-p21* 基質認識を妨害し、*p21* ユビキチン化の阻害、迅速な *p21* の安定化、および乳癌細胞の細胞増殖を低減することを示唆して

10

20

30

40

50

いる。

#### 【0646】

標的タンパク質分解のためのRNF114リクルーターとしてのニンボリドの使用。標的タンパク質分解は、タンパク質標的化リガンド、リンカーおよびE3リガーゼリクルーターからなる「分解剤」と呼ばれる二官能性分子を利用してE3リガーゼを目的のタンパク質へと運び、プロテアソーム依存的に標的をユビキチン化させ、分解することを通じて、アンドラッグアブルなプロテオームに取り組むために生まれた強力な薬物発見プラットフォームである<sup>43-51</sup>。ニンボリドは潜在的な基質認識部位を標的とするため、ニンボリドをRNF114リクルーターとして使用する二官能性分解剤の開発を通じて、プロテアソーム分解のためにRNF114を他のタンパク質基質に動員するためにニンボリドを使用できると推測した。実現可能性を実証するために、ニンボリドをBRD4阻害剤JQ1に結合することによって形成された2つの分解剤を合成した(図12A)。以前の研究では、セレブロンリクルーターサリドマイドまたはVHLリクルーターのいずれかに結合したJQ1ベースの分解剤による効率的なプロテアソーム依存性BRD4分解が実証されている<sup>44, 47, 51</sup>。以前に調製された酸3は、より長い(PEGベースの)およびより短い(アルキルベースの)スペーサー単位の両方を含むJQ1官能化アミンにカップリングされ、分解剤XH1およびXH2に到達した。XH1は感知できるBRD4分解を示さなかったが、231MFP細胞でのXH2処理(100 nM)は12時間以内にBRD4分解を引き起こし、この分解はプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)による処理によって弱められた(図12C)。XH2によるBRD4分解の用量反応を、JQ1に結合したVHLリガンドを利用する以前に報告されたBRD4分解剤MZ1の用量反応と比較した(図12D)。MZ1は、1および0.1 μMでより優れたBRD4分解を示し、10 nMでXH2と同等の分解を示した。興味深いことに、XH2は、0.1および0.01 μMと比較して1 μMでより少ない分解を示し、MZ1を含む分解剤で以前に報告した「フック効果」に起因する<sup>43, 44</sup>。XH2を介したBRD4分解は、E1ユビキチン活性化酵素阻害剤(TAK-243)による処理、またはBRD4リガンド自体(JQ1)との事前競合によっても弱められた(図12E~12F)。しかしながら、翻訳阻害剤(エメチン)による処理は、観察されたBRD4分解の効果を発揮しなかった(図12G)。これらの結果は、RNF114のC8とのニンボリド反応性を利用して、このE3リガーゼをBRD4などの他のタンパク質基質に動員し、それらをユビキチン化させ、分解することができることを強く示唆している。

#### 【0647】

RNF114に対する共有結合リガンドを同定するためのケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニング。RNF114のC8は、癌治療および標的タンパク質分解用途に利用できる独自のドラッグアブルモダリティであるという洞察を得て、RNF114を同様に標的とする合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを検索した。この目標を達成するために、中程度スループットのゲルベースABPPアプローチを使用して、RNF114に対するシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングした。ここでは、共有結合リガンドを、RNF114のIA-アルキン標識と競合させ、続いてローダミン-アジドを付加し、SDS/PAGEおよびゲル内蛍光による分析を行う。RNF114のIA-アルキン標識とニンボリドを競合させる初期の研究では、おそらくC8を超えるIA-アルキンによる複数のシステインのアルキル化が原因で、標識の完全な阻害は示されなかった。したがって、本発明者らは、C8A RNF114突然変異体タンパク質の標識の欠如およびニンボリドとの観察された完全な競合によって証明されるように、RNF114上のC8の選択的標識を示す、より調整されたアルキン官能化環状エノンプローブJNS27を合成した(図13A)。RNF114に対してスクリーニングされた約200個のシステイン反応性共有結合リガンドのうち、アクリルアミドEN62が有望なヒットとして出現した(図13B; 図16A~16C)。EN62はC8依存的にRNF114自己ユビキチン化活性を阻害し、231MFP乳癌細胞プロテオームにおいてプロテオーム全体の選択性も示した(図13C~13D)。EN62はまた

10

20

30

40

50

、231MFP乳癌細胞の生存を損ない、免疫不全マウスにおけるインビボでの231MFP腫瘍異種移植片の増殖を弱めた(図13E~13F)。EN62は効力のさらなる改善を必要とするが、この共有結合リガンドは、将来の癌治療およびタンパク質分解用途のための合成するのににより扱いやすい出発点となる。

#### 【0648】

ニンボリドがRNF114内のC8の基質認識ドメインを標的にして、p21のユビキチン化および分解を阻害し、その安定化につながることで、乳癌の病原性を部分的に低減するという説得力のある証拠を示す。RNF114上のC8のニンボリド標的を使用して、標的タンパク質分解用途のためにRNF114を動員できることを実証し、ニンボリド-JQ1分解剤XH2によるBRD4分解を実証する。さらに、ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニングアプローチを使用して、EN62などの合成するのににより扱いやすい共有結合リガンドを迅速に同定して、RNF114のC8などの複雑な天然物で採用されているドラッグブルモダリティを標的とすることができるという概念を実証する。

#### 【0649】

ここでは、ニンボリドがRNF114とp21との相互作用を妨害することを報告し、p21レベルがp53に依存しない方法で乳癌細胞において急速に安定化することも示す。SCFSkp2、CRL4Cdt2、CHIPなど、他のいくつかのE3リガーゼも、細胞周期または外因性ストレス中、さまざまな条件下でp21を分解することが報告されている<sup>52-54</sup>。以前の研究では、RNF114の発現はG1期後期に上昇して、p21レベルを調節し、G1期からS期への移行に重要であることが示されている<sup>39</sup>。報告されている他のRNF114基質には、母体から接合体への移行に関与するTAB1と、NF-κB活性およびT細胞活性化に関与するA20が含まれる<sup>55, 56</sup>。したがって、癌の状況または他の細胞および組織の種類では、ニンボリドは、他のRNF114タンパク質基質のレベルを調節することによって追加の活性を有する可能性がある。さらに、RNF114がニンボリドの主要な機能的標的の1つであることを示しているが、この方法では容易に同定できなかった可能性のある、追加の可逆的または不可逆的なタンパク質標的が存在する可能性がある。それにもかかわらず、本発明者らは、RNF114過敏化細胞のニンボリドへのノックダウン以来、RNF114が乳癌細胞の増殖における重要かつ機能的なニンボリド標的であることを実証している。

#### 【0650】

本発明者らの結果はまた、ニンボリドがRNF114内の天然変性領域を機能的に標的とすることを実証している。ニンボリドでRNF114の構造を解明することはこれまでのところ困難であることが証明されているが、ニンボリドがN末端に秩序を誘導するかどうかを調査する将来の研究は、天然変性し、かつアンドラッグブルなタンパク質標的のリガンド結合性および他のE3リガーゼを標的とする可能性のある戦略への洞察を提供する。

#### 【0651】

標的タンパク質分解は、プロテアソームを介した排除のためにタンパク質を標的とするための困難かつ効果的な創薬パラダイムとして浮上している<sup>43, 45</sup>。しかしながら、課題のうちの1つは、ヒトゲノムにおける約600個のE3リガーゼの中で開発されたE3リガーゼリクルーターの数が少ないことである<sup>57</sup>。これらのE3リガーゼリクルーターには、セレブロンを動員するサリドマイド型免疫調節薬(IMiD)、VHLを動員するリガンド、MDM2を動員するnutlin、cIAPを動員するリガンドが含まれる<sup>43, 45</sup>。ここでは、ニンボリドが標的タンパク質分解用途のための新規RNF114リクルーターとして使用できる可能性があることを報告する。すでに重要であることが示されている分子の領域である、さらなるリンカー修飾により、この分解剤クラスの性能を大幅に最適化できるはずである。EN62などのRNF114のC8を標的とすることができる合成するのににより扱いやすい共有結合リガンドをRNF114リクルーターとして利用することも可能かもしれない。ニンボリドはRNF114内の基質認識ドメインを標的とするため、IMiDに関して報告されているように、ニンボリドが新基質を動員および分

10

20

30

40

50

解する分子接着剤として機能し得るかどうかを判断することも将来的に興味深い<sup>58-60</sup>。

#### 【0652】

全体として、これは、ABPPベースの化学プロテオームプラットフォームを使用して、天然物によって利用される独自のドラッグブルモダリティを特定することの有用性を示している。興味深いことに、天然物は、潜在的な癌治療および標的タンパク質分解用途のためにE3リガーゼタンパク質間相互作用部位に機能的にアクセスでき、タンパク質の天然変性領域で著しくアクセスできることを示している。本発明者らの研究はまた、共有結合リガンドスクリーニングアプローチを利用して、より複雑な天然物と同様に作用する合成するのにより扱いやすい小分子を同定し、共有結合リガンドが他のE3リガーゼにアクセスしてE3リガーゼリクルーターの範囲を拡大できる可能性があることも示している。

#### 【0653】

##### 実施例5．方法およびアッセイ

細胞培養。231MFP細胞は、前述のように、MDA-MB-231細胞の外植腫瘍異種移植片から生成された<sup>61</sup>。HCC38およびHEK293T細胞は、American Type Culture Collectionから入手した。HEK293T細胞を、10% (v/v) のウシ胎児血清 (FBS) を含有するDMEMで培養し、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。231MFP細胞を、10%のFBSを含有するL15培地で培養し、0%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。HCC38細胞を、10%のFBSを含有するRPMI培地で培養し、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。

#### 【0654】

生存および増殖アッセイ。細胞の生存および増殖アッセイは、製造元のプロトコルに従ってヘキスト33342色素 (Invitrogen) を使用して以前に記載されたように、および以前に記載されたように実施した<sup>62</sup>。231MFP細胞を96ウェルプレート (生存用に40,000個、増殖用に20,000個) に150μLの容量で播種し、一晚接着させた。細胞を、DMSO中に1:250で希釈した1000倍の化合物ストックを含有する追加の50μLの培地で処理した。適切なインキュベーション期間の後、培地を各ウェルから除去し、10%のホルマリンおよびHoechst 33342色素を含有する100μLの染色溶液を各ウェルに加え、暗所にて室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、染色液を除去し、画像化する前に、ウェルをPBSで洗浄した。HCC38細胞を用いた研究も上記のように実施したが、生存用に20,000個の細胞および増殖用に10,000個の細胞を播種した。

#### 【0655】

Isotop-ABPPケモプロテオミクス研究。Isotop-ABPP研究は、以前に報告されたように行った<sup>28, 31, 35, 63</sup>。細胞をPBS中でプローブ超音波処理して溶解し、タンパク質濃度をBCAアッセイで測定した<sup>64</sup>。インサイチュ実験では、DMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子 (1000×DMSOストックから) のいずれかで細胞を90分間処理してから、細胞を収集して溶解した。インビトロ実験では、PBSで希釈したプロテオームサンプル (生物学的複製あたり4mgのプロテオーム) をDMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子で室温にて30分間処理した。続いて、プロテオームをIA-アルキン標識 (100μM) で室温にて1時間標識した。CuAACは、tris (2-カルボキシエチル) ホスフィン (1mM)、tris [ (1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル) メチル] アミン (34μM)、硫酸銅 (II) (1mM, Sigma)、およびビオチン-リンカー-アジドを順次加えることによって使用し、リンカーを、対照または処理プロテオームの処理のために同位体的に軽いまたは重いバリンと共にTEVプロテアーゼ認識配列で官能化した。CuAAC後、プロテオームを、6500×gでの遠心分離によって沈殿させ、氷冷メタノール中で洗浄し、1:1の対照/処理比で混合し、再び洗浄し、次いで、変性し、1.2% SDS/PBS中で80℃まで5分間加熱することによって再可溶化した。不溶性成分を、6500×gでの遠心分離によって沈殿させ、可溶性プロテオームを5mLの0.2%

S D S / P B S 中に希釈した。4℃で一晩回転させながら、標識タンパク質を、アビジン-アガロースビーズ（170μLの再懸濁ビーズ／サンプル、Thermo Pierce）に結合させた。ビーズ結合タンパク質を、PBSおよび水でそれぞれ3回洗浄することにより濃縮し、次いで、6M尿素／PBS（Sigma）に再懸濁し、TCEP（1mM、Sigma）中で還元し、ヨードアセトアミド（IA）（18mM、Sigma）でアルキル化し、次いで、洗浄し、2M尿素に再懸濁し、0.5μg／μLのシーケンシンググレードのトリプシン（Promega）で一晩トリプシン処理した。トリプシンペプチドを溶出した。ビーズをPBSおよび水でそれぞれ3回洗浄し、TEV緩衝液（水、TEV緩衝液、100μMジチオスレイトール）で洗浄し、Ac-TEVプロテアーゼを含む緩衝液に再懸濁し、一晩インキュベートした。ペプチドを、水で希釈し、ギ酸（1.2M、Spectrum）で酸性化し、分析用に調製した。

10

## 【0656】

質量分析。全てのプロテオミクス実験由来のペプチドを、4cmのAqua C18逆相樹脂（Phenomenex 番号04A-4299）を充填した内径250μmの溶融シリカ毛细管に加圧装填し、これは、10分間かけて100%緩衝液Aから100%緩衝液Bの勾配を使用したAgilent 600シリーズHPLC上で事前に平衡化し、その後、100%緩衝液Bで5分間洗浄し、100%緩衝液Aで5分間洗浄したものであった。その後、サンプルを、isoTOP-ABPP研究のために、10cmのAqua C18逆相樹脂および3cmの強カチオン交換樹脂を充填した13cmのレーザープルカラムへのMicroTee PEEK 360μmのフィッティング（Thermo Fisher Scientific #p-888）を使用して付着させた。サンプルを、500mM酢酸アンモニウム水溶液の0%、25%、50%、80%、および100%の塩バンブを使用し、かつ緩衝液A中5～55%緩衝液Bの勾配（緩衝液A：95：5の水：アセトニトリル、0.1%ギ酸、緩衝液B：80：20のアセトニトリル：水、0.1%ギ酸）を使用した、5段階多次元タンパク質同定技術（MudPIT）プログラムを使用したQ Exactive Plus質量分析計（Thermo Fisher Scientific）を使用して分析した。データを、動的排除を有効にして（60秒）、データ依存型取得モードで収集した。1回のフルMS（MS1）スキャン（400～1800m/z）を行い、続いて、n番目に最も豊富なイオンの15回のMS2スキャン（ITMS）を行った。加熱キャピラリー温度を200℃に設定し、ナノスプレー電圧を2.75kVに設定した。

20

30

## 【0657】

データは、Raw Extractor 1.9.9.2（Scripps Research Institute）を使用してMS1およびMS2ファイルの形式で抽出し、IP2 v.3（Integrated Proteomics Application, Inc）のProLuCID検索方法論を用いてUniprotヒトデータベースに対して検索した<sup>65</sup>。システイン残基を、カルボキシアミノメチル化についての静的修飾（+57.02146）およびメチオニン酸化についての最大2つの特異的修飾、および軽または重TEVタグ（それぞれ、+464.28596または+470.29977）で検索した。ペプチドは、少なくとも1つのトリプシン末端を有し、TEV修飾を含むことが必要とされた。ProLuCIDデータを、DTASelectを通してフィルター処理して、5%未満のペプチド偽陽性率を達成した。3つの生物学的複製のうち2つ全てにおいて明らかであったプローブ修飾ペプチドのみを、それらの同位体の軽対重比について解釈した。3を超える比を示すプローブ修飾ペプチドを、共有結合的に作用する小分子の潜在的な標的としてさらに分析した。3を超える比を有する修飾ペプチドの場合、これらのヒットをフィルタリングして、3つの生物学的複製全てに存在するペプチドを探した。プローブ修飾ペプチド比が3を超える場合、3つの比が3を超えるペプチドのみを解釈し、それ以外の場合は最低の比に置き換えられた。プローブ修飾ペプチド比が4を超える場合、3つの比が4を超えるペプチドのみを解釈し、それ以外の場合は最低の比に置き換えられた。次に、3を超える比を有する、得られたプローブ修飾ペプチドのMS1ピーク

40

50

形状が、全ての生物学的複製にわたって解釈したペプチドに対して良好な品質であることを手動で確認した。

【0658】

ノックダウン株の構築。ショートヘアピンオリゴヌクレオチドを使用して、前述の方法を使用して31MF細胞でRNF114の発現をノックダウンした<sup>66</sup>。安定したshRNA株を生成するために、ヒトRNF114に対するshRNA (Sigma)を含むpLKO.1バックボーンのレンチウイルスプラスミドを、Lipofectamine (Invitrogen)を使用してHEK293T細胞にトランスフェクトした。レンチウイルスを、濾過された培養培地から収集し、ポリブレンで標的癌細胞株を感染させるために使用した。標的細胞を、1 µg/mlのピューロマイシンで3日間にわたって選択した。RNF114ノックダウン株の生成に使用したショートヘアピン配列は次の通りである。

CCGGCCATGGCTGCCGTAAGAATTTCTCGAGAAATTCTTACGGCAGCCATGGTTTTTG (配列番号4)

(Sigma RNF114 MISSION shRNAバクテリアグリセロールストック、TRCN0000314877)。

【0659】

対照shRNAを、標的配列GCAAGCTGACCCCTGAAGTTCAT (配列番号5)を用いてGFPに対して標的化した。

【0660】

ノックダウンを、qPCRによって確認した。

【0661】

qPCRによる遺伝子発現。遺伝子発現を、Fisher Maxima SYBR Greenの製造元のプロトコルを使用したqPCRによって確認した。Fisher Maxima SYBR Greenのプライマー配列は、Primer Bankから得た。プライマーの配列は次の通りである。

RNF114フォワード：AAT GTT CCA AAC CG (配列番号6)

RNF114リバース：TTG CAG TGT TCC AC (配列番号7)

シクロフィリンフォワード：CCC ACC GTG TTC TTC GAC ATT (配列番号8)

シクロフィリンリバース：GGA CCC GTA TGC TTT AGG ATG A (配列番号9)

【0662】

ゲルベースABPP。ゲルベースABPP方法を、以前に記載されたように実施した<sup>34, 62, 63, 67</sup>。純粋な組換えヒトタンパク質はOrigeneから購入した。純粋なタンパク質(0.1 µg)をDMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子で室温にて30分間、50 µLのPBSのインキュベーション容量で前処理し、続いてJNS-1-27 (最終濃度50 µM)で室温にて1時間処理した。CuAACを実施して、ローダミン-Aジド (最終濃度1 µM) をアルキンプローブ標識タンパク質に付加した。次に、サンプルを20 µLの4×還元Laemmli SDSサンプルローディング緩衝液 (Alfa Aesar) で希釈し、90°Cで5分間加熱した。サンプルを、プレキャスト4~20% TGXゲル (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で分離した。ChemIDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc) でスキャンする前に、ゲルを10%酢酸、30%エタノールの溶液で2時間固定した。標的標識の阻害は、Image Jを使用したデンストメトリーによって評価した。

【0663】

共有結合リガンドライブラリー。RNF114に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの大半の合成および特徴付けは、以前に報告されている<sup>31, 32, 34, 63</sup>。「EN」で始まる化合物は、Enamine LLCから購入した。以前に報告されていない他の共有結合リガンドの合成および特徴付けは、実施例6に記載されている。



## 【0664】

ウエスタンブロッティング。RNF114 (Millipore Sigma、HPA 021184)、p21 (Cell Signaling Technology、12D1)、GAPDH (Proteintech Group Inc.、60004-1-Ig)、BRD4 (Abcam plc、Ab128874)、DYKDDDDKタグ (Cell Signaling Technology、D6W5B) およびベータアクチン (Proteintech Group Inc.、6609-1-Ig) に対する抗体は、さまざまな商業的供給元から入手し、推奨される製造元の手順に従って希釈液を調製した。タンパク質をSDS/PAGEによって分離し、iBlotシステムを使用してニトロセルロース膜に移した。プロットを、Tween 20 (TBST) 溶液を含有するTris緩衝生理食塩水中の5% BSAを用いて室温で1時間ブロックし、TBST中で洗浄し、製造元が推奨する希釈剤で希釈した一次抗体を用いて4℃で一晩プローブした。TBSTで洗浄した後、プロットを、Lycorから購入した二次抗体と共に暗所でインキュベートし、TBST中の5% BSA中に1:10,000の希釈で室温にて使用した。さらに洗浄した後、Odyssey Li-Corスキャナーを使用してプロットを可視化した。追加の一次抗体のインキュベーションが必要な場合は、ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (EMD Millipore、2504) を使用して膜をストリッピングし、洗浄して再度ブロックしてから、一次抗体と再インキュベートした。

## 【0665】

野生型およびC8A RNF114の発現および精製。RNF114は、いくつかの方法を使用して発現させ、精製した。いずれの場合も、RNF114の活性およびニンボリドに対する感受性を確認した。最初の方法では、C末端にFLAGタグが付いた野生型哺乳動物発現プラスミドをOrigene (Origene Technologies Inc.、RC209752) から購入した。RNF114 C8A突然変異体は、製造元の指示に従って、Q5部位特異的変異誘発キットを用いて (New England Biolabs、E0554S) 生成した。以前に報告されたように、発現および精製条件を最適化した<sup>68</sup>。HEK293T細胞を、10%のFBS (Corning) および2mMのL-グルタミン (Life Technologies) を補充したDMEM (Corning) 中で60%の密集度まで増殖させ、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。トランスフェクションの直前に、培地を、5%のFBSを含有するDMEMと置き換えた。各プレートに、100μgのPEIを含む20μgの過剰発現プラスミド (Sigma) をトランスフェクトした。48時間後、細胞をTBSに回収し、超音波処理により溶解し、抗DYKDDDDK樹脂 (GenScript、L00432) で90分間バッチ結合した。溶解物と樹脂を重力フローカラムに装填して洗浄した後、250ng/μLの3×FLAGペプチド (ApexBio、A6001) で溶出した。純度および濃度を、PAGE、UV/分光法、およびBCAアッセイによって確認した。

## 【0666】

2番目の方法では、RNF114の完全なヒトアイソフォーム (Uniprot id: Q9Y508) をコードするDNAを、E. coliでの発現用にコドン最適化し、Integrated DNA Technologiesによって合成した。所望の構築物は、NdeI制限部位とBamHI制限部位との間にHisg-MBP-TEV配列を含むように修飾されたpET24aプラスミド (Novagen) に相同な20塩基対を含むプライマーで完全RNF114配列から増幅した。PCR産物を、プレキャスト1%アガロースゲル (Invitrogen) を使用して分析し、正しい長さのPCR産物を、QIAquick Gel Extractionキット (Qiagen) を使用して精製した。精製したPCR産物を、Gibson Assembly (NEB Gibson Assembly 2× Master Mix) を使用して線形化ベクターにアセンブルし、E. coli 10G化学的コンピテント細胞 (Lucigen、ウィスコンシン州ミドルトン) に形質転換した。カナマイシン (Kan) 耐性コロニーをLB培地で増殖さ

10

20

30

40

50

せ、フォワードおよびリバースプライマーを使用して配列を確認する前に、Mini prep (Qiagen) を介してプラスミドを単離した。

【0667】

所望のRNF114構築物を含む100 ngのpET24a His-MBPプラスミドを、E. coli BL21 (DE3) 化学的コンピテント細胞 (NEB製品番号C2530H) に形質転換した。翌日、単一の形質転換コロニーを使用して、カナマイシン (50 µg/mL) を含む栄養豊富なLB培地50 mLに接種し、250 rpmで撹拌しながら37°Cで一晩インキュベートした。翌朝、50 mMの3- (N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) (pH 7.5)、1 mMの塩化亜鉛およびカナマイシン (50 µg/mL) を補充した1 LのTerrific Broth (TB) に、オーバーナイトスターター培養物を、600 nm (OD<sub>600</sub>) での開始光学密度が0.1になるまで接種した。OD<sub>600</sub>が0.8になるまで、250 rpmで撹拌しながら37°Cで細胞を増殖させた。この段階で、RNF114融合タンパク質の発現を1 mMのイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導し、インキュベーターの温度を18°Cに下げた。細胞を18°Cで18時間増殖させたままにし、続いて遠心分離によって回収し、1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 緩衝液で洗浄し、-20°Cで保存した。

【0668】

過剰発現したRNF114融合タンパク質を含有する10 gのE. coli細胞を、80 mLの溶解緩衝液 (50 mMのTris (pH 7.5)、150 mMのNaCl、2個のRocheプロテアーゼ阻害剤錠剤 [EDTA含まず]、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、1 mMのDTT) に再懸濁し、氷上で超音波処理し、サイクル時間はオン60秒、オフ60秒で、合計超音波処理時間は3分であった。細胞溶解物を18,000 rpmで20分間遠心分離し、可溶性タンパク質を、洗浄緩衝液 (50 mMのTris (pH 7.5)、150 mMのNaCl、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、1 mMのDTT、25 mMのイミダゾール) で事前に平衡化した2 mLのNi-NTA樹脂とともに4°Cで4時間撹拌しながらインキュベートした。細胞溶解物/Ni-NTA樹脂混合物をディスプレイカラムに入れ、樹脂に結合しない全てのタグなし可溶性タンパク質を収集して、2回目の精製を行った。樹脂を洗浄緩衝液25 mLで洗浄した後、His-MBP-RNF114タンパク質を、25 mLの溶出緩衝液 (50 mMのTris (pH 7.5)、500 mMのイミダゾール、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、150 mMのNaCl、1 mMのDTT) でNi-NTA樹脂から溶出した。このプロセスを繰り返し、収集したフローを、さらに2 mLの事前平衡化Ni-NTA樹脂とともに完全にインキュベートした。

【0669】

His-MBP-RNF114タンパク質を、TEVプロテアーゼ (100 単位/mg (MBP-RNF114)) で同時に4°Cで消化し、透析緩衝液 (50 mMのTris (pH 7.5)、150 mMのNaCl、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、1 mMのDTT) に対して一晩透析した。翌朝、タンデムに組み立てた2つの5 mL His Trap Excelカラムを、Aktavant上に置き、5カラム容量の洗浄緩衝液で平衡化した。TEVで切断されたサンプルを2 mL/分の速度でカラムに装填し、樹脂をさらに5カラム容量の洗浄緩衝液で洗浄した。切断されたRNF114を含むと同定された全ての画分を5 mLの容量に濃縮し、結晶学緩衝液 (25 mMのTris (pH 7.5)、137 mMのNaCl) またはNMR緩衝液 (20 mMのリン酸ナトリウム (pH 6.8)、150 mMのNaCl) で事前に平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75ゲル濾過カラム (GE Healthcare) に装填した。0.25 mL/分の流速を使用してゲル濾過カラムを実行し、2 mLの画分を収集した。ゲル濾過カラムから溶出するピークに対応する画分をSDS-PAGEを使用して分析し、RNF114を含む全ての画分を最終濃度10 mg/mLに濃縮し、液体窒素で瞬間冷凍し、必要になるまで-80°Cで保存した。

【0670】

RNF114のLC-MS/MS分析。50 µLのPBS中の精製RNF114 (10

10

20

30

40

50

μg)を、DMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する化合物(100 μM)のいずれかとともに室温で30分間インキュベートした。次に、DMSO対照を軽IAで処理しつつ、化合物で処理したサンプルを重いIAと室温でそれぞれ1時間インキュベートした(200 μMの最終濃度、Sigma-Aldrich、721328)。12.5 μLの100% (w/v) TCAを加えてサンプルを沈殿させ、処理群と対照群をペアで組み合わせながら、-80℃で1時間冷却した。次に、合わせたサンプルを最高速度にて4℃で10分間回転させ、上澄みを注意深く除去し、サンプルを氷冷した0.01M HCl/90%アセトン溶液で洗浄する。ペレットを、0.1%のProtease Max (Promega Corp.、V2071)を含有する4Mの尿素に再懸濁し、40mMの重炭酸アンモニウム緩衝液で希釈した。サンプルを、60℃で30分間10mMのTCEPで還元させた。次に、サンプルをPBSで50%希釈した後、シーケンシンググレードのトリプシン(サンプルあたり1 μg、Promega Corp.、V5111)を加えて、37℃で一晩インキュベートした。翌日、サンプルを13200 rpmで30分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、最終濃度が5%ギ酸になるように酸性化し、MS分析まで-80℃で保存した。

#### 【0671】

RNF114ユビキチン化アッセイ。組換えMyc-Flag-RNF114タンパク質を、上記のようにHEK292T細胞から精製するか、Origene (Origene Technologies Inc.、TP309752)から購入した。インビトロ自動ユビキチン化アッセイのために、25 μLのTBS中の0.2 μgのRNF114をDMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する化合物と室温で30分間プレインキュベートした。続いて、2mMのATPを含有する総量25 μLのTris緩衝液に0.1 μgのUBE1 (Boston Biochem. Inc.、E-305)、0.1 μgのUBE2D1 (Boston Biochem. Inc.、e2-615)、5 μgのFlag-ユビキチン (Boston Biochem. Inc.、u-120)を加えて、50 μLの最終容量を達成した。混合物を37℃で1.5時間攪拌しながらインキュベートした。20 μLのLaemmli緩衝液を加えて反応をクエンチし、タンパク質をウエスタンブロットアッセイによって分析した。

#### 【0672】

RNF114/p21プルダウン。組換えFlagタグ付きRNF114を餌として使用して、Anti-Flagアガロースビーズ (GenScript Biotech Corp.、L00432)を用いて純粋な組換えp21 (Origene Technologies Inc.、TP309752およびTP720567)を沈殿させた。1マイクログラムのFlag-RNF114を50 μLのTBSに加え、続いてニンボリド(100 μMの最終濃度、Cayman Chemical Co.、19230)または等量のDMSOを加えた。サンプルを室温で30分間インキュベートした。1マイクログラムの純粋なp21を各サンプルに加え、サンプルを室温で30分間攪拌しながらインキュベートした。10マイクロリットルのFlagアガロースビーズを各サンプルに加え、サンプルを室温で30分間攪拌した。洗浄(3回、1mLのTBS)を実施してから、250 ng/μLの3×FLAGペプチド (Apex Bio A6001)を補充した50 μLのTBSを使用してタンパク質を溶出した。上清(30 μL)を回収し、Laemmli還元剤(10 μL)を加えた後、サンプルを95℃で5分間煮沸し、放冷した。上記のように、サンプルをウエスタンブロットティングによって分析した。

#### 【0673】

腫瘍異種移植片の研究。ヒト腫瘍異種移植片は、以前に記載されたように、雌のC.B17重症複合免疫不全症(SCID)マウス(Taconic Farms)の脇腹に癌細胞を異所的に移植することによって確立した<sup>66, 69</sup>。手短に言えば、細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、血清含有培地に回収した。回収した細胞は、無血清培地中で洗浄し、 $2.0 \times 10^4$ 細胞/μLの濃度で無血清培地に再懸濁し、100 μLを各マウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍をキャリパーで測定した。動物実験を、the Univ

10

20

30

40

50

ersity of California, Berkeleyの施設内動物管理使用委員会の指針に従って行った。

【0674】

実施例6．追加の合成および特徴付けデータ

ニンボリドーアルキンプローブ（S I - 2）と分解剤X H 1およびX H 2の合成および特徴付け

一般的な手順。特に明記しない限り、全ての反応は、オープン乾燥または火炎乾燥したFisherbrand（登録商標）ホウケイ酸ガラス管（Fisher Scientific、1495925A、13×100mm）で、乾燥窒素雰囲気下で黒色フェノールスクリュキャップ（13-425）を使用して実施した。乾燥したN，N-ジメチルホルムアミド（DMF）、トルエンおよびアセトニトリルは、これらの事前に脱気した溶媒を活性アルミナカラムに通すことによって得た。ニンボリドはSigma-AldrichもしくはCayman Chemicalから購入し、さらに精製することなく直接使用した。プロパルギルアミンとN-メチルプロパルギルアミンはFisher Scientificから購入し、さらに精製することなく直接使用した。反応を、TLCシリカゲル60 F<sub>254</sub>ガラスプレート（EMD Millipore）での薄層クロマトグラフィー（TLC）によって監視し、UV照射およびp-アニスアルデヒド、リンモリブデン酸、または過マンガン酸カリウムによる染色によって可視化した。揮発性溶媒は、ロータリーエバポレーターを使用して減圧下で除去した。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、Silicycle F60シリカゲル（60 Å、230～400メッシュ、40～63 μm）を使用して実施した。酢酸エチルとヘキサンはFisher Chemicalから購入し、さらに精製することなくクロマトグラフィーに使用した。プロトン核磁気共鳴（<sup>1</sup>H NMR）および炭素核磁気共鳴（<sup>13</sup>C NMR）スペクトルは、<sup>1</sup>Hの場合は600および700 MHz、<sup>13</sup>Cの場合は150および175 MHzで動作するBruker AV-600およびAV-700分光計で記録した。化学シフトは、残留溶媒シグナルCDCl<sub>3</sub>に関して百万分率（ppm）で報告される（<sup>1</sup>H NMR：δ = 7.26；<sup>13</sup>C NMR：δ = 77.16），CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>（<sup>1</sup>H NMR：δ = 5.32；<sup>13</sup>C NMR：δ = 53.84）。ピーク多重度は次のように報告される：s = 一重項、d = 二重項、t = 三重項、dd = 二重項の二重項、tt = 三重項の三重項、m = 多重項、br = ブロードなシグナル、app = 見かけの。IRスペクトルは、Nicolet 380 FT-IR分光計で記録した。高分解能質量スペクトル（HRMS）は、カリフォルニア大学バークレー校のQB3／化学質量分析施設によって取得された。旋光度は、Perkin-Elmer 241 旋光計で測定した。

10

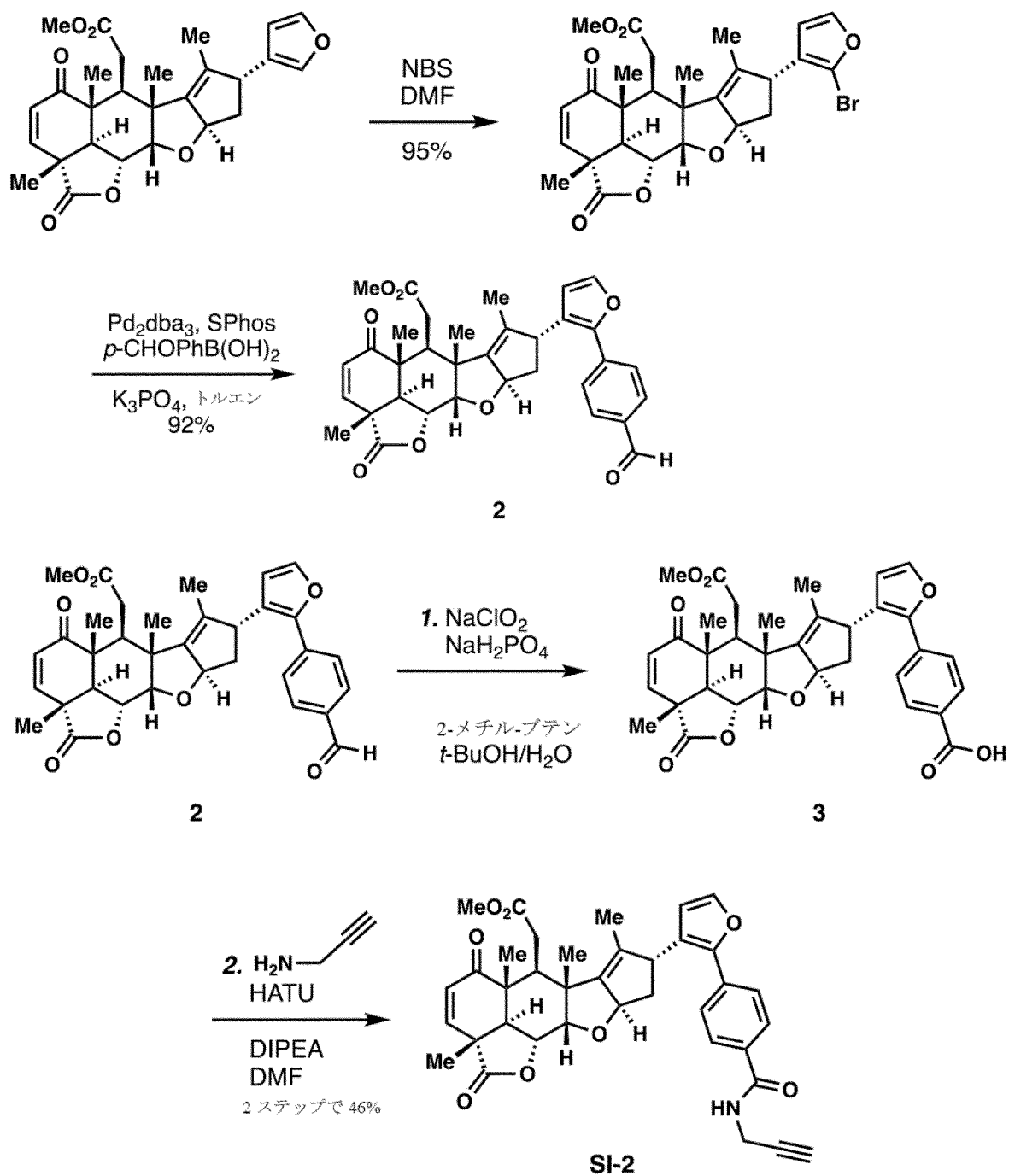
20

30

40

50

【化 2 4 9】



【 0 6 7 5】

スキーム S 1。ニンボリドアルキンプローブ (S I - 2) の合成。

10

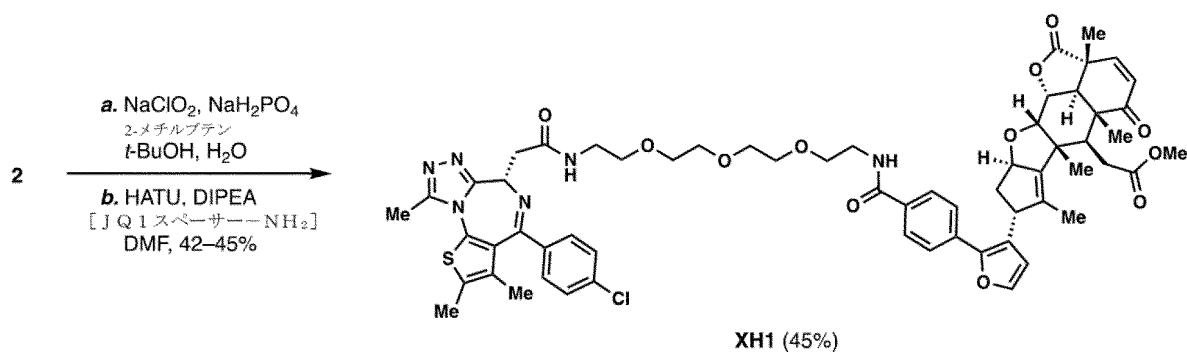
20

30

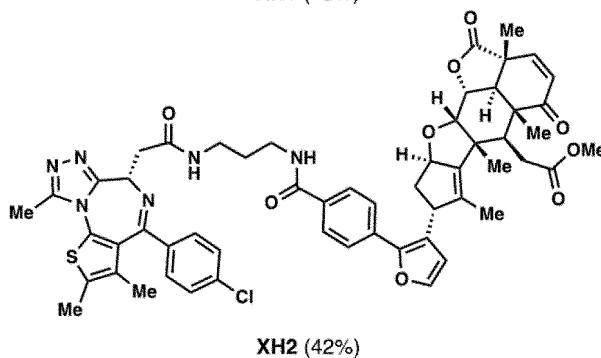
40

50

【化 2 5 0】



10

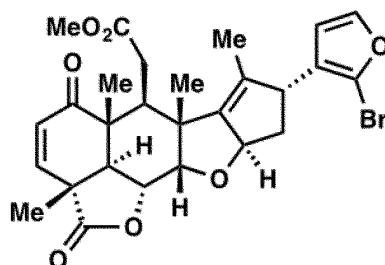


20

【0 6 7 6】

スキーム S 2。ニンボリド由来の二官能性分解剤 X H 1 および X H 2 の合成。

【化 2 5 1】



30

【0 6 7 7】

ブロモフラン S I - 1：ニンボリド（100 mg、0.214 mmol）を4つの反応管（Fisher Scientific、13×100 mm）に均等に分割し、それぞれに攪拌棒を入れた。チューブを排気し、窒素を再充填し、乾燥 DMF（各 0.25 mL）を加え、得られた溶液を氷浴で 0℃ に冷却した。再結晶した N-ブロモスクシンイミド（40.0 mg、0.225 mmol）を乾燥 DMF（4 mL）に溶解し、溶液を各反応管（各 1 mL）にゆっくりと加えた。反応混合物を 0℃ で 1 時間攪拌し、次に飽和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液（各 5 mL）の添加によりクエンチした。得られた混合物を合わせ、EtOAc（3×20 mL）で抽出した。合わせた有機層を、 $\text{H}_2\text{O}$ （50 mL）およびブライン（50 mL）で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  で乾燥し、真空中で濃縮した。粗混合物をカラムクロマトグラフィー（EtOAc：ヘキサン＝1：3～1：1）によって精製して、白色フォームとして S I - 1（111 mg、95%）を得た。

40

【数 1】

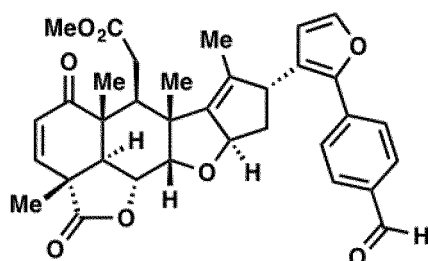
$$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$$

= +190.3° (c 0.010 g/mL,  $\text{CHCl}_3$ ) ;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.34 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J=9.$

50

7 Hz, 1H), 6.29 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 5.92 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.56 (app. tt,  $J=7.4, 1.8$  Hz, 1H), 4.62 (dd,  $J=12.5, 3.7$  Hz, 1H), 4.27 (d,  $J=3.7$  Hz, 1H), 3.67 (brd,  $J=7.0$  Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.24 (dd,  $J=16.3, 5.5$  Hz, 1H), 3.18 (d,  $J=12.5$  Hz, 1H), 2.75 (dd,  $J=5.5, 5.5$  Hz, 1H), 2.36 (dd,  $J=16.3, 5.5$  Hz, 1H), 2.18–2.13 (m, 2H), 1.66 (d,  $J=1.4$  Hz, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.9, 175.0, 173.2, 149.8, 145.4, 144.2, 136.1, 131.2, 125.2, 120.3, 112.1, 88.5, 83.1, 73.5, 52.0, 50.5, 50.0, 47.9, 45.4, 43.8, 41.2, 40.4, 32.2, 18.7, 17.3, 15.3, 13.0; IR (薄膜,  $\text{cm}^{-1}$ ) 2974, 2929, 2875, 1783, 1734, 1678, 1594, 1438, 1394, 1373; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{BrNa}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$  の場合):  $m/z$  567.0989、実測値: 567.0990。

【化252】



【0678】

アルデヒド2: 反応管 (Fisher Scientific、13×100mm) に、攪拌棒、SI-1 (12mg、0.022mmol、1当量)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (10mg、0.011mmol、0.5等量)、SPhos (10mg、0.024mmol、1当量)、無水 $\text{K}_3\text{PO}_4$  (35mg、0.17mmol、7.5当量) および4-ホルミルフェニルボロン酸 (16mg、0.11mmol、5当量) を入れた。チューブを排気し、窒素を再充填し、乾燥トルエン (0.5mL) を加えた。得られた混合物を60℃で48時間加熱し、室温に冷却し、Celite (登録商標) のプラグに通した。濾液を真空中で濃縮し、カラムクロマトグラフィー (EtOAc:ヘキサン=1:3~1:1) によって精製して、淡黄色油としてアルデヒド2 (11.5mg、92%) を得た。

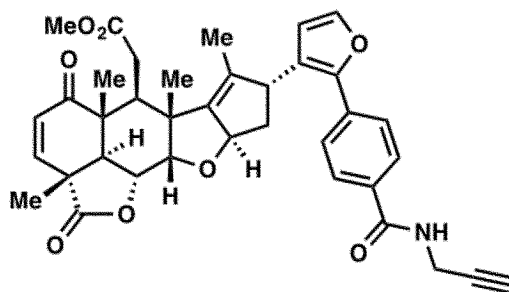
【数2】

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$

= +4.8° (c 0.005 g/mL,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.01 (s, 1H), 7.92 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.71 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.42 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 6.39 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 5.93 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.60 (app. tt,  $J=7.3, 1.7$  Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J=12.5, 3.6$  Hz, 1H), 4.32 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 4.17–4.13 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (dd,  $J=16.4, 5.5$  Hz, 1H), 3.20 (d,  $J=12.5$  Hz, 1H), 2.78 (dd,  $J=5.5, 5.5$  Hz, 1H), 2.41 (dd,  $J=16.4, 5.5$  Hz, 1H), 2.31–2.27 (m, 2H), 1.69 (d,  $J=1.7$  Hz, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.25 (s,

3H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.8, 191.7, 175.0, 173.2, 149.8, 147.9, 146.3, 143.1, 137.0, 136.1, 134.8, 131.1, 130.3, 126.1, 126.0, 112.6, 88.4, 83.3, 73.4, 52.1, 50.8, 50.0, 47.9, 45.5, 43.8, 41.3, 32.5, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4; IR (薄膜、 $\text{cm}^{-1}$ ) 2977, 2935, 2873, 1782, 1733, 1702, 1677, 1608, 1438, 1393, 1372; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_8\text{Na}]^+$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ の場合) :  $m/z$  593.2146、実測値 : 593.2154.

【化253】



【0679】

ニンボリドアルキンプローブS I-2 : i. 反応管 (Fisher Scientific、 $13 \times 100\text{mm}$ ) に、攪拌棒、アルデヒド2 (7.0mg、0.012mmol、1当量)、および  $t\text{-BuOH}$  と 2-メチル-2-ブテンの混合物 (0.6mL、3 : 5 v/v) を入れた。 $\text{H}_2\text{O}$  (0.2mL) 中の  $\text{NaClO}_2$  (3.3mg、3当量) および  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (13.2mg、9当量) の溶液を一度に加え、得られた混合物を室温で6時間攪拌した。TLC ( $\text{EtOAc}$  : ヘキサン = 2 : 1) によって判断されるように反応が完了した後、混合物を  $\text{EtOAc}$  (10mL) および飽和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液 (10mL) で希釈し、水相を  $\text{EtOAc}$  (10mL  $\times$  2) で抽出した。合わせた有機層をブライン (20mL) で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をさらに精製することなく直接使用した。

【0680】

ii. 攪拌棒、粗製3 (0.012mmolを想定)、および HATU (13.7mg、0.036mmol、3当量) を入れた反応管 (Fisher Scientific、 $13 \times 100\text{mm}$ ) に、DMF (0.1mL) 中の DIPEA (6.4  $\mu\text{L}$ 、0.036mmol、3当量) の溶液を加えた。得られた混合物を  $0^\circ\text{C}$  に冷却し、10分間攪拌した。次に、DMF (0.2mL) 中のプロパルギルアミン (1.6  $\mu\text{L}$ 、0.024mmol、2当量) の溶液を加え、反応混合物をさらに  $0 \sim 4^\circ\text{C}$  で12時間攪拌した。TLC ( $\text{EtOAc}$  : ヘキサン = 2 : 1) によって判断されるように、反応が完了した後、混合物を  $\text{EtOAc}$  (10mL) および飽和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液 (10mL) で希釈し、水相を  $\text{EtOAc}$  (10mL  $\times$  2) で抽出した。合わせた有機層を、 $\text{H}_2\text{O}$  (20mL) およびブライン (20mL) で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  で乾燥し、真空中で濃縮した。得られた粗製物を分取TLC ( $\text{EtOAc}$  : ヘキサン = 2 : 1) によって精製して、白色固体としてS I-3 (3.5mg、2ステップで46%) を得た。

【数3】

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$$

$= +21.5^\circ$  (c 0.002 g/mL,  $\text{CHCl}_3$ ) ;  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.83 (d,  $J=8.2\text{ Hz}$ , 2H), 7.61 (d,  $J=8.2$

10

20

30

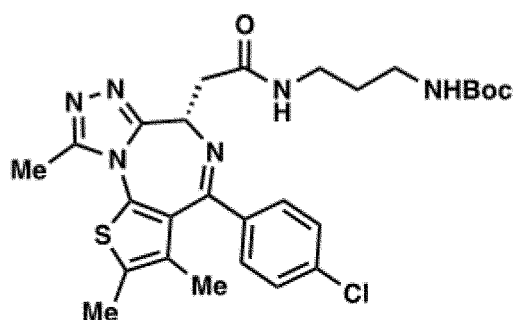
40

50



$^1\text{H}$  NMR ( $400\text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.39 (d,  $J=1.8\text{ Hz}$ , 1H), 7.29 (d,  $J=9.7\text{ Hz}$ , 1H), 6.36 (d,  $J=1.8\text{ Hz}$ , 1H), 6.27 (t,  $J=5.2\text{ Hz}$ , 1H), 5.93 (d,  $J=9.7\text{ Hz}$ , 1H), 5.60 (app. t,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 1H), 4.64 (dd,  $J=12.6, 3.7\text{ Hz}$ , 1H), 4.31 (d,  $J=3.7\text{ Hz}$ , 1H), 4.28 (dd,  $J=5.2, 2.6\text{ Hz}$ , 2H), 4.11 (br d,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 1H), 3.68 (s, 3H), 3.25–3.18 (m, 2H), 2.78 (dd,  $J=5.5, 5.5\text{ Hz}$ , 1H), 2.40 (dd,  $J=16.4, 5.5\text{ Hz}$ , 1H), 2.32–2.24 (m, 3H), 1.67 (br s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.24 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $150\text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.8, 175.0, 173.2, 166.6, 149.8, 148.2, 146.1, 142.5, 136.3, 134.7, 132.1, 131.2, 127.6, 126.1, 124.8, 112.3, 88.5, 83.2, 79.6, 73.5, 72.2, 52.1, 50.8, 50.0, 48.0, 45.5, 43.8, 41.3, 41.3, 32.5, 30.0, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4; IR (薄膜,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3337, 2954, 2921, 2852, 1781, 1734, 1663, 1609; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{NO}_8\text{Na}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$  の場合) :  $m/z$  646.2417、実測値 646.2417。

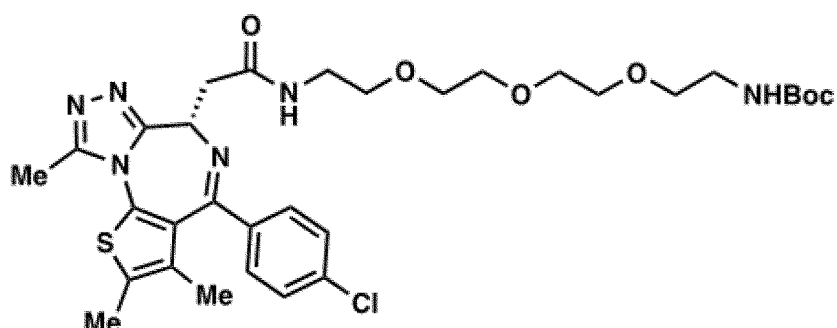
【化 2 5 4】



**【 0 6 8 1 】**

この化合物は、Warningおよび同僚によって報告された条件に従って調製した（J. Med. Chem., 2016, 59, 7801）。

【化 2 5 5】



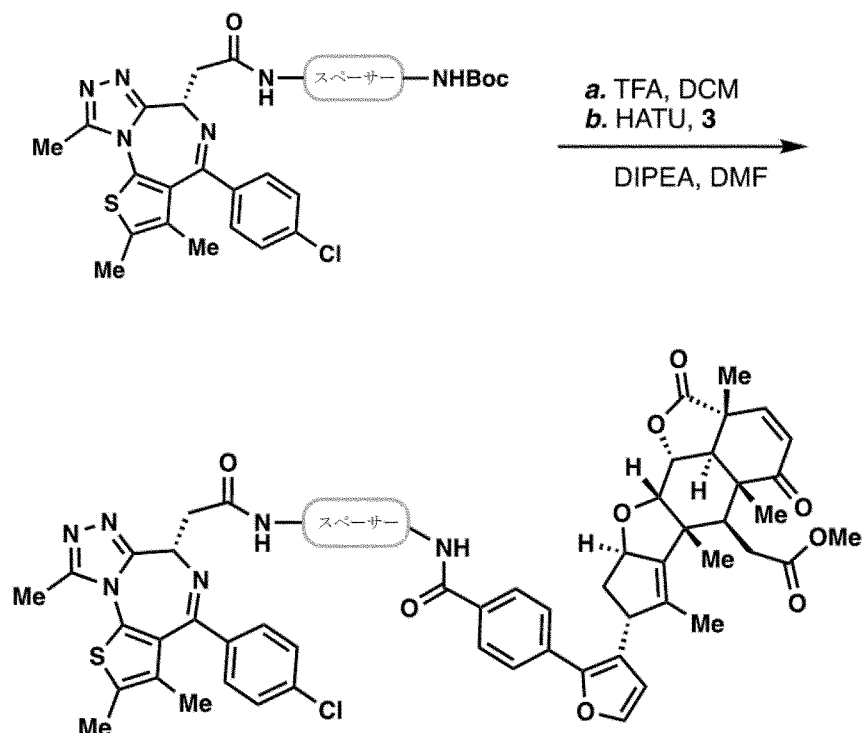
**【 0 6 8 2 】**

この化合物は、Bradnerおよび同僚によって報告された条件（2017年PCT国際特許出願第WO2017/091673A2号）に従って調製した。

【 0 6 8 3 】

二官能性分解剤 X H 1 および X H 2 の一般的な合成手順：

【化 2 5 6】



10

20

【0684】

i. 反応管 (Fisher Scientific、13×100mm) に、攪拌棒、Boc保護アミン (0.04mmol)、トリエチルシラン (12μL、0.075mmol)、およびDCM (0.4mL) を入れた。得られた混合物を0℃に冷却し、続いてTFA (0.12mL) を滴下して加えた。反応混合物を室温まで加温させ、さらに2時間攪拌した。TLC (MeOH:DCM=1:10) で判断して反応が完了した後、混合物をトルエン (2mL) で希釈し、真空中で濃縮した。得られた粗製物を高真空中で30分間乾燥し、さらに精製することなく次のステップで直接使用した。酸3は、前述の手順に従ってアルデヒド2から調製し、さらに精製することなく使用した。

30

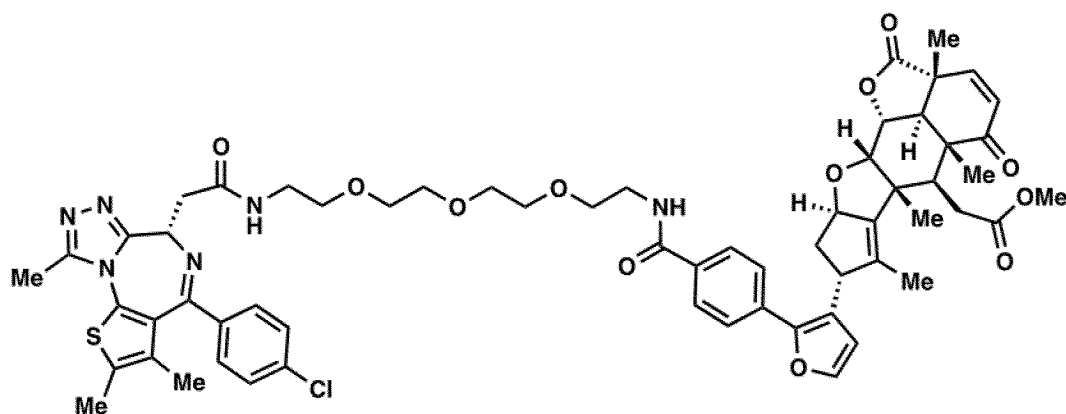
【0685】

ii. 反応管 (Fisher Scientific、13×100mm) に、攪拌棒、粗アミン (0.04mmolを想定)、未精製3 (0.02mmolを想定)、およびDMF (0.6mL) を入れた。得られた混合物を氷浴中で0℃に冷却し、続いてHATU (23.0mg、0.06mmol) およびDIPEA (11μL、0.06mmol) を加えた。反応混合物を4℃で16時間攪拌した。TLC (MeOH:DCM=1:10) によって判断されるように反応が完了した後、混合物をEtOAc (10mL) および飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (10mL) で希釈し、水相をEtOAc (2×10mL) で抽出した。合わせた有機層を、H<sub>2</sub>O (20mL) およびブライン (20mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、真空中で濃縮した。得られた粗物質を分取TLC (MeOH:DCM=1:15、2回展開) によって精製して、二官能性分解剤XH1またはXH2を得た。

40

50

【化 2 5 7】



10

【0 6 8 6】

白色フォーム X H 1 (S I - 2 からの収率 4 5 %) :

【数 4】

 $[\alpha]_D^{20}$ 

$= +48.7^\circ$  (c 0.0052 g/mL, CHCl<sub>3</sub>);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.87 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.40 (d,  $J=8.2$  Hz, 3H), 7.36 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.34–7.29 (m, 2H), 7.28 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 6.33 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 5.93 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.61–5.55 (m, 1H), 4.73 (app. t,  $J=7.1$  Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J=12.5, 3.7$  Hz, 1H), 4.30 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 4.12–4.08 (m, 1H), 3.75–3.64 (m, 15H), 3.64–3.53 (m, 3H), 3.51–3.40 (m, 3H), 3.25–3.16 (m, 2H), 2.77 (app. t,  $J=5.5$  Hz, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.42–2.36 (m, 4H), 2.26–2.20 (m, 2H), 1.68–1.65 (m, 3H), 1.65 (d,  $J=1.8$  Hz, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.24 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  200.6, 174.8, 173.0, 170.1, 167.0, 164.4, 155.3, 149.9, 149.6, 148.3, 146.1, 145.6, 142.1, 137.2, 136.3, 135.8, 133.8, 133.0, 131.6, 131.2, 131.0, 130.6, 130.0, 130.0, 128.7, 128.7, 127.6, 127.6, 125.7, 125.7, 124.1, 112.0, 88.3, 83.0, 73.3, 70.5, 70.5, 70.3, 70.2, 69.7, 69.6, 54.1, 51.9, 50.5, 49.7, 47.8, 45.3, 43.6, 41.1, 41.1, 39.7, 39.4, 38.5, 32.3, 18.6, 17.3, 15.1, 14.4, 13.1, 13.1, 11.6; IR (薄膜,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3339, 2923, 2866, 1781, 1734, 1659, 1540, 1487, 1437, 1419, 1300; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{61}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{Cl}_1\text{S}_1\text{Na}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$  の場合) :  $m/z$  1165.4118、実測値 1165.4142.

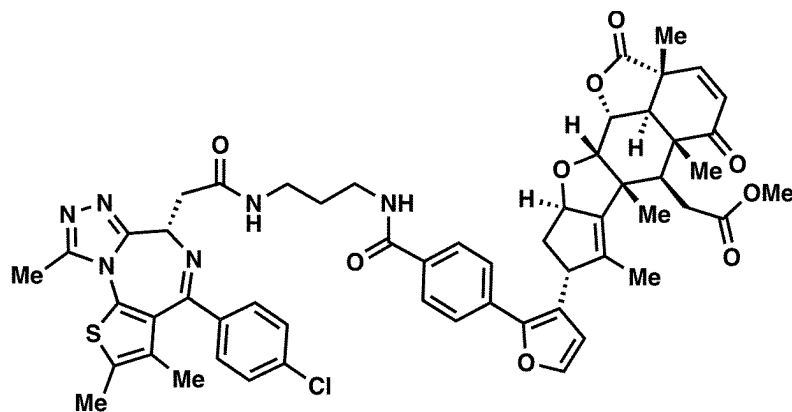
20

30

40

50

【化 2 5 8】



10

【0 6 8 7】

白色フォーム X H 2 (S I - 2 からの収率 4 2 %) :

【数 5】

 $[\alpha]_D^{20}$ 

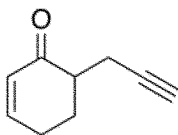
$= +18.6^\circ$  (c 0.004 g/mL,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  7.90 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.65–7.57 (m, 3H), 7.44–7.39 (m, 3H), 7.33 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 7.07 (t,  $J=6.5$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 5.89 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.52 (app. t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.66–4.59 (m, 2H), 4.26 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 4.12 (brd,  $J=7.6$  Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.52–3.45 (m, 2H), 3.44–3.34 (m, 4H), 3.20 (dd,  $J=16.4, 5.5$  Hz, 1H), 3.15 (d,  $J=12.5$  Hz, 1H), 2.74 (app. t,  $J=5.5$  Hz, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.45–2.37 (m, 4H), 2.25–2.21 (m, 2H), 1.75–1.70 (m, 2H), 1.65 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  201.2, 175.6, 173.5, 171.9, 166.7, 164.5, 156.1, 150.5, 149.9, 148.8, 146.3, 142.5, 137.1, 137.0, 136.6, 134.2, 133.7, 132.7, 131.6, 131.3, 131.2, 130.8, 130.3, 130.3, 129.0, 129.0, 127.8, 127.8, 126.2, 126.2, 124.8, 112.6, 88.6, 83.4, 73.9, 54.9, 52.1, 51.0, 50.2, 48.2, 45.8, 44.1, 41.6, 41.5, 39.7, 36.5, 36.2, 32.7, 29.9, 18.8, 17.5, 15.4, 14.6, 13.4, 13.3, 12.0; IR (薄膜、 $\text{cm}^{-1}$ ) 3308, 3023, 2930, 2867, 1782, 1734, 1654, 1540, 1488, 1437, 1301; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{56}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_9\text{S}]^+$  (M+H) $^+$  の場合) :  $m/z$  1025.3669、実測値 1025.3669.

20

30

40

【化 2 5 9】



【0 6 8 8】

50

JNS27の合成および特徴付け。JNS27. 窒素雰囲気下、 $-78^{\circ}\text{C}$ でリチウムジイソプロピルアミド(6 mL、1.2当量)の攪拌溶液に、5 mLのTHF中のクリクロヘキセノン(0.48 mL、1当量)の溶液を滴下した。45分後、5 mLのTHF中の3-ブロモ-1-(トリメチルシリル)-プロピン(0.85 mL、2.4当量)の溶液を徐々に加えた後、反応を一晩室温に戻した。反応を飽和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ でクエンチした(20 mL)。混合物をEtOAc(20 mL $\times$ 3)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、濃縮した。シリカゲルでの残留物のフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン中の10~20%のEtOAc)により、25.4%の収率(261 mg)でTMS-アルキンが得られた。 $\text{N}_2$ 下で、5 mLのTHF中のTMS-アルキン(261 mg、1当量)の溶液に、TBAF(0.44 mL、1当量)を加えた。室温で4時間攪拌した後、飽和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ (15 mL)を加えることにより反応をクエンチした。混合物をEtOAc(15 mL $\times$ 3)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、濃縮した。シリカゲルでの残留物のフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン中0~20%のEtOAc)により、JNS-27を淡黄色ワックスとして81%の収率(168 mg、2ステップで20.6%)で得た。 $^1\text{H}$  NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.99 (m, 1H), 6.03 (dt,  $J=10.02$ , 1.97 Hz, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.48 (m, 3H), 2.33 (m, 2H), 1.98 (t,  $J=2.68$ , 1H), 1.88 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.30, 129.34, 45.74, 27.68, 25.78, 20.27; HRMS(ESI) 計算値( $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ONa}]^+$  (M+N) $^+$ の場合):  $m/z$  134.0732、実測値134.0728。

【0689】

一般的な合成方法化学薬品および試薬を主要な商業的供給業者から購入し、さらに精製することなく使用した。別途記述されない限り、反応を、窒素雰囲気下で実施した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを、EMDまたはSigma Aldrichシリカゲル60(230~400メッシュ)を使用して実施した。プロトンおよび炭素核磁気共鳴( $^1\text{H}$  NMRおよび $^{13}\text{C}$  NMR)データを、the University of California, BerkeleyのBruker AVB400、AVQ400、またはAV600分光計で取得した。高分解能質量スペクトルを、ポジティブまたはネガティブエレクトロスプレーイオン化(+ESIまたは-ESI)を使用して、the University of California, BerkeleyのQB3質量分析施設から取得した。収量は、1回の実行として報告される。

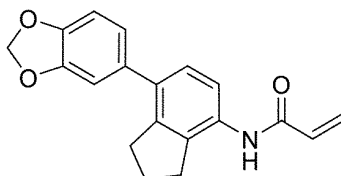
【0690】

一般的手順A。アミン(1当量)をDCM(5 mL/mmole)中に溶解し、 $0^{\circ}\text{C}$ に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル(1.2当量)、続いて、トリエチルアミン(1.2当量)を加えた。溶液を室温に加温させ、一晩攪拌した。その後、溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(および必要に応じて再結晶)により精製して、対応するアクリルアミドを得た。

【0691】

一般的手順B。アミン(1当量)をDCM(5 mL/mmole)中に溶解し、 $0^{\circ}\text{C}$ に冷却した。この溶液に、塩化クロロアセチル(1.2当量)、続いて、トリエチルアミン(1.2当量)を加えた。溶液を室温に加温させ、一晩攪拌した。その後、溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(および必要に応じて再結晶)により精製して、対応するクロロアセトアミドを得た。

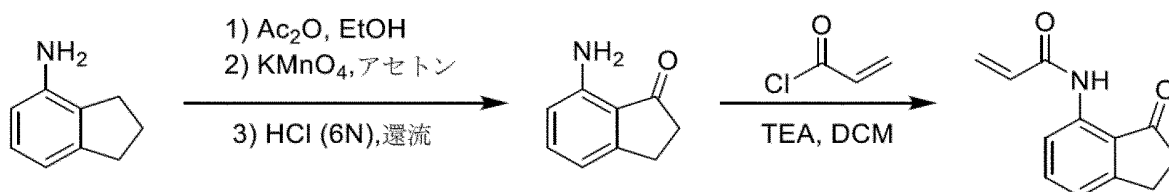
【化260】



## 【0692】

N-(7-(ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-78)。ジオキサンと水の混合物 (4:1 ジオキサン:水、2.1 mL) 中の N-(7-ブromo-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-65、55 mg、0.2 mmol) の溶液に、窒素雰囲気下で、3,4-(メチレンジオキシ)フェニルボロン酸 (70 mg、0.4 mmol)、炭酸カリウム (74 mg、0.5 mmol)、およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) (24 mg、10 mol%) を連続して加えた。反応混合物を加熱還流し、一晩攪拌した。反応物を水 (20 mL) で希釈し、DCM (3×20 mL) で抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、蒸発させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 0%~25% の酢酸エチル) によって精製して、7 mg の白色固体を得た (11% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.93 (d, J=7.0 Hz, 1H), 7.18 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.86 (t, J=8.1 Hz, 2H), 6.45 (d, J=16.8 Hz, 1H), 6.30 (dd, J=10.3, 16.8 Hz, 1H), 5.79 (d, J=10.2 Hz, 1H), 3.00 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.88 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.10 (五重項, 7.3 Hz, 2H)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 147.7, 146.7, 142.84, 142.81, 135.2, 134.9, 132.8, 131.3, 127.9, 127.8, 122.1, 119.8, 109.2, 108.3, 101.2, 36.8, 33.5, 30.5, 25.4。HRMS (-ESI): 計算値: 306.1136 (C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>)。観測値: 306.1130。

## 【化261】



## 【0693】

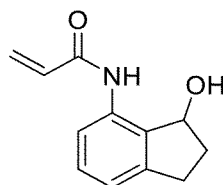
N-(3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-129)。0℃でエタノール (20 mL) 中の 4-アミノインダン (1.0 g、7.5 mmol) の溶液に無水酢酸 (1.4 mL、15.0 mmol) を加えた。溶液を室温に上げ、一晩攪拌した後、溶媒を蒸発させた。次に、残留物をアセトン (50 mL) に溶解し、それに 15% 硫酸マグネシウム水溶液 (6.75 mL の水中 1.2 g)、続いて過マンガン酸カリウム (3.4 g、17.0 mmol) を加え、得られた溶液を 24 時間攪拌した。反応物をセライトのパッドを通して濾過し、クロロホルム、次に水で溶出した。溶離液を分離し、追加のクロロホルムで水層を数回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させた。次に、残留物を 6N HCl 溶液 (20 mL) に溶解し、90℃に加熱した。5 時間攪拌した後、溶液を冷却し、少量の炭酸カリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させて、610 mg (3 ステップで 55%) の粗 7-アミノインダン-1-オンを得て、これをさらに精製することなく使用した。

## 【0694】

ジクロロメタン (15 mL) 中の 7-アミノインダン-1-オンの溶液に、塩化アクリロイル (0.39 mL、4.8 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.67 mL、4.8 mmol) を N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃に加えた。反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を 1M HCl 溶液 (2×) およびブラインで洗浄し、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 10%~20% の酢酸エチル) により精製して

、390mgの白色固体（47%収率、4ステップで合わせて26%）を得た。<sup>1</sup>H NMR（400MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 10.64（s，1H），8.45（d，J=8.2 Hz，1H），7.55（t，J=7.9 Hz，1H），7.12（d，J=7.6 Hz，1H），6.45（dd，J=1.0，17.0 Hz，1H），6.33（dd，J=10.1，17.0 Hz，1H），5.82（dd，J=1.0，10.1 Hz，1H），3.11（t，J=11.5 Hz，2H），2.74–2.71（m，2H）。<sup>13</sup>C NMR（100MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 209.3，164.4，155.9，138.7，137.0，131.7，128.0，123.1，120.8，116.9，36.5，25.5。HRMS（+ESI）：計算値：202.0863（C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>）。観測値：202.0860。  
【化262】

10

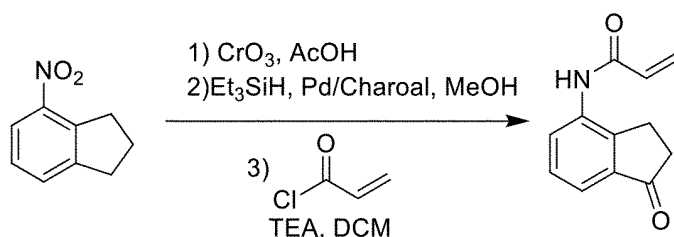


## 【0695】

N-（3-ヒドロキシ-2，3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）アクリルアミド（TRH1-133）。窒素雰囲気下、無水メタノール（7mL）中のN-（3-オキソ-2，3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）アクリルアミド（TRH 1-129、201mg、1.0mmol）の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム（46.1mg、1.2mmol）を加えた。30分間攪拌した後、反応物を飽和重炭酸ナトリウム溶液でクエンチし、DCMで3回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中30～50%の酢酸エチル）で精製して、190mgの生成物を白色固体として得た（94%収率）。<sup>1</sup>H NMR（400MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 8.93（s，1H），7.98（d，J=7.8 Hz，1H），7.19（t，J=7.9 Hz，1H），6.95（d，J=7.4 Hz，1H），6.29（d，J=16.8 Hz，1H），6.15（dd，J=10.2，16.9 Hz，1H），5.66（d，J=10.2 Hz，1H），5.32（q，J=6.9 Hz，1H），3.60（d，J=6.7 Hz，1H），2.96（ddd，J=2.4，9.0，15.7 Hz），2.73（五重項，J=8.1 Hz，1H），2.56–2.48（m，1H），1.96–1.86（m，1H）。<sup>13</sup>C NMR（100MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 164.1，143.7，135.6，132.8，131.6，129.5，127.3，121.0，118.5，76.2，36.0，29.8。HRMS（-ESI）：計算値：202.0874（C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>）。観測値：202.0874。  
【化263】

20

30



40

## 【0696】

N-（1-オキソ-2，3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）アクリルアミド（TRH1-134）。酢酸（250mL）中の4-ニトロインダン（5.38g、33mmol）の溶液に、三酸化クロム（8.95g、90mmol）をゆっくりと加えた。2

50

4時間撹拌した後、反応物を2M NaOHで中和し、酢酸エチルで5回抽出した。合わせた有機物を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、次に硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中10～20%の酢酸エチル）により精製して、1.26g（約7.1mmol）の4-ニトロインダノンを白色固体として得た。

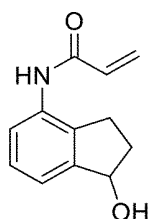
【0697】

この中間体を、窒素バルーンの雰囲気下で無水メタノール（21mL）に溶解した活性炭（125mg、10重量%）上のパラジウムと組み合わせた。反応物を室温の水浴の冷却下で撹拌しながら、トリエチルシラン（11.3mL、71mmol）を、添加漏斗によって10分間にわたってゆっくりと加えた。さらに20分間撹拌した後、反応混合物をセライトのパッドを通して濾過し、続いて濃縮して、粗4-アミノインダノンを得、これをさらに精製することなく使用した。

【0698】

次に、この最終中間体をN<sub>2</sub>雰囲気下でDCM（21mL）に溶解し、0℃に冷却した後、塩化アクリロイル（0.77mL、9.5mmol）およびトリエチルアミン（1.19mL、8.5mmol）をゆっくりと加えた。一晩撹拌しながら反応物を室温まで加温させ、その時点で反応物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中30～50%の酢酸エチル）により精製して、989mgの白色固体を得た（3ステップで15%収率）。<sup>1</sup>H NMR（400MHz, CDCl<sub>3</sub>）：δ 8.20（d, J=5.8 Hz, 1H）, 7.63（s, 1H）, 7.56（d, J=7.5 Hz, 1H）, 7.39（t, J=7.7 Hz, 1H）, 6.48（d, J=16.7 Hz, 1H）, 6.37（dd, J=10.0 Hz, 16.8 Hz, 1H）, 5.83（d, J=10.1 Hz, 1H）, 3.04（t, J=5.6 Hz, 2H）, 2.70（t, J=5.7 Hz, 2H）。<sup>13</sup>C NMR（100MHz, CDCl<sub>3</sub>）：δ 206.3, 163.9, 146.0, 138.0, 135.4, 130.7, 128.8, 128.7, 127.6, 120.4, 36.1, 23.4。HRMS（-ESI）：計算値：200.0717（C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>）。観測値：200.0715。

【化264】



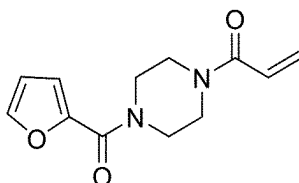
【0699】

N-（1-ヒドロキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）アクリルアミド（TRH1-135）。窒素雰囲気下、無水メタノール（50mL）中のN-（1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）アクリルアミド（TRH1-134、1.26g、6.25mmol）の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム（292.7mg、7.7mmol）を加えた。30分間撹拌した後、反応を水でクエンチし、メタノールを真空中で除去した。残留物をNaClで飽和させ、2：1のクロロホルム：メタノール溶液で5回抽出した。合わせた有機物を3オングストロームのモレキュラーシーブで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中40～70%酢酸エチル）により精製して、1.05gの生成物を白色固体として得た（83%収率）。<sup>1</sup>H NMR（400MHz, MeOD）：δ 7.50（dd, J=2.3, 6.3 Hz, 1H）, 7.25-7.20（m, 2H）, 6.51（dd, J=10.2, 17.0 Hz, 1H）, 6.35（dd, J=1.7, 17.0 Hz, 1H）, 5.77（dd, J=1.7, 10.2 Hz, 1H）, 5.17（t, J=6.3 Hz, 1



H), 2.97 (ddd,  $J=4.5, 8.6, 16.2$ , 1H), 2.74 (五重項,  $J=7.8$  Hz, 1H), 2.47–2.39 (m, 1H), 1.95–1.86 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, MeOD):  $\delta$  166.3, 148.0, 137.8, 134.8, 132.1, 128.3, 127.9, 124.0, 122.7, 76.9, 36.1, 28.6. HRMS (–ESI): 計算値: 202.0874 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ ). 観測値: 202.0872.

【化265】



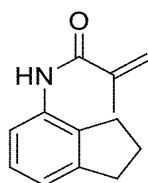
10

【0700】

1-(4-(フラン-2-カルボニル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (TRH1-145)。ジクロロメタン (10mL) 中の1-(2-フロイル)ピペラジン (362mg、2.0mmol) 溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34mL、2.4mmol) を $\text{N}_2$ 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、24時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中の70%から100%酢酸エチル) によって精製して、446mgの黄色固体を得た (95%収率)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.53 (m, 1H), 7.06 (dd,  $J=0.7, 3.5$  Hz, 1H), 6.61 (dd,  $J=10.5, 16.8$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J=1.8, 3.5$  Hz, 1H), 6.33 (dd,  $J=1.9, 16.8$  Hz, 1H), 5.75 (dd,  $J=1.9, 10.5$  Hz, 1H), 3.84–3.67 (m, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.5, 159.1, 147.5, 144.0, 128.5, 127.1, 117.0, 111.5, 45.6, 41.9. HRMS (+ESI): 計算値: 235.1077 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$ ). 観測値: 235.1075.

20

【化266】



【0701】

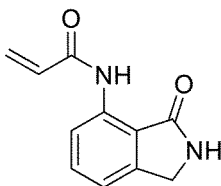
N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)メタクリルアミド (TRH1-149)。ジクロロメタン (10mL) 中の4-アミノインダン (0.24mL、2.0mmol) 溶液に、 $\text{N}_2$ 雰囲気下、0℃で塩化メタクリロイル (0.23mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34mL、2.4mmol) を加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、3.5時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中35%~40%の酢酸エチル) によって精製して、378mgのオフホワイト色固体を得た (94%収率)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.72 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t,  $J=7.7$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 2.93 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.79 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.12–2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$

30

40

50

NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  166.3, 145.1, 140.6, 134.5, 133.7, 127.0, 120.7, 119.8, 118.9, 33.1, 29.9, 24.7, 18.6. HRMS (+ESI) : 計算値 : 202.1226 (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO). 観測値 : 202.1224.  
【化267】

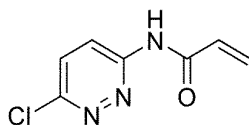


10

## 【0702】

N-(3-オキソイソインドリン-4-イル) アクリルアミド (TRH1-152)。ジクロロメタン (4 mL) 中の7-アミノイソインドリン-1-オン (99 mg、0.67 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.07 mL、0.8 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.11 mL、0.8 mmol) をN<sub>2</sub>雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中50~60%酢酸エチル) によって精製して、58 mgの白色固体を得た (43%収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  10.50 (s, 1H), 8.58 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.55 (t, J=7.9 Hz, 1H), 7.15 (d, J=7.5 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.46 (dd, J=1.3, 17.0 Hz, 1H), 6.36 (dd, J=10.0, 17.0 Hz, 1H), 5.81 (dd, J=1.3, 10.0 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  172.9, 164.2, 143.9, 138.2, 133.8, 131.8, 127.8, 118.0, 117.7, 117.6, 45.6. HRMS (+ESI) : 計算値 : 203.0815 (C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 観測値 : 203.0814.  
【化268】

20



30

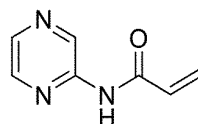
## 【0703】

N-(6-クロロピリダジン-3-イル) アクリルアミド (TRH1-155)。ジクロロメタン (10 mL) 中の3-アミノ-6-クロロピリダジン (261 mg、2.0 mmol) 溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を、N<sub>2</sub>雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中の40%から50%酢酸エチル) によって精製して、23 mgの淡黄色固体を得た (6%収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  10.06 (s, 1H), 8.70 (d, J=9.4 Hz, 1H), 7.57 (d, J=9.4 Hz, 1H), 6.73 (dd, J=10.2, 16.8 Hz, 1H), 6.56 (dd, J=1.2, 16.8, 1H), 5.94 (dd, J=1.2, 10.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  164.8, 155.2, 152.3, 130.7, 130.4, 130.3, 122.0. HRMS (+ESI) : 計算値 : 182.0127 (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>OCl). 観測値 : 182.0126.

40

50

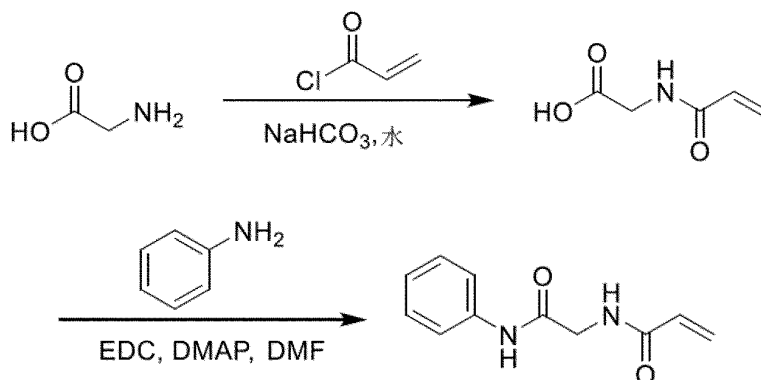
## 【化 2 6 9】



## 【0 7 0 4】

N-(ピラジン-2-イル) アクリルアミド (T R H 1-1 5 6)。ジクロロメタン (10 mL) 中のアミノピラジン (192 mg、2.0 mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20 mL、2.4 mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34 mL、2.4 mmol) を、N<sub>2</sub> 雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中50%~70%の酢酸エチル) によって精製して、22 mgの白色固体を得た (7%収率)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 9.65 (d, J=1.3 Hz, 1H), 8.38 (d, J=2.5 Hz, 1H), 8.27 (dd, J=1.6, 2.5 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.54 (dd, J=0.8, 16.9 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=10.3, 16.9 Hz, 1H), 5.90 (dd, J=0.8, 10.3 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.5, 148.2, 142.2, 140.6, 137.4, 130.2, 129.8. HRMS (+ESI) : 計算値 : 150.0662 (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O)。観測値 : 150.0660.

## 【化 2 7 0】

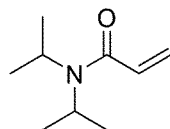


## 【0 7 0 5】

N-(2-オキソ-2-(フェニルアミノ)エチル)アクリルアミド (T R H 1-1 6 0)。水 (30 mL) 中のグリシン (1.50 g、20.0 mmol) および重炭酸ナトリウム (1.70 g、20.2 mmol) の溶液に、0℃で、塩化アクリロイル (2.45 mL、30.2 mmol) をゆっくりと加えた。3.5時間攪拌した後、反応物を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮して油を得た。油をヘキサンで処理すると、白色固体が崩壊し、これを重力濾過によって収集して、124 mgの粗アクリロイルグリシンを得て、そのうち58 mg (粗物質の47%) をさらに精製することなく直ちに使用した。この固体 (約0.45 mmol) を DMF (2.5 mL) に溶解し、DMF (2.5 mL) 中のN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジミド塩酸塩 (104 mg、0.54 mmol) および4-ジメチルアミノピリジン (68 mg、0.56 mmol) の溶液、続いてアニリン (0.050 mL、0.54 mmol) を加えた。溶液を一晩攪拌し、酢酸エチルで希釈し、重炭酸ナトリウムの飽和溶液およびブラインの両方で洗浄した。次に、有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30~60%の酢酸エチル) によって精製して、19 mgの表題化合物を白色固

体として得た（２ステップで１％収率）。<sup>1</sup>H NMR（４００MHz，MeOD）：δ 7.56－7.53（m，2H），7.30（t，J＝8.0 Hz，2H），7.08（t，J＝7.4 Hz，1H），6.35（dd，J＝9.9，17.1 Hz，1H），6.26（dd，J＝2.0，17.1 Hz，1H），5.71（dd，J＝2.0，9.9 Hz，1H），4.08（s，2H）。<sup>13</sup>C NMR（１００MHz，MeOD）：δ 169.4，168.6，139.5，131.7，129.8，127.2，125.3，121.2，44.0。HRMS（－ESI）：計算値：203.0826（C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）。観測値：203.0825。

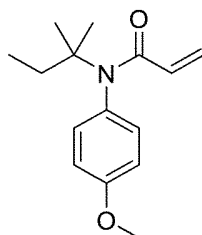
【化２７１】



【０７０６】

N、N-ジイソプロピルアクリルアミド（TRH1-167）。ジクロロメタン（10 mL）中のジイソプロピルアミン（0.42 mL、3.0 mmol）溶液に、塩化アクリロイル（0.29 mL、3.6 mmol）、続いてトリエチルアミン（0.50 mL、3.6 mmol）を、N<sub>2</sub>雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、19時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中0％～30％の酢酸エチル）によって精製して、392 mgの淡黄色油を得た（84％収率）。<sup>1</sup>H NMR（４００MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 6.35（dd，J＝10.6，16.8 Hz，1H），5.98（dd，J＝1.7，16.8 Hz，1H），5.36（dd，J＝1.7，10.6 Hz，1H），3.85（s，1H），3.56（s，1H），1.18（s，6H），1.06（s，6H）。<sup>13</sup>C NMR（１００MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 165.9，130.5，125.3，47.9，45.4，21.1，20.3。HRMS（＋ESI）：計算値：178.1202（C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NONa）。観測値：178.1201。

【化２７２】

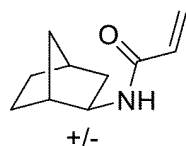


【０７０７】

N-（４-メトキシフェニル）-N-（tert-ペンチル）アクリルアミド（TRH1-170）。ジクロロメタン（5 mL）中の４-メトキシ-N-（tert-ペンチル）アニリン（94 mg、0.49 mmol）の溶液に、塩化アクリロイル（0.05 mL、0.6 mmol）、続いてトリエチルアミン（0.09 mL、0.6 mmol）を、N<sub>2</sub>雰囲気下、0℃で加えた。15分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、18時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中0％～20％の酢酸エチル）によって精製して、82 mgの淡黄色油を得た（68％収率）。<sup>1</sup>H NMR（４００MHz，CDCl<sub>3</sub>）：δ 6.99（d，J＝8.7 Hz，2H），6.85（d，J＝8.7 Hz，2H），6.17（dd，J＝1.9，16.7 Hz，1H），5.76（dd，J＝10.3，16.7 Hz，1H），5.28（dd

,  $J=1.9, 10.3$  Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (q,  $J=7.5$  Hz, 2H), 1.20 (s, 6H), 0.91 (t,  $J=7.5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.3, 159.0, 134.3, 131.49, 131.45, 125.6, 114.1, 61.7, 55.5, 32.0, 27.4, 9.4. HRMS (+ESI): 計算値: 247.1572 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ ). 観測値: 247.1577.

【化273】



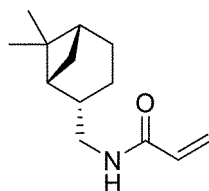
10

【0708】

N-(エキソ-ノルボルン-2-イル) アクリルアミド (TRH1-176)。ジクロロメタン (10mL) 中のエキソ-2-アミノノルボルナン (0.24mL、2mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33mL、2.4mmol) を、 $\text{N}_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、18時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30%の酢酸エチル) によって精製して、271mgの白色固体を得た (82%収率)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.42 (s, 1H), 6.25 (dd,  $J=2.3, 17.0$  Hz, 1H), 6.18 (dd,  $J=9.5, 17.0$  Hz, 1H), 5.58 (dd,  $J=2.3, 9.5$  Hz, 1H), 3.8-3.77 (m, 1H), 2.27-2.24 (m, 2H), 1.78 (dddd,  $J=2.1, 8.1, 13.0$  Hz, 1H), 1.55-1.38 (m, 3H), 1.30-1.10 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.0, 131.4, 125.8, 52.9, 42.4, 40.0, 35.7, 35.6, 28.2, 26.6. HRMS (+EI): 計算値: 165.1154 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$ ). 観測値: 165.1155.

20

【化274】



【0709】

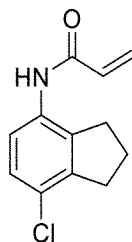
N-(((1R, 2S, 5R)-6, 6-ジメチルビシクロ[3.1.1]ヘプタン-2-イル)メチル) アクリルアミド (TRH1-178)。ジクロロメタン (10mL) 中の(-)-シス-ミルタニルアミン (0.34mL、2mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33mL、2.4mmol) を、 $\text{N}_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、21時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、得られた粗製物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中20~30%の酢酸エチル) によって精製して、369mgの白色固体を得た (89%収率)。 $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.26 (dd,  $J=1.5, 17.0$  Hz, 1H), 6.11 (dd,  $J=10.3, 17.0$  Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.61 (dd,  $J=1.5, 10.3$  Hz, 1H), 3.39-3.29 (m, 2H), 2.38-2.34 (m, 1H), 2.26-2.

40

50

2.1 (m, 1H), 1.98–1.90 (m, 4H), 1.88–1.83 (m, 1H), 1.53–1.47 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.89 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.7, 131.2, 126.2, 45.3, 43.9, 41.5, 38.8, 33.3, 28.1, 26.1, 23.3, 19.9. HRMS (–ESI): 計算値: 206.1550 ( $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$ ). 観測値: 206.1551.

【化275】

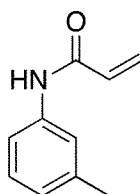


10

【0710】

N-(7-chloro-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)acrylamide (YP1-1). PEG400 (5.2 mL) 中の N-(2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)acrylamide (187 mg, 1.0 mmol) の溶液を 0℃ に冷却した。この溶液に、N-クロロスクシンイミド (140 mg, 1.0 mmol) を加えた。溶液を 30 分後に室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液を酢酸エチルで希釈し、ブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 30% の酢酸エチル) により精製した。得られた異性体の混合物を再結晶により分離し、白色固体として、22% の収率で、生成物 (47 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.78 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.15–7.11 (m, 2H), 6.42 (dd,  $J=1.4, 16.8$  Hz, 1H), 6.26 (dd,  $J=10.2, 16.8$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J=1.4, 10.2$  Hz, 1H), 2.98 (t,  $J=7.6$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.12 (五重項,  $J=7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.4, 143.1, 136.1, 132.2, 131.0, 128.0, 127.2, 126.7, 120.9, 32.7, 31.1, 24.0. HRMS (+ESI): 計算値: 220.0535 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}$ ). 観測値: 220.0533.

【化276】



40

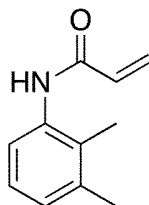
【0711】

N-(m-トリル)acrylamide (YP1-16). DCM (10 mL) 中の o-トリルイジン (107 mg, 1.0 mmol) の溶液を、0℃ に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg, 1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg, 1.2 mmol) を加えた。溶液を 40 分後に室温に加温させ、一晚攪拌した。溶液をブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20～40% の酢酸エチル) によって精製して、白色固体として、収率 86% で、生成物 (139 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.82 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.

50

2.1–7.17 (m, 2H), 7.10–7.06 (m, 1H), 6.43–6.38 (m, 1H), 6.29 (dd,  $J=10.2, 17.1$  Hz, 1H), 5.75–5.72 (m, 1H), 2.25 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  135.5, 131.2, 130.5, 127.5, 126.8, 125.5, 123.4, 17.8. HRMS (+ESI): 計算値: 162.0913 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}$ ). 観測値: 162.0912.

【化277】



10

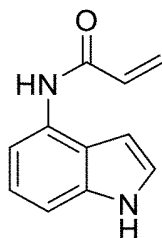
【0712】

N-(2,3-ジメチルフェニル)アクリルアミド (YP1-18)。DCM (10 mL) 中の2,3-ジメチルアニリン (121 mg, 1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg, 1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg, 1.2 mmol) を加えた。溶液を29分後に室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中30～40%の酢酸エチル) によって精製して、白色固体として、収率88%で、生成物 (154 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.49 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.11–7.07 (m, 1H), 7.01 (d,  $J=7.7$ , 1H), 6.40 (d,  $J=17.1$ , 1H), 6.30 (dd,  $J=7.3, 17.1$  Hz, 1H), 5.74 (d,  $J=10.1$  Hz, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.13 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  135.1, 131.2, 127.6, 127.3, 125.9, 122.3, 20.6, 13.9. HRMS (+ESI): 計算値: 176.1070 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}$ ). 観測値: 176.1068.

20

30

【化278】



【0713】

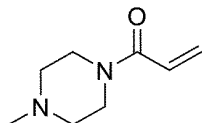
N-(1H-インドール-4-イル)アクリルアミド (YP1-19)。DCM (5 mL) およびDMF (5 mL) 中の4-アミノインドール (132 mg, 1 mmol) の溶液を0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg, 1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg, 1.2 mmol) を加えた。溶液を26分後に室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物を塩基性アルミナクロマトグラフィー (ヘキサン中60～75%の酢酸エチル) によって精製して、白灰色固体として、収率30%で、生成物 (56 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOD):  $\delta$  7.51 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 7.24–7.22 (m, 2H), 7.08 (t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 6.64 (dd,  $J=10.1, 16.7$  Hz, 2H), 6.38 (dd,  $J=1$

40

50

. 7, 16.9 Hz, 1H), 5.78 (dd,  $J=1.7, 10.3$  Hz, 1H), 4.6 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOD):  $\delta$  165.0, 137.2, 131.1, 129.2, 126.0, 123.8, 121.5, 120.9, 112.2, 108.4, 98.5. HRMS (+ESI): 計算値: 187.0866 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$ ). 観測値: 187.0865.

【化279】



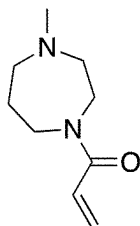
10

【0714】

1-(4-メチルピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-22)。DCM (10 mL) 中の1-メチルピペラジン (100 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を30分後に室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中85%~100%の酢酸エチル) によって精製して、黄色ゲルとして、収率29%で、生成物 (44 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.56 (dd,  $J=10.6, 16.9$  Hz, 1H), 6.29 (dd,  $J=2.0, 16.8$  Hz, 1H), 5.69 (dd,  $J=2.0, 10.6$  Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.42 (t,  $J=5.1$  Hz, 4H), 2.32 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.4, 127.8, 127.5, 55.2, 54.6, 46.0, 45.7, 41.9. HRMS (+ESI): 計算値: 155.1179 ( $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$ ). 観測値: 155.1178.

20

【化280】



30

【0715】

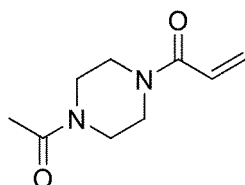
1-(4-メチル-1,4-ジアゼパム-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-23)。DCM (10 mL) 中の1-メチルホモピペラジン (114 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を32分後に室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中1%~10%のメタノール) によって精製して、黄色油として、収率51%で、生成物 (58 mg) を得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.61-6.53 (m, 1H), 6.35-6.29 (m, 1H), 5.70-5.66 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.69 (t,  $J=6.4$  Hz, 1H), 3.65-3.61 (m, 2H), 2.66-2.63 (m, 2H), 2.59-2.54 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.94 (五重項,  $J=6.2$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.4, 166.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 59.1, 58.0, 57.1, 56.8, 47.4, 47.1, 46.7, 46.6, 45.3, 44.8, 28.1, 26.9. HRMS (+

40

50



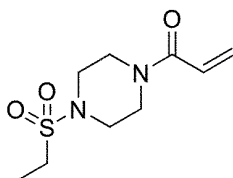
ESI) : 計算値 : 169.1335 (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O)。観測値 : 169.1333。  
【化281】



【0716】

1-(4-アセチルピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-24)。DCM (10 mL) 中の1-アセチルピペラジン (128 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を23分後に室温に加温させ、2時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中0%~10%のメタノール) によって精製して、黄色油として、収率18%で、生成物 (40 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 6.57 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=1.8, 16.8 Hz, 1H), 5.75 (dd, J=1.9, 10.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.66-3.64 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.51-3.49 (m, 2H), 2.13 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 165.6, 128.7, 127.0, 41.9, 41.4, 21.4. HRMS (+ESI) : 計算値 : 183.1128 (C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。観測値 : 183.1126。

【化282】



【0717】

1-(4-(エチルスルホニル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-25)。DCM (10 mL) 中の1-(エタンスルホニル)ピペラジン (178 mg、1.0 mmol) の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) を加え、続いて、トリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を加えた。溶液を27分後に室温に加温させ、2時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中1%~10%のメタノール) によって精製して、白黄色固体として、収率70%で、生成物 (163 mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 6.57 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.32 (dd, J=1.9, 16.8 Hz, 1H), 5.76 (dd, J=1.8, 10.5 Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.32 (t, J=5.2 Hz, 4H), 2.98 (q, J=7.5 Hz, 2H), 1.37 (t, J=7.4, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 165.5, 128.8, 127.0, 77.4, 45.9, 45.6, 44.2, 41.9, 7.8. HRMS (+ESI) : 計算値 : 233.0954 (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>1</sub>)。観測値 : 233.0953。

10

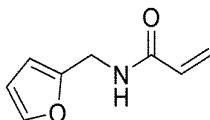
20

30

40

50

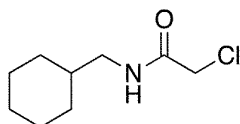
## 【化 2 8 3】



## 【0 7 1 8】

N-(フラン-2-イルメチル) アクリルアミド (Y P 1-2 6)。DCM (1 0 m L) 中のフルフリルアミン (9 7 m g、1. 0 m m o l) の溶液を、0 °C に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル (1 0 9 m g、1. 2 m m o l) を加え、続いて、トリエチルアミン (1 2 1 m g、1. 2 m m o l) を加えた。溶液を 1 7 分後に室温に加温させ、2. 5 時間攪拌した。溶液をブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 3 5 ~ 7 0 % の酢酸エチル) によって精製して、白色固体として、収率 8 6 % で、生成物 (1 3 2 m g) を得た。<sup>1</sup> H NMR (4 0 0 M H z, C D C l<sub>3</sub>) : δ 7. 3 3 (s, 1 H), 6. 6 0 (s, 1 H), 6. 3 1-6. 2 2 (m, 3 H), 6. 1 5 (dd, J=10. 1, 16. 9 H z, 1 H), 5. 6 3 (dd, J=1. 6, 10. 1 H z, 1 H), 4. 4 8 (d, J=5. 6 H z, 2 H). <sup>13</sup> C NMR (1 0 0 M H z, C D C l<sub>3</sub>) : δ 165. 5, 151. 2, 142. 2, 130. 6, 126. 8, 110. 5, 107. 5, 36. 5. HRMS (+ESI) : 計算値 : 152. 0706 (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>1</sub>)。観測値 : 152. 0706.

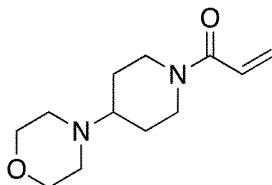
## 【化 2 8 4】



## 【0 7 1 9】

2-クロロ-N-(シクロヘキシルメチル) アセトアミド (Y P 1-3 1)。一般的手順 B に従って、シクロヘキサンメチルアミン (1 1 3 m g、1. 0 m m o l) から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー (ジクロロメタン中 1 0 0 % のジクロロメタン ~ 3 % のメタノール) の後、白色固体として、収率 6 0 % で、生成物 (1 1 2 m g) を得た。<sup>1</sup> H NMR (4 0 0 M H z, C D C l<sub>3</sub>) : δ 6. 7 0 (s, 1 H), 4. 0 6 (s, 2 H), 3. 1 5 (t, J=6. 4 7 H z, 2 H), 1. 7 7-1. 6 5 (m, 5 H), 1. 5 6-1. 4 6 (m, 1 H), 1. 3 0-1. 1 0 (m, 3 H), 1. 0 0-0. 9 0 (m, 2 H). <sup>13</sup> C NMR (1 0 0 M H z, C D C l<sub>3</sub>) : δ 165. 8, 58. 1, 46. 0, 42. 8, 37. 7, 30. 7, 26. 3, 25. 7, 18. 2. HRMS (+ESI) : 計算値 : 190. 0993 (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>ONCl)。観測値 : 190. 0992.

## 【化 2 8 5】

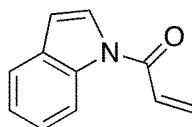


## 【0 7 2 0】

1-(4-モルホリノピペリジン-1-イル) プロプ-2-エン-1-オン (Y P 1-4 2)。一般的手順 A に従って、4-モルホリノピペリジン (3 3 6 m g、2. 0 m m o l) から開始して、シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 1 % のメタノールおよび

80%の酢酸エチル)の後、無色油として、収率58%で、生成物(259mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.42(dd, J=10.6, 16.8 Hz, 1H), 6.06(dd, J=2.0, 16.8 Hz, 1H), 5.49(dd, J=2.0, 10.6 Hz, 1H), 4.45(d, J=12.8 Hz, 1H), 3.86(d, J=12.8 Hz, 1H), 3.52(t, J=4.7 Hz, 4H), 2.90(t, J=12.8 Hz, 1H), 2.55-2.48(m, 1H), 2.37-2.35(m, 4H), 2.26(tt, J=3.7, 11.0 Hz, 1H), 1.72(d, J=12.8 Hz, 2H), 1.30-1.20(m, 2H). <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.0, 127.7, 127.3, 67.1, 61.6, 49.6, 44.9, 41.1, 28.9, 27.8. HRMS(+ESI): 計算値: 225.1598(C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 観測値: 225.1595.

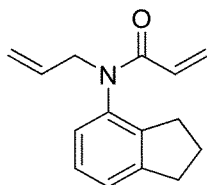
【化286】



【0721】

1-(1H-インドール-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン(YP1-44)。2-メチルテトラヒドロフラン(10mL)中のインドール(117mg、1.0mmol)の溶液を、0℃に冷却した。この溶液に、水素化ナトリウム(60mg、2.5mmol)を加えた。得られた中間体を一般的手順Aに供し、アルミナゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中10%~40%の酢酸エチル)の後、白色固体として、収率8%で、生成物(14mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.48-8.46(m, 1H), 7.82(d, J=3.9 Hz, 1H), 7.61-7.59(m, 1H), 7.36-7.32(m, 1H), 7.31-7.21(m, 2H), 6.73(dd, J=0.8, 3.8 Hz, 1H), 6.64(dd, J=1.7, 16.7 Hz, 1H), 6.09(dd, J=1.7, 10.5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 164.3, 135.7, 131.0, 130.9, 128.0, 125.0, 124.4, 123.6, 120.5, 116.2, 108.9. HRMS(+ESI): 計算値: 172.0757(C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>NO). 観測値: 172.0756.

【化287】

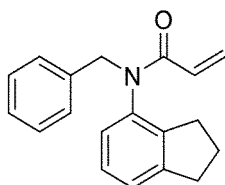


【0722】

N-アリル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド(IGA1-12)。テトラヒドロフラン(8mL)中の水素化ナトリウム(96mg、4.0mmol)の溶液を窒素雰囲気下に置いた。この溶液に、テトラヒドロフラン(2mL)中のN-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド(187mg、1.0mmol)を加えた。溶液を0℃に冷却し、攪拌した。30分後に3-ブロモプロプ-1-エン(484mg、4.0mmol)を加え、その後、溶液を室温まで加温させ、一晚攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中20%の酢酸エチル)によって精製して、黄色結晶性固体として、収率67%で、生成物(151mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400M

Hz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.06–7.18 (m, 2H), 6.80–6.88 (m, 1H), 6.26–6.37 (dd, J=16.8, 2.0 Hz, 1H), 5.76–5.96 (m, 2H), 5.38–5.48 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 4.98–5.08 (m, 2H), 4.40–4.52 (ddt, J=14.5, 6.3, 1.3 Hz, 1H), 4.00–4.11 (ddt, J=14.5, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 2.82–2.98 (m, 2H), 2.59–2.79 (m, 2H), 1.92–2.07 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 165.1, 146.5, 142.4, 137.9, 133.0, 128.4, 127.8, 127.48, 126.1, 124.3, 118.1, 51.6, 33.3, 30.9, 25.0. HRMS (+ESI) : 計算値 : 228.13 (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO)。観測値 : 228.1381.

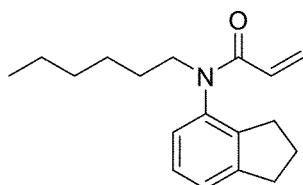
【化288】



【0723】

N-ベンジル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (IGA1-14)。テトラヒドロフラン (8mL) 中の水素化ナトリウム (96mg、4.0mmol) の溶液を窒素雰囲気下に置いた。この溶液に、テトラヒドロフラン (2mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (187mg、1.0mmol) を加えた。溶液を 0℃ に冷却し、攪拌した。30 分後に臭化ベンジル (476mg、4.0mmol) を加え、その後、溶液を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20% の酢酸エチル) によって精製して、橙色油として、収率 63% で、生成物 (173mg) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.10–7.35 (m, 7H), 6.74–6.85 (dd, J=7.8, 1.1 Hz, 1H), 6.40–6.55 (dd, J=16.8, 2.1 Hz, 1H), 5.93–6.08 (dd, J=16.8, 10.3 Hz, 1H), 5.49–5.62 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 4.78–5.10 (m, 2H), 2.85–3.02 (m, 2H), 2.52–2.67 (m, 1H), 2.22–2.37 (m, 1H), 1.83–2.01 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 146.4, 142.9, 137.7, 137.3, 129.3, 128.4, 128.3, 128.0, 127.5, 127.5, 126.0, 124.3, 52.3, 33.2, 30.6, 25.1. HRMS (+ESI) : 計算値 : 278.15 (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO)。観測値 : 278.1538.

【化289】



【0724】

N-アリル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (IGA1-15)。テトラヒドロフラン (8mL) 中の水素化ナトリウム (96mg、4.0mmol) の溶液を窒素雰囲気下に置いた。この溶液に、テトラヒドロフラン (2mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (187

mg、1.0 mmol)を加えた。溶液を0℃に冷却し、攪拌した。30分後に1-ブromoヘキサン(660 mg、4.0 mmol)を加え、その後、溶液を室温まで加温させ、一晚攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中20%の酢酸エチル)によって精製して、黄色油として、収率34%で、生成物(92 mg)を得た。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.11–7.25 (m, 2H), 6.86–6.96 (dd, J=7.5, 1.2 Hz, 1H), 6.30–6.40 (dd, J=16.8, 2.1 Hz, 1H), 5.86–6.00 (m, 1H), 5.41–5.51 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 3.82–3.96 (m, 1H), 3.42–3.56 (m, 1H), 2.90–3.04 (m, 2H), 2.65–2.85 (m, 2H), 1.98–2.16 (m, 2H), 1.47–1.63 (m, 2H), 1.20–1.36 (m, 6H), 0.80–0.90 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.16, 146.54, 142.38, 138.21, 128.59, 127.51, 127.35, 126.09, 124.13, 48.67, 33.26, 31.62, 30.85, 27.85, 26.72, 25.01, 22.59, 14.05. HRMS(+ESI): 計算値: 272.19 (C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO)。観測値: 272.2007.

【0725】

インビトロ実験では、DMSOビヒクル、ニンボリド、またはEN62を231MFP乳癌細胞プロテオームにおいて30分間処理した後、プロテオームをIA-アルキン(100 μM)で1時間標識した。同位体的に軽い(DMSOで処理した場合)または重い(化合物で処理した場合)TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグをCuAACにより付加して、isoTOP-ABPP分析を行った。231MFP乳癌細胞をDMSOビヒクルもしくはニンボリドで1時間インサイチュで処理した後、プロテオームをIA-アルキン(100 μM)で1時間インビトロで標識した。同位体的に軽い(DMSOで処理した場合)または重い(化合物で処理した場合)TEVプロテアーゼ切断可能なビオチン-アジドタグをCuAACにより付加して、isoTOP-ABPP分析を行った。3つの生物学的複製のうち2つに存在するプローブ修飾ペプチドのみを解釈した。それらの比が3を超える場合、全ての複製比が3を超える全ての生物学的複製に存在するペプチドのみを解釈した。それらの比が4を超える場合、全ての複製比が4を超える全ての生物学的複製に存在するペプチドのみを解釈した。MS1のピーク形状の品質を手動でキュレーションして、全ての複製について良好なピーク品質を確認した。

【0726】

表2. RNF114に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの構造

10

20

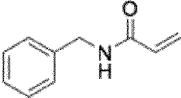
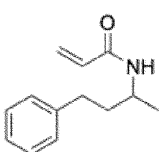
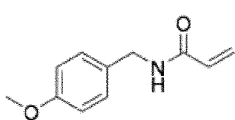
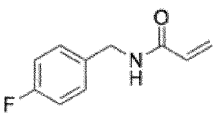
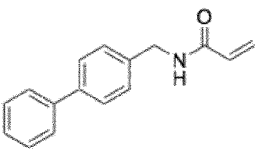
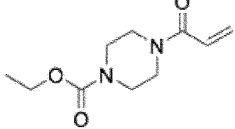
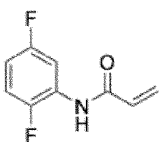
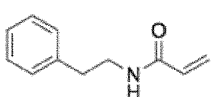
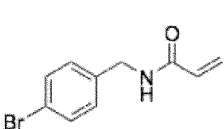
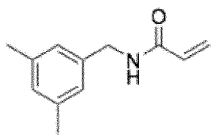
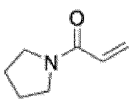
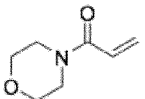
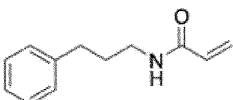
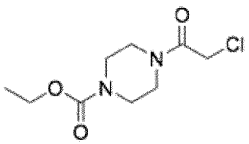
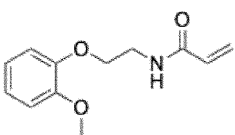
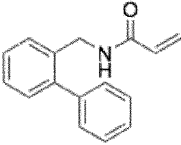
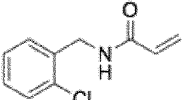
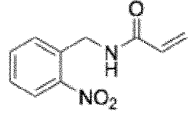
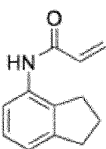
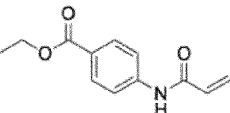
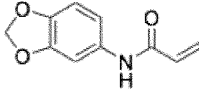
30

40

50

【表 2-1】

表 2. RNF114 に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの構造

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 2-31<br>   | DKM 2-32<br>   | DKM 2-33<br>   |
| DKM 2-34<br>   | DKM 2-37<br>   | DKM 2-39<br>   |
| DKM 2-40<br>   | DKM 2-42<br>   | DKM 2-43<br>   |
| DKM 2-47<br>  | DKM 2-48<br>  | DKM 2-49<br>  |
| DKM 2-50<br> | DKM 2-52<br> | DKM 2-58<br> |
| DKM 2-59<br> | DKM 2-60<br> | DKM 2-62<br> |
| DKM 2-84<br> | DKM 2-85<br> | DKM 2-86<br> |

10

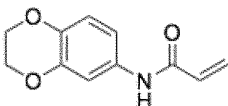
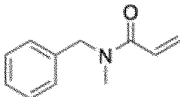
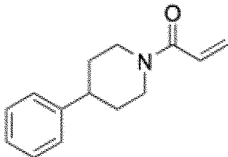
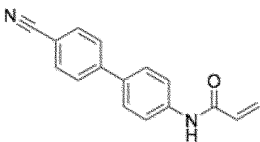
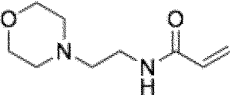
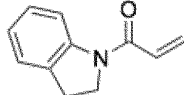
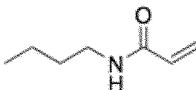
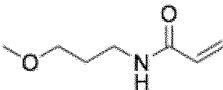
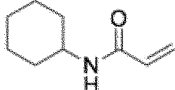
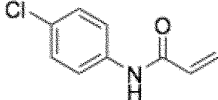
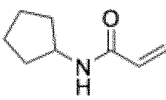
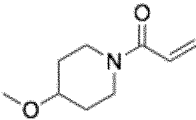
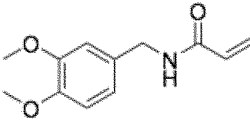
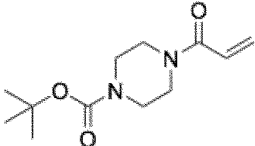
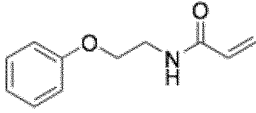
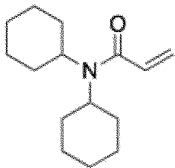
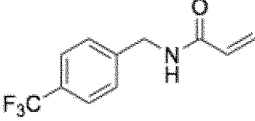
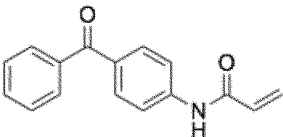
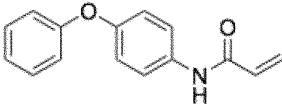
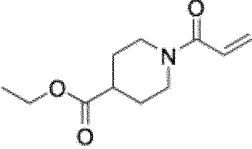
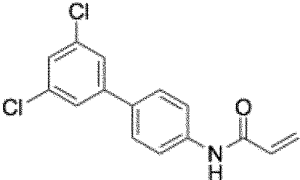
20

30

40

50

【表 2-2】

|                                                                                                  |                                                                                                                |                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 2-87<br>    | DKM 2-95<br><br>(等量の2つの回転異性体) | DKM 2-97<br>    |
| DKM 2-98<br>    | DKM 2-100<br>                 | DKM 2-101<br>  |
| DKM 2-102<br>   | DKM 2-103<br>                 | DKM 2-106<br>  |
| DKM 2-107<br>   | DKM 2-108<br>                 | DKM 2-109<br>  |
| DKM 2-110<br> | DKM 2-111<br>               | DKM 2-113<br> |
| DKM 2-114<br> | DKM 2-116<br>               | DKM 2-117<br> |
| DKM 2-119<br> | DKM 2-120<br>               | DKM 3-3<br>   |

10

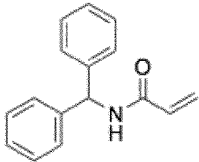
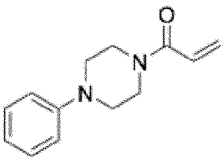
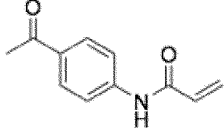
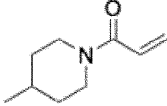
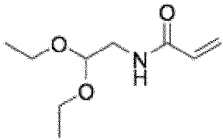
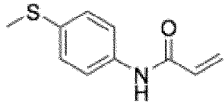
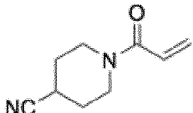
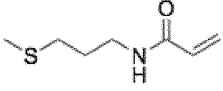
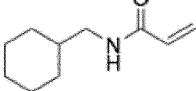
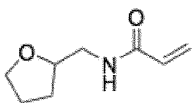
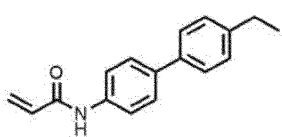
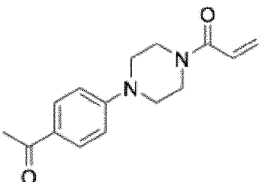
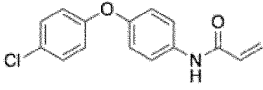
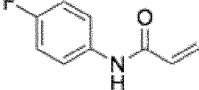
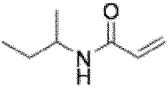
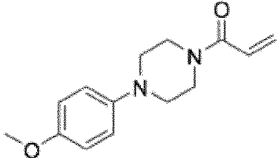
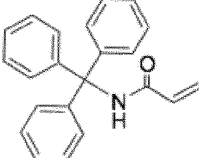
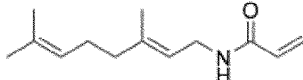
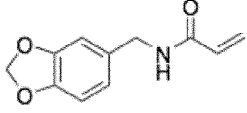
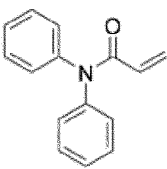
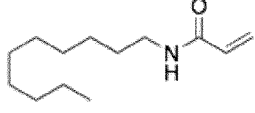
20

30

40

50

【表 2-3】

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DKM 3-4<br>    | DKM 3-5<br>    | DKM 3-7<br>    |
| DKM 3-8<br>    | DKM 3-9<br>    | DKM 3-10<br>   |
| DKM 3-11<br>   | DKM 3-12<br>   | DKM 3-13<br>   |
| DKM 3-15<br>   | DKM 3-16<br>  | DKM 3-29<br>  |
| DKM 3-30<br> | DKM 3-31<br> | DKM 3-32<br> |
| DKM 3-36<br> | DKM 3-41<br> | DKM 3-42<br> |
| DKM 3-43<br> | DKM 3-70<br> | TRH 1-12<br> |

10

20

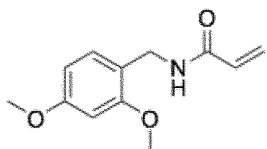
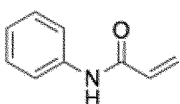
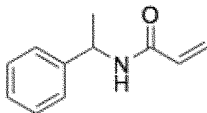
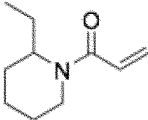
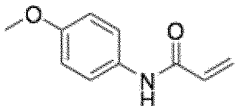
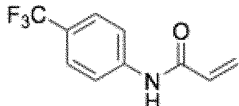
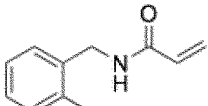
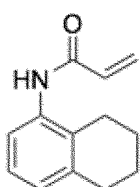
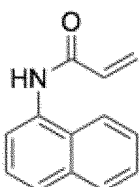
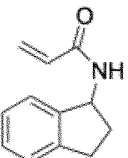
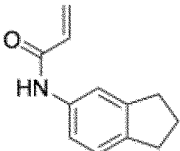
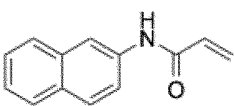
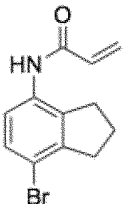
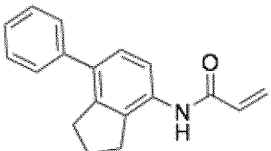
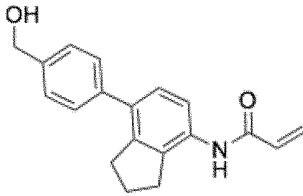
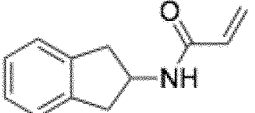
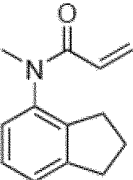
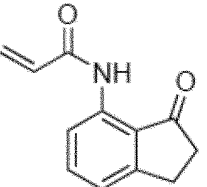
30

40

50



【表 2 - 4】

|                                                                                                 |                                                                                                  |                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TRH 1-13<br>   | TRH 1-19<br>    | TRH 1-20<br>    |
| TRH 1-27<br>   | TRH 1-32<br>    | TRH 1-50<br>    |
| TRH 1-54<br>   | TRH 1-56<br>    | TRH 1-57<br>    |
| TRH 1-58<br>  | TRH 1-59<br>   | TRH 1-60<br>   |
| TRH 1-65<br> | TRH 1-68<br>  | TRH 1-70<br>   |
| TRH 1-74<br> | TRH 1-115<br> | TRH 1-129<br> |

10

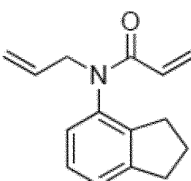
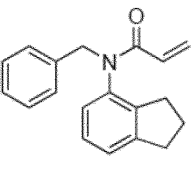
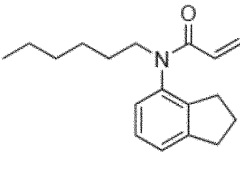
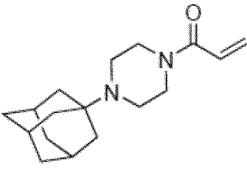
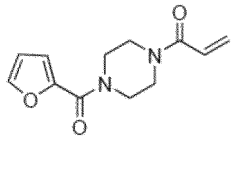
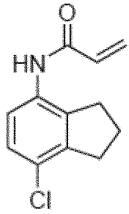
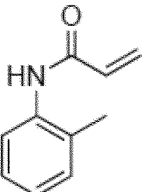
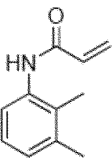
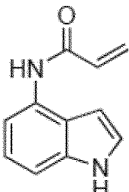
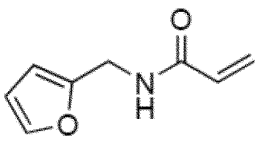
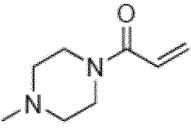
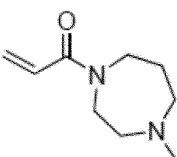
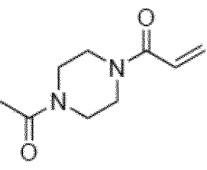
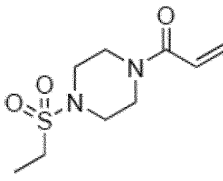
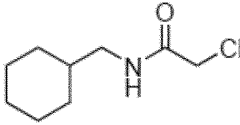
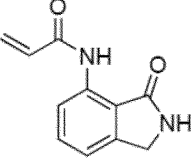
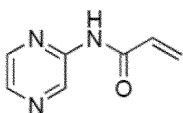
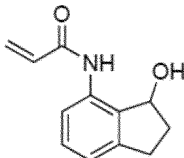
20

30

40

50

【表 2 - 5】

|                                                                                                  |                                                                                                  |                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IGA 1-12<br>    | IGA 1-14<br>    | IGA 1-15<br>    |
| TRH 1-143<br>   | TRH 1-145<br>   | YP 1-1<br>      |
| YP 1-16<br>     | YP 1-18<br>     | YP 1-19<br>     |
| YP 1-26<br>   | YP 1-22<br>   | YP 1-23<br>   |
| YP 1-24<br>   | YP 1-25<br>   | YP 1-31<br>   |
| TRH 1-152<br> | TRH 1-156<br> | TRH 1-133<br> |

10

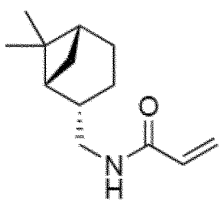
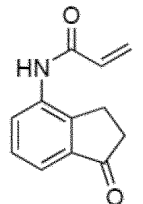
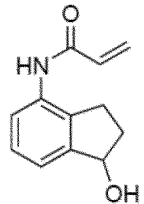
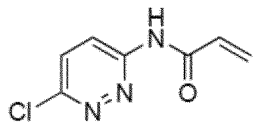
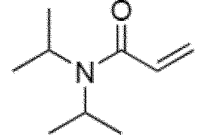
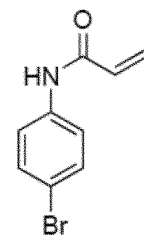
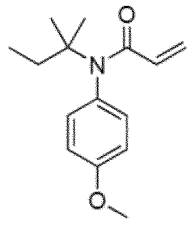
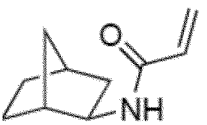
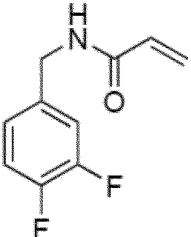
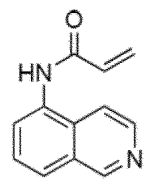
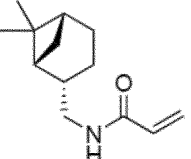
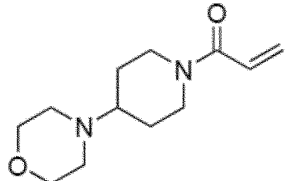
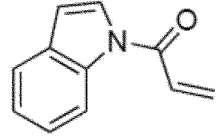
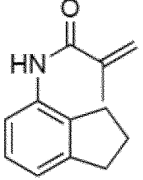
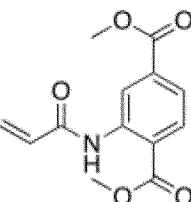
20

30

40

50

【表 2 - 6】

|                                                                                                  |                                                                                                         |                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TRH 1-133<br>   | TRH 1-134<br>          | TRH 1-135<br> |
| TRH 1-155<br>   | TRH 1-167<br>          | YP 1-36<br>   |
| TRH 1-170<br>  | TRH 1-176<br><br>(ラセミ) | YP 1-38<br>  |
| TRH 1-162<br> | TRH 1-178<br>        | YP 1-42<br>  |
| YP 1-44<br>   | TRH 1-149<br>        | EN1<br>     |

10

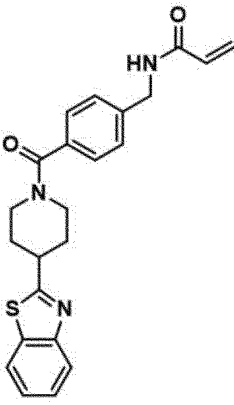
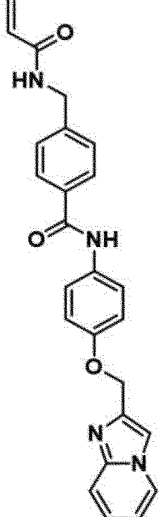
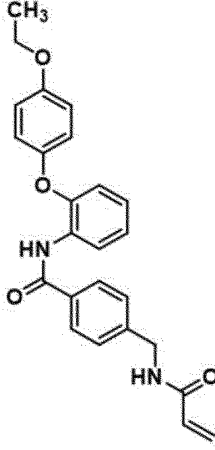
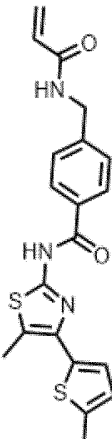
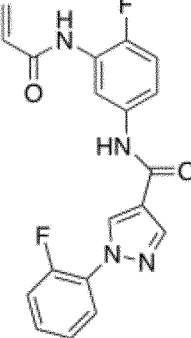
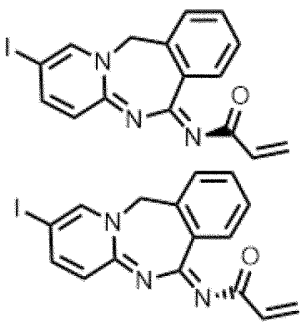
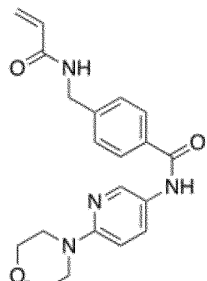
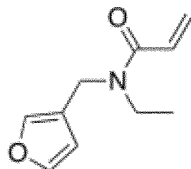
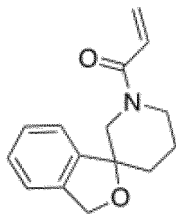
20

30

40

50

【表 2 - 7】

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 2</p>    | <p>EN 3</p>    | <p>EN 4</p>      |
| <p>EN 5</p>   | <p>EN 6</p>   | <p>EN 7</p>     |
| <p>EN 8</p>  | <p>EN 9</p>  | <p>EN 10</p>  |

10

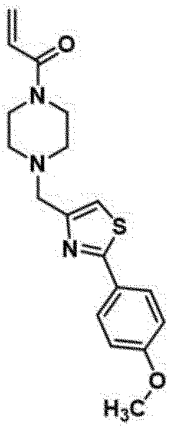
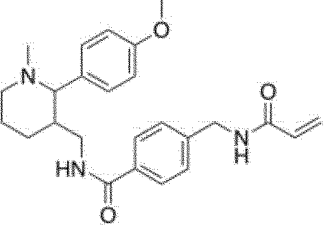
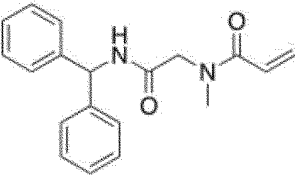
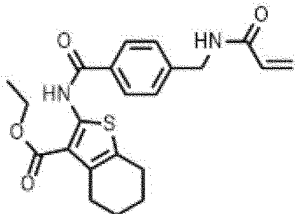
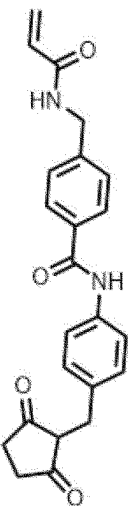
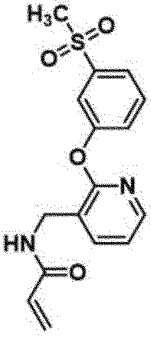
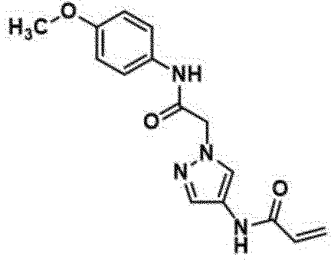
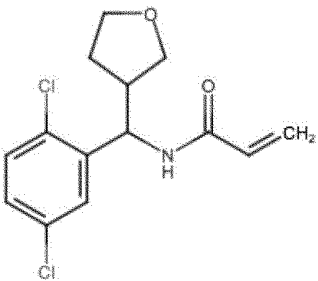
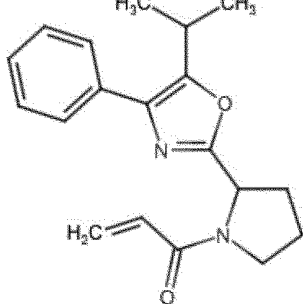
20

30

40

50

【表 2 - 8】

|                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN12</p>    | <p>EN13</p>    | <p>EN14</p>   |
| <p>EN15</p>    | <p>EN16</p>   | <p>EN17</p>  |
| <p>EN18</p>  | <p>EN19</p>  | <p>EN20</p>  |

10

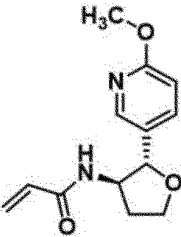
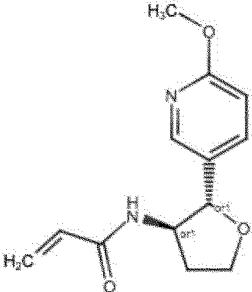
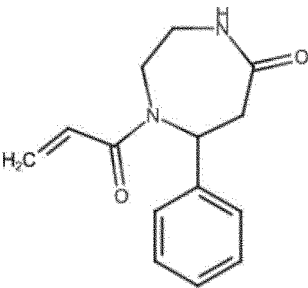
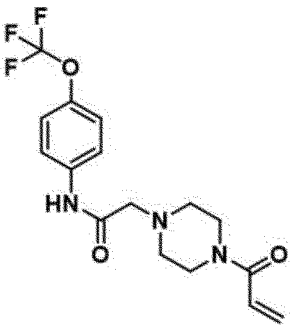
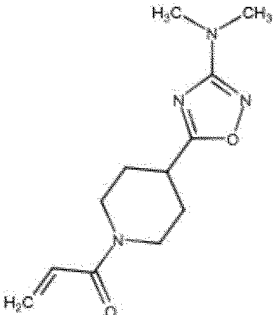
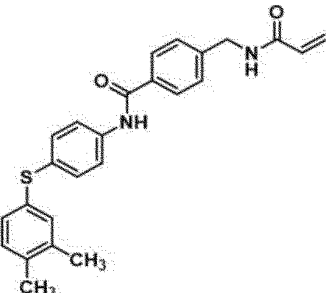
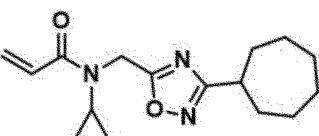
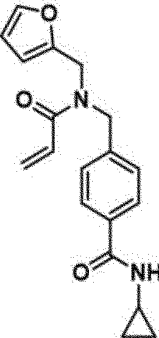
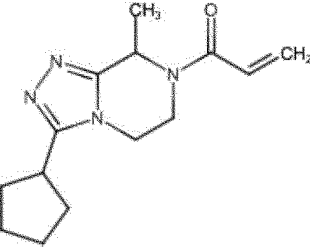
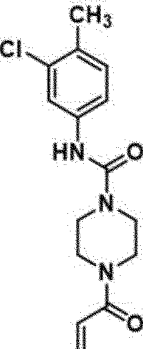
20

30

40

50

【表 2 - 9】

|                                                                                                                                                                                   |                                                                                                   |                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 2 1</p>   | <p>EN 2 2</p>    | <p>EN 2 3</p>    |
| <p>EN 2 4</p>                                                                                   | <p>EN 2 5</p>   | <p>EN 2 6</p>   |
| <p>EN 2 7</p>                                                                                  | <p>EN 2 8</p>  | <p>EN 2 9</p>  |

10

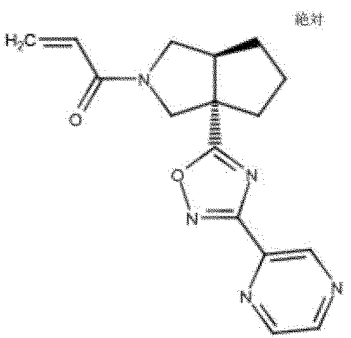
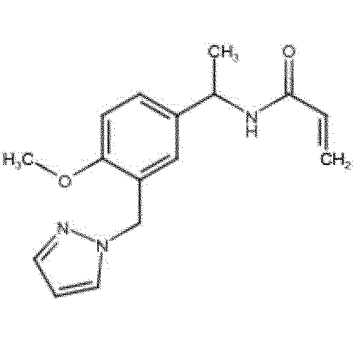
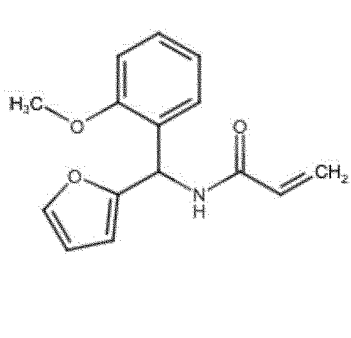
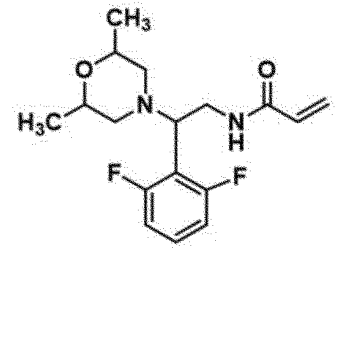
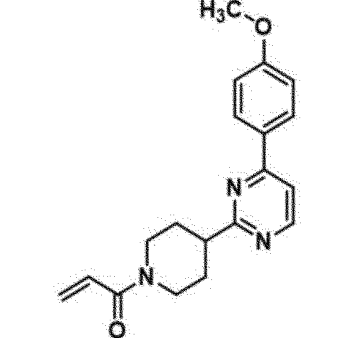
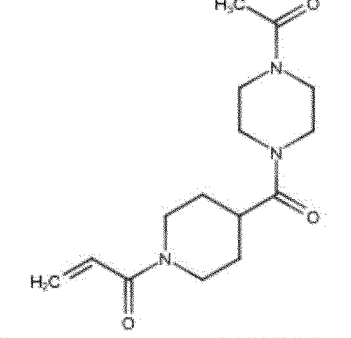
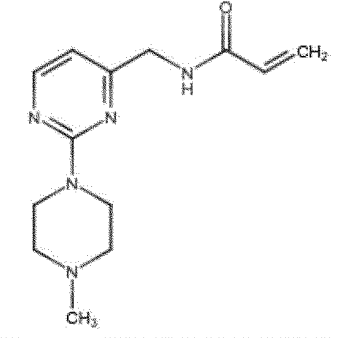
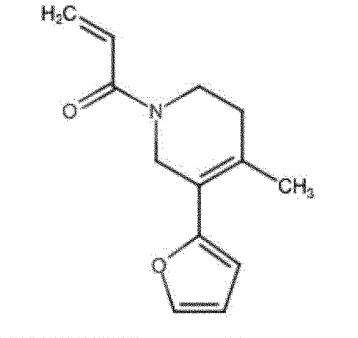
20

30

40

50

【表 2 - 10】

|                                                                                                          |                                                                                                          |                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 30</p> <p>絶対</p>  | <p>EN 32</p> <p>絶対</p>  | <p>EN 33</p>    |
| <p>EN 35</p>            | <p>EN 36</p>            | <p>EN 37</p>    |
| <p>EN 38</p>          | <p>EN 39</p>          | <p>EN 40</p>  |

10

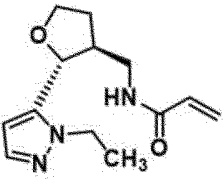
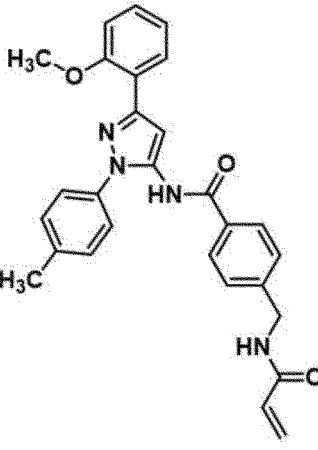
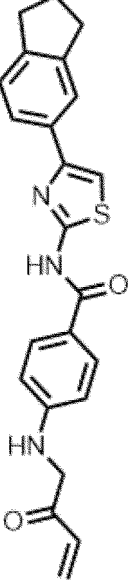
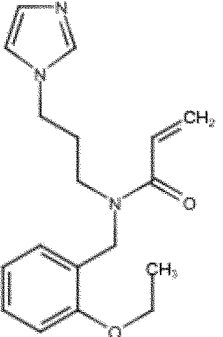
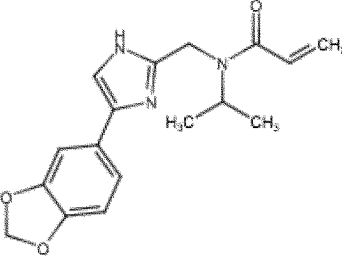
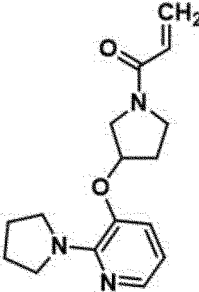
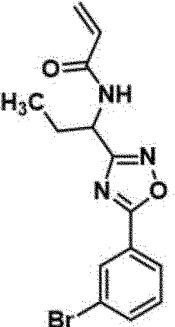
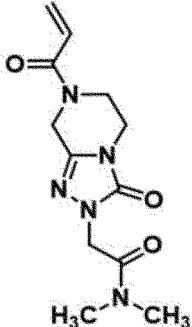
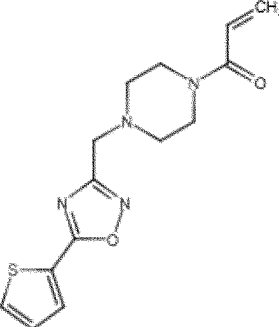
20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

|                                                                                                   |                                                                                                   |                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 4 3</p>    | <p>EN 4 4</p>    | <p>EN 4 5</p>    |
| <p>EN 4 6</p>   | <p>EN 4 7</p>   | <p>EN 4 8</p>   |
| <p>EN 4 9</p>  | <p>EN 5 0</p>  | <p>EN 5 1</p>  |

10

20

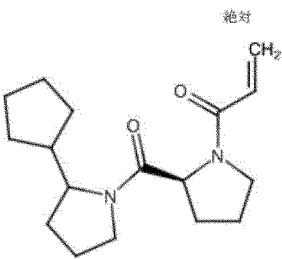
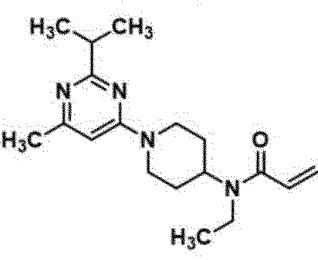
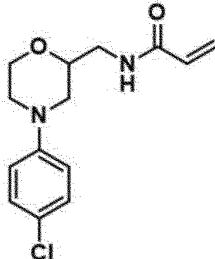
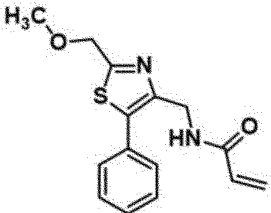
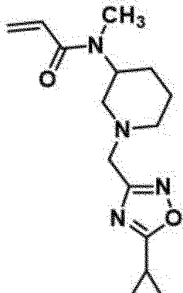
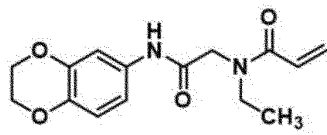
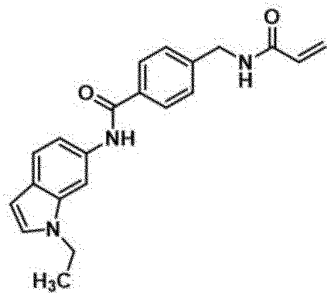
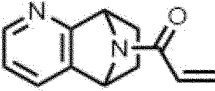
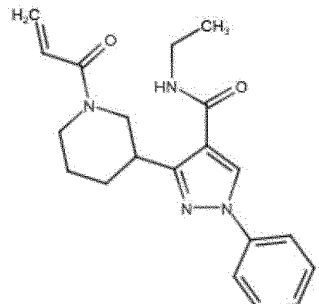
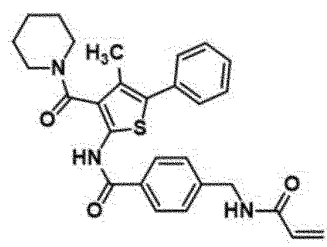
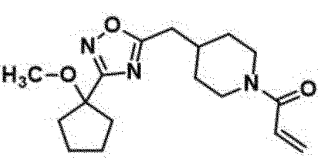
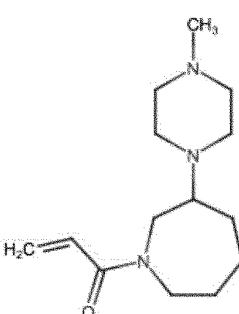
30

40

50



【表 2 - 1 2】

|                                                                                                           |                                                                                                   |                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 5 2</p>  <p>絶対</p> | <p>EN 5 3</p>    | <p>EN 5 4</p>    |
| <p>EN 5 5</p>            | <p>EN 5 7</p>    | <p>EN 5 8</p>     |
| <p>EN 5 9</p>           | <p>EN 6 0</p>   | <p>EN 6 1</p>    |
| <p>EN 6 2</p>          | <p>EN 6 3</p>  | <p>EN 6 4</p>  |

10

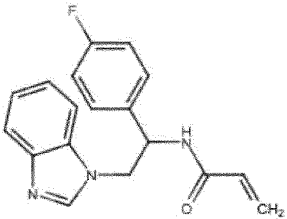
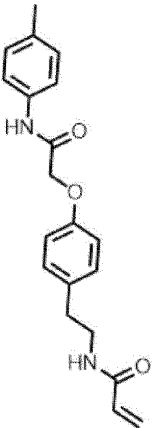
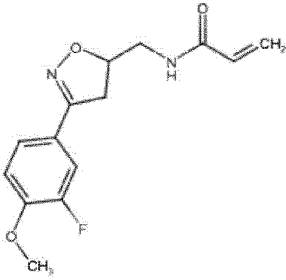
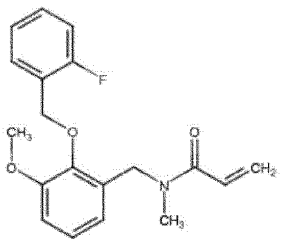
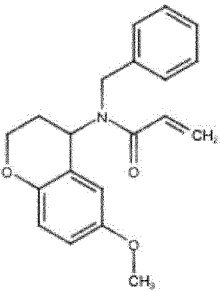
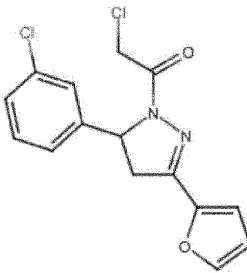
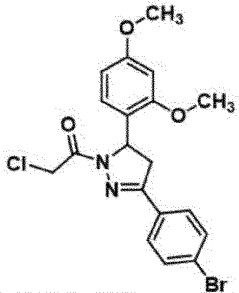
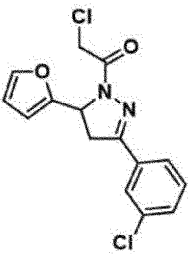
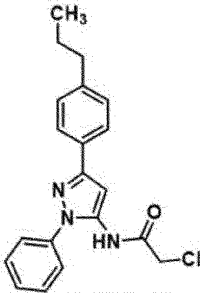
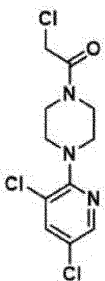
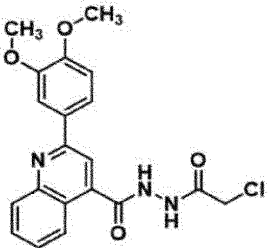
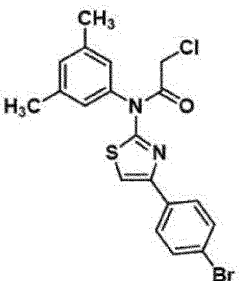
20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

|                                                                                                   |                                                                                                   |                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 6 5</p>    | <p>EN 6 6</p>    | <p>EN 6 7</p>    |
| <p>EN 6 8</p>    | <p>EN 6 9</p>   | <p>EN 7 0</p>   |
| <p>EN 7 1</p>  | <p>EN 7 2</p>  | <p>EN 7 4</p>  |
| <p>EN 7 5</p>  | <p>EN 7 8</p>  | <p>EN 8 0</p>  |

10

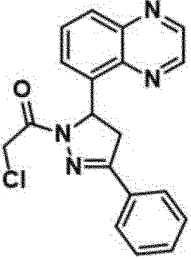
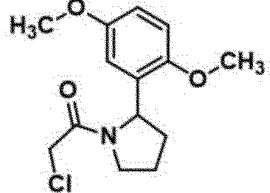
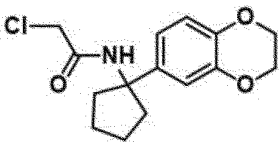
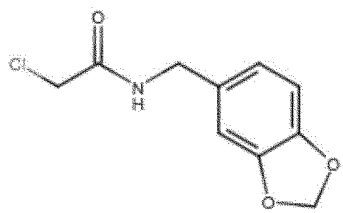
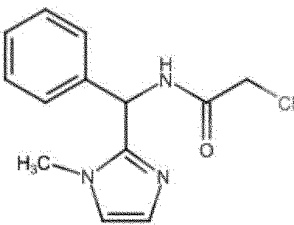
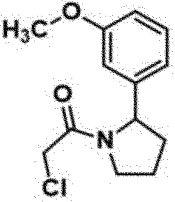
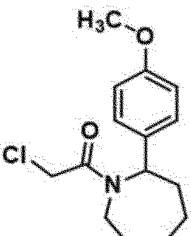
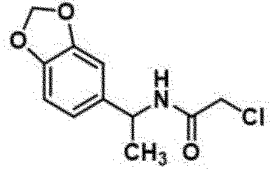
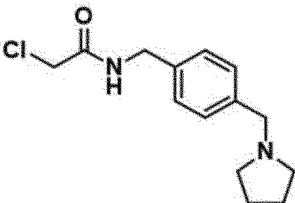
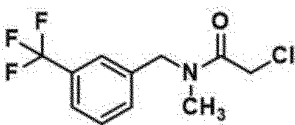
20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

|                                                                                                   |                                                                                                  |                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>EN 8 2</p>    | <p>EN 8 3</p>   | <p>EN 8 4</p>   |
| <p>EN 8 5</p>    | <p>EN 8 6</p>   | <p>EN 8 7</p>   |
| <p>EN 8 8</p>   | <p>EN 8 9</p>  | <p>EN 9 0</p>  |
| <p>EN 9 3</p>  |                                                                                                  |                                                                                                    |

【 0 7 2 7】

実施例 4 ～ 6 に関連する参考文献

1. Laraia, L., Robke, L. & Waldmann, H. Bioactive Compound Collections: From Design to Target Identification. Chem 4, 705–730 (2018).
2. Koehn, F. E. & Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 4, 206–220 (2005).
3. Kingston, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. J. Nat. Prod. 74, 496–511 (2011).
4. Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 111–129 (2015).
5. Nomura, D. K. & Maimone, T. J. Target Identification of Bioactive Covalently Acting Natural Products. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 420, 351–3

74 (2019) . 6. Wright, M. H. & Sieber, S. A. Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Nat. Prod. Rep.* 33, 681–708 (2016) . 7. Drahl, C., Cravatt, B. F. & Sorensen, E. J. Protein-reactive natural products. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44, 5788–5809 (2005) . 8. Liu, J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807–815 (1991) . 9. Cohen, E., Quistad, G. B. & Casida, J. E. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sci.* 58, 1075–1081 (1996) . 10. Bodduluru, L. N., Kasala, E. R., Thota, N., Barua, C. C. & Sistla, R. Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: the underlying mechanisms. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 1026–1035 (2014) . 11. Subramani, R. et al. Nimbolide inhibits pancreatic cancer growth and metastasis through ROS-mediated apoptosis and inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* 6, 19819 (2016) . 12. Hao, F., Kumar, S., Yadav, N. & Chandra, D. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1846, 247–257 (2014) . 13. Chien, S.-Y. et al. Nimbolide induces apoptosis in human nasopharyngeal cancer cells. *Environ. Toxicol.* 32, 2085–2092 (2017) . 14. Elumalai, P. et al. Nimbolide inhibits invasion and migration, and down-regulates uPAR chemokine gene expression, in two breast cancer cell lines. *Cell Prolif.* 47, 540–552 (2014) . 15. Elumalai, P., Arunkumar, R., Benson, C. S., Sharmila, G. & Arunkaran, J. Nimbolide inhibits IGF-I-mediated PI3K/Akt and MAPK signalling in human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) . *Cell Biochem. Funct.* 32, 476–484 (2014) . 16. Kavitha, K. et al. Nimbolide, a neem limonoid abrogates canonical NF- $\kappa$ B and Wnt signalling to induce caspase-dependent apoptosis in human hepatocarcinoma (HepG2) cells. *Eur. J. Pharmacol.* 681, 6–14 (2012) . 17. Pooladanda, V., Bandi, S., Mondi, S. R., Gottumukkala, K. M. & Godugu, C. Nimbolide epigenetically regulates autophagy and apoptosis in breast cancer. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 51, 114–128 (2018) . 18. Gupta, S. C. et al. Nimbolide, a limonoid triterpene, inhibits grow

10

20

30

40

50

th of human colorectal cancer xenografts by suppressing the proinflammatory microenvironment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 4465–4476 (2013). 19. Lin, H., Qiu, S., Xie, L., Liu, C. & Sun, S. Nimbolide suppresses non-small cell lung cancer cell invasion and migration via manipulation of DUSP4 expression and ERK1/2 signaling. *Bio med. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 92, 340–346 (2017). 20. Babykutty, S. et al. Nimbolide retards tumor cell migration, invasion, and angiogenesis by downregulating MMP-2/9 expression via inhibiting ERK1/2 and reducing DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* 51, 475–490 (2012). 21. Nagini, S. Neem Limonoids as Anticancer Agents: Modulation of Cancer Hallmarks and Oncogenic Signaling. *The Enzymes* 36, 131–147 (2014). 22. Alshammari, G. M., Balakrishnan, A. & Chinnasamy, T. Nimbolide attenuate the lipid accumulation, oxidative stress and antioxidant in primary hepatocytes. *Mol. Biol. Rep.* 44, 463–474 (2017). 23. Leslie, B. J. & Hergenrother, P. J. Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1347–1360 (2008). 24. Pan, S., Zhang, H., Wang, C., Yao, S. C. L. & Yao, S. Q. Target identification of natural products and bioactive compounds using affinity-based probes. *Nat. Prod. Rep.* 33, 612–620 (2016). 25. Ursu, A. & Waldmann, H. Hide and seek: Identification and confirmation of small molecule protein targets. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 3079–3086 (2015). 26. Bianchini, G., Ballo, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 674–690 (2016). 27. Zeichner, S. B., Terawaki, H. & Gogineni, K. A Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 10, 25–36 (2016). 28. Weerapana, E. et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790–795 (2010). 29. Evans, M. J. & Cravatt, B. F. Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chem. Rev.* 106, 3279–3301 (2006). 30. Roberts, A. M., Ward, C. C. & Nomura, D. K. Activity-based protein profil

10

20

30

40

50

ing for mapping and pharmacologically interrogating proteome-wide ligandable hotspots. *Curr. Opin. Biotechnol.* 43, 25–33 (2017). 31. Grossman, E. A. et al. Covalent Ligand Discovery against Druggable Hotspots Targeted by Anti-cancer Natural Products. *Cell Chem. Biol.* 24, 1368–1376. e4 (2017). 32. Roberts, A. M. et al. Chemoproteomic Screening of Covalent Ligands Reveals UBA5 As a Novel Pancreatic Cancer Target. *ACS Chem. Biol.* 12, 899–904 (2017). 33. Anderson, K. E., To, M., Olzmann, J. A. & Nomura, D. K. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals a Thioredoxin-Caspase 3 Interaction Disruptor That Impairs Breast Cancer Pathogenicity. *ACS Chem. Biol.* 12, 2522–2528 (2017). 34. Counihan, J. L., Wiggenhorn, A. L., Anderson, K. E. & Nomura, D. K. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals ALDH3A1 as a Lung Cancer Therapy Target. *ACS Chem. Biol.* 13, 1970–1977 (2018). 35. Backus, K. M. et al. Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature* 534, 570–574 (2016). 36. Wang, C., Weerapana, E., Blewett, M. M. & Cravatt, B. F. A chemoproteomic platform to quantitatively map targets of lipid-derived electrophiles. *Nat. Methods* 11, 79–85 (2014). 37. Hacker, S. M. et al. Global profiling of lysine reactivity and ligandability in the human proteome. *Nat. Chem.* 9, 1181–1190 (2017). 38. Ward, C. C., Kleinman, J. I. & Nomura, D. K. NHS-Esters As Versatile Reactivity-Based Probes for Mapping Proteome-Wide Ligandable Hotspots. *ACS Chem. Biol.* 12, 1478–1483 (2017). 39. Han, J. et al. ZNF313 is a novel cell cycle activator with an E3 ligase activity inhibiting cellular senescence by destabilizing p21 (WAF1.). *Cell Death Differ.* 20, 1055–1067 (2013). 40. Ma, Y.-X. et al. Identification of a novel human zinc finger protein gene ZNF313. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochim. Biophys. Sin.* 35, 230–237 (2003). 41. Lee, M.-G. et al. XAF1 directs apoptotic switch of p53 signaling through activation of HIPK2 and ZNF313. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15532–15537 (2014). 42. Huang, S. et al. The UBL-UBA Ubiquitin4 protein functions as a tumor suppressor in gastric cancer by p53-dependent and p53-in

10

20

30

40

50

dependent regulation of p21. *Cell Death Differ.* 26, 516–530 (2018). Burslem, G. M. & Crews, C. M. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis. *Chem. Rev.* 117, 11269–11301 (2017). 44. Zengerle, M., Chan, K. -H. & Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* 10, 1770–1777 (2015). 45. Lai, A. C. & Crews, C. M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 101–114 (2017). 46. Neklesa, T. K., Winkler, J. D. & Crews, C. M. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacol. Ther.* 174, 138–144 (2017). 47. Winter, G. E. et al. DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* 348, 1376–1381 (2015). 48. Shortt, J., Ott, C. J., Johnstone, R. W. & Bradner, J. E. A chemical probe toolbox for dissecting the cancer epigenome. *Nat. Rev. Cancer* 17, 160–183 (2017). 49. Sakamoto, K. M. et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8554–8559 (2001). 50. Schneekloth, J. S. et al. Chemical genetic control of protein levels: selective in vivo targeted degradation. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3748–3754 (2004). 51. Lu, J. et al. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem. Biol.* 22, 755–763 (2015). 52. Havens, C. G. & Walter, J. C. Mechanism of CRL4 (Cdt2), a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. *Genes Dev.* 25, 1568–1582 (2011). 53. Kitagawa, K., Kotake, Y. & Kitagawa, M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci.* 100, 1374–1381 (2009). 54. Biswas, K. et al. The E3 Ligase CHIP Mediates p21 Degradation to Maintain Radioresistance. *Mol. Cancer Res. MCR* 15, 651–659 (2017). 55. Rodriguez, M. S. et al. The RING ubiquitin E3 RNF114 interacts with A20 and modulates NF- $\kappa$ B activity and T-cell activation. *Cell Death Dis.* 5, e1399 (2014). 56. Yang, Y. et al. The E3 ubiquitin ligase RNF114 and TAB1 degradation are required for maternal-to-zygotic transition. *EMBO Rep.* 18, 205–216 (2017). 57. Rape, M. Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 59–70 (2018).

10

20

30

40

50

58. Hughes, S. J. & Ciulli, A. Molecular recognition of ternary complexes: a new dimension in the structure-guided design of chemical degraders. *Essays Biochem.* 61, 505–516 (2017).
59. Chamberlain, P. P. et al. Structure of the human Cereblon–DDB1–lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 803–809 (2014).
60. Kronke, J. et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 $\alpha$  in del(5q) MDS. *Nature* 523, 183–188 (2015).
61. Jessani, N. et al. Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13756–13761 (2004).
62. Louie, S. M. et al. GSTP1 Is a Driver of Triple-Negative Breast Cancer Cell Metabolism and Pathogenicity. *Cell Chem. Biol.* 23, 567–578 (2016).
63. Bateman, L. A. et al. Chemoproteomics-enabled covalent ligand screen reveals a cysteine hotspot in reticulon 4 that impairs ER morphology and cancer pathogenicity. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 53, 7234–7237 (2017).
64. Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85 (1985).
65. Xu, T. et al. ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. *J. Proteomics* 129, 16–24 (2015).
66. Benjamin, D. I. et al. Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14912–14917 (2013).
67. Medina-Cleghorn, D. et al. Mapping Proteome-Wide Targets of Environmental Chemicals Using Reactivity-Based Chemoproteomic Platforms. *Chem. Biol.* 22, 1394–1405 (2015).
68. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. -S. & Leahy, D. J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 529, 227–240 (2013).
69. Nomura, D. K. et al. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* 140, 49–61 (2010).

[0728]

実施例 7. 標的タンパク質分解のための抗癌性天然物ニンボリドの利用

植物および微生物などの生物由来の天然物は、治療リード化合物の豊富な供給源である<sup>1</sup>。それらの生物学的活性の特性評価は、癌、細菌および真菌感染、炎症、および糖尿病を含む広範囲の病状に対する無数の薬物療法をもたらした<sup>1</sup>。天然物の中には、タンパ



ク質内の求核性アミノ酸と本質的に不可逆的な反応を受けてそれらの治療活性を発揮することができる求電子性部分を有する共有結合的に作用する分子のサブセットが存在する。これらの天然物の例としては、抗菌活性を誘導するセリントランスペプチダーゼを不可逆的に阻害するペニシリン、またはPI3-キナーゼの機能的リジンを共有結合的に修飾してその活性を阻害するワートマニンが含まれる<sup>1, 2</sup>。抗癌性および共有作用のある天然物の標的となるドラッグブルなホットスポットを発見することは、新しい抗癌剤および治療標的を生み出すだけでなく、標準的な創薬の努力ではアンドラッグブルであるか、または取り組むのが難しいと見なされることが多いタンパク質標的の天然物がアクセスするモダリティへの独自の洞察を明らかにすることができる。先験的に予測するのが難しいドラッグブルなモダリティの一例は、FKBP12に結合することによりペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を阻害し、それによりカルシニューリンの阻害を介してT細胞シグナル伝達を調節するFKBP12-FK506複合体を生成するFK506またはタクロリムスである<sup>3</sup>。したがって、タンパク質標的に関与するための自然の戦略への洞察を得ることは、ドラッグブルであると考えられ得るものに関する新しい予想へのアクセスを提供することができる。

#### 【0729】

この研究では、ニームの木 (*Azadirachta indica*) に由来するリモノイド天然物である天然物ニンボリド (1) の作用機序を調査した (図8A)<sup>4</sup>。ニンボリドは複数の治療効果を発揮することが示されており、システインと反応することができる環状エノンを含んでいる<sup>5-7</sup>。癌との関連で、ニンボリドは、広範囲の癌にわたって毒性または望ましくない副作用を引き起こすことなく、腫瘍形成および転移を阻害することが示されている<sup>8</sup>。以前の研究では、ニンボリドが、生存、成長、浸潤、血管新生、炎症および酸化ストレスに関連するシグナル伝達経路および転写因子を調節することにより、またに影響を与えることにより、癌の病原性を低減することが示唆されているが、ニンボリドの直接標的は依然として十分に特徴付けされていない<sup>8</sup>。

#### 【0730】

複雑な天然物の直接的なタンパク質標的を同定することは依然として困難であり、光親和性および濃縮ハンドルを有するこれらの化合物の類似体を合成する必要があり、これは合成するのに困難であり、分子の活性を変える可能性がある<sup>1</sup>。このようなプローブを生成しても、天然物が標的とする特定の amino 酸部位を特定することは困難である。この研究では、活性ベースタンパク質プロファイリング (ABPP) 化学プロテオームアプローチを利用して、乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリドのプロテオーム全体の標的をマッピングした。ABPPプラットフォームを使用して、乳癌細胞におけるニンボリドの主要な標的の1つがE3ユビキチンリガーゼRNF114のシステイン-8 (C8) であることを明らかにする。ニンボリドによるRNF114の共有結合修飾は、ユビキチン化障害、およびその基質である腫瘍抑制因子CDKN1A (p21) の分解を引き起こし、その急速な安定化をもたらす。興味深いことに、RNF114活性のこの明らかな阻害は、基質認識障害によるものであり、標的タンパク質分解のE3リガーゼ動員モジュールとしてニンボリドを使用できる可能性があることを示している。細胞内の目的の標的の化学的誘発分解の戦略は、E3リガーゼリクルーターに結合して、E3リガーゼを目的のタンパク質へと運び、ユビキチン化させ、プロテアソーム依存的に分解の標的をマークするタンパク質標的化リガンドからなる「タンパク質分解標的カメラ」(PROTAC) または「ヘテロ二官能分解剤」と呼ばれる二官能性分子の開発を含む、創薬への関心を急速に高めている<sup>9, 10</sup>。ニンボリドを使用してRNF114を他のタンパク質基質に動員して標的タンパク質分解用途に使用できることを実証する。ケモプロテオミクス対応の共有結合リガンドスクリーニングプラットフォームを使用して、RNF114のC8および表現型コピーニンボリド作用と同様に反応できる、合成することにより扱いやすい化合物も同定する。

#### 【0731】

乳癌の表現型に対するニンボリドの影響。ニンボリドは多くの異なるタイプのヒト癌にわたって癌の病原性を低減することが示されているが、トリプルネガティブ乳癌 (TNB

10

20

30

40

50

C)におけるニンボリドの役割の解明に焦点を当てることを選択した。TNBCは、エストロゲン、プロゲステロンおよびHER2受容体を欠いており、最も臨床予後が悪い最も攻撃的な癌の1つである<sup>11</sup>。現在、TNBC患者を対象とした標的療法はほとんどない。したがって、TNBCの新しい治療法を明らかにすることは、乳癌に関連する死亡率の低下に大きく貢献する可能性がある。以前の報告と一致して、乳癌細胞における抗癌活性、231MFPおよびHCC38 TNBC細胞におけるニンボリドによる細胞増殖または無血清細胞生存の低減を示す(図17A~17B、図18A~18B)<sup>8</sup>。また、231MFPおよびHCC38の生存率に対するこれらの影響は、フローサイトメトリー分析によって評価した、ニンボリド処理によるアポトーシス細胞の有意な増加によるものであることも示している(図17C、図18C~18E)。

#### 【0732】

乳癌細胞のニンボリド標的をマッピングするためのABPP。ニンボリドが乳癌の病原性を低減するメカニズムを調べるために、同位体タンデム直交タンパク質分解対応の活性ベースタンパク質プロファイリング(isoTOP-ABPP)と呼ばれる化学プロテオームプラットフォームを適用して、ニンボリドの特定のタンパク質標的を決定した。CravattおよびWeerapanaによって開拓されたisoTOP-ABPPは、反応性ベースの化学プローブを使用して、複雑なプロテオーム内の反応性、機能性およびリガンド結合可能なホットスポットを直接マッピングする<sup>12, 13</sup>。競合的に使用される場合、共有結合的に作用する小分子は、広範な反応性ベースのプローブの結合と競合して、共有結合的に作用する化合物が標的とするタンパク質およびリガンド結合可能部位の両方の迅速な発見を容易にすることができる<sup>14-16</sup>(図9A)。この研究では、インサイチュで乳癌細胞をビヒクルまたはニンボリドで処理した後、システイン反応性アルキン官能化ヨードアセトアミドプローブ(IA-アルキン)でプロテオームを競合標識し、その後同位体的に軽いまたは重い切断可能な濃縮ハンドルを、isoTOP-ABPP分析のために、プローブ標識タンパク質に追加した。プローブ修飾トリプシンペプチドを液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS/MS)で分析し、対照対処理済みIA-アルキン標識部位を表す軽対重トリプシンプローブ修飾ペプチド比を定量化した。231MFP TNBC細胞におけるインサイチュニンボリド処理の標的となるリガンド結合可能なホットスポットのisoTOP-ABPP分析は、ニンボリドが有意に関与する、4を超える同位体比を示す1つの主要な標的であるE3ユビキチンリガーゼRNF114を示した(図19A)。重要なことに、3つの独立した低分子干渉RNA(siRNA)を使用したRNF114ノックダウンは、231MFP細胞におけるニンボリドの抗増殖効果に類似していた(図19B~19C、図20A~20B)。RNF114がニンボリドの抗増殖効果に寄与することをさらに実証して、RNF114ノックダウンは、ニンボリドを介した抗増殖効果に対する有意な耐性をもたらした(図19D、図20C)。ニンボリドは、isoTOP-ABPPアプローチではアクセスできないRNF114以外の多くの追加標的を持っている可能性があるが、本発明者らの結果は、RNF114がニンボリドの新規標的であり、RNF114がこの天然物の抗増殖効果に一部関与していることを示唆した。したがって、ニンボリドとRNF114との間の相互作用にさらに特徴付けの努力を集中させることを選択した。

#### 【0733】

RNF114とのニンボリドの相互作用の特徴付け。RNF114は、RINGファミリーのE3ユビキチンリガーゼである<sup>17</sup>。ニンボリドの標的としてisoTOP-ABPPによって同定されたRNF114上の部位C8は、タンパク質のN末端領域内にあり、天然変性していると予測され、2つの注釈付きジンクフィンガードメインの外側に存在する(図21A)。天然物によるタンパク質の天然変性領域の明らかな標的化に興味をそられ、ニンボリドとRNF114との間の相互作用を調査することを試みた。

#### 【0734】

isoTOP-ABPPは、共有結合的に作用する分子とより広範な反応性プローブとの間の競合アッセイであるため、潜在的なニンボリドが標的とするホットスポットの間接

10

20

30

40

50

的な読み取りである。ニンボリドがRNF114を直接標的としていることを確認するために、ニンボリドから3つのステップで示されるアルキン官能化プローブを合成した(図21B)。フラン部分のC2での選択的臭素化および後続の4-ホルミルフェニルボロン酸との鈴木カップリングによりアリール-アルデヒド(3が得られ)、これはピニック酸化によって対応するカルボン酸(4)に変換された。最後に、(4)とプロパルギルアミン(HATU、DIPEA)とのカップリングにより、ニンボリド-アルキンプローブ(5)が得られた。変性SDS/PAGEゲル上でタンパク質を標識することにより示されるように、このニンボリドプローブが、純粋なヒトRNF114タンパク質と反応することを確認した。この標識イベントはまた、ニンボリドによって競合され、C8A RNF114突然変異体において阻害された(図21C)。ニンボリド-アルキンプローブは、出発材料としてかなり高価なニンボリドを必要とする、合成するのが困難なプローブであるため、RNF114のC8を標識できるより単純なプローブの開発も試みた。RNF114とニンボリドとの相互作用を検証しようとする最初の研究では、RNF114のIA-アルキン標識に対してニンボリドを競合させたが、おそらくはC8の他に複数のシステインがIA-アルキンによってアルキル化されるために、標識の完全な阻害は観察されなかった(図21D)。したがって、本発明者らは、C8A RNF114突然変異体タンパク質の標識の欠如によって証明されるように、RNF114上のC8の選択的標識を示す、より調整されたアルキン官能化環状エノンプローブJNS27(6)を合成した(図21E)。JNS27を用いて、本発明者らは、0.73  $\mu$ Mの50%阻害濃度(IC50)を有するニンボリドによるJNS27標識の完全な競合を実証することができた(図21E)。RNF114とのニンボリドの相互作用が反応性によって完全に駆動されるのではなく、タンパク質との追加の相互作用によっても駆動されることを示すために、ニンボリドが、それぞれ0.55、2.2および>100  $\mu$ MのIC50を有するより単純なJNS27プローブまたはヨードアセトアミドと比較してはるかに低い濃度でローダミン官能化ヨードアセトアミドプローブ(IA-ローダミン)によるRNF114の標識と競合することを示す(図20D)。さらに、ニンボリドの直接質量付加物が、純粋なタンパク質を天然物とインキュベートした後、LC-MS/MSによってRNF114上のC8を含むトリプシンペプチドで検出された。共に行われたこれらの実験の全てにより、ニンボリドが、共有結合の形成により、C8でRNF114の天然変性領域を修飾することが証明される。

#### 【0735】

次に、2つの補完的な実験を実施して、ニンボリドが231MFP乳癌細胞においてRNF114に直接関与していることを実証した。最初に、Flagタグ付きRNF114発現細胞をプローブで処理し、続いてFlagタグ付きRNF114を濃縮し、CuAACによってプローブ標識タンパク質にローダミンアジドを付加し、ゲルベースABPP法により可視化することにより、RNF114の用量反応性インサイチュニンボリド-アルキン標識を示した。(図21F)。本発明者らは、10  $\mu$ Mのプローブによりロバストなインサイチュニンボリド-アルキン標識を観察したが、100 nMまで低下した場合でさえ低い有意なプローブ標識も観察した(図21F)。第二に、本発明者らはまた、細胞をプローブで処理し、続いてCuAACによってプローブ標識タンパク質にビオチン-アジドを付加し、ウエスタンブロッティングによってRNF114プルダウンを可視化することにより、ニンボリド-アルキンプローブによる内因性RNF114のインサイチュ標識を示した(図21G)。この場合、50  $\mu$ Mのニンボリド-アルキンプローブで有意なプルダウンが観察されたが、それよりも低濃度では観察されなかった。この実験では、GAPDHなどの無関係のタンパク質がニンボリド-アルキンプローブによって濃縮されないことを示す(図21G)。これらの後者の条件を使用して、相補的な定量的プロテオミクスプロファイリング研究を実施して、ニンボリド-アルキンプローブによる231MFP細胞のインサイチュ標識から濃縮される可能性のある追加のタンパク質を同定した。急性の細胞毒性という問題のため、高濃度のニンボリド自体を用いたインサイチュ競合研究を実施することはできなかった。この研究では、RNF114が、プローブを使用しない

対照と比較して、ニンボリドールキンプローブによって10倍を超えて濃縮されたタンパク質のうちの1つであることを示した。また、プローブを使用しない対照と比較して、プローブによって10倍を超えて濃縮された114個の追加のタンパク質を同定した。これらのタンパク質は、ニンボリドの抗増殖効果に寄与する可能性のある追加の潜在的な共有結合標的または非共有結合標的を表している。これらの濃縮された標的は、ニンボリドとの関与の程度が低い～部分的であるタンパク質を表す場合もあるが、isoTOP-ABPP実験は、より高い関与の標的を同定することを目的としている。さらに、これらのタンパク質には、直接的なニンボリド標識されたタンパク質との相互作用を介して間接的に濃縮される可能性のあるプローブ特異的標的またはタンパク質が含まれる場合がある。それにもかかわらず、100nMまで低下した場合でも、RNF114が乳癌細胞におけるニンボリドールキンプローブに関与すること、およびニンボリドの抗増殖効果が少なくとも部分的にRNF114によって媒介されることを示す。

【0736】

RNF114の機能に対するニンボリドの影響。RNF114は、基質の中でもとりわけ、腫瘍抑制因子p21をユビキチン化させ、分解することが以前に示されている<sup>17-19</sup>。インビトロで再構成された系において、ニンボリドは、RNF114自己ユビキチン化およびp21ユビキチン化活性の両方を阻害した(図22A~22B)。RNF114C8A突然変異は、基本的なRNF114自己ユビキチン化活性に影響を及ぼさなかったが、ニンボリド処理で観察された阻害を弱めた(図22C)。RNF114の以前の特徴付けは、N末端が基質認識に関与している可能性があることを示唆していた<sup>17</sup>。この前提と一致して、本発明者らは、RNF114と共免疫沈降したp21の量がニンボリドによって減少することを発見し、RNF114の見かけの阻害は、その触媒活性の阻害ではなく、基質認識障害による可能性があることを示唆している(図22D)。さらに、231MFP細胞におけるニンボリド処理により、TP53(p53)レベルが有意に変化することなく、1時間以内にCDKN1A(p21)タンパク質の発現が用量反応的に安定化することを示した(図22E)。観察されたCDKN1Aレベルの上昇は、p21のmRNAレベルがニンボリド処理で変化しなかったため、mRNAレベルの転写下方制御によるものではなかった。RNF114の他の潜在的な基質を同定するために、ニンボリドで処理した231MFP細胞に対してタンデム質量タグ(TMT)ベースの定量的プロテオミクス実験も実施した。ウエスタンブロッティングデータと一致して、CDKN1A(p21)は、ニンボリド処理により2倍を超えて有意に上昇したタンパク質の1つとして観察された(図22F)。また、CDKN1C(p57)、PEG10およびCTGFなど、ニンボリド処理によって高められた他のいくつかの標的レベルも観察された。潜在的なRNF114基質として以前に報告されたCDKN1A(p21)およびCDKN1C(p57)以外に<sup>17</sup>、本発明者らは、PEG10およびCTGFもRNF114の追加の新規基質となる可能性があるかと推測した(図22F)。この前提と一致して、本発明者らは、インビトロRNF114ユビキチン化アッセイにおいて、RNF114がPEG10およびCTGFをユビキチン化させること、およびこのユビキチン化がニンボリドによって阻害されることを実証した(図22G)。p21とp57はいずれも腫瘍抑制因子であり、上昇すると細胞周期の停止およびアポトーシスを促進するため<sup>20, 21</sup>、これらの腫瘍抑制因子の両方の安定化がニンボリドの抗増殖効果の原因である可能性があるかと仮定した。CDKN1A(p21)とCDKN1C(p57)のデュアルノックダウンにより、231MFP乳癌細胞におけるニンボリドを介した抗増殖効果が大幅に低下することを示した(図22H~22I)。まとめると、これらのデータは、ニンボリドが乳癌細胞においてRNF114の天然変性C8と反応して、RNF114-基質認識を妨害し、CDKN1AおよびCDKN1Cなどのその基質のユビキチン化を阻害し、それらを安定化し、乳癌細胞の細胞増殖を低減することを示唆している。

【0737】

RNF114リクルーターとしてのニンボリド。ニンボリドは潜在的な基質認識部位を標的とするため、ニンボリドをRNF114リクルーターとして使用するヘテロ二官能性

分解剤の開発を通じて、プロテアソーム分解のために RNF114 を他のタンパク質基質に動員するためにニンボリドを使用できると推測した。実現可能性を実証するために、ニンボリドをプロモドメインおよび末端外 (BET) ファミリー阻害剤 JQ1 に結合することによって形成された 2 つの分解剤を合成した (図 23A)。以前の研究では、CRBN (セレブロン) リクルーターであるサリドマイドまたは VHL リクルーターのいずれかに結合した JQ1 ベースの分解剤による、BET ファミリーメンバー、特に BRD4、の効率的なプロテアソーム依存性分解が実証されている<sup>22, 23</sup>。以前に調製された酸 (4) は、より長い (PEG ベースの) (7) およびより短い (アルキルベースの) (8) スペーサー単位の両方を含む JQ1 官能化アミンにカップリングされ、分解剤 XH1 (9) および XH2 (10) に到達した (図 23A)。本発明者らは、XH2 が依然として 0.24 μM の IC50 で RNF114 に結合することを示す (図 23B)。XH1 は感知できるほどの BRD4 分解を示さなかったが、231MFP 細胞における XH2 処理は、12 時間の処理後に BRD4 分解をもたらした (図 23C)。興味深いことに、XH2 は 0.1 および 0.01 μM と比較して 1 μM でより少ない分解を示し、MZ1 は 10、1 および 0.1 μM と比較して 20 μM でより少ない分解を示した。これは、VHL リクルーターを利用する JQ1 ベースの分解剤 MZ1 などの他の分解剤で報告した「フック効果」に起因する<sup>9, 22</sup> (図 23C ~ 23D)。BRD4 分解のプロテアソーム依存性を確認するために、本発明者らは、BRD4 の XH2 を介した分解が、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) による細胞の前処理によって弱められることを示した (図 23E)。XH2 を介した BRD4 分解は、E1 ユビキチン活性化酵素阻害剤 (TAK-243) による前処理、または BRD4 阻害剤 JQ1 との事前競合によっても防止された (図 23F)。しかしながら、翻訳阻害剤 (エメチン) による処理は、観察された BRD4 分解の効果を発揮しなかった。XH2 による BRD4 分解が RNF114 の特異的動員によるものであることをさらに実証するために、野生型 (WT) HAP1 細胞の対応物と比較して、RNF114 ノックアウト (KO) HAP1 細胞では、MZ1 ではなく XH2 による BRD4 の分解が観察されなかったことを示した (図 23G ~ 23H)。さらに、HAP1 RNF114 ノックアウト細胞における野生型 RNF114 の再発現が、XH2 による BRD4 分解の回復につながることを示した。XH2 を介したタンパク質分解の選択性は、TMT ベースの定量的プロテオミクスプロファイリング実験を使用してタンパク質発現の変化を評価することで実証された。本発明者らは、XH2 が 231MFP 乳癌細胞において BRD4 を選択的に分解する一方で、他の同定された BET ファミリーメンバーである BRD2 および BRD3 を温存することを示した (図 23I)。注目すべきことに、CDKN1A、CDKN1C、PEG10 および CTGF を含む XH2 処理によってレベルの増加を示すいくつかのタンパク質も観察され、ニンボリド処理のみでレベルが上昇したことが観察された (図 23I)。DSG1、FN1、FLG2 および CASP14 などの上方制御された追加のタンパク質もあった (図 23I)。これらの上方制御されたタンパク質は、CDKN1A、CDKN1C、PEG10 および CTGF の場合と同様に、XH2 のニンボリド部分に由来する安定化を伴う RNF114 の潜在的な基質である可能性がある。他の標的は、JQ1 を介した BRD4 の阻害および分解に起因する下流の転写効果である可能性がある。本発明者らの結果は、RNF114 とのニンボリドの反応性を利用して、この E3 リガーゼを BRD4 などの他のタンパク質基質に動員し、それらをユビキチン化させ、分解することができることを示している。

#### 【0738】

RNF114 に対する共有結合リガンド。RNF114 の C8 は、癌治療および標的タンパク質分解用途に利用される可能性があるという洞察を得て、RNF114 を同様に標的とする、合成するのにより扱いやすい共有結合リガンドを検索した。この目標を達成するために、中程度スループットのゲルベース ABPP アプローチを使用して、RNF114 に対するシステイン反応性共有結合リガンドのライブラリーをスクリーニングした。ここでは、共有結合リガンドを、RNF114 の JNS27 標識と競合させ、続いてローダミン-アジドを付加し、SDS/PAGE およびゲル内蛍光による分析を行う。RNF1

10

20

30

40

50

14に対してスクリーニングされた約200個のシステイン反応性共有結合リガンドのうち、アクリルアミドEN62(11)が有望なヒットとして出現した。EN62はC8依存的にRNF114の自己ユビキチン化活性を阻害した。EN62は、細胞の透過性、効力および選択性の大幅な改善を必要とする初期のヒット化合物であるが、この共有結合リガンドは、標的タンパク質分解用途のためにRNF114のC8を標的とする、合成するのにより扱いやすい共有結合リガンド足場の出発点となる。

#### 【0739】

ニンボリドがRNF114内のC8の基質認識ドメインを標的にして、p21のユビキチン化および分解を阻害し、その安定化につながることで、乳癌の病原性を部分的に低減するという説得力のある証拠を示す。RNF114上のC8のニンボリド標的を使用して、標的タンパク質分解用途のためにRNF114を動員できること、およびニンボリド-JQ1分解剤XH2によるBRD4分解が可能であることを実証する。

#### 【0740】

ここでは、ニンボリドがRNF114と、その内因性基質の1つであるp21との相互作用を妨害することを報告し、p21レベルがp53に依存しない方法で乳癌細胞において急速に安定化することも示す。SCF<sup>SKP2</sup>、CRL4<sup>CDT2</sup>、CHIPなど、他のいくつかのE3リガーゼも、細胞周期または外因性ストレス中、さまざまな条件下でp21を分解することが報告されている<sup>24-26</sup>。以前の研究では、RNF114の発現はG1期後期に上昇して、p21およびp57レベルを調節し、G1期からS期への移行に重要であることが示されている<sup>17</sup>。報告されている他のRNF114基質には、母体から接合体への移行に関与するTAB1と、NF-κB活性およびT細胞活性化に関与するA20が含まれる<sup>27, 28</sup>。したがって、癌の状況または他の細胞および組織の種類では、ニンボリドは、他のRNF114タンパク質基質のレベルを調節することによって追加の活性を有する可能性がある。興味深いことに、CTGFとPEG10は、インサイチュでのニンボリドによる安定化とインビトロでのRNF114によるポリユビキチン化によって実証されるように、RNF114の追加の基質となる可能性があることを示している。これらの追加のタンパク質をRNF114の直接的かつ内因性基質として確立するには、さらなる研究が必要である。さらに、RNF114が少なくとも部分的に増殖および標的タンパク質分解に対する影響を媒介するニンボリドの1つの標的であることを示すが、ニンボリドが多く追加のタンパク質標的を持っている可能性があることもニンボリド-アルキンプローブで示す。これらの追加の標的は、isoTOP-ABPP実験においてIA-アルキンシステイン反応性プローブによって標識されていないシステインとその他の共有相互作用を含む場合があるか、他のアミノ酸との共有結合的相互作用を表す場合があるか、追加のタンパク質標的との可逆的相互作用を表す場合があるか、直接ニンボリド標識されたタンパク質との相互作用から間接的に濃縮されるタンパク質を含む場合がある。ニンボリドが複数の潜在的な標的を持っているにもかかわらず、本発明者らは、RNF114が、標的タンパク質分解用途に利用できる乳癌細胞におけるニンボリドの重要かつ機能的な標的であることを実証している。また、ニンボリドベースの分解剤を使用して観察されたBRD4分解がRNF114を介して駆動されることも説得力を持って示している。

#### 【0741】

本発明者らの結果はまた、ニンボリドがRNF114内の天然変性領域を機能的に標的とすることを実証している。ニンボリドで共有結合的に修飾されたRNF114の構造を解明することはこれまでのところ困難であることが証明されているが、ニンボリドがN末端に秩序を誘導するかどうかを調査する将来の研究は、天然変性し、かつアンドラッグブルなタンパク質標的のリガンド結合性および他のE3リガーゼを標的とする可能性のある戦略への洞察を提供する。

#### 【0742】

標的タンパク質分解は、プロテアソームを介した排除のためにタンパク質を標的とするための困難かつ効果的な創薬パラダイムとして浮上している<sup>9, 10</sup>。しかしながら、課題のうちの1つは、ヒトゲノムにおける約600個のE3リガーゼの中で開発されたE3リ

10

20

30

40

50

ガーゼリクルーターの数が少ないことである<sup>29</sup>。これらのE3リガーゼリクルーターには、セレブロンを動員するサリドマイド型免疫調節薬 (IMiD)、VHLを動員するリガンド、MDM2を動員するnutlin、BIRC2を動員するリガンドが含まれる (cIAP)<sup>9, 10</sup>。ここでは、ニンボリドが標的タンパク質分解用途のための新規RNF114リクルーターとして使用できることを報告する。重要であることがすでに決定されている分子の領域である、さらなるリンカー修飾により、この分解剤クラスの性能を最適化できるはずである。EN62などのRNF114のC8を標的とすることができ合成することにより扱いやすい共有結合リガンドをRNF114リクルーターとして利用することも可能かもしれない。ニンボリドはRNF114内の基質認識ドメインを標的とするため、IMiDに関して報告されているように、ニンボリドが新基質を動員および分解する分子接着剤として機能し得るかどうかを判断することも将来的に興味深い<sup>30</sup>。

#### 【0743】

興味深いことに、それぞれのBETプロモドメインの相同性が高いにもかかわらず、BRD4レベルの大幅な低下につながる条件下でBRD2およびBRD3の分解は観察されなかった。セレブロンおよびVHL動員モジュールを備えたJQ1ベースの分解剤について、BETファミリーメンバー内でのさまざまなレベルの選択性およびその構造的基盤が報告されている<sup>22, 23, 31, 32</sup>。XH2の選択性およびその構造的基盤のより詳細な調査は、この研究の範囲外であるが、所与の基質認識モジュールに対する追加のE3部分の利用可能性が、目的の所与のタンパク質を標的とする分解剤の有効性および選択性の調整にどのように役立つかを示す別の例として役立つ。

#### 【0744】

全体として、本発明者らの研究は、ABPPベースの化学プロテオームプラットフォームを使用して、天然物によって利用される独自のドラッグブルモダリティを特定することの有用性をさらに実証している。興味深いことに、天然物は、潜在的な癌治療および標的タンパク質分解用途のためにE3リガーゼタンパク質間相互作用部位に機能的にアクセスでき、タンパク質の天然変性領域で著しくアクセスできることを示している。本発明者らの研究はまた、共有結合リガンドスクリーニングアプローチを利用して、より複雑な天然物と同様に作用する合成することにより扱いやすい小分子を同定し、共有結合リガンドが他のE3リガーゼにアクセスしてE3リガーゼリクルーターの範囲を拡大できる可能性があることも示している。

#### 【0745】

##### 実施例8方法およびアッセイ

細胞培養。231MFP細胞は、Benjamin Cravatt教授から入手し、前述のようにMDA-MB-231細胞の外植腫瘍異種移植片から生成された<sup>33</sup>。HCC38およびHEK293T細胞は、American Type Culture Collectionから入手した。HEK293T細胞を、10% (v/v) のウシ胎児血清 (FBS) を含有するDMEMで培養し、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。231MFP細胞を、10%のFBSを含有するL15培地で培養し、0%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。HCC38細胞を、10%のFBSを含有するRPMI培地で培養し、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。HAP1 RNF114野生型およびノックアウト細胞株は、Horizon Discoveryから購入した。RNF114のコーディングエクソンにフレームシフト変異が含まれるように、RNF114ノックアウト細胞株を、CRISPR/Cas9によって生成した。HAP1細胞は、10%のFBSおよびペニシリン/ストレプトマイシンの存在下でIscove改変ダルベッコ培地 (IMDM) で増殖させた。

#### 【0746】

生存および増殖アッセイ。細胞の生存および増殖アッセイは、製造元のプロトコルに従ってヘキスト33342色素 (Invitrogen) を使用して以前に記載されたように、および以前に記載されたように実施した<sup>14</sup>。231MFP細胞を96ウェルプレート (生存用に40,000個、増殖用に20,000個) に150 μlの容量で播種し、

一晚接着させた。細胞を、DMSO中に1:250で希釈した1000倍の化合物ストックを含有する追加の50  $\mu$ Lの培地で処理した。適切なインキュベーション期間の後、培地を各ウェルから除去し、10%のホルマリンおよびHoechst 33342色素を含有する100  $\mu$ Lの染色溶液を各ウェルに加え、暗所にて室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、染色液を除去し、画像化する前に、ウェルをPBSで洗浄した。HCC38細胞を用いた研究も上記のように実施したが、生存用に20,000個の細胞および増殖用に10,000個の細胞を播種した。

#### 【0747】

乳癌細胞におけるアポトーシスの評価。アポトーシス細胞は、フローサイトメトリーを使用して、DMSOビヒクルまたは化合物を含有する無血清培地で24時間または48時間処理した細胞において分析した。以前に記載されているように、アネキシンV陽性およびヨウ化プロピジウム陰性の初期アポトーシス細胞とアネキシンV陽性およびヨウ化プロピジウム陽性の後期アポトーシス細胞の割合を測定した<sup>34</sup>。FlowJoソフトウェアを使用してデータ分析を実施した。

#### 【0748】

IsoTOP-ABPPケモプロテオミクス研究。IsoTOP-ABPP研究は、以前に報告されたように行った<sup>12, 14, 15</sup>。細胞をPBS中でプローブ超音波処理して溶解し、タンパク質濃度をBCAアッセイで測定した<sup>35</sup>。インサイチュ実験では、DMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子(1000×DMSOストックから)のいずれかで細胞を90分間処理してから、細胞を収集して溶解した。続いて、プロテオームをIA-アルキン標識(100  $\mu$ M)で室温にて1時間標識した。CuAACは、tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン(1mM)、tris[(1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン(34  $\mu$ M)、硫酸銅(II)(1mM、Sigma)、およびビオチン-リンカー-アジドを順次加えることによって使用し、リンカーを、対照または処理プロテオームの処理のために同位体的に軽いまたは重いバリオンと共にTEVプロテアーゼ認識配列で官能化した。CuAAC後、プロテオームを、6500×gでの遠心分離によって沈殿させ、氷冷メタノール中で洗浄し、1:1の対照/処理比で混合し、再び洗浄し、次いで、変性し、1.2%SDS/PBS中で80℃まで5分間加熱することによって再可溶化した。不溶性成分を、6500×gでの遠心分離によって沈殿させ、可溶性プロテオームを5mLの0.2%SDS/PBS中に希釈した。4℃で一晩回転させながら、標識タンパク質を、アビジン-アガロースビーズ(170  $\mu$ Lの再懸濁ビーズ/サンプル、Thermo Pierce)に結合させた。ビーズ結合タンパク質を、PBSおよび水でそれぞれ3回洗浄することにより濃縮し、次いで、6M尿素/PBS(Sigma)に再懸濁し、TCEP(1mM、Sigma)中で還元し、ヨードアセトアミド(IA)(18mM、Sigma)でアルキル化し、次いで、洗浄し、2M尿素に再懸濁し、0.5  $\mu$ g/ $\mu$ Lのシークエンシンググレードのトリプシン(Promega)で一晩トリプシン処理した。トリプシンペプチドを溶出した。ビーズをPBSおよび水でそれぞれ3回洗浄し、TEV緩衝液(水、TEV緩衝液、100  $\mu$ Mジチオスレイトール)で洗浄し、Ac-TEVプロテアーゼを含む緩衝液に再懸濁し、一晚インキュベートした。ペプチドを、水で希釈し、ギ酸(1.2M、Spectrum)で酸性化し、分析用に調製した。

#### 【0749】

質量分析。全てのケモプロテオミクス実験由来のペプチドを、4cmのAqua C18逆相樹脂(Phenomenex番号04A-4299)を充填した内径250  $\mu$ mの溶融シリカ毛细管に加圧装填し、これは、10分間かけて100%緩衝液Aから100%緩衝液Bの勾配を使用したAgilent 600シリーズHPLC上で事前に平衡化し、その後、100%緩衝液Bで5分間洗浄し、100%緩衝液Aで5分間洗浄したものであった。その後、サンプルを、IsoTOP-ABPP研究のために、10cmのAqua C18逆相樹脂および3cmの強カチオン交換樹脂を充填した13cmのレーザーブルカラムへのMicroTee PEEK 360  $\mu$ mのフィッティング(Thermo

10

20

30

40

50



Fisher Scientific #p-888) を使用して付着させた。サンプルを、500mM酢酸アンモニウム水溶液の0%、25%、50%、80%、および100%の塩バンブを使用し、かつ緩衝液A中5~55%緩衝液Bの勾配(緩衝液A:95:5の水:アセトニトリル、0.1%ギ酸、緩衝液B:80:20のアセトニトリル:水、0.1%ギ酸)を使用した、5段階多次元タンパク質同定技術(MudPIT)プログラムを使用したQ Exactive Plus質量分析計(Thermo Fisher Scientific)を使用して分析した。データを、動的排除を有効にして(60秒)、データ依存型取得モードで収集した。1回のフルMS(MS1)スキャン(400~1800m/z)を行い、続いて、n番目に最も豊富なイオンの15回のMS2スキャン(ITMS)を行った。加熱キャピラリー温度を200℃に設定し、ナノスプレー電圧を2.75kVに設定した。

10

【0750】

データは、Raw Extractor 1.9.9.2(Scripps Research Institute)を使用してMS1およびMS2ファイルの形式で抽出し、IP2 v.3(Integrated Proteomics Applications, Inc)のProLuCID検索方法論を用いてUniprotヒトデータベースに対して検索した<sup>36</sup>。システイン残基を、カルボキシアミノメチル化についての静的修飾(+57.02146)およびメチオニン酸化についての最大2つの特異的修飾、および軽または重TEVタグ(それぞれ、+464.28596または+470.29977)で検索した。ペプチドは、完全にトリプシンペプチドであり、TEV修飾を含有することが必要とされた。ProLuCIDデータを、DTASelectを通してフィルター処理して、5%未満のペプチド偽陽性率を達成した。3つの生物学的複製のうちの2つにおいて明らかであったプローブ修飾ペプチドのみを、それらの同位体の軽対重比について解釈した。2を超える比を示したプローブ修飾ペプチドについては、3つの生物学的複製全てに存在し、統計的に有意であり、全ての生物学的複製にわたって高品質のMS1ピーク形状を示した標的のみを解釈した。軽い同位体プローブと重い同位体プローブで修飾されたペプチドの比は、ペプチドに関連する全てのペプチドスペクトル一致(PSM)について、各複製の対になった軽い前駆体と重い前駆体の存在量の比の平均を取ることで計算される。対になった存在量は、対になった存在量内の不変性および処置と対照との間の変化の有意性を推定するために、対応のあるサンプルのt検定のp値を計算するためにも使用された。P値を、Benjamini/Hochberg法を使用して補正した。

20

30

【0751】

231MFP細胞におけるRNA干渉(RNAi)によるRNF114、CDKN1A(p21)およびCDKN1C(p57)のノックダウン。RNAiは、デュアルノックダウン用にDharmaconから購入したRNF114またはp21およびp57に特異的なsiRNAを使用して実施した。簡単に述べると、96ウェルフォーマットにおいて、231MFP細胞を、完全培地1mLあたり $5 \times 10^4$ 個の細胞密度で播種した。0日目に、48時間、トランスフェクション試薬としてDharmafect 1(Dharmacon)を使用して、対応する低分子干渉RNA(siRNA)と非標的化陰性対照(Dharmacon、ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10-05)デュプレックスを50nM、231MFP細胞にトランスフェクトした。その後(2日目)、トランスフェクション培地に新鮮なDMSOまたは化合物を含有する完全なL15培地を補充し、さらに24~48時間培養した後、上記のように細胞生存率試験を行った。処理時(2日目)に、qRT-PCRによる分析のためにRNAを抽出し、ノックダウンのウエスタンブロットティング確認のために溶解物を取得した。

40

【0752】

標的配列:

siRNF114-1: GUGUGAAGGCCACCAUUA (配列番号: 10)  
(Dharmacon J-007024-08-0002)

50

s i R N F 1 1 4 - 2 : G C U U A G A G G U G U A C G A G A A (配列番号 1 1) (Dharmacon J-007024-05-0002)

s i R N F 1 1 4 - 3 : G C A C G G A U A C C A A A U C U G U (配列番号 1 2) (Dharmacon J-007024-06-0002)

s i C D K N 1 A : A G A C C A G C A U G A C A G A U U U (配列番号 1 3) (Dharmacon J-003471-12-0002)

s i C D K N 1 C : C U G A G A A G U C G U C G G G C G A (配列番号 1 4) (Dharmacon J-003244-13-0002)

【0753】

qPCRによる遺伝子発現。Trizol (Thermo Fisher Scientific) を使用して、細胞からトータルRNAを抽出した。MaximaRT (Thermo Fisher Scientific) を使用してcDNAを合成し、CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad) 上で、Fisher Maxima SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) の製造元のプロトコルを使用したqPCRによって、遺伝子発現を確認した。Fisher Maxima SYBR Greenのプライマー配列は、Primer Bankから得た。プライマーの配列は次の通りである。

RNF114フォワード: AAT GTT CCA AAC CG (配列番号 6)

RNF114リバース: TTG CAG TGT TCC AC (配列番号 7)

CDKN1Aフォワード: TGT CCG TCA GAA CCC ATG C (配列番号 15)

CDKN1Aリバース: AAA GTC GAA GTT CCA TCG CTC (配列番号 16)

PPIA (シクロフィリン) フォワード: CCC ACC GTG TTC TTC G AC ATT (配列番号 8)

PPIA (シクロフィリン) リバース: GGA CCC GTA TGC TTT AGG ATG A (配列番号 9)

【0754】

qPCRによる遺伝子発現。遺伝子発現を、Fisher Maxima SYBR Greenの製造元のプロトコルを使用したqPCRによって確認した。Fisher Maxima SYBR Greenのプライマー配列は、Primer Bankから得た。プライマーの配列は次の通りである。

RNF114フォワード: AAT GTT CCA AAC CG (配列番号 6)

RNF114リバース: TTG CAG TGT TCC AC (配列番号 7)

PPIA (シクロフィリン) フォワード: CCC ACC GTG TTC TTC G AC ATT (配列番号 8)

PPIA (シクロフィリン) リバース: GGA CCC GTA TGC TTT AGG ATG A (配列番号 9)

【0755】

ゲルベースのABPP。ゲルベースのABPP方法を、以前に記載されたように実施した<sup>14</sup>。純粋な組換えヒトタンパク質はOrigeneから購入した。純粋なタンパク質 (0.1 μg) をDMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する小分子で室温にて30分間、50 μLのPBSのインキュベーション容量で前処理し、続いてJNS-1-27 (最終濃度50 μM) で室温にて1時間処理した。CuAACを実施して、ローダミンアジド (最終濃度1 μM) をアルキンプローブ標識タンパク質に付加した。次に、サンプルを20 μLの4×還元Laemmli SDSサンプルローディング緩衝液 (Alfa Aesar) で希釈し、90℃で5分間加熱した。サンプルを、プレキャスト4~20% TGXゲル (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で分離した。Chemidoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc) でスキャンする前に、ゲルを10%酢酸、30%エタノールの溶液で2時間固定した。標的標識の阻害は

10

20

30

40

50

、Image Jを使用したデンストメトリーによって評価した。

【0756】

共有結合リガンドライブラリー。RNF114に対してスクリーニングされた共有結合リガンドの大半の合成および特徴付けは、以前に報告されている<sup>14, 37-39</sup>。TRH1-156、TRH1-160、TRH1-167、YP1-16、YP1-22、YP1-26、YP1-31、YP1-44の合成は以前に報告されている<sup>40-47</sup>。「EN」で始まる化合物は、Enamine LLCから購入した。以前に報告されていない他の共有結合リガンドの合成および特徴付けは、実施例9に記載されている。

【0757】

ウエスタンブロットティング。RNF114 (Millipore Sigma、HPA021184)、p21 (Cell Signaling Technology、12D1)、GAPDH (Proteintech Group Inc.、60004-1-Ig)、BRD4 (Abcam plc、Ab128874)、DYKDDDDKタグ (Cell Signaling Technology、D6W5B) およびベータアクチン (Proteintech Group Inc.、6609-1-Ig) に対する抗体は、さまざまな商業的供給元から入手し、推奨される製造元の手順に従って希釈液を調製した。タンパク質をSDS/PAGEによって分離し、iBlotシステムを使用してニトロセルロース膜に移した。ブロットを、Tween 20 (TBST) 溶液を含有するTris緩衝生理食塩水中の5% BSAを用いて室温で1時間ブロックし、TBST中で洗浄し、製造元が推奨する希釈剤で希釈した一次抗体を用いて4℃で一晩プローブした。TBSTで洗浄した後、ブロットを、Lycorから購入した二次抗体と共に暗所でインキュベートし、TBST中の5% BSA中に1:10,000の希釈で室温にて使用した。さらに洗浄した後、Odyssey Li-Cor スキャナーを使用してブロットを可視化した。追加の一次抗体のインキュベーションが必要な場合は、ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (EMD Millipore、2504) を使用して膜をストリッピングし、洗浄して再度ブロックしてから、一次抗体と再インキュベートした。

【0758】

野生型およびC8A突然変異体RNF114タンパク質の発現および精製。RNF114は、いくつかの方法を使用して発現させ、精製した。いずれの場合も、RNF114の活性およびニンボリドに対する感受性を確認した。最初の方法では、C末端にFLAGタグが付いた野生型哺乳動物発現プラスミドをOrigene (Origene Technologies Inc.、RC209752) から購入した。RNF114 C8A突然変異体は、製造元の指示に従って、Q5部位特異的変異誘発キットを用いて (New England Biolabs、E0554S) 生成した。以前に報告されたように、発現および精製条件を最適化した<sup>48</sup>。HEK293T細胞を、10%のFBS (Corning) および2mMのL-グルタミン (Life Technologies) を補充したDMEM (Corning) 中で60%の密集度まで増殖させ、5%のCO<sub>2</sub>で37℃に維持した。トランスフェクションの直前に、培地を、5%のFBSを含有するDMEMと置き換えた。各プレートに、100 μgのPEIを含む20 μgの過剰発現プラスミド (Sigma) をトランスフェクトした。48時間後、細胞をTBSTに回収し、超音波処理により溶解し、抗DYKDDDDK樹脂 (GenScript、L00432) で90分間バッチ結合した。溶解物と樹脂を重力フローカラムに装填して洗浄した後、250 ng/μLの3×FLAGペプチド (Apex Bio、A6001) で溶出した。純度および濃度を、PAGE、UV/分光法、およびBCAアッセイによって確認した。

【0759】

2番目の方法では、RNF114の完全なヒトアイソフォーム (Uniprot id: Q9Y508) をコードするDNAを、E. coliでの発現用にコドン最適化し、Integrated DNA Technologiesによって合成した。完全なRNF114配列を含む構築物は、NdeI制限部位とBamHI制限部位との間にHis8-

10

20

30

40

50

MBP-TEV配列も含むpET24aプラスミド (Novagen) と相同な20塩基対を含むプライマーを使用して増幅した。PCR用の産物は1%アガロースゲル (Invitrogen) を使用して評価し、QIAquick Gel Extractionキット (Qiagen) を使用して、正しい長さのPCR産物を精製した。精製したPCR産物を、Gibson Assembly (NEB Gibson Assembly 2x Master Mix) を使用して線形化ベクターにアセンブルした。次に、このベクターを化学的にコンピテントなE. coli 10G細胞 (Lucigen、ウィスコンシン州ミドルトン) に形質転換した。カナマイシン (Kan) 耐性コロニーをLB培地で増殖させ、Miniprep (Qiagen) キットを使用してプラスミドを単離した後、適切なプライマーで配列を確認した。

10

【0760】

所望のRNF114構築物を含むpET24a His<sub>8</sub>-MBPプラスミド (100 ng) を、化学的にコンピテントなE. coli BL21 (DE3) 細胞 (NEB製品番号C2530H) に形質転換した。翌日、単一の形質転換コロニーを使用して、カナマイシン (50 µg/mL) を含む栄養豊富なLB培地50 mLに接種し、攪拌しながら (250 rpm) 37°Cで一晩インキュベートした。翌朝、一晩のスターター培養物を、50 mMの3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) (pH 7.5)、1 mMの塩化亜鉛およびKan (50 µg/mL) を含有するTerrific Broth (TB) (1 L) 中、500 nMでの開始光学密度 (OD<sub>600</sub>) が0.1になるまで接種した。250 rpmで攪拌しながら37°Cで、OD<sub>600</sub>が0.8に達するまで、細胞を増殖させた。この段階で、RNF114融合タンパク質の発現を1 mMのイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導し、インキュベーターの温度を18°Cに下げた。18°Cで18時間増殖させた後、遠心分離により細胞を回収した。続いて、細胞を1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 緩衝液で洗浄し、-20°Cで保存した。

20

【0761】

過剰発現したRNF114融合タンパク質を含有するE. coli細胞 (10 g) を、80 mLの溶解緩衝液 (50 mMのTris (pH 7.5)、150 mMのNaCl、2個のRocheプロテアーゼ阻害剤錠剤 [EDTA含まず]、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、1 mMのDTT) に再懸濁し、氷上で超音波処理し、サイクル時間はオン60秒、オフ60秒で、合計超音波処理時間は3分であった。細胞溶解物を18,000 rpmで20分間遠心分離し、可溶性タンパク質を、洗浄緩衝液 (50 mMのTris (pH 7.5)、150 mMのNaCl、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、1 mMのDTT、25 mMのイミダゾール) で事前に平衡化した2 mLのNi-NTA樹脂とともに4°Cで4時間攪拌しながらインキュベートした。細胞溶解物/Ni-NTA樹脂混合物をディスプレイカラムに入れ、樹脂に結合しない全てのタグなし可溶性タンパク質を収集して、2回目の精製を行った。樹脂を洗浄緩衝液25 mLで洗浄した後、His-MBP-RNF114タンパク質を、25 mLの溶出緩衝液 (50 mMのtris (pH 7.5)、500 mMのイミダゾール、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、150 mMのNaCl、1 mMのDTT) でNi-NTA樹脂から溶出した。このプロセスを繰り返し、収集したフローを、さらに2 mLの事前平衡化Ni-NTA樹脂とともに完全にインキュベートした。

30

40

【0762】

His-MBP-RNF114タンパク質を、TEVプロテアーゼ (100単位/mg (MBP-RNF114)) で同時に4°Cで消化し、透析緩衝液 (50 mMのtris (pH 7.5)、150 mMのNaCl、200 mMのZnCl<sub>2</sub>、1 mMのDTT) に対して一晩透析した。翌朝、タンデムに組み立てた2つの5 mL His Trap Excelカラムを、Aktavant上に置き、5カラム容量の洗浄緩衝液で平衡化した。TEVで切断されたサンプルを2 mL/分の速度でカラムに装填し、樹脂をさらに5カラム容量の洗浄緩衝液で洗浄した。切断されたRNF114を含む全ての画分を、5 mLの容量に濃縮した。次に、サンプルを事前に平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75ゲル濾過カラム (GE Healthcare) に装填した。カラムは、

50

25mMのTris (pH7.5)、137mMのNaClまたは20mMのリン酸ナトリウム (pH6.8)、150mMのNaClのいずれかで事前に平衡化した。0.25 mL/分の流速を使用してゲル濾過カラムを実行し、2mLの画分を収集した。ゲル濾過カラムから溶出するピークに対応する画分をSDS-PAGEを使用して分析し、RNF114を含む全ての画分を最終濃度10mg/mLに濃縮し、液体窒素で瞬間冷凍し、必要になるまで-80℃で保存した。

#### 【0763】

レンチウイルス形質導入による、安定して発現するFLAG-RNF114 231MFP細胞株の生成。FastCloningにより、C末端にFLAGタグを有するヒトRNF114をpLentiベクターに挿入した<sup>49</sup>。FLAG-RNF114レンチウイルスは、Lipfectamine 2000トランスフェクション試薬 (ThermoFischer) を使用して、FLAG-RNF114、VSV-GおよびpSPAX2をHEK293T細胞に共トランスフェクトすることによって生成した。トランスフェクション培地を10%熱不活化血清 (HIS) を含むDMEMに交換してから24時間後、およびさらに24時間後、ウイルス含有培地を収集し、10μg/mLのポリブレン (Santa Cruz) の存在下、0.45μMフィルターで等量のHIS L15培地を含む231MFP細胞に濾過した。形質導入の24時間後、ピューロマイシン (2μg/mL) を細胞に加え、ピューロマイシンを72時間選択した後、安定して発現するFLAG-RNF114が得られた。FLAG-eGFPを安定して発現する231MFP細胞を対照として並行作製した。

#### 【0764】

ニンボリドールキンプローブのインサイチュ標識およびFLAG-RNF114プルダウン。FLAG-RNF114を安定して発現する231MFP細胞を、ビヒクル (DMSO) または100nM~10μMのニンボリドールキンプローブで2~4時間処理した。細胞をPBSで回収し、超音波処理により溶解した。溶解物の総タンパク質濃度をBCAアッセイで正規化し、正規化した溶解物を50μLまたはFLAG-アガローススラリーとともに4℃で1.5時間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルをスピンカラムに移し、500μLのPBSで3回洗浄した。250ng/μLの3×FLAGペプチド (ApexBio A6001) を補充したPBSの250μL洗浄液を使用してタンパク質を溶出した。CuAACを実施して、ローダミンアジドをアルキンプローブ標識タンパク質に付加し、ローディング緩衝液の添加後、サンプルをプレキャスト4~20%TGXゲル (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で分離し、ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc) で画像化した。

#### 【0765】

RNF114のLC-MS/MS分析。50μLのPBS中の精製RNF114 (10μg) を、DMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する化合物 (100μM) のいずれかとともに室温で30分間インキュベートした。次に、DMSO対照を軽IAで処理しつつ、化合物で処理したサンプルを重いIAと室温でそれぞれ1時間インキュベートした (200μMの最終濃度、Sigma-Aldrich, 721328)。12.5μLの100% (w/v) TCAを加えてサンプルを沈殿させ、処理群と対照群をペアで組み合わせながら、-80℃で1時間冷却した。次に、合わせたサンプルを最高速度にて4℃で10分間回転させ、上澄みを注意深く除去し、サンプルを氷冷した0.01M HCl/90%アセトン溶液で洗浄する。ペレットを、0.1%のProtease Max (Promega Corp., V2071) を含有する4Mの尿素に再懸濁し、40mMの重炭酸アンモニウム緩衝液で希釈した。サンプルを、60℃で30分間10mMのTCEPで還元させた。次に、サンプルをPBSで50%希釈した後、シーケンシンググレードのトリプシン (サンプルあたり1μg、Promega Corp., V5111) を加えて、37℃で一晩インキュベートした。翌日、サンプルを13200rpmで30分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、最終濃度が5%ギ酸になるように酸性化し

、MS分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0766】

RNF114ユビキチン化アッセイ。組換えMyc-Flag-RNF114タンパク質を、上記のようにHEK292T細胞から精製するか、Origene (Origene Technologies Inc.、TP309752) から購入した。インビトロ自動ユビキチン化アッセイのために、 $25\mu\text{L}$ のTBS中の $0.2\mu\text{g}$ のRNF114をDMSOビヒクルまたは共有結合的に作用する化合物と室温で30分間プレインキュベートした。続いて、 $0.1\mu\text{g}$ のUBE1 (Boston Biochem. Inc、E-305)、 $0.1\mu\text{g}$ のUBE2D1 (Boston Biochem. Inc、e2-615)、 $5\mu\text{g}$ のFlag-ユビキチン (Boston Biochem. Inc、u-120) を、 $2\text{mM}$ のATP、 $10\text{mM}$ のDTT、および $10\text{mM}$ の $\text{MgCl}_2$ を含む総量 $25\mu\text{L}$ のTris緩衝液に加えて、最終容量を $50\mu\text{L}$ にした。基質タンパク質ユビキチン化アッセイでは、商業的供給元から購入した $0.1\mu\text{g}$ の適切な基質タンパク質をこの段階で加えた (p21およびPEG10: Origene、CTGF: R&D Systems)。混合物を $37^{\circ}\text{C}$ で1.5時間攪拌しながらインキュベートした。 $20\mu\text{L}$ のLaemmli緩衝液を加えて反応をクエンチし、タンパク質をウエスタンブロットアッセイによって分析した。

【0767】

RNF114 / p21の共免疫沈降。組換えFlagタグ付きRNF114を餌として使用して、Anti-Flagアガロースビーズ (GenScript Biotech Corp.、L00432) を用いて純粋な組換えp21 (Origene Technologies Inc.、TP309752およびTP720567) を沈殿させた。 $1\mu\text{g}$ のFlag-RNF114を $50\mu\text{L}$ のTBSに加え、続いてニンボリド ( $100\mu\text{M}$ の最終濃度、Cayman Chemical Co.、19230) または等量のDMSOを加えた。サンプルを室温で30分間インキュベートした。 $1\mu\text{g}$ の純粋なp21を各サンプルに加え、サンプルを室温で30分間攪拌しながらインキュベートした。 $10\mu\text{L}$ のアガロースビーズを各サンプルに加え、サンプルを室温で30分間攪拌した。洗浄 (3回、 $1\text{mL}$ のTBS) を実施してから、 $250\text{ng}/\mu\text{L}$ の $3\times\text{FLAG}$ ペプチド (Apex Bio A6001) を補充した $50\mu\text{L}$ のTBSを使用してタンパク質を溶出した。上清 ( $30\mu\text{L}$ ) を回収し、Laemmli還元剤 ( $10\mu\text{L}$ ) を加えた後、サンプルを $95^{\circ}\text{C}$ で5分間煮沸し、放冷した。上記のように、サンプルをウエスタンブロットティングによって分析した。

【0768】

ニンボリド-アルキンプローブのインサイチュ標識およびビオチン-アジドプルダウン。実験は、以前に記載されたプロトコルの適応に従って実施した<sup>50</sup>。231MFP細胞をビヒクル (DMSO) または $50\mu\text{M}$ ニンボリドアルキンプローブのいずれかで90分間処理した。細胞をPBSにおいて回収し、超音波処理により溶解した。ウエスタンブロットティングサンプルの調製のために、 $25\mu\text{L}$ の $10\%$  SDS、 $5\mu\text{L}$ の $5\text{mM}$ ビオチンピコリアジド (900912 Sigma-Aldrich) および $25\mu\text{L}$ のクリック反応ミックス (3部のTBTA、ブタノール: DMSO (4:1、v/v) 中 $5\text{mM}$ のTBTA、1部の $50\text{mM}$   $\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4$ 溶液、および1部の $50\text{mM}$  TCEP) を含むサンプルあたり $195\mu\text{L}$ の溶解物を分注した。サンプルを穏やかに攪拌しながら $37^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートした後、 $1.2\text{mL}$ の氷冷アセトンを加えた。 $-20^{\circ}\text{C}$ で一晩沈殿させた後、サンプルを予冷した遠心分離機において $1250\text{g}$ で10分間回転させ、過剰なアセトンを吸引し、次いで、プローブ超音波処理により $1\%$  SDSを含む $200\mu\text{L}$ のPBSにおいてタンパク質ペレットを再構成した。この段階で、総タンパク質濃度をBCAアッセイによって決定し、サンプルを $230\mu\text{L}$ の総量に対して正規化し、 $30\mu\text{L}$ が入力として予約した。 $20\mu\text{L}$ の事前に洗浄した $50\%$  ストレプトアビジンアガロースビーズスラリーを各サンプルに加え、サンプルを穏やかに攪拌しながら室温で一晩インキュベートした。上清 $90\text{g}$ を室温で2分間スピン回転させた後、各サンプルから吸引

10

20

30

40

50

した。ビーズをスピнкаラムに移し、PBSで3回洗浄した。溶出するために、ビーズを50  $\mu$ LのLDSサンプル緩衝液で5分間煮沸した。遠心分離によって溶出液を収集し、イムノブロットティングによって分析した。得られたサンプルは、TMTベースの定量的プロテオミクスプロファイリングのセクションで以下に説明するように分析した。

【0769】

TMTベースの定量的プロテオミクスプロファイリング。

【0770】

細胞溶解、タンパク質分解および等圧標識。処理された細胞ペレットは、市販のPierce (商標) Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific、P/N 84840) を使用して、製造元の指示に従って溶解および消化した。簡単に説明すると、各サンプルからの100  $\mu$ gのタンパク質を還元し、アルキル化し、エンドプロテイナーゼLys-Cとトリプシンプロテアーゼの組み合わせを使用して一晩消化した。次に、市販のTandem MassTag (商標) 6-plex (TMTsixplex (商標)) (Thermo Fisher Scientific、P/N 90061) またはTMT11plex (TMT11plex (商標)) 等圧標識試薬 (Thermo Fisher Scientific、P/N 23275) キットを使用して、メーカーのプロトコルに従って、個々のサンプルを等圧タグで標識した。

【0771】

高pH逆相分離。次に、タンデム質量タグ標識 (TMT) サンプルを統合し、前述のように画分を収集する高pH逆相クロマトグラフィー (RP-10) を使用して分離した<sup>50</sup>。画分をspeed-vac乾燥し、再構成して24画分を生成し、後続のオンラインナノLC-MS/MS分析に使用した。

【0772】

ナノLC-MS/MSによるタンパク質の同定および定量。再構成したRP-10画分を、EasyLC1200 HPLCシステム (Thermo Fisher Scientific) に連結したThermo Orbitrap Fusion Lumos Mass Spectrometer (Xcalibur 4.1、Tune Application 3.0.2041) で分析した。EasyLC1200には、96ウェルプレート用にセットアップされた20  $\mu$ Lのループが装備されていた。ReproSil-Pur 120 C18-AQ、5  $\mu$ mの材料 (15mmのベッド長) を充填したKasilフリットトラッピングカラム (75  $\mu$ m ID) を、長さ160mm、内径75  $\mu$ mのスプレーキャピラリーと共に使用し、P-2000キャピラリーブラー (Sutter Instruments、カリフォルニア州ノバート) を使用して先端の直径を約8~10  $\mu$ mまで引き上げた。160mm分離カラムには、ReproSil-Pur 120 C18-AQ、3  $\mu$ mの材料 (Dr. Maisch GmbH、ドイツ、アンマーブーフエントリンゲン) を充填した。移動相は、A=0.1%ギ酸/2%アセトニトリル (v/v)、および移動相B=0.1%ギ酸/98%アセトニトリル (v/v) で構成されていた。サンプル (18  $\mu$ L) を、移動相Aを使用して2.5  $\mu$ L/分の流速でトラッピングカラムに注入した。次に、キャピラリー分離カラムで、300 nL/分の流量にて、80分のグラジエントを使用してペプチドを溶出した (5分間は2%の移動相B、5~65分は2%~40%の移動相B、続いて65~70分は70%の移動相B、70~80分は2%移動相Bに戻る) (質量分析計に直接スプレー)。同期プリカーサーズキャンMS<sup>3</sup>モード (SPS-MS3) を使用して、データ依存モードのOrbitrap Fusion Lumos Mass Spectrometerでデータを取得し、MS<sup>2</sup>は、完全なMS調査スキャンイベントで検出された300~1500の質量電荷比 (m/z) 範囲内の12個の最も強いプリカーサーイオンに対してトリガーされた。MSスキャンは、4 $\times$ 10<sup>5</sup>個のイオンの標的値、および50ミリ秒の最大充填時間を使用して、m/z 400で60,000の質量分解能 (R) で取得された。MS<sup>2</sup>スキャンは、1 $\times$ 10<sup>4</sup>個のイオンの標的値、50ミリ秒の最大充填時間、および2 Daの分離ウィンドウを使用して、C

10

20

30

40

50

IDイオントラップ (IT) ラピッドタイプスキャンとして取得された。データ依存的MS<sup>3</sup>スペクトルは、m/z 100~500の走査範囲で、トップ10のMS<sup>2</sup>ドーター選択 (Top 10 MS<sup>2</sup> daughter selection)、5×10<sup>4</sup>個のイオンの自動利得制御 (AGC) 標的値を使用して、Orbitrap (OT) スキャンとして取得された。MS<sup>3</sup>の最大注入時間は86ミリ秒で、HCD衝突エネルギーは65%に設定した。MS<sup>3</sup>の質量分解能 (R) を、TMT6plex実験ではm/z 400で15,000に設定し、TMT11plex実験ではm/z 400で50,000に設定した。動的除外を、選択したプリカーサーを60秒間、繰り返し回数1で除外するように設定した。ナノスプレー電圧を2.2 kVに設定し、加熱したキャピラリー温度を300℃に設定し、SレンズのRFレベルは30%に等しかった。シースまたは補助ガスフローは適用されない。

#### 【0773】

データ処理および分析。取得したMSデータを、ペプチドスペクトル一致フィルタリング用のパーコレーター検証ノードと共に、Mascot v 2.5.1検索エンジン (Matrix Science、英国、ロンドン) を利用したProteome Discoverer v. 2.2.0.388ソフトウェア (Thermo) を使用して処理した<sup>51</sup>。一般的な汚染物質の配列を補足したUniProtタンパク質データベース (標準的なヒトおよびマウスの配列、EBI、英国、ケンブリッジ) に対してデータを検索した。ペプチド検索トレランスを、前駆体では10 ppm、断片では0.8 Daに設定した。トリプシン切断特異性 (K、Rでの切断 (その後Pが続く場合を除く)) により、最大2つの切断の失敗が許容された。システインのカルバミドメチル化は固定修飾、メチオニン酸化として設定され、N末端およびリジン残基のTMT修飾は可変修飾として設定された。ペプチドおよびタンパク質の同定に関するデータ検証を、Proteome Discovererのパーコレーター検証ノードを介して、実験ごとに全ての個々のサンプルのマスコット検索結果を組み合わせた完全なデータセットのレベルで行った。レポーターイオン比の計算は、20 ppmウィンドウから選択された最も信頼できる重心を用いて合計存在量を使用して実施した。タンパク質の定量化では、データセット全体の中で同定された所与のタンパク質への一意の割り当てであるペプチドとスペクトルの一致のみが考慮される。信頼性の高いタンパク質の同定は、パーコレーターの推定<1%の偽発見率 (FDR) カットオフを使用して報告された。調整p値を決定するために、Benjamini-Hochberg補正を使用したバックグラウンドベースのANOVAを使用して、存在量の有意差を推定した。

#### 【0774】

##### 実施例9. 追加の合成および特徴付けデータ

ニンボリドーアルキンプローブ (5) と分解剤XH1 (9) およびXH2 (10) の合成および特徴付け

一般的な手順。特に明記しない限り、全ての反応は、オープン乾燥または火炎乾燥したFisherbrand (登録商標) ホウケイ酸ガラス管 (Fisher Scientific、1495925A、13×100mm) で、乾燥窒素雰囲気下で黒色フェノールスクリュウキャップ (13-425) を使用して実施した。乾燥したN,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、トルエンおよびアセトニトリルは、これらの事前に脱気した溶媒を活性アルミナカラムに通すことによって得た。ニンボリドはSigma-AldrichもしくはCayman Chemicalから購入し、さらに精製することなく直接使用した。プロパルギルアミンとN-メチルプロパルギルアミンはFisher Scientificから購入し、さらに精製することなく直接使用した。反応を、TLCシリカゲル60 F<sub>254</sub>ガラスプレート (EMD Millipore) での薄層クロマトグラフィー (TLC) によって監視し、UV照射およびp-アニスアルデヒド、リンモリブデン酸、または過マンガン酸カリウムによる染色によって可視化した。揮発性溶媒は、ロータリーエバポレーターを使用して減圧下で除去した。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、Silicycle F60シリカゲル (60 Å、230~400メッシュ、4

10

20

30

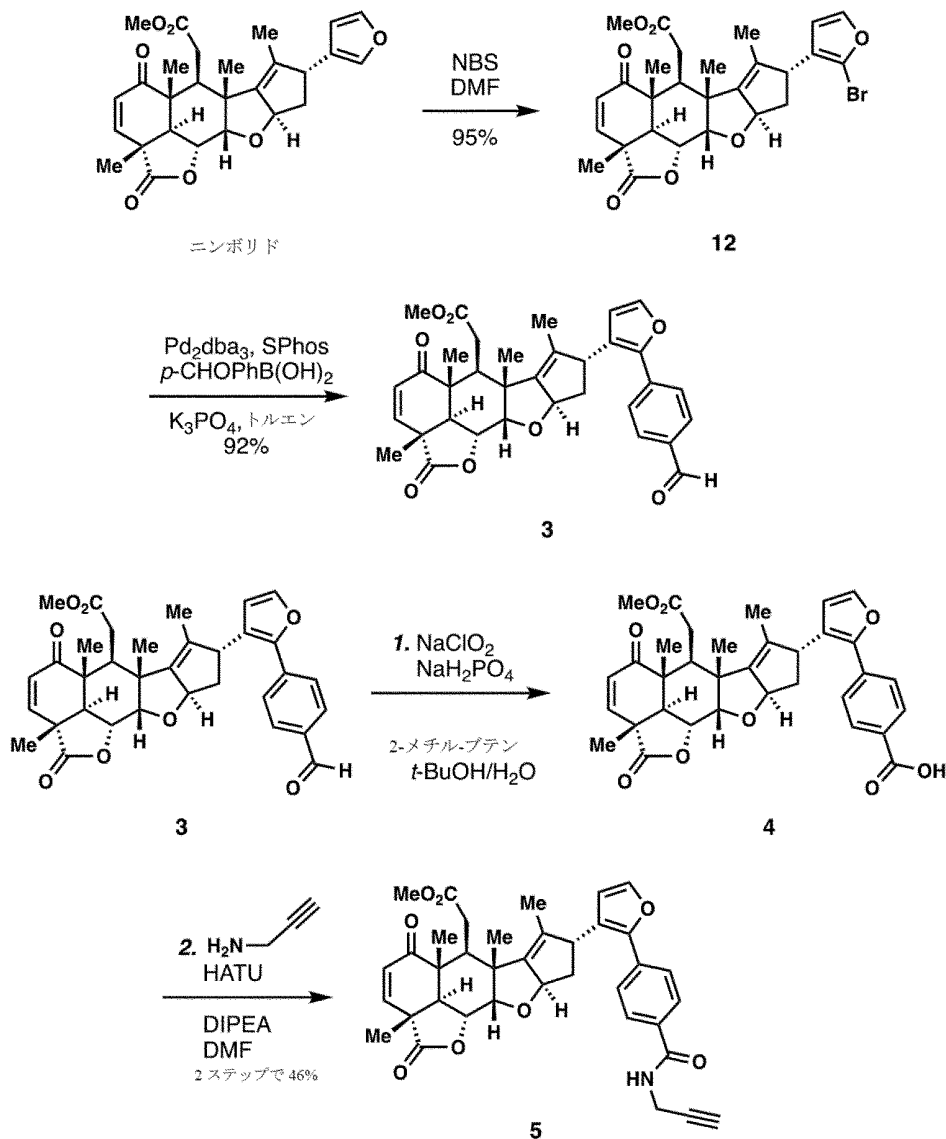
40

50



0～63 μm) を使用して実施した。酢酸エチルとヘキサンはFisher Chemicalから購入し、さらに精製することなくクロマトグラフィーに使用した。プロトン核磁気共鳴 ( $^1\text{H}$  NMR) および炭素核磁気共鳴 ( $^{13}\text{C}$  NMR) スペクトルは、 $^1\text{H}$  の場合は600および700 MHz、 $^{13}\text{C}$  の場合は150および175 MHzで動作するBruker AV-600およびAV-700分光計で記録した。化学シフトは、残留溶媒シグナル $\text{CDCl}_3$ に関して百万分率 (ppm) で報告される ( $^1\text{H}$  NMR:  $\delta = 7.26$ ;  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta = 77.16$ ),  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  ( $^1\text{H}$  NMR:  $\delta = 5.32$ ;  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta = 53.84$ )。ピーク多重度は次のように報告される: s = 一重項、d = 二重項、t = 三重項、dd = 二重項の二重項、tt = 三重項の三重項、m = 多重項、br = ブロードなシグナル、app = 見かけの。IRスペクトルは、Nicolet 380 FT-IR分光計で記録した。高分解能質量スペクトル (HRMS) は、カリフォルニア大学バークレー校のQB3 / 化学質量分析施設によって取得された。旋光度は、Perkin-Elmer 241 旋光計で測定した。

【化290】



【0775】

スキーム S1。ニンボリド-アルキンプローブ (5) の合成。

10

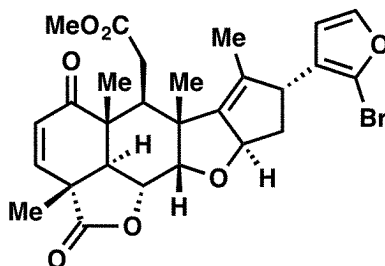
20

30

40

50

## 【化 2 9 1】



10

## 【0 7 7 6】

ブロモニンボリド (12) : ニンボリド (100 mg、0.214 mmol) を4つの反応管 (Fisher Scientific、13×100 mm) に均等に分割し、それぞれに攪拌棒を入れた。チューブを排気し、窒素を再充填し、乾燥DMF (各0.25 mL) を加え、得られた溶液を氷浴で0℃に冷却した。再結晶したN-ブロモスクシンイミド (40.0 mg、0.225 mmol) を乾燥DMF (4 mL) に溶解し、溶液を各反応管 (各1 mL) にゆっくりと加えた。反応混合物を0℃で1時間攪拌し、次に飽和Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>水溶液 (各5 mL) の添加によりクエンチした。得られた混合物を合わせ、EtOAc (3×20 mL) で抽出した。合わせた有機層を、H<sub>2</sub>O (50 mL) およびブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、真空中で濃縮した。粗混合物をカラムクロマトグラフィー (EtOAc : ヘキサン = 1 : 3 ~ 1 : 1) によって精製して、白色フォームとして (12) (111 mg、95%) を得た。

20

## 【数 6】

$$[\alpha]_D^{20}$$

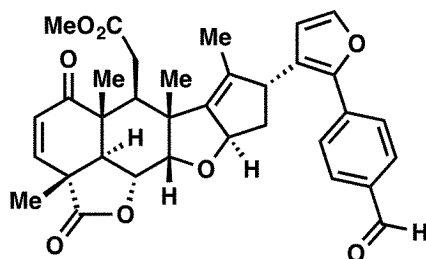
= +190.3° (c 0.010 g/mL, CHCl<sub>3</sub>) ; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.34 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.92 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 5.56 (app. tt, J = 7.4, 1.8 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 12.5, 3.7 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 3.67 (brd, J = 7.0 Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.24 (dd, J = 16.3, 5.5 Hz, 1H), 3.18 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 2.75 (dd, J = 5.5, 5.5 Hz, 1H), 2.36 (dd, J = 16.3, 5.5 Hz, 1H), 2.18–2.13 (m, 2H), 1.66 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H) ; <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.9, 175.0, 173.2, 149.8, 145.4, 144.2, 136.1, 131.2, 125.2, 120.3, 112.1, 88.5, 83.1, 73.5, 52.0, 50.5, 50.0, 47.9, 45.4, 43.8, 41.2, 40.4, 32.2, 18.7, 17.3, 15.3, 13.0 ; IR (薄膜、cm<sup>-1</sup>) 2974, 2929, 2875, 1783, 1734, 1678, 1594, 1438, 1394, 1373 ; HRMS (ESI) 計算値 ([C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>BrNa]<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>の場合) : m/z 567.0989、実測値 : 567.0990。

30

40

50

【化 2 9 2】



【0 7 7 7】

アルデヒド (3) : 反応管 (Fisher Scientific、13×100mm) に、攪拌棒、(12) (12mg、0.022mmol、1当量)、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (10mg、0.011mmol、0.5等量)、SPhos (10mg、0.024mmol、1当量)、無水K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (35mg、0.17mmol、7.5当量) および 4-ホルミルフェニルボロン酸 (16mg、0.11mmol、5当量) を入れた。チューブを排気し、窒素を再充填し、乾燥トルエン (0.5mL) を加えた。得られた混合物を 60℃で 48時間加熱し、室温に冷却し、Celite (登録商標) のプラグに通した。濾液を真空中で濃縮し、カラムクロマトグラフィー (EtOAc : ヘキサン = 1 : 3 ~ 1 : 1) によって精製して、淡黄色油としてアルデヒド (3) (11.5mg、92%) を得た。

【数 7】

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$$

= +4.8° (c 0.005 g/mL, CHCl<sub>3</sub>) ; <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.01 (s, 1H), 7.92 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.71 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.42 (d, J=1.9 Hz, 1H), 7.29 (d, J=9.7 Hz, 1H), 6.39 (d, J=1.9 Hz, 1H), 5.93 (d, J=9.7 Hz, 1H), 5.60 (app. tt, J=7.3, 1.7 Hz, 1H), 4.64 (dd, J=12.5, 3.6 Hz, 1H), 4.32 (d, J=3.6 Hz, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (dd, J=16.4, 5.5 Hz, 1H), 3.20 (d, J=12.5 Hz, 1H), 2.78 (dd, J=5.5, 5.5 Hz, 1H), 2.41 (dd, J=16.4, 5.5 Hz, 1H), 2.31-2.27 (m, 2H), 1.69 (d, J=1.7 Hz, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.25 (s, 3H) ; <sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.8, 191.7, 175.0, 173.2, 149.8, 147.9, 146.3, 143.1, 137.0, 136.1, 134.8, 131.1, 130.3, 126.1, 126.0, 112.6, 88.4, 83.3, 73.4, 52.1, 50.8, 50.0, 47.9, 45.5, 43.8, 41.3, 32.5, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4 ; IR (薄膜、cm<sup>-1</sup>) 2977, 2935, 2873, 1782, 1733, 1702, 1677, 1608, 1438, 1393, 1372 ; HRMS (ESI) 計算値 ([C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>8</sub>Na]<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup> の場合) : m/z 593.2146、実測値 : 593.2154。

[注 : アルデヒド (3) ) は分取 TLC 条件下では安定していない]

10

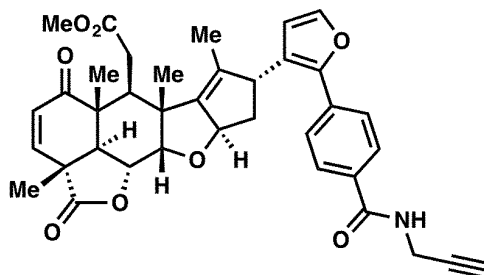
20

30

40

50

## 【化 2 9 3】



10

## 【0 7 7 8】

ニンボリドアルキンプローブ (5) : i. 反応管 (Fisher Scientific、 $13 \times 100$  mm) に、攪拌棒、アルデヒド (3) (7.0 mg、0.012 mmol、1 当量)、および *t*-BuOH と 2-メチル-2-ブテンの混合物 (0.6 mL、3 : 5 v/v) を入れた。 $H_2O$  (0.2 mL) 中の  $NaClO_2$  (3.3 mg、3 当量) および  $NaH_2PO_4$  (13.2 mg、9 当量) の溶液を一度に加え、得られた混合物を室温で 6 時間攪拌した。TLC (EtOAc : ヘキサン = 2 : 1) によって判断されるように反応が完了した後、混合物を EtOAc (10 mL) および飽和  $NH_4Cl$  水溶液 (10 mL) で希釈し、水相を EtOAc (10 mL  $\times$  2) で抽出した。合わせた有機層をブライン (20 mL) で洗浄し、 $MgSO_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗カルボン酸 (4) をさらに精製することなく直接使用した。

20

## 【0 7 7 9】

ii. 攪拌棒、粗酸 (4) (0.012 mmol を想定)、および HATU (13.7 mg、0.036 mmol、3 当量) を入れた反応管 (Fisher Scientific、 $13 \times 100$  mm) に、DMF (0.1 mL) 中の DIPEA (6.4  $\mu$ L、0.036 mmol、3 当量) の溶液を加えた。得られた混合物を  $0^\circ C$  に冷却し、10 分間攪拌した。次に、DMF (0.2 mL) 中のプロパルギルアミン (1.6  $\mu$ L、0.024 mmol、2 当量) の溶液を加え、反応混合物をさらに  $0 \sim 4^\circ C$  で 12 時間攪拌した。TLC (EtOAc : ヘキサン = 2 : 1) によって判断されるように、反応が完了した後、混合物を EtOAc (10 mL) および飽和  $NH_4Cl$  水溶液 (10 mL) で希釈し、水相を EtOAc (10 mL  $\times$  2) で抽出した。合わせた有機層を、 $H_2O$  (20 mL) およびブライン (20 mL) で洗浄し、 $MgSO_4$  で乾燥し、真空中で濃縮した。得られた粗製物を分取 TLC (EtOAc : ヘキサン = 2 : 1) によって精製して、白色固体としてアミド (5) (3.5 mg、2 ステップで 46%) を得た。

30

## 【数 8】

$$[\alpha]_D^{20}$$

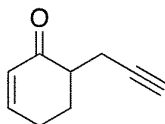
$= +21.5^\circ$  (c 0.002 g/mL,  $CHCl_3$ ) ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.83 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 6.27 (t,  $J=5.2$  Hz, 1H), 5.93 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.60 (app. t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J=12.6, 3.7$  Hz, 1H), 4.31 (d,  $J=3.7$  Hz, 1H), 4.28 (dd,  $J=5.2, 2.6$  Hz, 2H), 4.11 (br d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.25–3.18 (m, 2H), 2.78 (dd,  $J=5.5, 5.5$  Hz, 1H), 2.40 (dd,  $J=16.4, 5.5$  Hz, 1H), 2.32–2.24 (m, 3H), 1.67 (br s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.24 (s, 3H) ;  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  200.8, 175.0, 173.2, 16

40

50

6.6, 149.8, 148.2, 146.1, 142.5, 136.3, 134.7, 132.1, 131.2, 127.6, 126.1, 124.8, 112.3, 88.5, 83.2, 79.6, 73.5, 72.2, 52.1, 50.8, 50.0, 48.0, 45.5, 43.8, 41.3, 41.3, 32.5, 30.0, 18.8, 17.5, 15.3, 13.4; IR (薄膜、 $\text{cm}^{-1}$ ) 3337, 2954, 2921, 2852, 1781, 1734, 1663, 1609; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{NO}_8\text{Na}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$  の場合) :  $m/z$  646.2417、実測値 646.2417。

【化294】



10

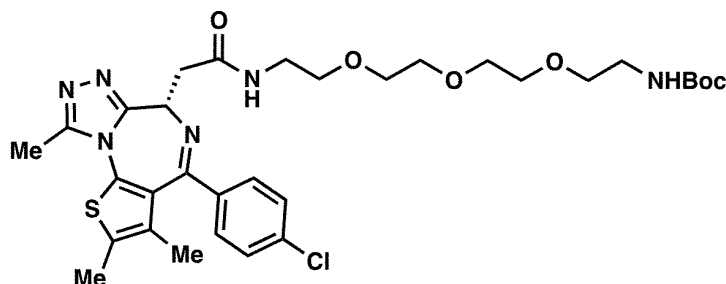
【0780】

JNS27 (6). i. 窒素雰囲気下、 $-78^\circ\text{C}$  でリチウムジイソプロピルアミド (6.0 mL、1.2 当量) の攪拌溶液に、THF (5.0 mL) 中のクリクロヘキセノン (0.48 mL、1 当量) の溶液を滴下した。45 分後、THF (5.0 mL) 中の 3-ブロモ-1-(トリメチルシリル)-プロピン (0.85 mL、2.4 当量) の溶液を徐々に加えた後、反応を一晩室温に戻した。反応を飽和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) でクエンチし、EtOAc (20 mL  $\times$  3) で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮した。シリカゲルでの残留物のフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中の 10~20% の EtOAc) により、25% の収率 (261 mg) で TMS-アルキンが得られた。ii.  $\text{N}_2$  下で、THF (5.0 mL) 中の本物質 (261 mg、1 当量) の溶液に、TBAF (0.44 mL、1 当量) の溶液を加えた。室温で 4 時間攪拌した後、飽和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (15 mL) を加えることにより反応をクエンチした。混合物を EtOAc (3  $\times$  15 mL) で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、真空中で濃縮した。シリカゲルでの残留物のフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~20% の EtOAc) により、JNS-27 を淡黄色ワックス状固体として 81% の収率 (168 mg、2 ステップで 21%) で得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.99 (m, 1H), 6.03 (dt,  $J=10.02$ , 1.97 Hz, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.48 (m, 3H), 2.33 (m, 2H), 1.98 (t,  $J=2.68$ , 1H), 1.88 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.30, 129.34, 45.74, 27.68, 25.78, 20.27; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ONa}]^+ (\text{M}+\text{Na})^+$  の場合) :  $m/z$  134.0732、実測値 134.0728。

20

30

【化295】



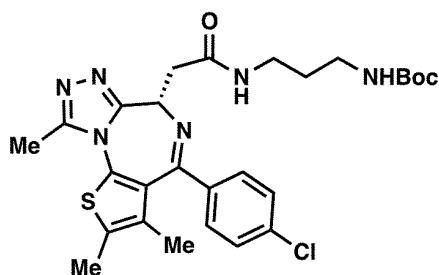
40

【0781】

この化合物 (7) は、Bradner および同僚によって報告された条件 (2017 年 PCT 国際特許出願第 WO2017/091673A2) に従って調製した。

50

【化 2 9 6】

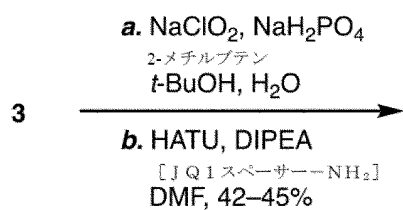


10

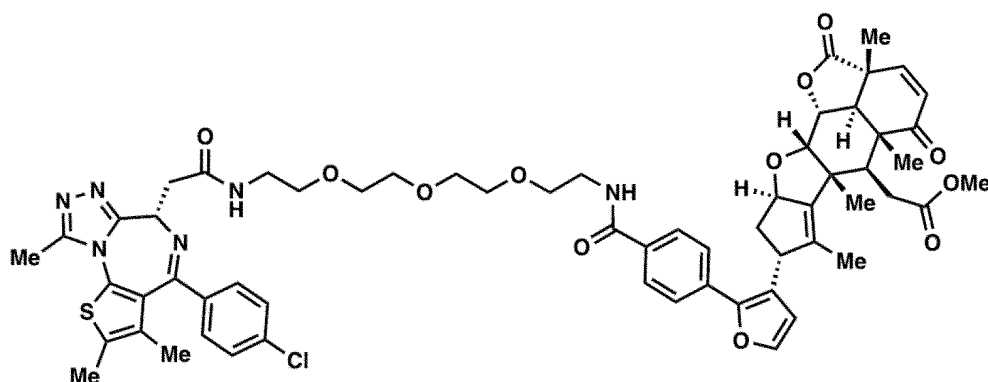
【0 7 8 2】

この化合物（8）は、Waring および同僚によって報告された条件に従って調製した（J. Med. Chem., 2016, 59, 7801）。

【化 2 9 7】

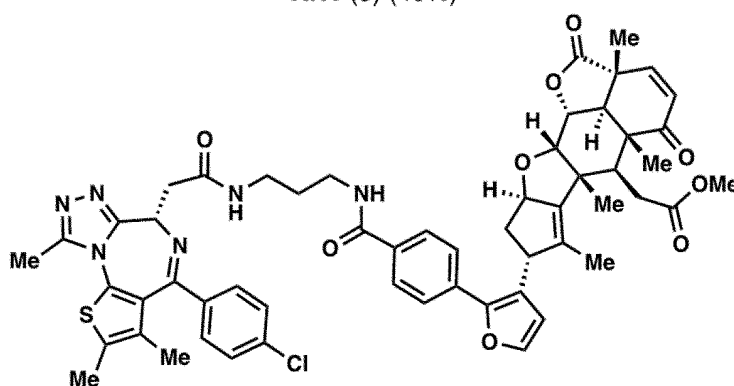


20



XH1 (9) (45%)

30



XH2 (10) (42%)

40

【0 7 8 3】

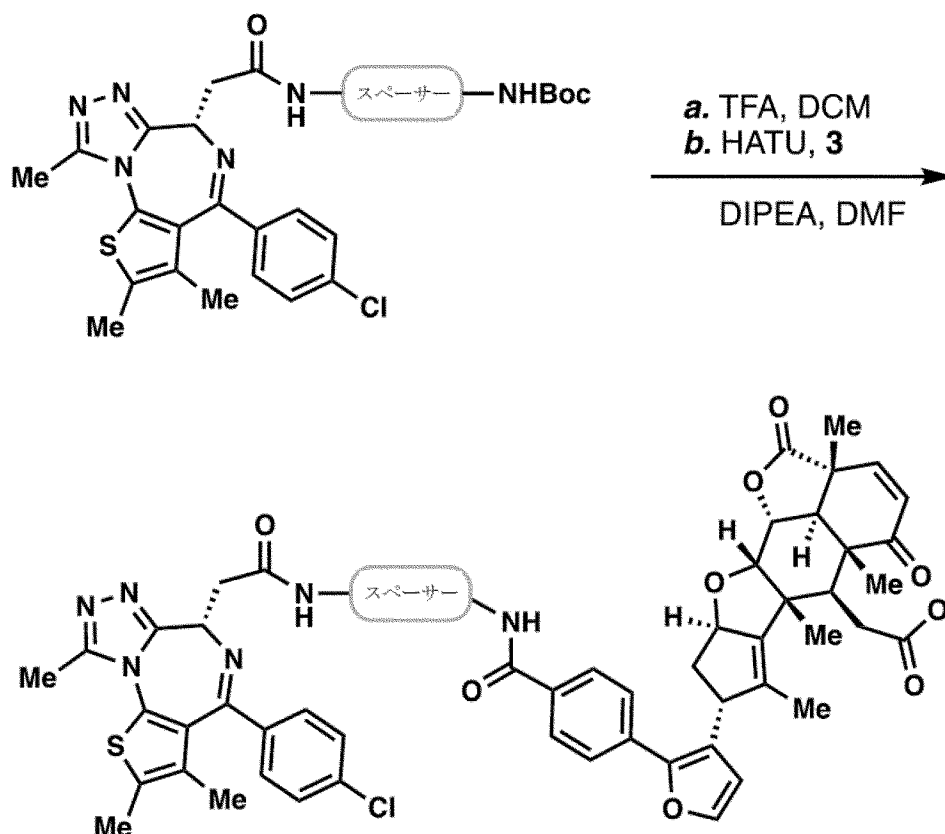
スキーム S 2。ニンボリド由来の二官能性分解剤 XH1 (9) および XH2 (10) の合成。

【0 7 8 4】

二官能性分解剤 XH1 (9) および XH2 (10) の一般的な合成手順：

50

【化 2 9 8】



10

20

【0785】

i. 反応管 (Fisher Scientific、13×100mm) に、攪拌棒、Boc 保護アミン (7) または (8) (0.04mmol)、トリエチルシラン (12 μL、0.075mmol)、および DCM (0.4mL) を入れた。得られた混合物を 0℃ に冷却し、続いて TFA (0.12mL) を滴下して加えた。反応混合物を室温まで加温させ、さらに 2 時間攪拌した。TLC (MeOH : DCM = 1 : 10) で判断して反応が完了した後、混合物をトルエン (2mL) で希釈し、真空中で濃縮した。得られた粗製物を高真空下で 30 分間乾燥し、さらに精製することなく次のステップで直接使用した。カルボン酸 (4) は、前述の手順に従ってアルデヒド (3) から調製し、さらに精製することなく使用した。

30

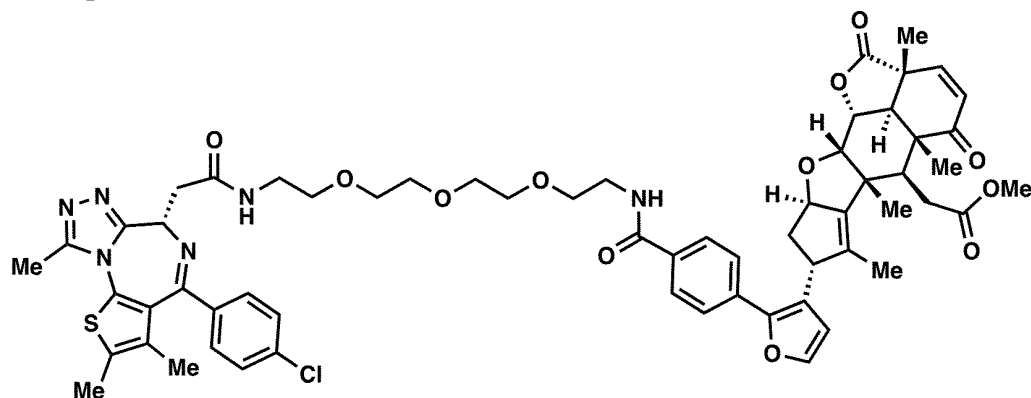
【0786】

ii. 反応管 (Fisher Scientific、13×100mm) に、攪拌棒、粗アミン (0.04mmol を想定)、未精製酸 (4) (0.02mmol を想定)、および DMF (0.6mL) を入れた。得られた混合物を氷浴中で 0℃ に冷却し、続いて HATU (23.0mg、0.06mmol) および DIPEA (11 μL、0.06mmol) を加えた。反応混合物を 4℃ で 16 時間攪拌した。TLC (MeOH : DCM = 1 : 10) によって判断されるように反応が完了した後、混合物を EtOAc (10mL) および飽和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液 (10mL) で希釈し、水相を EtOAc (2×10mL) で抽出した。合わせた有機層を、H<sub>2</sub>O (20mL) およびブライン (20mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、真空中で濃縮した。得られた粗物質を分取 TLC (MeOH : DCM = 1 : 15、2 回展開) によって精製して、二官能性分解剤 XH1 または XH2 を得た。

40

50

【化 2 9 9】



10

【0 7 8 7】

白色フォーム XH1 (9) ((3) からの収率 45%) :

【数 9】

 $[\alpha]_D^{20}$ 

$= +48.7^\circ$  (c 0.0052 g/mL,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.87 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.40 (d,  $J=8.2$  Hz, 3H), 7.36 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.34–7.29 (m, 2H), 7.28 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 6.33 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 5.93 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.61–5.55 (m, 1H), 4.73 (app. t,  $J=7.1$  Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J=12.5, 3.7$  Hz, 1H), 4.30 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 4.12–4.08 (m, 1H), 3.75–3.64 (m, 15H), 3.64–3.53 (m, 3H), 3.51–3.40 (m, 3H), 3.25–3.16 (m, 2H), 2.77 (app. t,  $J=5.5$  Hz, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.42–2.36 (m, 4H), 2.26–2.20 (m, 2H), 1.68–1.65 (m, 3H), 1.65 (d,  $J=1.8$  Hz, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.24 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.6, 174.8, 173.0, 170.1, 167.0, 164.4, 155.3, 149.9, 149.6, 148.3, 146.1, 145.6, 142.1, 137.2, 136.3, 135.8, 133.8, 133.0, 131.6, 131.2, 131.0, 130.6, 130.0, 130.0, 128.7, 128.7, 127.6, 127.6, 125.7, 125.7, 124.1, 112.0, 88.3, 83.0, 73.3, 70.5, 70.5, 70.3, 70.2, 69.7, 69.6, 54.1, 51.9, 50.5, 49.7, 47.8, 45.3, 43.6, 41.1, 41.1, 39.7, 39.4, 38.5, 32.3, 18.6, 17.3, 15.1, 14.4, 13.1, 13.1, 11.6; IR (薄膜、 $\text{cm}^{-1}$ ) 3339, 2923, 2866, 1781, 1734, 1659, 1540, 1487, 1437, 1419, 1300; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{61}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{Cl}_1\text{S}_1\text{Na}]^+$  (M+Na) $^+$  の場合) :  $m/z$  1165.4118、実測値 1165.4142.

20

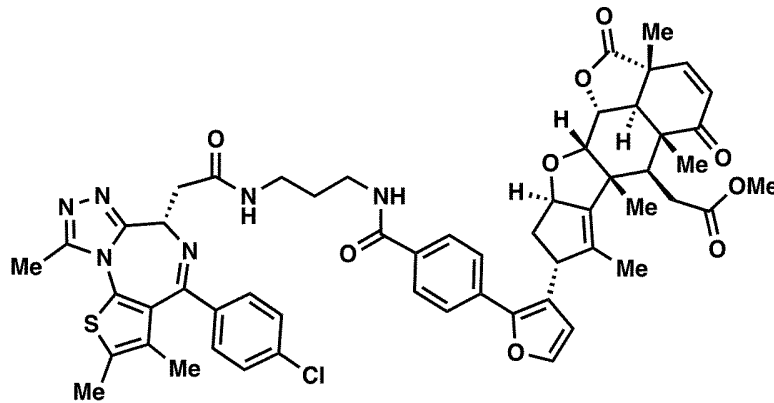
30

40

50



【化 3 0 0】



10

【0 7 8 8】

白色フォーム X H 2 (10) ((3) からの収率 42%) :

【数 10】

 $[\alpha]_D^{20}$ 

$= +18.6^\circ$  (c 0.004 g/mL,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  7.90 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.65–7.57 (m, 3H), 7.44–7.39 (m, 3H), 7.33 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 7.07 (t,  $J=6.5$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 5.89 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 5.52 (app. t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.66–4.59 (m, 2H), 4.26 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 4.12 (brd,  $J=7.6$  Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.52–3.45 (m, 2H), 3.44–3.34 (m, 4H), 3.20 (dd,  $J=16.4, 5.5$  Hz, 1H), 3.15 (d,  $J=12.5$  Hz, 1H), 2.74 (app. t,  $J=5.5$  Hz, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.45–2.37 (m, 4H), 2.25–2.21 (m, 2H), 1.75–1.70 (m, 2H), 1.65 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  201.2, 175.6, 173.5, 171.9, 166.7, 164.5, 156.1, 150.5, 149.9, 148.8, 146.3, 142.5, 137.1, 137.0, 136.6, 134.2, 133.7, 132.7, 131.6, 131.3, 131.2, 130.8, 130.3, 130.3, 129.0, 129.0, 127.8, 127.8, 126.2, 126.2, 124.8, 112.6, 88.6, 83.4, 73.9, 54.9, 52.1, 51.0, 50.2, 48.2, 45.8, 44.1, 41.6, 41.5, 39.7, 36.5, 36.2, 32.7, 29.9, 18.8, 17.5, 15.4, 14.6, 13.4, 13.3, 12.0; IR (薄膜、 $\text{cm}^{-1}$ ) 3308, 3023, 2930, 2867, 1782, 1734, 1654, 1540, 1488, 1437, 1301; HRMS (ESI) 計算値 ( $[\text{C}_{56}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_9\text{S}]^+$  (M+H) $^+$  の場合) :  $m/z$  1025.3669、実測値 1025.3669.

20

30

40

【0 7 8 9】

以前に報告されていないシステイン反応性共有結合リガンドの合成および特徴付け

一般的な合成方法化学薬品および試薬を主要な商業的供給業者から購入し、さらに精製することなく使用した。別途記述されない限り、反応を、窒素雰囲気下で実施した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを、EMDまたはSigma Aldrichシリカゲル60 (230~400メッシュ) を使用して実施した。プロトンおよび炭素核磁気共鳴 ( $^1\text{H}$  NMRおよび $^{13}\text{C}$  NMR) データを、the Universit

50

y of California, BerkeleyのBruker AVB400、AVQ400、またはAV600分光計で取得した。高分解能質量スペクトルを、ポジティブまたはネガティブエレクトロスプレーイオン化(+ESIまたは-ESI)を使用して、the University of California, BerkeleyのQB3質量分析施設から取得した。収量は、1回の実行として報告される。

#### 【0790】

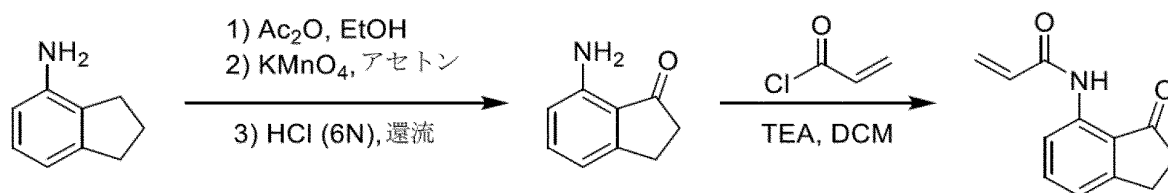
一般的手順A。アミン(1当量)をDCM(5mL/mmole)中に溶解し、0℃に冷却した。この溶液に、塩化アクリロイル(1.2当量)、続いて、トリエチルアミン(1.2当量)を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌した。その後、溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(および必要に応じて再結晶)により精製して、対応するアクリルアミドを得た。

10

#### 【0791】

一般的手順B。アミン(1当量)をDCM(5mL/mmole)中に溶解し、0℃に冷却した。この溶液に、塩化クロロアセチル(1.2当量)、続いて、トリエチルアミン(1.2当量)を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌した。その後、溶液をブラインで洗浄し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(および必要に応じて再結晶)により精製して、対応するクロロアセトアミドを得た。

#### 【化301】



20

#### 【0792】

N-(3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド(TH1-129)(13)。i. 0℃でエタノール(20mL)中の4-アミノインダン(1.0g、7.5mmole)の溶液に無水酢酸(1.4mL、15.0mmole)を加えた。溶液を室温に加温させ、一晚攪拌し、その時点で溶媒を真空中で蒸発させた。次に、残留物をアセトン(50mL)に溶解し、15%硫酸マグネシウム水溶液(6.75mLの水中1.2g)、続いて過マンガン酸カリウム(3.4g、17.0mmole)を加えた。得られた溶液を24時間攪拌し、次にセライトのパッドを通して濾過し、クロロホルム、次に水で溶出した。溶離液を分離し、追加のクロロホルムで水層を数回抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、真空中で蒸発させた。次に、残留物を6N HCl(20mL)に溶解し、90℃に加熱した。5時間攪拌した後、溶液を冷却し、少量の炭酸カリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。合わせた有機物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、真空中で蒸発させて、粗7-アミノインダン-1-オン(610mg、3ステップで55%)を得て、これをさらに精製することなく使用した。

30

#### 【0793】

ii. ジクロロメタン(15mL)中の粗7-アミノインダン-1-オンの溶液に、塩化アクリロイル(0.39mL、4.8mmole)、続いてトリエチルアミン(0.67mL、4.8mmole)をN<sub>2</sub>雰囲気下、0℃で加えた。反応混合物を室温に加温させ、一晚攪拌した。次に、反応混合物を1M HCl溶液で2回、ブラインで洗浄し、真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン中10%~20%の酢酸エチル)により精製して、白色固体として(13)生成物(390mg、47%収率、4ステップで26%の合計収率)を得た。

40

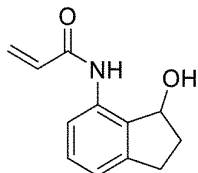
#### 【0794】

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.64(s, 1H), 8.45(d

50

,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.55 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 6.45 (dd,  $J=1.0, 17.0$  Hz, 1H), 6.33 (dd,  $J=10.1, 17.0$  Hz, 1H), 5.82 (dd,  $J=1.0, 10.1$  Hz, 1H), 3.11 (t,  $J=11.5$  Hz, 2H), 2.74–2.71 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  209.3, 164.4, 155.9, 138.7, 137.0, 131.7, 128.0, 123.1, 120.8, 116.9, 36.5, 25.5. HRMS (+ESI): 計算値: 202.0863 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ ). 観測値: 202.0860.

【化302】



10

【0795】

N-(3-ヒドロキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-133) (14)。窒素雰囲気下、無水メタノール (7 mL) 中の (13) (201 mg, 1.0 mmol) の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム (46.1 mg, 1.2 mmol) を加えた。30 分間攪拌した後、反応物を飽和重炭酸ナトリウム溶液でクエンチし、DCM で 3 回抽出した。合わせた有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 30~50% 酢酸エチル) により精製して、白色固体として (14) (190 mg, 94% 収率) を得た。

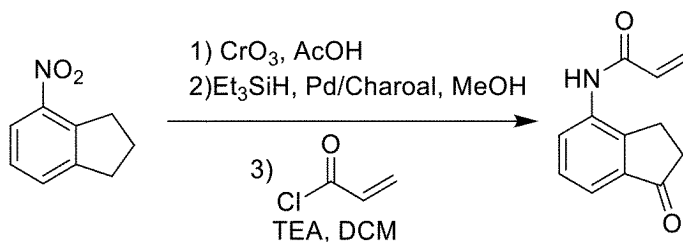
20

【0796】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.93 (s, 1H), 7.98 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 7.19 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J=16.8$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J=10.2, 16.9$  Hz, 1H), 5.66 (d,  $J=10.2$  Hz, 1H), 5.32 (q,  $J=6.9$  Hz, 1H), 3.60 (d,  $J=6.7$  Hz, 1H), 2.96 (ddd,  $J=2.4, 9.0, 15.7$  Hz), 2.73 (五重項,  $J=8.1$  Hz, 1H), 2.56–2.48 (m, 1H), 1.96–1.86 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.1, 143.7, 135.6, 132.8, 131.6, 129.5, 127.3, 121.0, 118.5, 76.2, 36.0, 29.8. HRMS (−ESI): 計算値: 202.0874 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ ). 観測値: 202.0874.

30

【化303】



40

【0797】

N-(1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-134) (15)。i. 酢酸 (250 mL) 中の 4-ニトロインダン (5.38 g, 33 mmol) の溶液に、三酸化クロム (8.95 g, 90 mmol) をゆっくりと加えた。24 時間攪拌した後、反応物を 2 M NaOH で中和し、酢酸エチルで 5 回抽

50

出した。合わせた有機物を飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中10～20%の酢酸エチル）により精製して、1.26 g（約7.1 mmol）の4-ニトロインダノン白色固体として得た。

【0798】

ii. 次いで、この中間体を、窒素雰囲気下で無水メタノール（21 mL）に溶解した活性炭（125 mg、10重量%）上のパラジウムと組み合わせた。トリエチルシラン（11.3 mL、71 mmol）を、10分間にわたって添加漏斗によってゆっくりと室温の水浴中での反応物に加えた。さらに20分間攪拌した後、反応混合物をセライトのパッドを通して濾過し、続いて真空中で濃縮して、4-アミノインダノンを得、これをさらに精製することなく使用した。

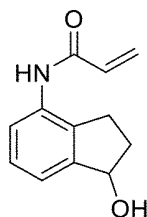
【0799】

iii. 前述の粗アミノインダノンを窒素雰囲気下でDCM（21 mL）に溶解し、0℃に冷却し、その時点で塩化アクリロイル（0.77 mL、9.5 mmol）およびトリエチルアミン（1.19 mL、8.5 mmol）をゆっくりと滴下した。反応混合物を室温に加温させ、一晩攪拌し、ブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中30～50%の酢酸エチル）により精製して、白色固体として（15）（989 mg、3ステップで15%収率）を得た。

【0800】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.20 (d,  $J=5.8$  Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 7.39 (t,  $J=7.7$  Hz, 1H), 6.48 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 6.37 (d,  $J=10.0$  Hz, 16.8 Hz, 1H), 5.83 (d,  $J=10.1$  Hz, 1H), 3.04 (t,  $J=5.6$  Hz, 2H), 2.70 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  206.3, 163.9, 146.0, 138.0, 135.4, 130.7, 128.8, 128.7, 127.6, 120.4, 36.1, 23.4. HRMS (ESI): 計算値: 200.0717 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_2$ ). 観測値: 200.0715.

【化304】



【0801】

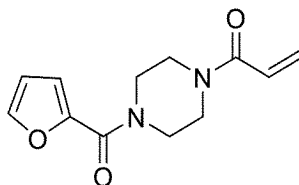
N-(1-ヒドロキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-135) (16)。窒素雰囲気下、無水メタノール（50 mL）中の（15）（1.26 g、6.25 mmol）の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム（292.7 mg、7.7 mmol）を加えた。30分間攪拌した後、反応を水でクエンチし、メタノールを真空中で除去した。残留物をNaClで飽和させ、2:1のクロロホルム:メタノール溶液で5回抽出した。合わせた有機層を3 Åモレキュラーシーブで乾燥し、濾過し、真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中40～70%の酢酸エチル）により精製して、白色固体として（16）（1.05 g、83%収率）を得た。

【0802】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.50 (dd,  $J=2.3, 6.3$  Hz, 1H), 7.25–7.20 (m, 2H), 6.51 (dd,  $J=10.2, 17$

. 0 Hz, 1H), 6.35 (dd,  $J=1.7, 17.0$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J=1.7, 10.2$  Hz, 1H), 5.17 (t,  $J=6.3$  Hz, 1H), 2.97 (ddd,  $J=4.5, 8.6, 16.2$ , 1H), 2.74 (五重項,  $J=7.8$  Hz, 1H), 2.47–2.39 (m, 1H), 1.95–1.86 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, MeOD):  $\delta$  166.3, 148.0, 137.8, 134.8, 132.1, 128.3, 127.9, 124.0, 122.7, 76.9, 36.1, 28.6. HRMS (–ESI): 計算値: 202.0874 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ ). 観測値: 202.0872.

【化305】



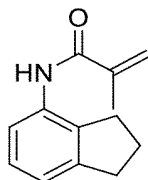
【0803】

1-(4-(フラン-2-カルボニル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (TRH1-145) (17)。ジクロロメタン (10mL) 中の1-(2-フロイル)ピペラジン (362mg、2.0mmol) 溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34mL、2.4mmol) を窒素雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温に加温させ、さらに24時間攪拌した。反応混合物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中70%~100%の酢酸エチル) により精製して、黄色固体として (17) (446mg、95%) を得た。

【0804】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.53 (m, 1H), 7.06 (dd,  $J=0.7, 3.5$  Hz, 1H), 6.61 (dd,  $J=10.5, 16.8$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J=1.8, 3.5$  Hz, 1H), 6.33 (dd,  $J=1.9, 16.8$  Hz, 1H), 5.75 (dd,  $J=1.9, 10.5$  Hz, 1H), 3.84–3.67 (m, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.5, 159.1, 147.5, 144.0, 128.5, 127.1, 117.0, 111.5, 45.6, 41.9. HRMS (+ESI): 計算値: 235.1077 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$ ). 観測値: 235.1075.

【化306】



【0805】

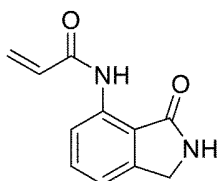
N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)メタクリルアミド (TRH1-149) (18)。ジクロロメタン (10mL) 中の4-アミノインダン (0.24mL、2.0mmol) 溶液に、窒素雰囲気下、0℃で塩化メタクリロイル (0.23mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34mL、2.4mmol) を加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温に加温させ、さらに3.5時間攪拌した。次いで、反応混合物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中の35%~40%の酢酸エチル) によって精製して、オフホワイト色固体として (18) (378mg、94%)

)を得た。

【0806】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.72 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t,  $J=7.7$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 2.93 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.79 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.12–2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.3, 145.1, 140.6, 134.5, 133.7, 127.0, 120.7, 119.8, 118.9, 33.1, 29.9, 24.7, 18.6. HRMS (+ESI): 計算値: 202.1226 ( $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}$ ). 観測値: 202.1224.

【化307】



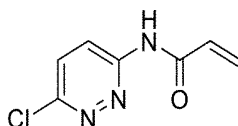
【0807】

N-(3-オキソイソインドリン-4-イル)アクリルアミド (TRH1-152) (19)。ジクロロメタン (4mL) 中の7-アミノイソインドリン-1-オン (99mg、0.67mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.07mL、0.8mmol)、続いてトリエチルアミン (0.11mL、0.8mmol) を  $\text{N}_2$  雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。反応混合物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中50～60%の酢酸エチル) により精製して、白色固体として表題化合物 (58mg、43%) を得た。

【0808】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.50 (s, 1H), 8.58 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.55 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.46 (dd,  $J=1.3, 17.0$  Hz, 1H), 6.36 (dd,  $J=10.0, 17.0$  Hz, 1H), 5.81 (dd,  $J=1.3, 10.0$  Hz, 1H), 4.46 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.9, 164.2, 143.9, 138.2, 133.8, 131.8, 127.8, 118.0, 117.7, 117.6, 45.6. HRMS (+ESI): 計算値: 203.0815 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$ ). 観測値: 203.0814.

【化308】



【0809】

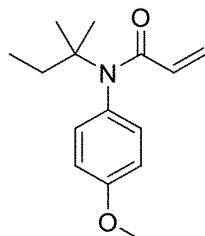
N-(6-クロロピリダジン-3-イル)アクリルアミド (TRH1-155) (20)。ジクロロメタン (10mL) 中の3-アミノ-6-クロロピリダジン (261mg、2.0mmol) 溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.34mL、2.4mmol) を窒素雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで加温させ、一晩攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲ

ルクロマトグラフィー（ヘキサン中40%～50%の酢酸エチル）により精製して、淡黄色固体として（20）（23mg、6%）を得た。

【0810】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.06 (s, 1H), 8.70 (d,  $J=9.4$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J=9.4$  Hz, 1H), 6.73 (dd,  $J=10.2, 16.8$  Hz, 1H), 6.56 (dd,  $J=1.2, 16.8$ , 1H), 5.94 (dd,  $J=1.2, 10.2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.8, 155.2, 152.3, 130.7, 130.4, 130.3, 122.0. HRMS (+ESI): 計算値: 182.0127 ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{OCl}$ ). 観測値: 182.0126

【化309】



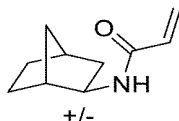
【0811】

N-(4-メトキシフェニル)-N-(tert-ペンチル)アクリルアミド (TRH 1-170) (21)。ジクロロメタン (5mL) 中の4-メトキシ-N-(tert-ペンチル)アニリン (94mg、0.49mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.05mL、0.6mmol)、続いてトリエチルアミン (0.09mL、0.6mmol) を、窒素雰囲気下、0℃で加えた。15分間攪拌した後、反応混合物を室温に加熱させ、さらに18時間攪拌した。次に、反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム水溶液、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中0%～20%の酢酸エチル）により精製して、淡黄色油として表題化合物 (82mg、68%) を得た。

【0812】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.99 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 6.85 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 6.17 (dd,  $J=1.9, 16.7$  Hz, 1H), 5.76 (dd,  $J=10.3, 16.7$  Hz, 1H), 5.28 (dd,  $J=1.9, 10.3$  Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (q,  $J=7.5$  Hz, 2H), 1.20 (s, 6H), 0.91 (t,  $J=7.5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.3, 159.0, 134.3, 131.49, 131.45, 125.6, 114.1, 61.7, 55.5, 32.0, 27.4, 9.4. HRMS (+ESI): 計算値: 247.1572 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ ). 観測値: 247.1577.

【化310】



【0813】

N-(エキソ-ノルボルン-2-イル)アクリルアミド (TRH 1-176) (22)。ジクロロメタン (10mL) 中のエキソ-2-アミノノルボルナン (0.24mL、2mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33mL、2.4mmol) を、窒素雰囲気下、0℃で加えた。20

10

20

30

40

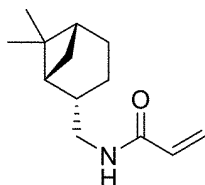
50

分間攪拌した後、反応混合物を室温に加温させ、さらに18時間攪拌した。次に、反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム水溶液、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中30%の酢酸エチル）により精製して、白色固体として表題化合物（271mg、82%）を得た。

【0814】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  6.42 (s, 1H), 6.25 (dd,  $J=2.3, 17.0$  Hz, 1H), 6.18 (dd,  $J=9.5, 17.0$  Hz, 1H), 5.58 (dd,  $J=2.3, 9.5$  Hz, 1H), 3.8–3.77 (m, 1H), 2.27–2.24 (m, 2H), 1.78 (ddd,  $J=2.1, 8.1, 13.0$  Hz, 1H), 1.55–1.38 (m, 3H), 1.30–1.10 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  165.0, 131.4, 125.8, 52.9, 42.4, 40.0, 35.7, 35.6, 28.2, 26.6. HRMS (+ ESI) : 計算値 : 165.1154 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$ )。観測値 : 165.1155.

【化311】



【0815】

N-((1R, 2S, 5R)-6,6-ジメチルビスクロ[3.1.1]ヘプタン-2-イル)メチル)アクリルアミド (TRH1-178) (23)。ジクロロメタン (10mL) 中の (–)-cis-ミルタニルアミン (0.34mL、2mmol) の溶液に、塩化アクリロイル (0.20mL、2.4mmol)、続いてトリエチルアミン (0.33mL、2.4mmol) を、窒素雰囲気下、0℃で加えた。20分間攪拌した後、反応混合物を室温に加温させ、さらに21時間攪拌した。次に、反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム水溶液、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。得られた粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中20～30%の酢酸エチル）により精製して、白色固体として表題化合物（369mg、89%）を得た。

【0816】

$^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  6.26 (dd,  $J=1.5, 17.0$  Hz, 1H), 6.11 (dd,  $J=10.3, 17.0$  Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.61 (dd,  $J=1.5, 10.3$  Hz, 1H), 3.39–3.29 (m, 2H), 2.38–2.34 (m, 1H), 2.26–2.21 (m, 1H), 1.98–1.90 (m, 4H), 1.88–1.83 (m, 1H), 1.53–1.47 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.89 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  165.7, 131.2, 126.2, 45.3, 43.9, 41.5, 38.8, 33.3, 28.1, 26.1, 23.3, 19.9. HRMS (–ESI) : 計算値 : 206.1550 ( $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$ )。観測値 : 206.1551.

10

20

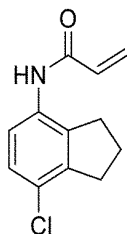
30

40

50



## 【化 3 1 2】



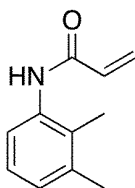
## 【0 8 1 7】

N-(7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) アクリルアミド (Y P 1-1) (24)。P E G 400 (5.2 mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) アクリルアミド (187 mg、1.0 mmol) の溶液を 0℃ に冷却し、N-クロロスクシンイミド (140 mg、1.0 mmol) を加えた。30 分後、混合物を室温に加温させ、一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、ブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。揮発性物質を真空中で除去し、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 30% の酢酸エチル) によって精製した。得られた異性体の混合物を再結晶して、白色固体として表題化合物 (47 mg、22% 収率) を得た。

## 【0 8 1 8】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.78 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.15–7.11 (m, 2H), 6.42 (dd,  $J=1.4, 16.8$  Hz, 1H), 6.26 (dd,  $J=10.2, 16.8$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J=1.4, 10.2$  Hz, 1H), 2.98 (t,  $J=7.6$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.12 (五重項,  $J=7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.4, 143.1, 136.1, 132.2, 131.0, 128.0, 127.2, 126.7, 120.9, 32.7, 31.1, 24.0. HRMS (+ESI): 計算値: 220.0535 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}$ )。観測値: 220.0533。

## 【化 3 1 3】



## 【0 8 1 9】

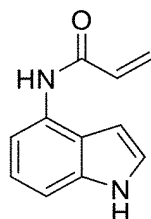
N-(2,3-ジメチルフェニル) アクリルアミド (Y P 1-18) (25)。DCM (10 mL) 中の 2,3-ジメチルアニリン (121 mg、1.0 mmol) の溶液を 0℃ に冷却し、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) およびトリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を連続して加えた。反応混合物をこの温度で 30 分間維持し、次に室温に加温させ、一晩攪拌した。反応混合物をブラインで 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。揮発性物質を真空中で除去し、粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 30%～40% の酢酸エチル) によって精製して、白色固体として生成物 (154 mg、88%) を得た。

## 【0 8 2 0】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.49 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.11–7.07 (m, 1H), 7.01 (d,  $J=7.7$ , 1H), 6.40 (d,  $J=17.1$ , 1H), 6.30 (dd,  $J=7.3, 17.1$  Hz, 1H), 5.74 (d,  $J=10.1$  Hz, 1H), 2.29 (s, 1H),

2.13 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  135.1, 131.2, 127.6, 127.3, 125.9, 122.3, 20.6, 13.9. HRMS (+ESI): 計算値: 176.1070 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}$ ). 観測値: 176.1068.

【化314】



10

【0821】

N-(1H-インドール-4-イル)アクリルアミド (YP1-19) (26)。DCM/DMF (1:1 (v:v)、10 mL) 中の4-アミノインドール (132 mg、1 mmol) の溶液を0℃に冷却し、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) およびトリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を連続して加えた。反応混合物をこの温度で26分間攪拌し、次に室温に加温させ、一晩攪拌した。反応混合物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。揮発性物質を真空中で除去し、粗生成物を塩基性アルミナクロマトグラフィー (ヘキサン中60%~75%の酢酸エチル) によって精製して、白灰色固体として表題化合物 (56 mg、30%) を得た。

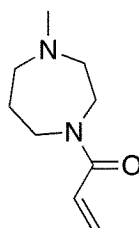
20

【0822】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOD):  $\delta$  7.51 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 7.24–7.22 (m, 2H), 7.08 (t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 6.64 (dd,  $J=10.1, 16.7$  Hz, 2H), 6.38 (dd,  $J=1.7, 16.9$  Hz, 1H), 5.78 (dd,  $J=1.7, 10.3$  Hz, 1H), 4.6 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOD):  $\delta$  165.0, 137.2, 131.1, 129.2, 126.0, 123.8, 121.5, 120.9, 112.2, 108.4, 98.5. HRMS (+ESI): 計算値: 187.0866 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$ ). 観測値: 187.0865.

30

【化315】



【0823】

1-(4-メチル-1,4-ジアゼパム-1-イル)プロブ-2-エン-1-オン (YP1-23) (27)。DCM (10 mL) 中の1-メチルホモピペラジン (114 mg、1.0 mmol) の溶液を0℃に冷却し、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) およびトリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を連続して加えた。溶液をこの温度で30分間維持し、次に室温に加温させ、一晩攪拌した。反応混合物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。揮発性物質を真空中で除去した後、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中1%~10%のメタノール) によって精製して、黄色油として表題化合物 (58 mg、51%) を得た (回転異性体の混合物)。

40

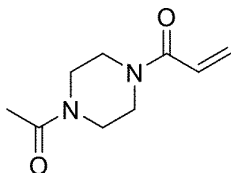
【0824】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.61–6.53 (m, 1H), 6.35–6.29 (m, 1H), 5.70–5.66 (m, 1H), 3.74–3.72 (

50

m, 1 H), 3.69 (t, J=6.4 Hz, 1H), 3.65–3.61 (m, 2H), 2.66–2.63 (m, 2H), 2.59–2.54 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.94 (五重項, J=6.2 Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.4, 166.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 59.1, 58.0, 57.1, 56.8, 47.4, 47.1, 46.7, 46.6, 45.3, 44.8, 28.1, 26.9. HRMS (+ESI): 計算値: 169.1335 ( $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$ ). 観測値: 169.1333.

【化316】



10

【0825】

1-(4-アセチルピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-24) (28)。DCM (10 mL) 中の1-アセチルピペラジン (128 mg、1.0 mmol) の溶液を0℃に冷却し、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) およびトリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を連続して加えた。溶液をこの温度で23分間攪拌し、次に室温に加温させ、さらに2時間攪拌した。反応混合物をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、揮発性物質を真空中で除去した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中0%~10%のメタノール) によって精製して、黄色油として表題化合物 (40 mg、18%) を得た。

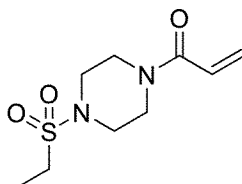
20

【0826】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.57 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=1.8, 16.8 Hz, 1H), 5.75 (dd, J=1.9, 10.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.66–3.64 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.51–3.49 (m, 2H), 2.13 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.0, 165.6, 128.7, 127.0, 41.9, 41.4, 21.4. HRMS (+ESI): 計算値: 183.1128 ( $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ ). 観測値: 183.1126.

30

【化317】



【0827】

1-(4-(エチルスルホニル)ピペラジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-25) (29)。DCM (10 mL) 中の1-(エタンスルホニル)ピペラジン (178 mg、1.0 mmol) の溶液を0℃に冷却し、塩化アクリロイル (109 mg、1.2 mmol) およびトリエチルアミン (121 mg、1.2 mmol) を連続して加えた。溶液をこの温度で27分間攪拌し、次に室温に加温させ、さらに2時間攪拌した。溶液をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM中1%~10%のメタノール) によって精製して、白黄色固体として表題化合物 (163 mg、70%) を得た。

40

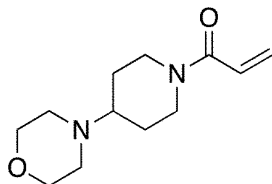
【0828】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.57 (dd, J=10.5, 16.8 Hz, 1H), 6.32 (dd, J=1.9, 16.8 Hz, 1H), 5.76 (d

50

d,  $J=1.8, 10.5$  Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.32 (t,  $J=5.2$  Hz, 4H), 2.98 (q,  $J=7.5$  Hz, 2H), 1.37 (t,  $J=7.4$ , 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.5, 128.8, 127.0, 77.4, 45.9, 45.6, 44.2, 41.9, 7.8. HRMS (+ESI): 計算値: 233.0954 ( $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_1$ ). 観測値: 233.0953.

【化318】



10

【0829】

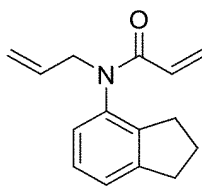
1-(4-モルホリノピペリジン-1-イル)プロプ-2-エン-1-オン (YP1-42) (30)。4-モルホリノピペリジン (336mg、2.0mmol) を使用する一般的な手順Aに従って、シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中1%のメタノールおよび80%の酢酸エチル) の後に、生成物を無色油 (259mg、58%) として得た。

【0830】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.42 (dd,  $J=10.6, 16.8$  Hz, 1H), 6.06 (dd,  $J=2.0, 16.8$  Hz, 1H), 5.49 (dd,  $J=2.0, 10.6$  Hz, 1H), 4.45 (d,  $J=12.8$  Hz, 1H), 3.86 (d,  $J=12.8$  Hz, 1H), 3.52 (t,  $J=4.7$  Hz, 4H), 2.90 (t,  $J=12.8$  Hz, 1H), 2.55–2.48 (m, 1H), 2.37–2.35 (m, 4H), 2.26 (tt,  $J=3.7, 11.0$  Hz, 1H), 1.72 (d,  $J=12.8$  Hz, 2H), 1.30–1.20 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.0, 127.7, 127.3, 67.1, 61.6, 49.6, 44.9, 41.1, 28.9, 27.8. HRMS (+ESI): 計算値: 225.1598 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ ). 観測値: 225.1595.

20

【化319】



30

【0831】

N-アリル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (IGA1-12) (31)。窒素雰囲気下で、テトラヒドロフラン (8mL) 中の水素化ナトリウム (96mg、4.0mmol) の溶液に、テトラヒドロフラン (2mL) 中のN-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (187mg、1.0mmol) を加えた。反応混合物を0℃に冷却し、3-ブロモプロプ-1-エン (484mg、4.0mmol) を室温に加温させ、一晩攪拌した。水を加えることにより反応をクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中20%の酢酸エチル) によって精製して、黄色結晶性固体として生成物 (151mg、67%) を得た。

40

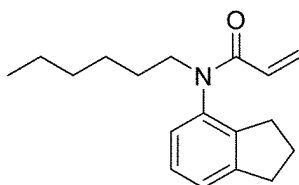
【0832】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.06–7.18 (m, 2H), 6.80–6.88 (m, 1H), 6.26–6.37 (dd,  $J=16.8, 2.0$  Hz

50

, 1H), 5.76–5.96 (m, 2H), 5.38–5.48 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 4.98–5.08 (m, 2H), 4.40–4.52 (ddt, J=14.5, 6.3, 1.3 Hz, 1H), 4.00–4.11 (ddt, J=14.5, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 2.82–2.98 (m, 2H), 2.59–2.79 (m, 2H), 1.92–2.07 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.1, 146.5, 142.4, 137.9, 133.0, 128.4, 127.8, 127.48, 126.1, 124.3, 118.1, 51.6, 33.3, 30.9, 25.0. HRMS (+ESI): 計算値: 228.13 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}$ ). 観測値: 228.1381.

【化320】



【0833】

N-アリル-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (IGA1-15) (32)。窒素雰囲気下で、テトラヒドロフラン (8mL) 中の水素化ナトリウム (96mg、4.0mmol) の溶液に、テトラヒドロフラン (2mL) 中の N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)アクリルアミド (187mg、1.0mmol) を加えた。溶液を 0℃ に冷却し、1-ブロモヘキサン (660mg、4.0mmol) を加えた後、溶液を室温に加温させ、一晩攪拌した。溶液を水でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中 20% の酢酸エチル) によって精製して、黄色油として、収率 34% で、生成物 (92mg) を得た。

【0834】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.11–7.25 (m, 2H), 6.86–6.96 (dd, J=7.5, 1.2 Hz, 1H), 6.30–6.40 (dd, J=16.8, 2.1 Hz, 1H), 5.86–6.00 (m, 1H), 5.41–5.51 (dd, J=10.3, 2.1 Hz, 1H), 3.82–3.96 (m, 1H), 3.42–3.56 (m, 1H), 2.90–3.04 (m, 2H), 2.65–2.85 (m, 2H), 1.98–2.16 (m, 2H), 1.47–1.63 (m, 2H), 1.20–1.36 (m, 6H), 0.80–0.90 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.2, 146.5, 142.4, 138.2, 128.6, 127.5, 127.4, 126.1, 124.1, 48.7, 33.3, 31.6, 30.9, 27.9, 26.7, 25.0, 22.6, 14.1. HRMS (+ESI): 計算値: 272.19 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}$ ). 観測値: 272.2007.

【0835】

実施例 7～9 に関連する参考文献

1. Nomura, D. K. & Maimone, T. J. Target Identification of Bioactive Covalently Acting Natural Products. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 420, 351–374 (2018). 2. Drahl, C., Cravatt, B. F. & Sorensen, E. J. Protein-reactive natural products. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44, 5788–5809 (2005). 3. Liu, J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807–815 (1991). 4. Cohen, E., Quistad, G. B. & Casi

da, J. E. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sci.* 58, 1075–1081 (1996). 5. Bodduluru, L. N., Kasala, E. R., Thota, N., Barua, C. C. & Sistla, R. Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: the underlying mechanisms. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 1026–1035 (2014). 6. Subramani, R. et al. Nimbolide inhibits pancreatic cancer growth and metastasis through ROS-mediated apoptosis and inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* 6, 19819 (2016). 7. Hao, F., Kumar, S., Yadav, N. & Chandra, D. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1846, 247–257 (2014). 8. Gupta, S. C., Prasad, S., Tyagi, A. K., Kunnumakkara, A. B. & Aggarwal, B. B. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 34, 14–20 (2017). 9. Burslem, G. M. & Crews, C. M. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis. *Chem. Rev.* 117, 11269–11301 (2017). 10. Lai, A. C. & Crews, C. M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 101–114 (2017). 11. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 674–690 (2016). 12. Weerapana, E. et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790–795 (2010). 13. Roberts, A. M., Ward, C. C. & Nomura, D. K. Activity-based protein profiling for mapping and pharmacologically interrogating proteome-wide ligandable hotspots. *Curr. Opin. Biotechnol.* 43, 25–33 (2017). 14. Grossman, E. A. et al. Covalent Ligand Discovery against Druggable Hotspots Targeted by Anti-cancer Natural Products. *Cell Chem. Biol.* 24, 1368–1376. e4 (2017). 15. Backus, K. M. et al. Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature* 534, 570–574 (2016). 16. Wang, C., Weerapana, E., Blewett, M. M. & Cravatt, B. F. A chemoproteomic platform to quantitatively map targets of lipid-derived electrophiles. *Nat. Methods* 11, 79–85 (2014). 17. Han, J. et al. ZNF31

10

20

30

40

50

3 is a novel cell cycle activator with an E3 ligase activity inhibiting cellular senescence by destabilizing p21 (WAF1.) . Cell Death Differ. 20, 1055–1067 (2013) . 18. Lee, M. –G. et al. XAF1 directs apoptotic switch of p53 signaling through activation of HIPK2 and ZNF313. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 15532–15537 (2014) . 19. Huang, S. et al. The UbL-UBA Ubiquilin4 protein functions as a tumor suppressor in gastric cancer by p53-dependent and p53-independent regulation of p21. Cell Death Differ. 26, 516–530 (2019) . 20. Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nat. Rev. Cancer 9, 400–414 (2009) . 21. Guo, H. , Tian, T. , Nan, K. & Wang, W. p57: A multifunctional protein in cancer (Review) . Int. J. Oncol. 36, 1321–1329 (2010) . 22. Zengerle, M. , Chan, K. –H. & Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. ACS Chem. Biol. 10, 1770–1777 (2015) . 23. Winter, G. E. et al. DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. Science 348, 1376–1381 (2015) . 24. Havens, C. G. & Walter, J. C. Mechanism of CRL4 (Cdt2) , a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. Genes Dev. 25, 1568–1582 (2011) . 25. Kitagawa, K. , Kotake, Y. & Kitagawa, M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. Cancer Sci. 100, 1374–1381 (2009) . 26. Biswas, K. et al. The E3 Ligase CHIP Mediates p21 Degradation to Maintain Radioresistance. Mol. Cancer Res. MCR 15, 651–659 (2017) . 27. Rodriguez, M. S. et al. The RING ubiquitin E3 RNF114 interacts with A20 and modulates NF- $\kappa$ B activity and T-cell activation. Cell Death Dis. 5, e1399 (2014) . 28. Yang, Y. et al. The E3 ubiquitin ligase RNF114 and TAB1 degradation are required for maternal-to-zygotic transition. EMBO Rep. 18, 205–216 (2017) . 29. Rape, M. Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19, 59–70 (2018) . 30. Hughes, S. J. & Ciulli, A. Molecular recognition of ternary complexes: a new dimension in the structure-guided design of chemical degraders. Essays Biochem. 61, 505–516 (2017) . 31. Gadd, M. S. et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradat

10

20

30

40

50

ion. Nat. Chem. Biol. 13, 514–521 (2017). 32. Nowak, R. P. et al. Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation. Nat. Chem. Biol. 14, 706–714 (2018). 33. Jessani, N. et al. Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 13756–13761 (2004). 34. Anderson, K. E., To, M., Olzmann, J. A. & Nomura, D. K. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals a Thioredoxin-Caspase 3 Interaction Disruptor That Impairs Breast Cancer Pathogenicity. ACS Chem. Biol. 12, 2522–2528 (2017). 35. Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76–85 (1985). 36. Xu, T. et al. ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. J. Proteomics 129, 16–24 (2015). 37. Bateman, L. A. et al. Chemoproteomics-enabled covalent ligand screen reveals a cysteine hotspot in reticulon 4 that impairs ER morphology and cancer pathogenicity. Chem. Commun. Camb. Engl. 53, 7234–7237 (2017). 38. Counihan, J. L., Wiggenhorn, A. L., Anderson, K. E. & Nomura, D. K. Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screening Reveals ALDH3A1 as a Lung Cancer Therapy Target. ACS Chem. Biol. 13 (8), 1970–1977 (2018). 39. Roberts, A. M. et al. Chemoproteomic Screening of Covalent Ligands Reveals UBA5 As a Novel Pancreatic Cancer Target. ACS Chem. Biol. 12, 899–904 (2017). 40. Kokoza, K., Balzarini, J. & Piotrowska, D. G. Novel 5-Arylcarbamoyl-2-methylisoxazolidin-3-yl-3-phosphonates as Nucleotide Analogues. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 33, 552–582 (2014). 41. Talaty, E. R., Young, S. M., Dain, R. P. & Stipdonk, M. J. V. A study of fragmentation of protonated amides of some acylated amino acids by tandem mass spectrometry: observation of an unusual nitrilium ion. Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 1119–1129 (2011). 42. Timokhin, V. I., Gastaldi, S., Bertrand, M. P. & Chatgililoglu, C. Rate Constants for the  $\beta$ -Elimination of Tosyl Radical from a Variety of Substituted Carbon-Centered Radicals. J. Org. Chem. 68, 3532–3537 (2003). 43. Cee, V. J. et al. Systematic Study of the Glutathione (GSH) Reactivity of N-Arylacryla

10

20

30

40

50

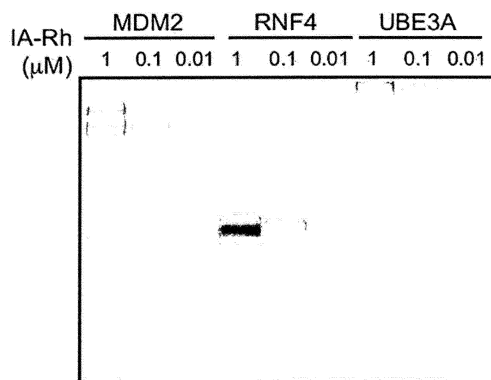


mides: 1. Effects of Aryl Substitution. J. Med. Chem. 58, 9171–9178 (2015). 44. Le Sann, C., Huddleston, J. & Mann, J. Synthesis and preliminary evaluation of novel analogues of quinolines as potential stabilisers of telomeric G-quadruplex DNA. Tetrahedron 63, 12903–12911 (2007). 45. Ikoma, M., Oikawa, M. & Sasaki, M. Synthesis and domino metathesis of functionalized 7-oxanorbornene analogs toward cis-fused heterocycles. Tetrahedron 64, 2740–2749 (2008). 46. Cho, S.-D. et al. A One-Pot Synthesis of Pyrido [2, 3-b] [1, 4] oxazin-2-ones. J. Org. Chem. 68, 7918–7920 (2003). 47. Magolan, J., Carson, C. A. & Kerr, M. A. Total Synthesis of (±)-Mersicarpine. Org. Lett. 10, 1437–1440 (2008). 48. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M.-S. & Leahy, D. J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). Methods Enzymol. 529, 227–240 (2013). 49. Li, C. et al. FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. BMC Biotechnol. 11, 92 (2011). 50. Thomas, J. R. et al. A Photoaffinity Labeling-Based Chemoproteomics Strategy for Unbiased Target Deconvolution of Small Molecule Drug Candidates. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1647, 1–18 (2017). 51. Kall, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nat. Methods 4, 923–925 (2007).

【図面】

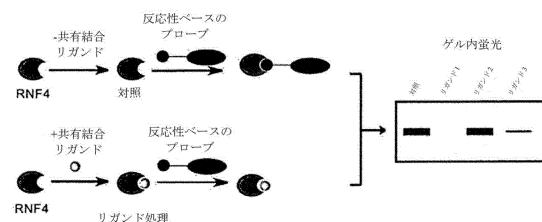
【図 1 A】

E3 リガーゼのシステイン反応性プローブ標識



【図 1 B】

RNF4 に対するシステイン反応性共有結合リガンドのゲルベース ABPP スクリーン



10

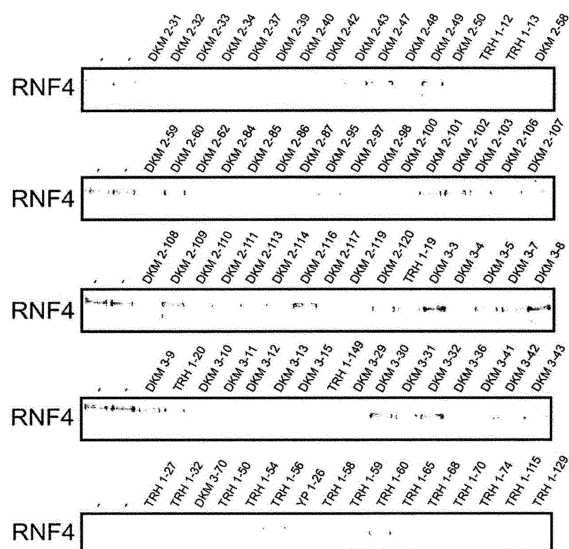
20

30

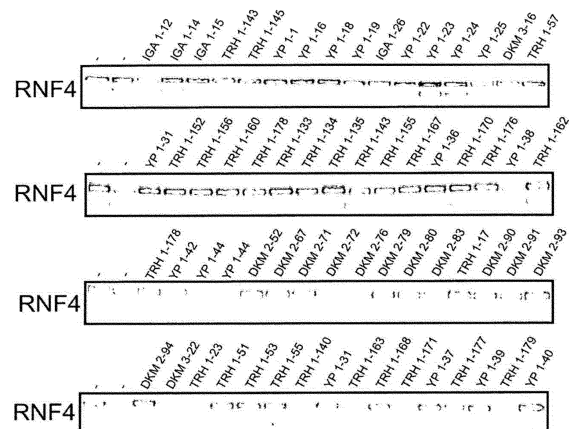
40

50

【図 1 C】

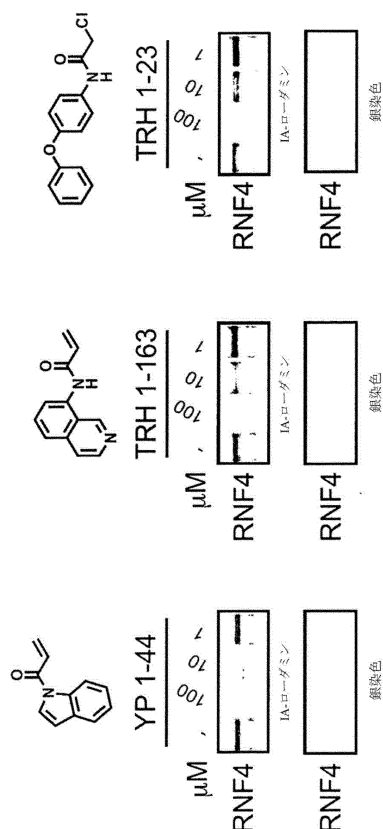


【図 1 D】



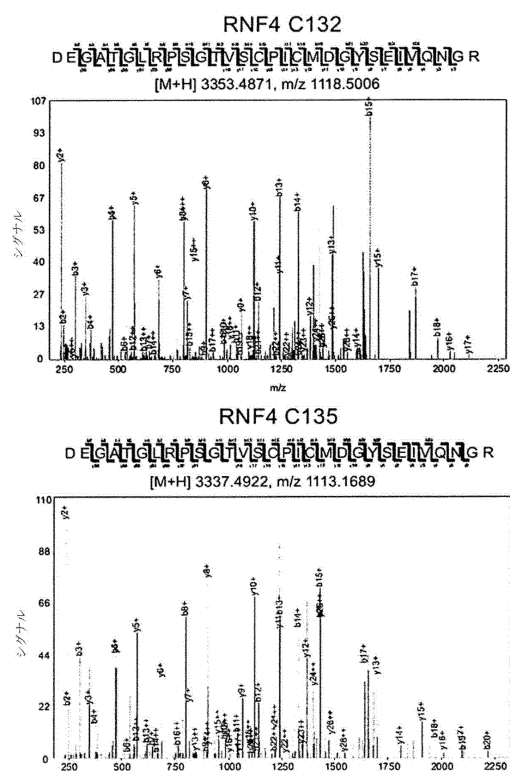
10

【図 1 E】



【図 2 A】

TRH1-23 は、RNF4 の C132 および C135 と反応する



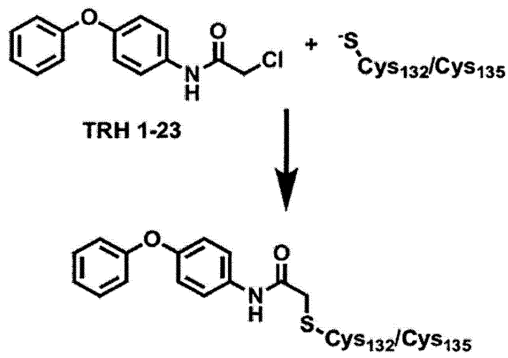
20

30

40

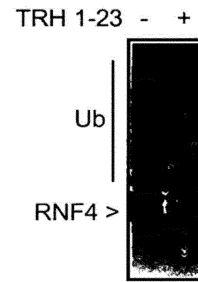
【図 2 B】

RNF4 の C132/135 との TRH1-23 の反応性

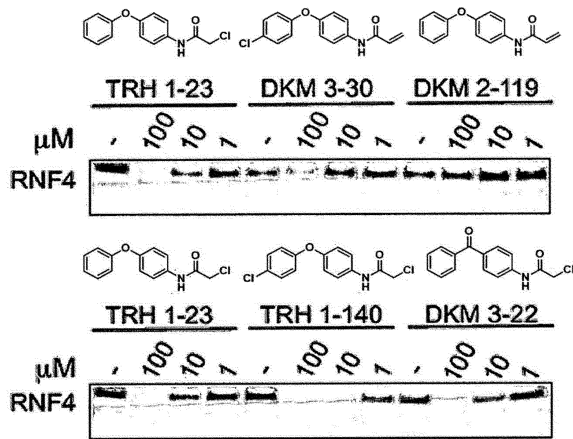


【図 2 C】

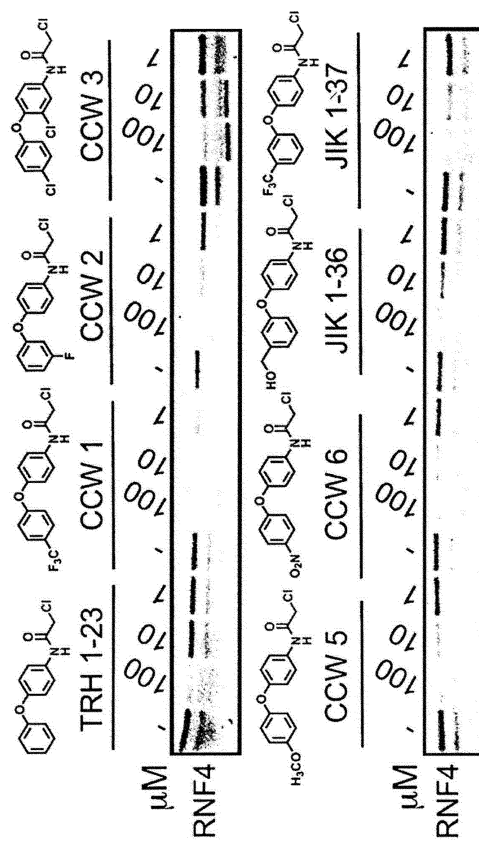
RNF4 の自動ユビキチン化活性



【図 3 A】



【図 3 B - 1】



10

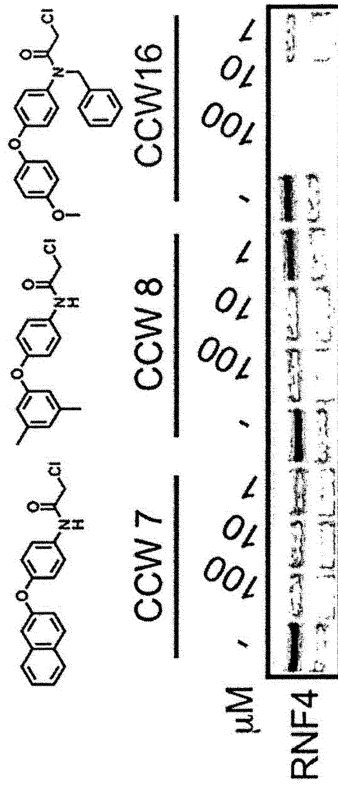
20

30

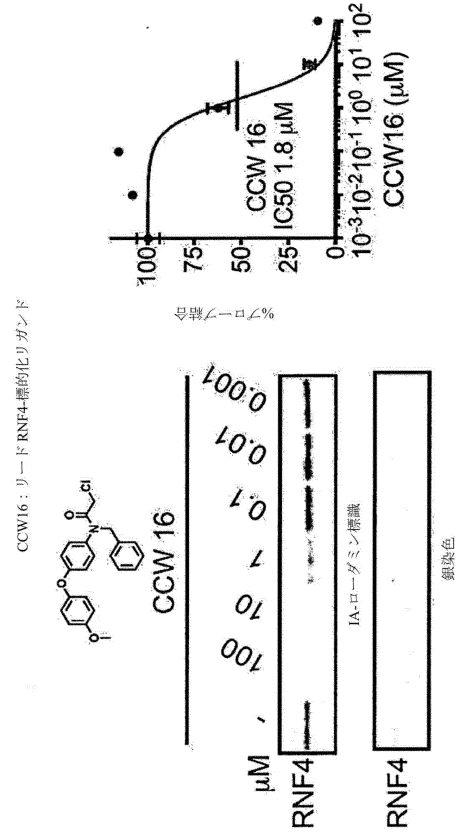
40

50

【図 3 B - 2】

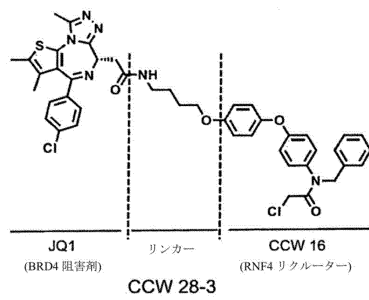


【図 3 C】

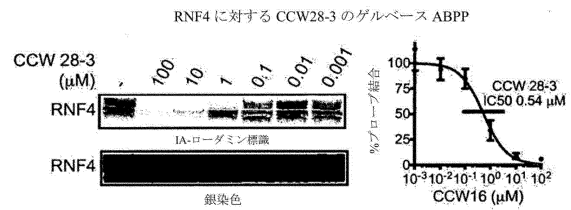


【図 4 A】

CCW28-3 : RNF4 リクルーターベースの分解剤



【図 4 B】



10

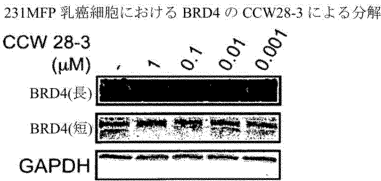
20

30

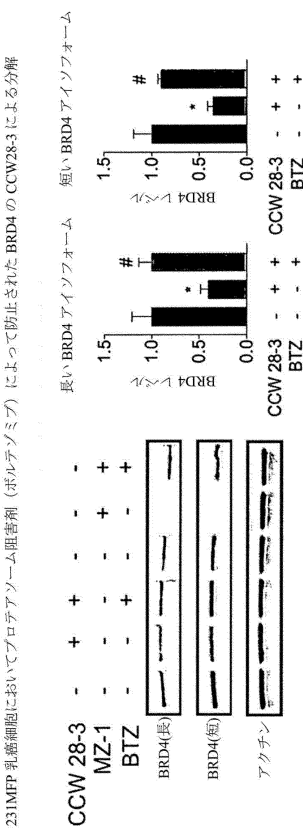
40

50

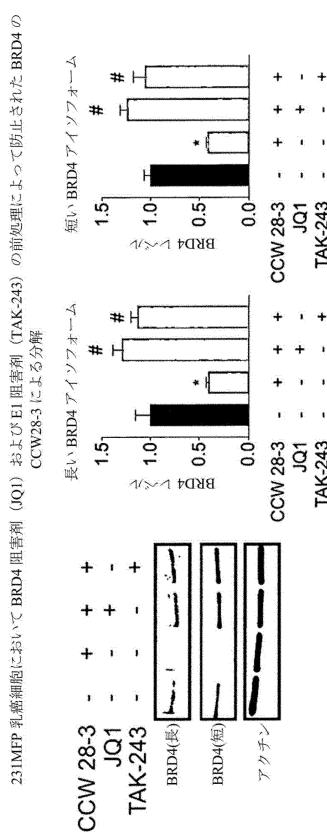
【図 4 C】



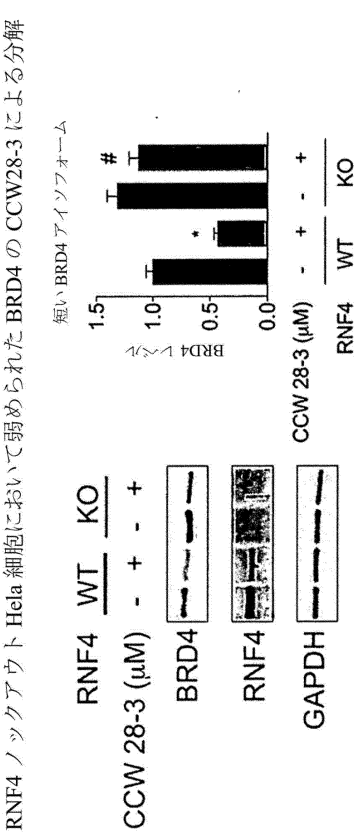
【図 4 D】



【図 4 E】



【図 4 F】



10

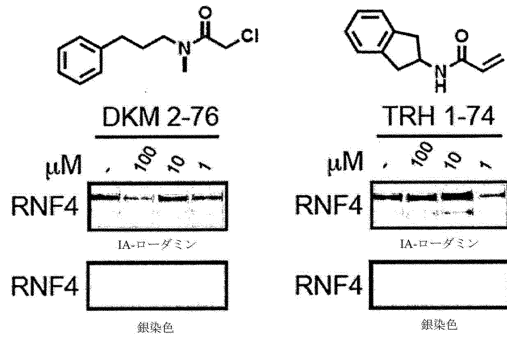
20

30

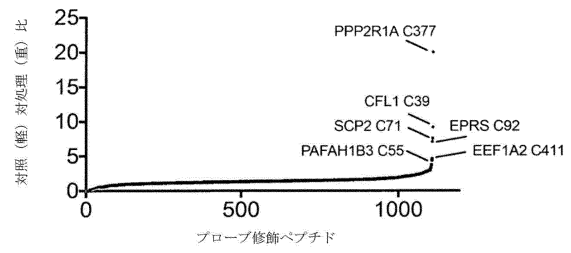
40

50

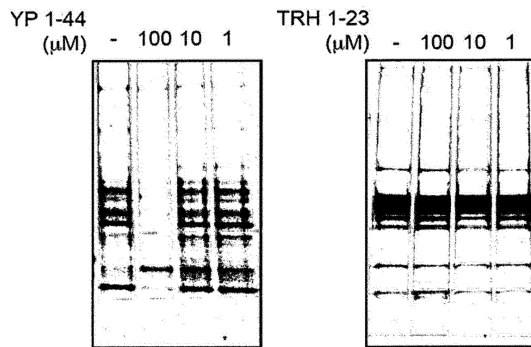
【図 5】



【図 6】

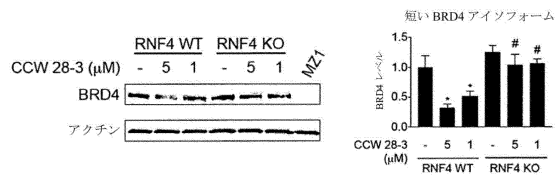


10

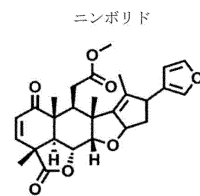


20

【図 7】



【図 8 A】

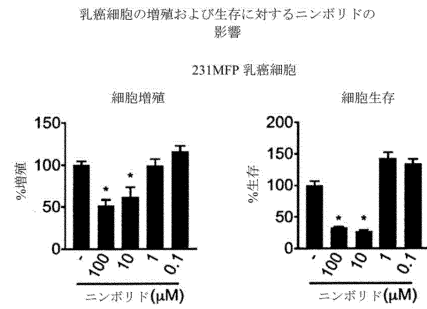


30

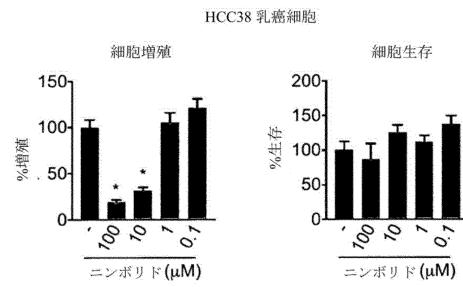
40

50

【図 8 B】



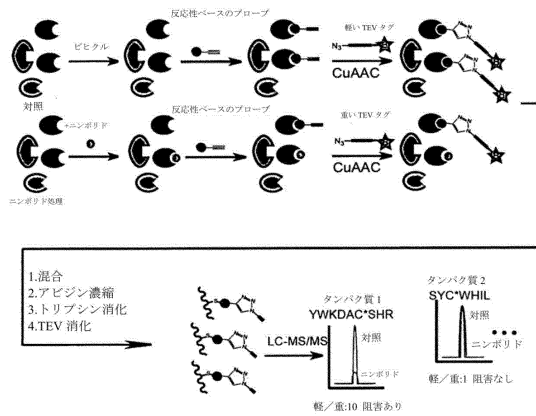
【図 8 C】



10

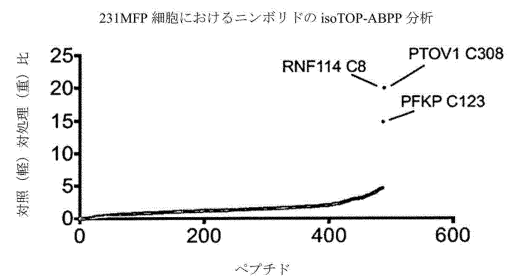
【図 9 A】

isoTOP-ABPP プラットフォームを使用して、ニンボリドの標的となるドラッグ可能なホストスポットをマッピングする



【図 9 B】

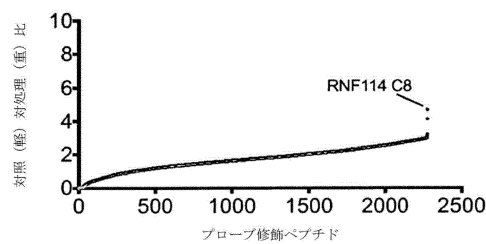
インビトロでの 231MFP 乳癌細胞プロテオームにおけるニンボリドの isoTOP-ABPP 分析



20

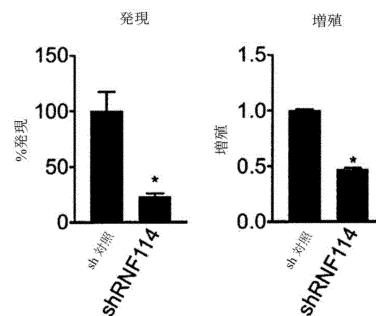
【図 9 C】

インサイチュでの 231MFP 乳癌細胞におけるニンボリドの isoTOP-ABPP 分析



【図 9 D】

RNF114 ノックダウン細胞における 231MFP 細胞増殖

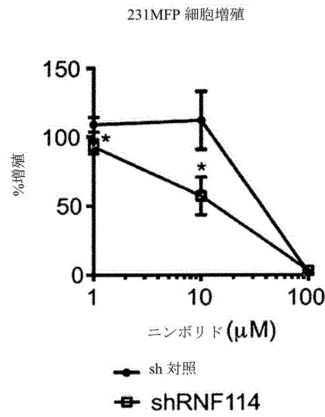


30

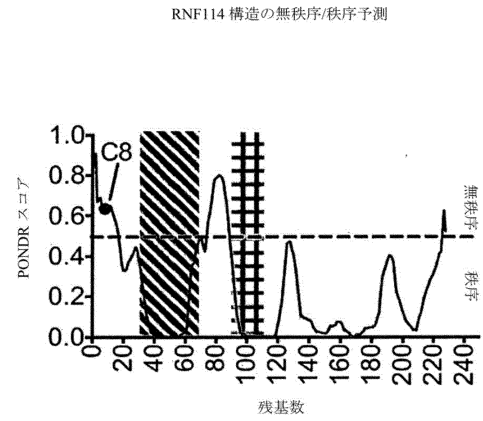
40

50

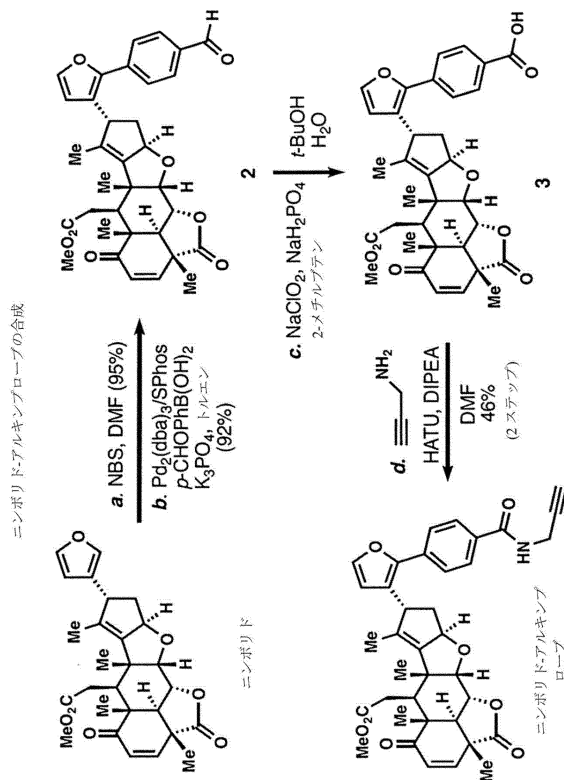
【図 9 E】



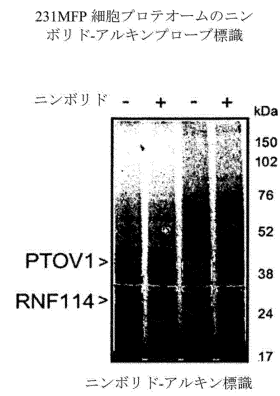
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】



10

20

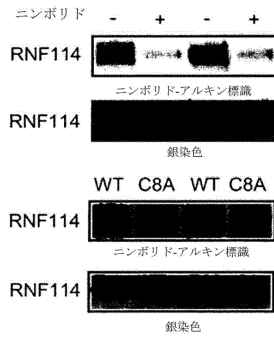
30

40

50

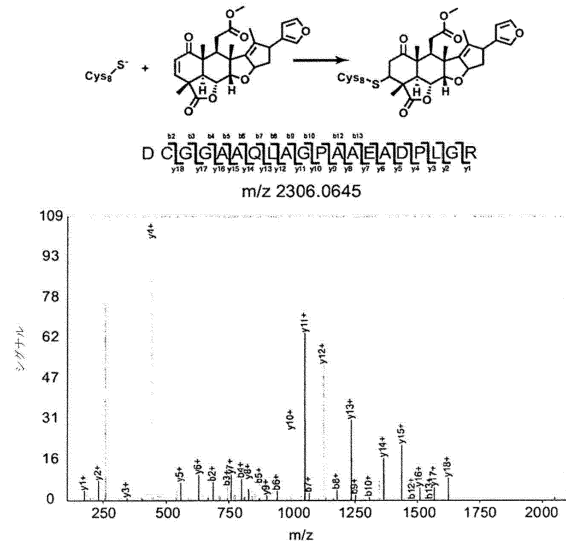


【図 10 D】

RNF114 のニンボリド-アルキルプロ  
ープ標識

【図 10 E】

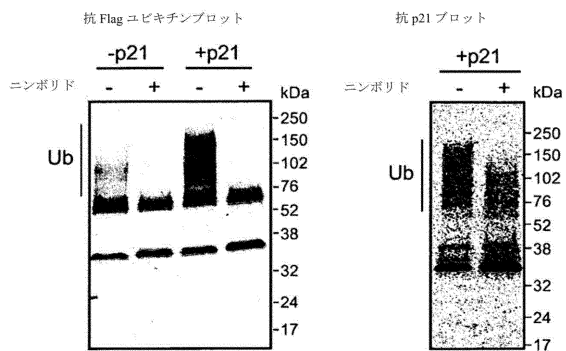
RNF114 の C8 へのニンボリド付加物



10

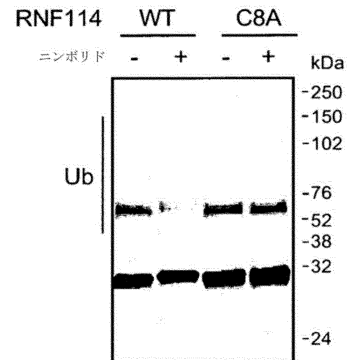
【図 11 A】

RNF114 活性アッセイ



【図 11 B】

抗 Flag ユビキチンプロット

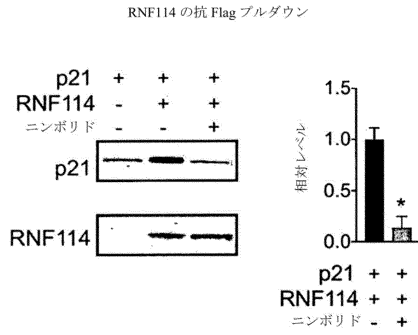


30

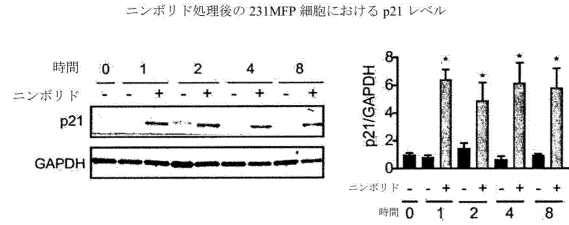
40

50

## 【図 1 1 C】

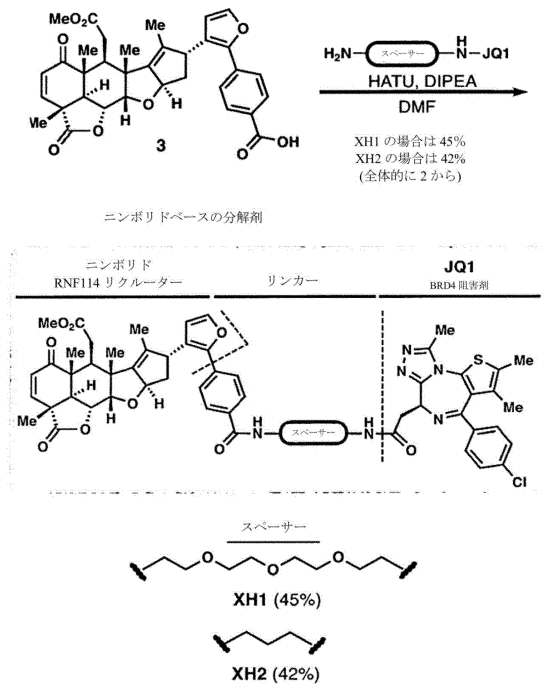


## 【図 1 1 D】

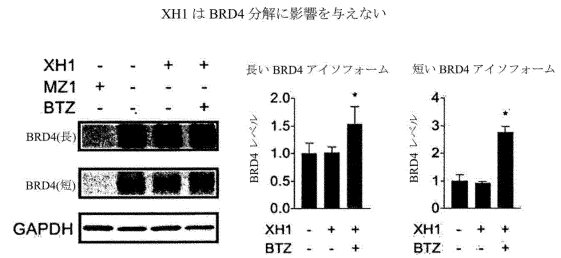


10

## 【図 1 2 A】

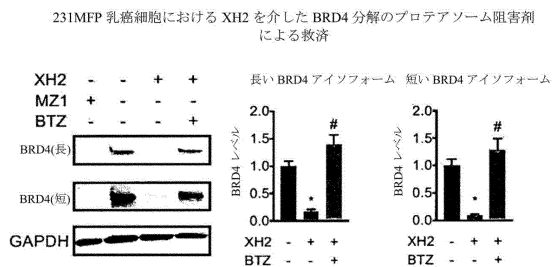


## 【図 1 2 B】

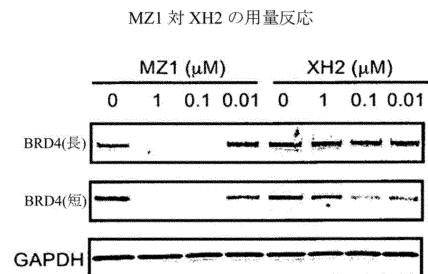


20

## 【図 1 2 C】



## 【図 1 2 D】

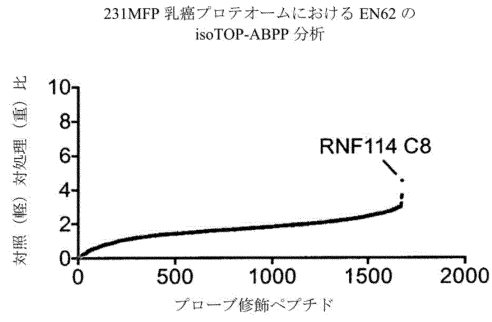


40

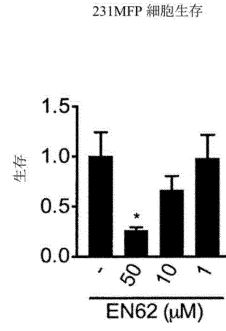
50



【図 1 3 D】

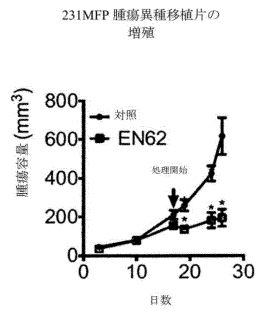


【図 1 3 E】

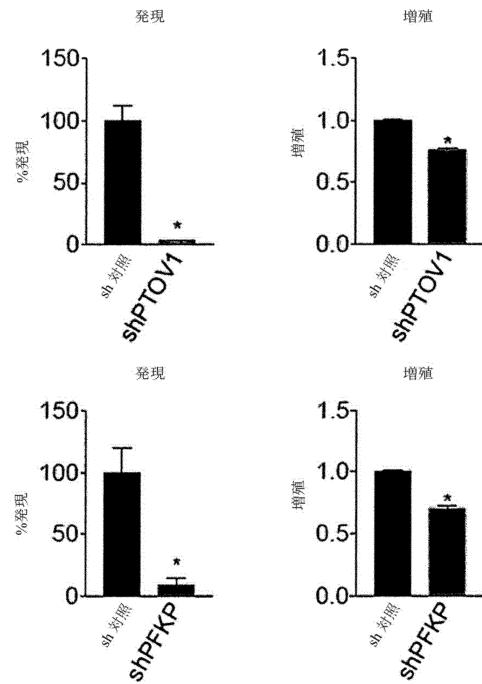


10

【図 1 3 F】



【図 1 4】



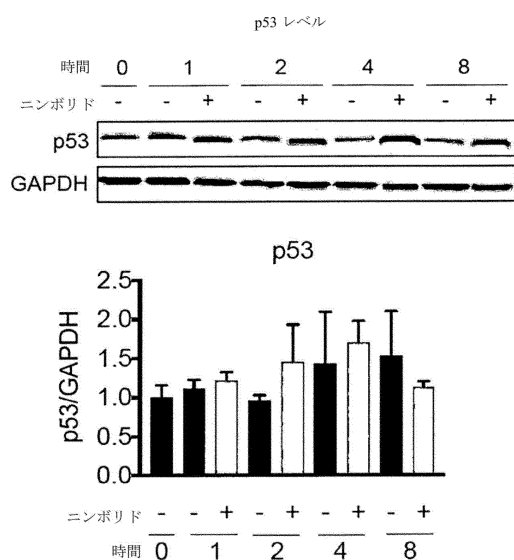
20

30

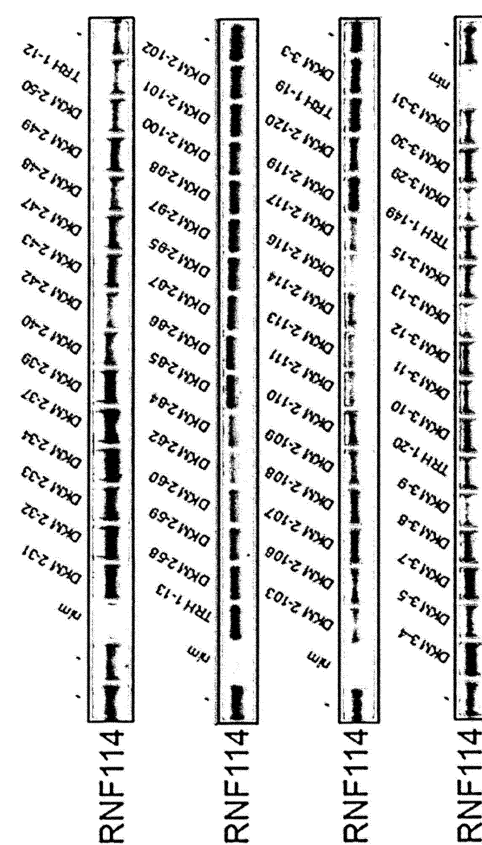
40

50

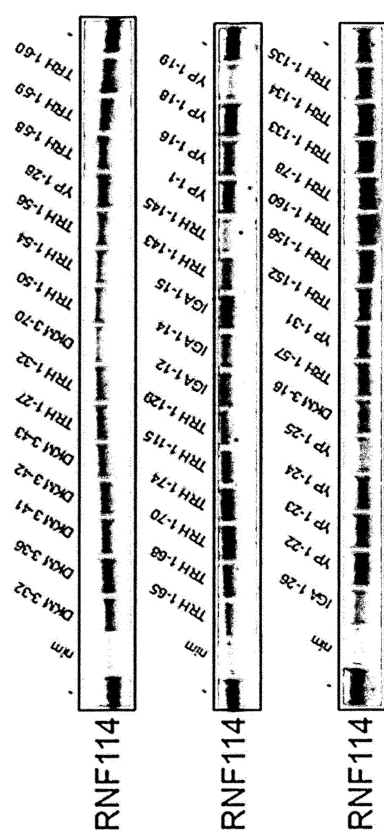
【図 15】



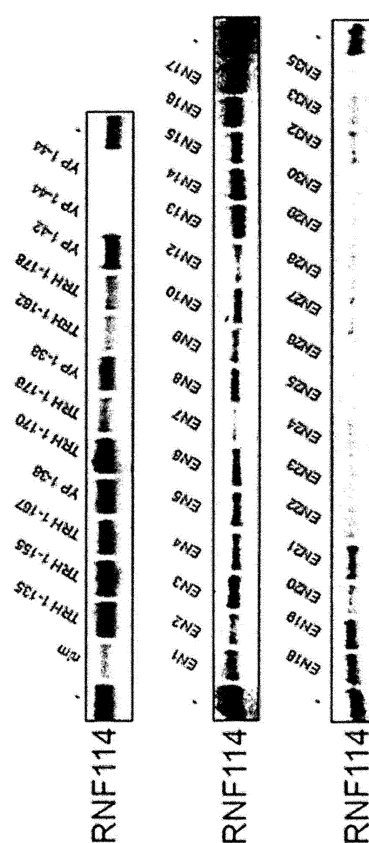
【図 16 A - 1】



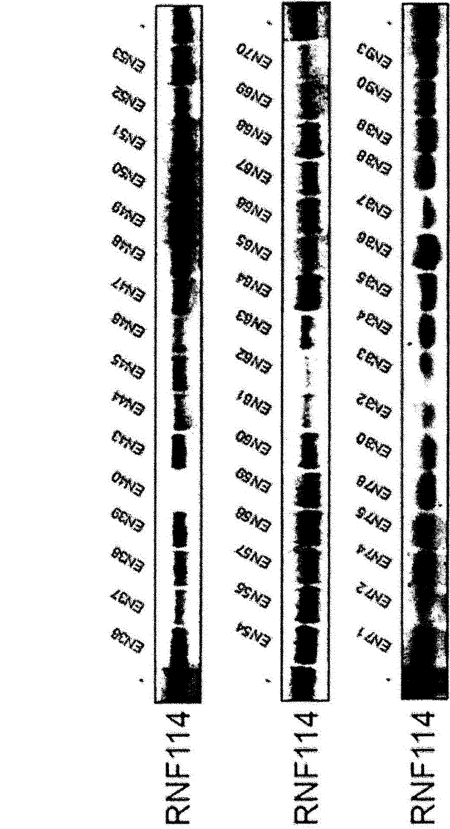
【図 16 A - 2】



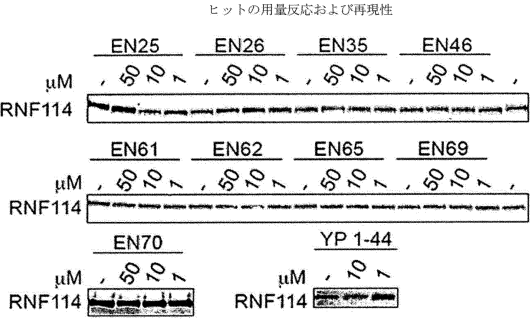
【図 16 B - 1】



【図 1 6 B - 2】



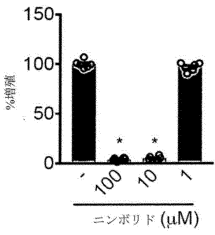
【図 1 6 C】



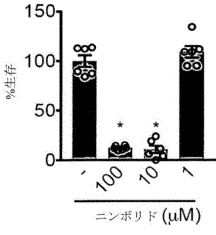
10

20

【図 1 7 A】



【図 1 7 B】

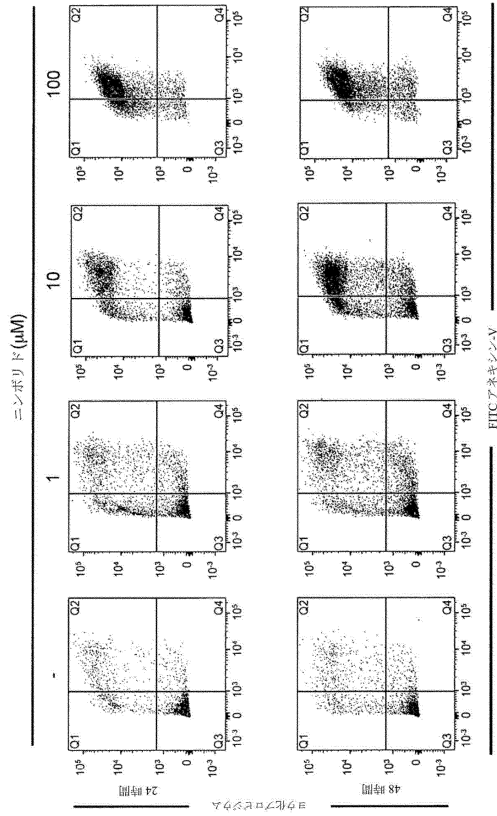


30

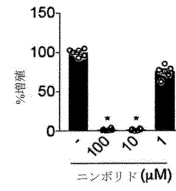
40

50

【図 17 C】



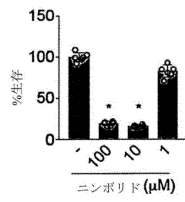
【図 18 A】



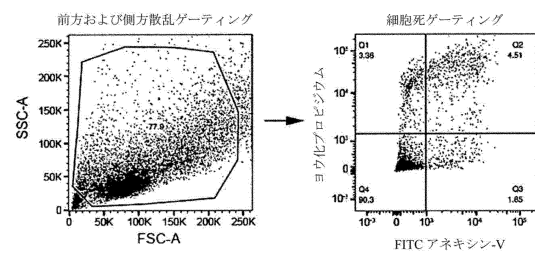
10

20

【図 18 B】



【図 18 C】

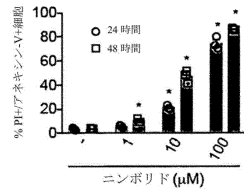


30

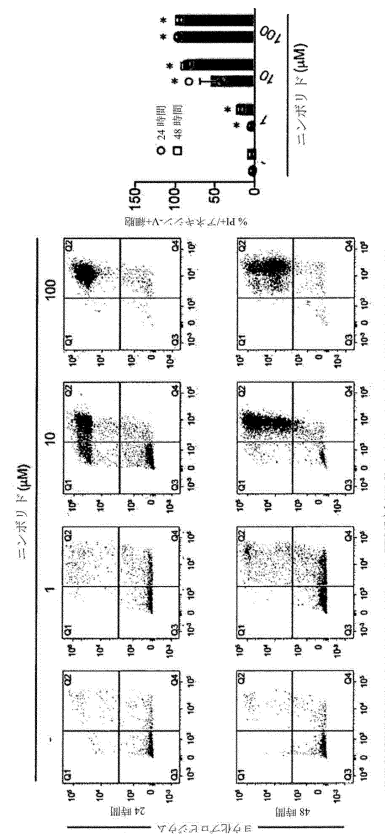
40

50

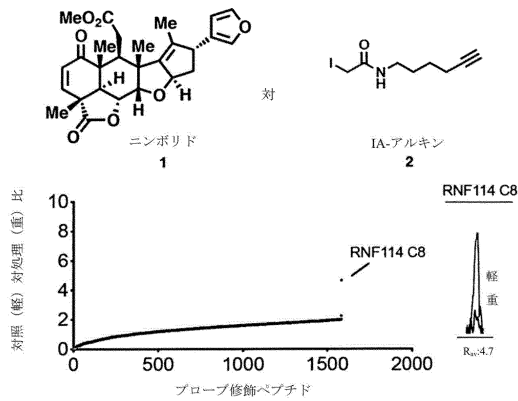
【図 18 D】



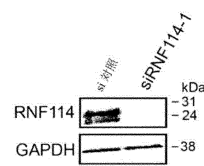
【図 18 E】



【図 19 A】



【図 19 B】



10

20

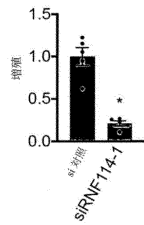
30

40

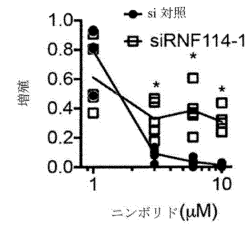
50



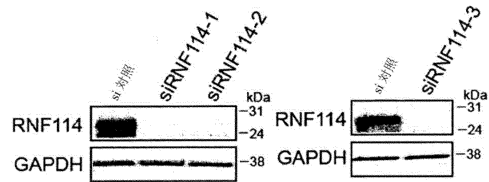
【図 19 C】



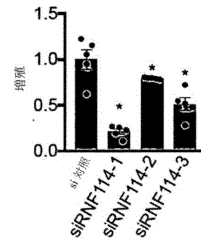
【図 19 D】



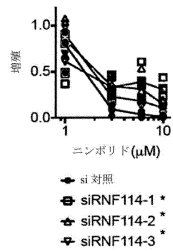
【図 20 A】



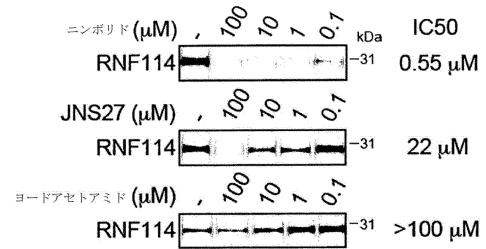
【図 20 B】



【図 20 C】



【図 20 D】



10

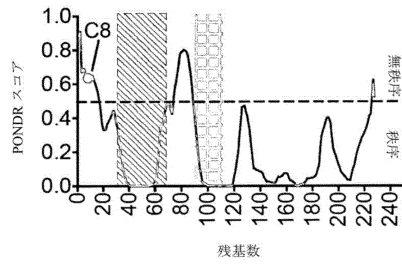
20

30

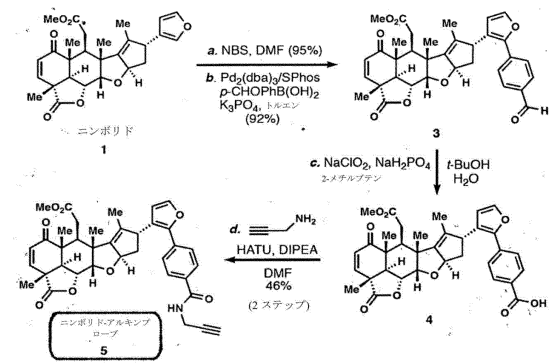
40

50

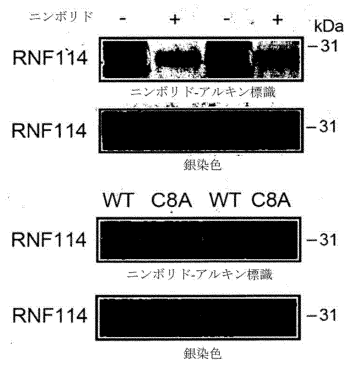
【図 2 1 A】



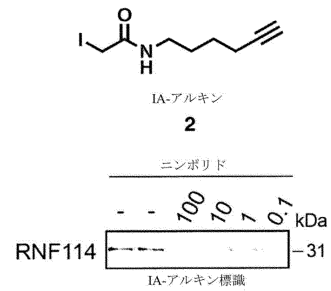
【図 2 1 B】



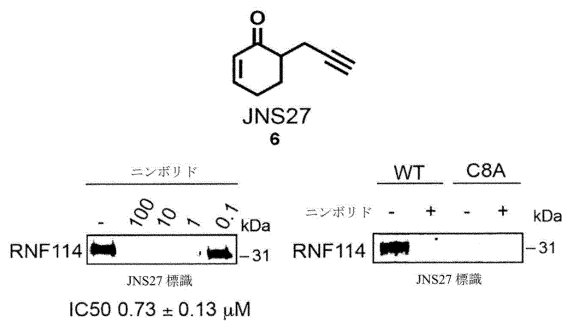
【図 2 1 C】



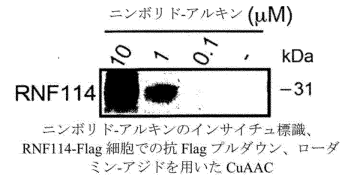
【図 2 1 D】



【図 2 1 E】



【図 2 1 F】



10

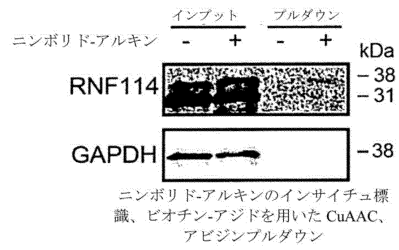
20

30

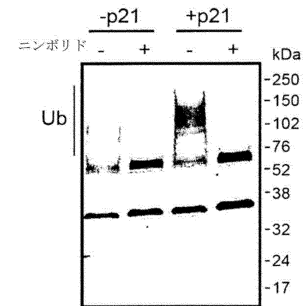
40

50

【図 2 1 G】

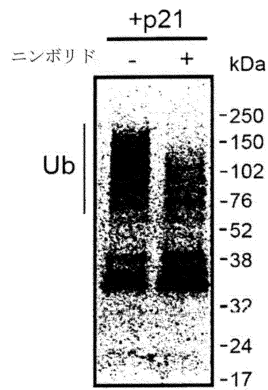


【図 2 2 A】

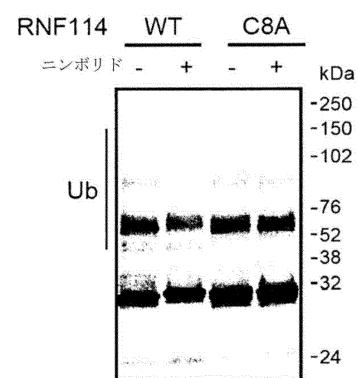


10

【図 2 2 B】



【図 2 2 C】



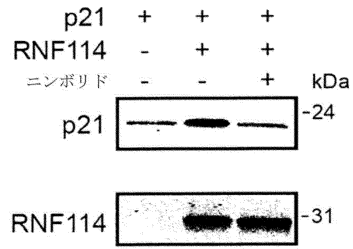
20

30

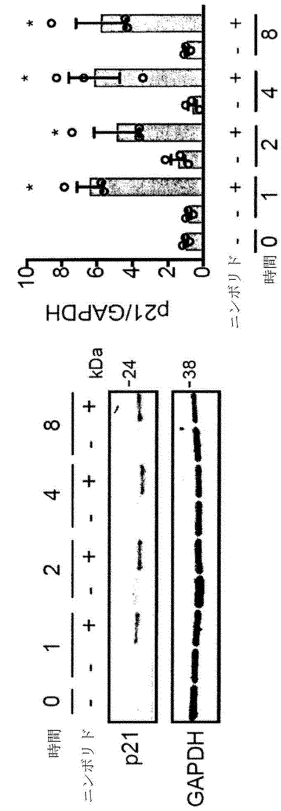
40

50

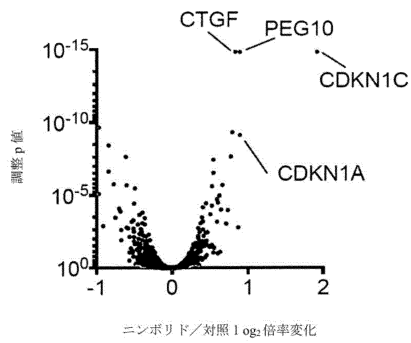
【図 2 2 D】



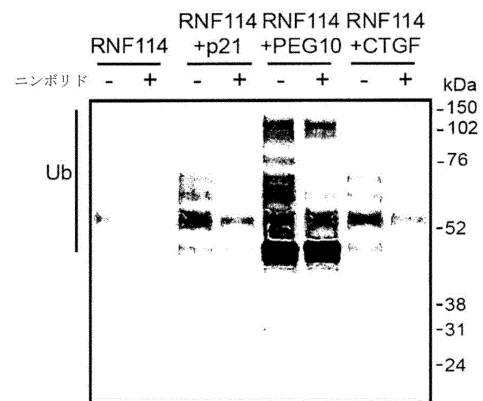
【図 2 2 E】



【図 2 2 F】



【図 2 2 G】



10

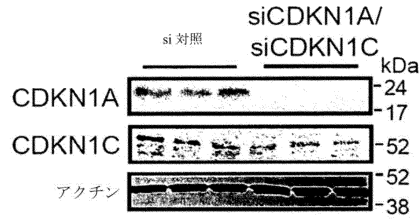
20

30

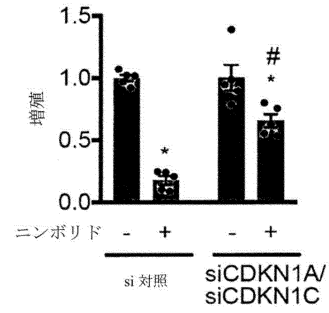
40

50

【図 2 2 H】

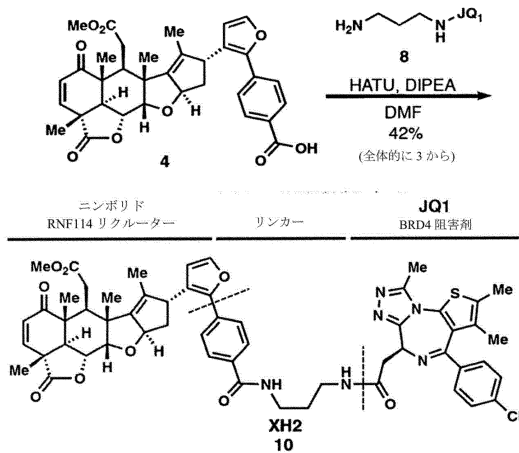


【図 2 2 I】

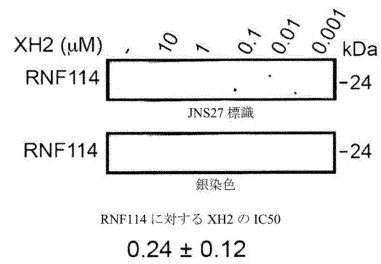


10

【図 2 3 A】

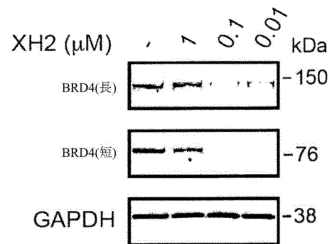


【図 2 3 B】

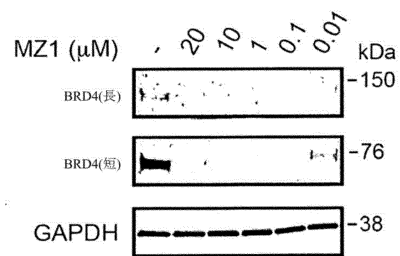


20

【図 2 3 C】



【図 2 3 D】

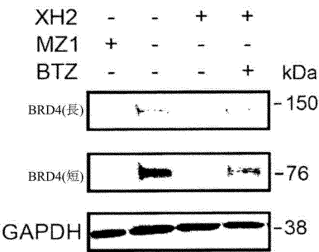


30

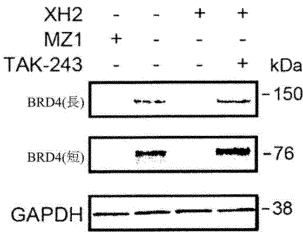
40

50

【図 2 3 E】

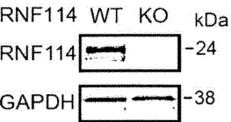


【図 2 3 F】

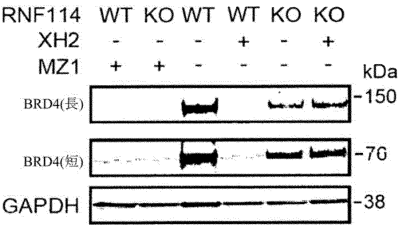


10

【図 2 3 G】

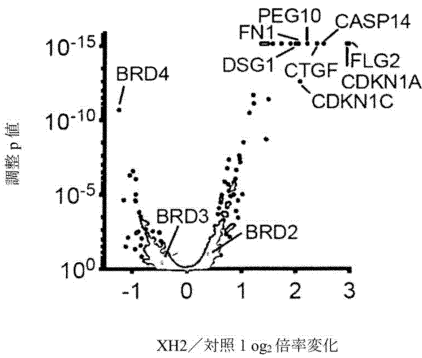


【図 2 3 H】



20

【図 2 3 I】



30

【配列表】

0007631191000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

|         |       |           |         |       |   |
|---------|-------|-----------|---------|-------|---|
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 |   |
| A 6 1 P | 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 |   |
| C 1 2 Q | 1/02  | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/02  |   |
| G 0 1 N | 27/62 | (2021.01) | G 0 1 N | 27/62 | V |
| G 0 1 N | 33/53 | (2006.01) | G 0 1 N | 27/62 | X |
| C 0 7 K | 14/46 | (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 | D |
| C 1 2 N | 9/00  | (2006.01) | C 0 7 K | 14/46 |   |
|         |       |           | C 1 2 N | 9/00  |   |

7 0 8、パークリー、ユークリッド・アベニュー・1 4 2 1

(72)発明者 ワード, カール・シー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 7 0 3、パークリー、ブエナ・アベニュー・1 6 1 2

(72)発明者 ノムラ, ダニエル・ケイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 5 9 7、ウォールナット・クリーク、チャールストン・コート・6 6 4

(72)発明者 シルル, マルクス

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 3 9、ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー・2 5 0、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド気付

(72)発明者 タラリコ, ジョン・エイ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 3 9、ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー・2 5 0、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド気付

(72)発明者 マッケナ, ジェフリー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 3 9、ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー・2 5 0、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド気付

(72)発明者 マイモニ, トーマス・ジョン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 8 0 5、リッチモンド、シニック・アベニュー・1 5 1 8

(72)発明者 フー, シールイ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク・ドライブ・1 3 0・ユニット・6 5 1

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 1 8 / 0 2 2 8 9 0 7 (US, A 1)

国際公開第2 0 1 7 / 1 8 0 4 1 7 (WO, A 1)

国際公開第2 0 1 8 / 0 5 2 9 4 5 (WO, A 1)

国際公開第2 0 2 0 / 1 4 6 7 7 9 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 5 / 0 6

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)