

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7592320号
(P7592320)

(45)発行日 令和6年12月2日(2024.12.2)

(24)登録日 令和6年11月22日(2024.11.22)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	38/12 (2006.01)	A 6 1 K	38/12
請求項の数 33 (全110頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-534405(P2021-534405)	(73)特許権者	518181833
(86)(22)出願日	令和1年8月26日(2019.8.26)		トランスフェール プリュ エス. ウ. セ.
(65)公表番号	特表2021-535209(P2021-535209 A)		カナダ国 アシュ3セ 2ジェ9 ケベック、モントリオール、リュ ピール 3 5 5、ビュロ 5 0 3
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)	(74)代理人	110000109
(86)国際出願番号	PCT/CA2019/051170		弁理士法人特許事務所サイクス
(87)国際公開番号	WO2020/037434	(72)発明者	ベリヴォー リシャル
(87)国際公開日	令和2年2月27日(2020.2.27)		カナダ国 ケベック州 アシュ3ウ 1イクス1 モントリオール クール デュフルーヴ 8
審査請求日	令和4年8月19日(2022.8.19)	(72)発明者	アナビー ボラーヌ
(31)優先権主張番号	62/722,726		カナダ国 ケベック州 ジ4イグレック 3ベ6 ブロッサード リュ オフフェン
(32)優先日	平成30年8月24日(2018.8.24)		バツハ 8 5 6 5
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/804,063		
(32)優先日	平成31年2月11日(2019.2.11)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ソルチリン受容体を標的化し血管擬態を阻害するための方法及び化合物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

ソルチリンを発現し、血管擬態を示す攻撃的癌を治療するための医薬の製造における、
(a)式A－(B)_nを有する結合体化合物であって、
式中、

nが、1、2、3、または4であり、
Aが、ペプチド化合物 式(X)

G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y (X) (配列番号10)

であり、

少なくとも1つの保護基および／または少なくとも1つのシステイン残基が、任意選択で、N末端および／またはC末端で前記ペプチド化合物に接続しており、

Bが、少なくとも1つの抗癌剤であって、任意選択で前記ペプチド化合物の遊離アミンで、前記ペプチド化合物のN末端位置で、前記ペプチド化合物の遊離－SHで、または前記ペプチド化合物の遊離カルボキシルでBがAに接続しており、前記抗癌剤が、アルキル化剤、白金配位剤、代謝拮抗薬、微小管損傷剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生物質、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアマイシン、アマトキシシ、アマニチン、抗癌ペプチド、チロシントキナーゼ阻害薬、上皮増殖因子(EFG)受容体阻害薬、血管新生阻害薬、またはプロテアソーム阻害薬である、前記結合体化合物、または

(b)配列番号25のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはそのフラグメント

の使用であって、

前記攻撃的癌がCD133陽性細胞を含む、使用。

【請求項2】

前記ペプチド化合物が、式(X)によって表され、配列番号10のアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

システインが前記ペプチド化合物のC末端に連結される、請求項1に記載の使用。

【請求項4】

前記ペプチド化合物が、配列番号23のアミノ酸配列からなる、請求項3に記載の使用。

【請求項5】

前記ペプチド化合物が、アセチルまたはスクシニルである少なくとも1つの保護基を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の使用。

【請求項6】

前記ペプチド化合物が、配列番号15または24：

アセチル-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY(配列番号15)

アセチル-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESYC(配列番号24)

によって表される、請求項1に記載の使用。

【請求項7】

抗体またはそのフラグメントが、式A'-(B)_nを有する結合体抗体またはそのフラグメントであり、式中、A'は抗体またはそのフラグメントであり、Bおよびnは請求項1で定義されるとおりである、請求項1に記載の使用。

【請求項8】

Bが、リンカーを介し、AまたはA'に接続している、請求項1から7のいずれか1項に記載の使用。

【請求項9】

リンカーが切断可能リンカーである、請求項7に記載の使用。

【請求項10】

前記抗癌剤が、ドセタキセル、パクリタキセル、ドキソルビシン、カバジタキセル、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアマイシン、アマトキシン、アマニチン、またはアルドキシソルビシンである、請求項1から9のいずれか1項に記載の使用。

【請求項11】

前記抗癌剤がドセタキセルである、請求項10に記載の使用。

【請求項12】

前記結合体化合物が、式(XIX)または(XXIII)：

GVRAK(ドセタキセル)AGVRN(Nle)FK(ドセタキセル)SESY-式(XIX)

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号10のペプチド化合物を含む)または

アセチル-GVRAK(ドセタキセル)AGVRN(Nle)FK(ドセタキセル)SESY-式(XXIII)

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号15のペプチド化合物を含む)によって表される、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

前記抗癌剤がドキソルビシンである、請求項10に記載の使用。

【請求項14】

前記結合体化合物が、式(XXVI)または(XXVII)：

GVRAK(ドキソルビシン)AGVRN(Nle)FK(ドキソルビシン)SESY-式(XXVI)

(各リジン残基にドキソルビシン分子が接続している配列番号10のペプチド化合物を含む)または

10

20

30

40

50

アセチル-G V R A K (ドキシソルビシン) A G V R N (N I e) F K (ドキシソルビシン) S E S Y-式 (X X V I I I)

(各リジン残基にドキシソルビシン分子が接続している配列番号 1 5 のペプチド化合物を含む)

によって表される、請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

前記抗癌剤がアルドキシソルビシンである、請求項 1 0 に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記結合体化合物が、式 (L I) または (L I I) :

G V R A K A G V R N (N I e) F K S E S Y C (アルドキシソルビシン) -式 (L I)

(システイン残基にアルドキシソルビシン分子が接続している配列番号 2 3 のペプチド化合物を含む、または

前記ペプチド化合物の C 末端にシステイン残基が付加され、前記システイン残基にアルドキシソルビシン分子が接続している、配列番号 1 0 のペプチド化合物を含む)、または

アセチル-G V R A K A G V R N (N I e) F K S E S Y C (アルドキシソルビシン) -式 (L I I)

(システイン残基にアルドキシソルビシン分子が接続している配列番号 2 4 のペプチド化合物を含む、または

前記ペプチド化合物の C 末端にシステイン残基が付加され、前記システイン残基にアルドキシソルビシン分子が接続している、配列番号 1 5 のペプチド化合物を含む)

によって表される、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 7】

ソルチリンを発現し、血管擬態を示す攻撃的癌が、卵巣癌、子宮内膜癌、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、皮膚癌、脳癌、尿路上皮癌、カルチノイド癌、腎臓癌、精巣癌または下垂体癌である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 8】

ソルチリンを発現し、血管擬態を示す攻撃的癌を治療するために使用するための薬剤であって、前記薬剤は

(a) 式 A - (B) _n 結合体化合物であり、

式中、

n が、1、2、3、または 4 であり、

A が、ペプチド化合物 式 (X) :

G V R A K A G V R N (N I e) F K S E S Y (X) (配列番号 1 0)

であり、

少なくとも 1 つの保護基および／または少なくとも 1 つのシステイン残基が、任意選択で、N 末端および／または C 末端で前記ペプチド化合物に接続しており、

B が、少なくとも 1 つの抗癌剤であって、前記ペプチド化合物のリジン残基の遊離アミンで、任意選択でリンカーを介し、または前記ペプチド化合物の N 末端位置で、任意選択でリンカーを介し、A に接続しており、前記抗癌剤が、アルキル化剤、白金配位剤、代謝拮抗薬、微小管損傷剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生物質、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアマイシン、アマトキシシン、アマニチン、抗癌ペプチド、チロシントキナーゼ阻害薬、上皮増殖因子 (E F G) 受容体阻害薬、血管新生阻害薬、またはプロテアソーム阻害薬である、前記結合体化合物、または

(b) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはそのフラグメント

であり、

前記攻撃的癌が C D 1 3 3 陽性細胞を含む、薬剤。

【請求項 1 9】

前記ペプチド化合物が、式 (X) によって表され、配列番号 1 0 のアミノ酸配列からなる、請求項 1 8 に記載の使用のための薬剤。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

システインが前記ペプチド化合物の C 末端に連結される、請求項 18 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 21】

前記ペプチド化合物が、配列番号 23 のアミノ酸配列からなる、請求項 20 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 22】

前記ペプチド化合物が、アセチルまたはスクシニルである少なくとも 1 つの保護基を含む、請求項 18 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の使用のための薬剤。

【請求項 23】

前記ペプチド化合物が、配列番号 15 または 24：

アセチル-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY(列番号 15)

アセチル-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESYC(配列番号 24)

によって表される、請求項 18 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 24】

抗体またはそのフラグメントが、式 A'-(B)_nを有する結合体抗体またはそのフラグメントであり、式中、A'は抗体またはそのフラグメントであり、Bおよびnは請求項 18 で定義されるとおりである、請求項 18 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 25】

Bが、リンカー、任意選択で切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーを介し、AまたはA'に接続している、請求項 18 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の使用のための薬剤。

【請求項 26】

前記抗癌剤が、ドセタキセル、パクリタキセル、ドキソルビシン、カバジタキセル、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアマイシン、アマトキシン、アマニチン、またはアルドキソルビシンである、請求項 18 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の使用のための薬剤。

【請求項 27】

前記抗癌剤がドセタキセルである、請求項 26 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 28】

前記結合体化合物が、式(XIX)または(XXIII)：

GVRAK(ドセタキセル)AGVRN(Nle)FK(ドセタキセル)SESY-式(XIX)

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号 10 のペプチド化合物を含む)または

アセチル-GVRAK(ドセタキセル)AGVRN(Nle)FK(ドセタキセル)SESY-式(XXIII)

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号 15 のペプチド化合物を含む)によって表される、請求項 27 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 29】

前記抗癌剤がドキソルビシンである、請求項 26 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 30】

前記結合体化合物が、式(XXVI)または(XXVII)：

GVRAK(ドキソルビシン)AGVRN(Nle)FK(ドキソルビシン)SESY-式(XXVI)

(各リジン残基にドキソルビシン分子が接続している配列番号 10 のペプチド化合物を含む)または

アセチル-GVRAK(ドキソルビシン)AGVRN(Nle)FK(ドキソルビシン)SESY-式(XXVII)

(各リジン残基にドキソルビシン分子が接続している配列番号 15 のペプチド化合物を

10

20

30

40

50

含む)

によって表される、請求項 29 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 31】

前記抗癌剤がアルドキソルピシンである、請求項 26 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 32】

前記結合体化合物が、式 (L I) または (L I I) :

G V R A K A G V R N (N I e) F K S E S Y C (アルドキソルピシン) - 式 (L I)

(システイン残基にアルドキソルピシン分子が接続している配列番号 23 のペプチド化合物を含む、または

前記ペプチド化合物の C 末端にシステイン残基が付加され、前記システイン残基にアルドキソルピシン分子が接続している、配列番号 10 のペプチド化合物を含む)、または

アセチル-G V R A K A G V R N (N I e) F K S E S Y C (アルドキソルピシン) - 式 (L I I)

(システイン残基にアルドキソルピシン分子が接続している配列番号 24 のペプチド化合物を含む、または

前記ペプチド化合物の C 末端にシステイン残基が付加され、前記システイン残基にアルドキソルピシン分子が接続している、配列番号 15 のペプチド化合物を含む)

によって表される、請求項 31 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 33】

ソルチリンを発現し、血管擬態を示す攻撃的癌が、卵巣癌、子宮内膜癌、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、皮膚癌、脳癌、尿路上皮癌、カルチノイド癌、腎臓癌、精巣癌または下垂体癌である、請求項 18 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の使用のための薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 8 月 24 日出願の米国特許仮出願第 62 / 722, 726 号及び 2019 年 02 月 11 日出願の米国特許仮出願第 62 / 804, 063 号の優先権を主張するものであり、これらはいずれも、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0002】

本開示は、ソルチリン受容体を標的化し血管擬態を阻害するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

近年の世界保健機関の報告によると、2012 年には 820 万例の患者が癌で死亡している (1)。そのため、癌は、発展途上国及び先進国の両方で継続的に増大している健康問題である。また、今後 20 年以内の年間の癌症例数は増加することが推定されている (1)。癌に対する一般的な治療法は、手術、内分泌療法、化学療法、及び放射線療法である (2)。しかし、最近では、癌細胞の特定の分子的欠陥を狙い、不正確な化学療法剤よりも有効かつ毒性の低い療法を約束する「標的治療薬」の世代に期待が寄せられている (3)。

【0004】

現在、抗癌薬が古典的処方投与される場合、治療剤の約 95 % が健康な組織内の細胞に取り入れられ、腫瘍に到達するのは約 2 ~ 5 % に過ぎないと推定されている (4)。そのため、任意の将来の個別治療アプローチを成功させる上での課題は、標的療法の選択性を増大させることであり、それは部分的には、抗癌薬を癌細胞区画内に能動輸送することによってなされる (5 ~ 6)。

【0005】

ソルチリンは、リガンド内在化及び細胞輸送における役割を考慮すれば、細胞自身のシ

10

20

30

40

50

ヤトルシステムの1つと考えられ得る(11)。最近の研究では、ソルチリンが、エンドサイトーシス及び受容体輸送の両方で二重の役割を有し、細胞表面から特定の細胞内区画までのリガンドの選別や、プロニューロトロフィン(例えば、ニューロペプチドニューロテンシン(NT)、proNGF、及びproBDNF)の輸送を可能にすることが実証されている(8、11~16)。ソルチリン発現は、乳癌、前立腺癌、結腸癌、膵臓癌、皮膚癌、及び下垂体癌を含めたいくつかのヒトの癌で上昇する(17~20)。また、ソルチリンは、健康な卵巣組織に比べて卵巣癌で過剰発現することも報告されている(21、22)。

【0006】

血管擬態は、浸潤及び転移を含めた腫瘍の悪性度に関連している。血管擬態は、より攻撃的な腫瘍表現型や、癌患者の5年全生存率が不良であることと結び付けられている(24)。血管擬態は、癌細胞が内皮細胞を伴わない機序を通じて代替的な血液灌流経路を確立させるのに用いられるプロセスとして説明されている(25、29)。加えて、血管擬態は、癌細胞の潜在的な伝播経路も提供する(42)。1999年には、非常に攻撃的かつ転移性のヒト黒色腫でパターン化された容器様チャネル構造が観察され、その構造内で赤血球が検出された(28)。このようなチャネル内では、光学顕微鏡でも、透過電子顕微鏡でも、CD34及びCD31内皮細胞マーカーの免疫組織化学検出法でも、内皮細胞が検出されなかった。

【0007】

血管擬態は、腫瘍成長で重要な役割を果たし(42)、また、卵巣、乳房、肺、結腸直腸、前立腺、膀胱、腎臓の癌腫、肉腫及び膠腫でも特徴付けられている(43、29、44)。生存期間解析により、腫瘍内に血管擬態を有する患者は、血管擬態を示さない腫瘍を有する患者に比べて臨床的転帰が不良であることが示された。15タイプの悪性腫瘍において血管擬態が癌患者の生存期間に及ぼす影響を評価するメタ解析研究では、血管擬態が、より攻撃的な腫瘍表現型及び不良な5年全生存率に関連することが示された(24、43)。最近、癌幹細胞(CSC)及び上皮内皮転換(上皮間葉転換のサブタイプ)が、癌細胞の可塑性を刺激し、細胞外マトリックスをリモデリングし、血管擬態チャネルを宿主血管に接続することによって血管擬態を促進し得ることが報告されている(45)。

【0008】

卵巣癌は、血管擬態が説明され、全患者生存期間の減少に関連付けられた最初の癌腫の1つである(43)。120件の卵巣癌試料における後ろ向き研究により、血管擬態が全試験組織の43%に関与することが実証された(46)。同じ研究において、癌幹細胞に対する最も信頼できる細胞表面マーカーの1つであるCD133発現が、卵巣癌組織の47%に認められた。血管擬態及びCD133陽性発現が両方存在することは、卵巣癌患者の予後不良につながる腫瘍段階の進行、高悪性度卵巣癌、及び化学療法に対する非応答性に関連付けられた。乳癌の場合には、血管擬態がトリプルネガティブ乳癌(TNBC)検体で最も高いことが報告されている(30)。この後者の研究では、CSCの特徴を有するCD133+細胞がTNBCの血管擬態と関連付けられた。さらに、TNBCにおいてCD133発現及び血管擬態は緊密な関係を有していた。これは、可塑性の程度が高いTNBC由来MDA-MB-231細胞の内部のCSC亜集団が、in vitroで血管擬態及び3D-管状構造形成を誘発することが示唆されたためである。

【発明の概要】

【0009】

したがって、第1の態様は、式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、及び式(XII)の化合物:

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY(I)$ (配列番号1)

$(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY(II)$ (配列番号2)

$YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L(III)$ (配列番号3)

10

20

30

40

50

YKX₁₈LRR(X₁₉)_nPLRDPALRX₂₀X₂₁L(IV)(配列番号4)

IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)(配列番号5)

IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)(配列番号6)

IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)(配列番号7)

GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)(配列番号8)

GVRAKAGVRNMFKSESY(IX)(配列番号9)

GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY(X)(配列番号10)

YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)(配列番号11)

YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)(配列番号12)

YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)(配列番号13)

から選択される化合物に対し、少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド化合物であって、式中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₈、及びX₁₉が、独立的に、任意のアミノ酸から選択され、

X₁₆、X₁₇、X₂₀、及びX₂₁が、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択され、nが、0、1、2、3、4、または5であり；

X₉が2回以上存在する場合、当該X₉の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、

X₁₉が2回以上存在する場合、当該X₉の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され

少なくとも1つの保護基及び／または少なくとも1つの標識剤が、任意選択で、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続しており、

任意選択で、当該ペプチド化合物が環状である、

血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、ペプチド化合物である。

【0010】

別の態様は、式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、及び式(XII)の化合物：

X₁X₂X₃X₄X₅GVX₆AKAGVX₇NX₈FKSESY(I)(配列番号1)

(X₉)_nGVX₁₀AKAGVX₁₁NX₁₂FKSESY(II)(配列番号2)

YKX₁₃LRRX₁₄APRWDX₁₅PLRDPALRX₁₆X₁₇L(III)(配列番号3)

YKX₁₈LRR(X₁₉)_nPLRDPALRX₂₀X₂₁L(IV)(配列番号4)

IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)(配列番号5)

IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)(配列番号6)

IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)(配列番号7)

GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)(配列番号8)

GVRAKAGVRNMFKSESY(IX)(配列番号9)

GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY(X)(配列番号10)

YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)(配列番号11)

YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)(配列番号12)

YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)(配列番号13)

から選択される化合物に対し、少なくとも80%の配列同一性を有するペプチド化合物であって、式中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₈、及びX₁₉が、独立的に、任意のアミノ酸から選択され、

X₁₆、X₁₇、X₂₀、及びX₂₁が、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択され、nが、0、1、2、3、4、または5であり；

X₉が2回以上存在する場合、当該X₉の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され

X₁₉が2回以上存在する場合、当該X₉の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され

少なくとも1つの保護基及び／または少なくとも1つの標識剤が、任意選択で、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続しており、

任意選択で、当該ペプチド化合物が環状である、
血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、ペプチド化合物である。

【0011】

1つの態様において、配列番号25～50のいずれか1つに示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントに特異的に結合する化合物、ペプチド化合物、またはその誘導体であって、血管凝態の阻害に使用するための、化合物、ペプチド化合物、またはその誘導体が提供される。

【0012】

1つの態様において、ソルチリン受容体を標的化する化合物、ペプチド化合物、またはその誘導体が提供される。

【0013】

1つの態様において、ソルチリン受容体の標的化に使用するための化合物、ペプチド化合物、またはその誘導体が提供される。

【0014】

1つの態様において、配列番号25～50のいずれか1つに示されるような少なくとも2個、任意選択で少なくとも4個の連続するアミノ酸残基、そのアナログ、またはそのフラグメントに結合する、化合物、ペプチド化合物、またはその誘導体が提供される。

【0015】

さらなる態様において、本明細書では、式 $A - (B)_n$ を有する結合体化合物であって、式中、

n が、1、2、3、または4であり、

A が、本開示で定義されるようなペプチド化合物であって、当該ペプチドが任意選択で保護基によって保護されている、ペプチド化合物であり、

B が、少なくとも1つの治療剤であって、 A に接続している、治療剤である、
血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、結合体化合物が開示される。

【0016】

さらなる態様において、本明細書では、式 $A - (B)_n$ を有する結合体化合物であって、式中、

n が、1、2、3、または4であり、

A が、本開示で定義されるようなペプチド化合物であって、任意選択で保護基によって保護されている、ペプチド化合物であり、

B が、少なくとも1つの治療剤であって、任意選択で当該ペプチド化合物の遊離アミンで、当該ペプチド化合物のN末端位置で、当該ペプチド化合物の遊離-SHで、または当該ペプチド化合物の遊離カルボキシルで A に接続している、治療剤である、
血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、結合体化合物が開示される。

【0017】

本明細書で開示されるさらなる態様は、式 $A - (B)_n$ を有する結合体化合物であって、式中、

n が、1、2、3、または4であり、

A が、本開示で定義されるようなペプチド化合物であって、当該ペプチドが任意選択で保護基によって保護されている、ペプチド化合物であり、

B が、少なくとも1つの治療剤であって、当該ペプチド化合物のリジン残基の遊離アミンで、任意選択でリンカーを介し、または当該ペプチド化合物のN末端位置で、任意選択でリンカーを介し、 A に接続している、治療剤である、
血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、結合体化合物である。

【0018】

本明細書で開示される別の態様は、式 $(XXIII)$ によって表される結合体化合物である。

アセチル-GVRAK (ドセタキセル) AGVRN (Nle) FK (ドセタキセル) SE
SY-式 $(XXIII)$

10

20

30

40

50

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号 15 を有するペプチド化合物を含む)

【0019】

本明細書で開示される別の態様は、式 (X X V I I I) によって表される結合体化合物である。

アセチル-G V R A K (ドキシソルピシン) A G V R N (N l e) F K (ドキシソルピシン) S E S Y-式 (X X V I I I)

(各リジン残基にドキシソルピシン分子が接続している配列番号 15 を有するペプチド化合物を含む)

【0020】

本明細書で開示される別の態様は、式 (L I I) によって表される結合体化合物である。

アセチル-G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y C (アルドキシソルピシン)-式 (L I I)

(システイン残基にアルドキシソルピシン分子が接続している配列番号 24 を有するペプチド化合物を含む、または

C 末端にシステイン残基が付加され、当該システイン残基にアルドキシソルピシン分子が接続している、配列番号 15 を有するペプチド化合物を含む)

【0021】

本明細書で開示される別の態様は、式 (X V I) 及び式 (X V I I) の化合物：

アセチル-G V R A K (クルクミン) A G V R N (N l e) F K (クルクミン) S E S Y-式 (X V I)

(各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号 15 を有するペプチド化合物を含む)

及び

アセチル-Y K (クルクミン) S L R R K (クルクミン) A P R W D A P L R D P A L R Q L L-式 (X V I I)

(各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号 16 を有するペプチド化合物を含む)

から選択される、結合体化合物である。

【0022】

本明細書で開示される別の態様は、配列番号 25 ~ 50 のいずれか 1 つに示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントに特異的に結合する単離抗体であって、血管凝態の阻害に使用するための、単離抗体である。

【0023】

本明細書で開示される別の態様は、ソルチリン受容体を標的化する単離抗体である。

【0024】

本明細書で開示される別の態様は、ソルチリン受容体の標的化に使用するための単離抗体である。本明細書で開示される別の態様は、配列番号 25 ~ 50 のいずれか 1 つに示されるような少なくとも 2 個、任意選択で少なくとも 4 個の連続するアミノ酸残基、そのアナログ、またはそのフラグメントに結合する単離抗体である。

【0025】

本明細書で開示されるまた別の態様は、式 A' - (B) n を有する結合体抗体であって、式中、

n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり、

A' が、本開示で定義されるような単離抗体であって、任意選択で保護基によって保護されている、単離抗体であり、

B が、少なくとも 1 つの治療剤であって、任意選択で当該単離抗体の遊離アミンで、当該単離抗体の N 末端位置で、当該単離抗体の遊離-SH で、または当該単離抗体の遊離カルボキシルで A' に接続している、治療剤である、

血管凝態の阻害に使用するための、結合体抗体である。

10

20

30

40

50

【0026】

本明細書で開示されるまた別の態様は、式 $A' - (B)_n$ を有する結合体抗体であって、式中、
 n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12であり、
 A' が、本開示で定義されるような単離抗体であって、任意選択で保護基によって保護されている、単離抗体であり、
 B が、少なくとも1つの治療剤であって、当該単離抗体のリジン残基の遊離アミンで、任意選択でリンカーを介し、または当該単離抗体のN末端位置で、任意選択でリンカーを介し、 A' に接続している、治療剤である、
血管凝態の阻害に使用するための、結合体抗体である。

10

【0027】

1つの態様において、ソルチリン受容体を標的化する結合体抗体が提供される。

【0028】

1つの態様において、本開示で開示される結合体化合物または結合体抗体を調製するための方法であって、
リンカーを当該少なくとも1つの治療剤と共に反応させて中間体を得ることと、
任意選択で、当該中間体を精製することと、
当該中間体を当該ペプチド化合物と共に反応させて、当該少なくとも1つの治療剤が当該リンカーを介し当該ペプチド化合物または単離抗体に接続している、当該結合体化合物または結合体抗体を得ることと、
任意選択で、当該結合体化合物または結合体抗体を精製することとを含み、
当該少なくとも1つの治療剤が、リジン残基の遊離アミンまたはN末端で当該ペプチド化合物または単離抗体に接続し、当該ペプチド化合物が、当該ペプチド化合物に接続している1、2、3、もしくは4個の治療剤分子を含む、または当該単離抗体が、当該単離抗体に接続している1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12個の治療剤分子を含む、方法が提供される。

20

【0029】

1つの態様において、血管凝態を阻害する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体の治療有効量を投与することを含む、方法が提供される。

30

【0030】

別の態様において、ソルチリンを発現する細胞の血管凝態を阻害する方法であって、当該細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体に接触させることを含む、方法が提供される。

【0031】

別の態様において、癌または攻撃的癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体の治療有効量を投与することを含む、方法が提供される。

【0032】

また、単離抗体を作製する方法であって、当該単離抗体が、i) 免疫原性形態の単離ポリペプチドで動物を免疫化すること、ii) 発現ライブラリーをスクリーニングすること、またはiii) ファージディスプレイを使用することにより、配列番号25～50のいずれか1つに示されるような配列を含む単離ポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントに特異的に結合する、方法も提供される。

40

【0033】

1つの態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管凝態を阻害する方法であって、当該癌性組織細胞を、本明細書で定義されている少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体に接触させることを含む、血管凝態を当該阻害することが、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管凝態の管の長さを、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30

50

％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、約５％～約５０％、約１０％～約５０％、約１５％～約４５％、約２０％～約４５％、または約３０％～約４０％大きく減少させることを含む、方法が提供される。

【００３４】

１つの態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織細胞を、本明細書で定義される少なくとも１つの化合物、単離抗体、または抗体結合体に接触させることを含み、血管擬態を当該阻害することが、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態のループ数を、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、約５％～約５０％、約１０％～約５０％、約１５％～約４５％、約２０％～約４５％または約３０％～約４０％大きく減少させることを含む、方法が提供される。

10

【００３５】

１つの態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織細胞を、本明細書で定義される少なくとも１つの化合物、単離抗体、または抗体結合体に接触させることを含み、血管擬態を当該阻害することが、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さを、当該少なくとも１つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも１．２倍、少なくとも１．４倍、少なくとも１．６倍、少なくとも１．８倍、少なくとも２．０倍、少なくとも２．２倍、少なくとも２．４倍、約１．２～約２．４倍、または約１．２～約２．０倍大きく減少させることを含む、方法が提供される。少なくとも２倍大きい減少とは、例えば、少なくとも１つの治療剤で治療したソルチリンを発現する癌性組織または細胞において血管擬態の管の長さが１０％減少する場合、本明細書で説明される少なくとも１つの化合物、単離抗体、または抗体結合体で治療したソルチリンを発現する癌性組織または細胞において血管擬態の管の長さが少なくとも２０％減少することを意味する。

20

【００３６】

１つの態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織細胞を、本明細書で定義される少なくとも１つの化合物、単離抗体、または抗体結合体に接触させることを含み、血管擬態を当該阻害することが、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態のループ数を、当該少なくとも１つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも１．２倍、少なくとも１．４倍、少なくとも１．６倍、少なくとも１．８倍、少なくとも２．０倍、少なくとも２．２倍、少なくとも２．４倍、約１．２～約２．４倍、または約１．２～約２．０倍大きく減少させることを含む、方法が提供される。少なくとも２倍大きい減少とは、例えば、少なくとも１つの治療剤で治療したソルチリンを発現する癌性組織または細胞において血管擬態のループ数が１０％減少する場合、本明細書で説明される少なくとも１つの化合物、単離抗体、または抗体結合体で治療したソルチリンを発現する癌性組織または細胞において血管擬態のループ数が少なくとも２０％減少することを意味する。

30

40

【００３７】

１つの態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織細胞を、本明細書で定義される少なくとも１つの化合物、単離抗体、または抗体結合体と接触させることを含み、当該ソルチリンを発現する細胞が、免疫細胞、任意選択でマクロファージ、ＣＤ４＋、ＣＤ８＋、Ｂ２２０＋、骨髓由来細胞好塩基球、好酸球、及び細胞傷害性Ｔリンパ球、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔヘルパー１型（Ｔ_h１）細胞である、方法が提供される。

【００３８】

50

1つの態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、血管擬態を阻害するための使用が提供される。

【0039】

1つの態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリン受容体を標的化するための使用が提供される。

【0040】

1つの態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害するための使用が提供される。

【0041】

1つの態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、癌または攻撃的癌を治療するための使用が提供される。

【0042】

1つの態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の癌または攻撃的癌を治療するための使用が提供される。

【0043】

1つの態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、血管擬態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0044】

1つの態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリン受容体を標的化するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0045】

1つの態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0046】

1つの態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、癌または攻撃的癌を治療するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0047】

1つの態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の癌または攻撃的癌を治療するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0048】

1つの態様において、本明細書で定義される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さを、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約5%～約50%、約10%～約50%、約15%～約45%、約20%～約45%、または約30%～約40%大きく減少させるための使用が提供される。

【0049】

1つの態様において、本明細書で定義される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態のループ数を、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約5%～約50%

10

20

30

40

50

、約10%～約50%、約15%～約45%、約20%～約45%または約30%～約40%大きく減少させるための使用が提供される。

【0050】

1つの態様において、本明細書で定義される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さを、当該少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、約1.2～約2.4倍、または約1.2～約2.0倍大きく減少させるための使用が提供される。

【0051】

1つの態様において、本明細書で定義される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態のループ数を、当該少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、約1.2～約2.4倍、または約1.2～約2.0倍大きく減少させるための使用が提供される。

【0052】

1つの態様において、本明細書で定義される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する細胞における血管擬態の阻害に使用するための使用であって、ソルチリンを発現する当該細胞が、免疫細胞、任意選択でマクロファージ、CD4+、CD8+、B220+、骨髓由来細胞、好塩基球、好酸球、及び細胞傷害性Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、Tヘルパー1型（Th1）細胞である、使用が提供される。

【0053】

1つの態様において、本開示で開示される結合体化合物または抗体結合体を調製するための方法であって、

リンカーを当該少なくとも1つの治療剤と共に反応させて中間体を得ることと、

任意選択で、当該中間体を精製することと、

当該中間体を当該ペプチド化合物または単離抗体と共に反応させて、当該少なくとも1つの治療剤が当該リンカーを介し当該ペプチド化合物または単離抗体に接続している、当該結合体化合物または抗体結合体を得ることと、

任意選択で、当該結合体化合物を精製することを含む、

当該少なくとも1つの治療剤が、リジン残基の遊離アミンまたはN末端で当該ペプチド化合物または単離抗体に接続し、当該ペプチド化合物が、当該ペプチド化合物に接続している1、2、3、もしくは4個の治療剤分子を含む、または当該単離抗体が、当該単離抗体に接続している1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12個の治療剤分子を含む、方法が提供される。

【0054】

別の態様において、治療剤の安定性及び／またはバイオアベイラビリティを高める方法であって、

本明細書で開示される結合体化合物を得ることであって、当該結合体化合物が当該治療剤を含む、得ることと、

当該結合体化合物の治療有効量を、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。

【0055】

別の態様において、治療剤の安定性及び／またはバイオアベイラビリティを高める方法であって、

当該治療剤を本明細書で定義されるようなペプチド化合物と結合体化させて、結合体化合物を得ることと、

当該結合体化合物の治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法

10

20

30

40

50

が提供される。

【0056】

別の態様において、本明細書で定義されるような結合体化合物における、当該少なくとも1つの治療剤の安定性及び／またはバイオアベイラビリティを高めるための使用が提供される。

【0057】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、血管凝態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0058】

別の態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリン受容体を標的化するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0059】

別の態様において、本明細書では、治療剤の忍容性を高める方法であって、当該治療剤を本明細書で開示されるペプチド化合物と結合体化させて、結合体化合物を得ることと、当該結合体化合物の治療有効量を、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。

【0060】

別の態様において、本明細書では、治療剤の忍容性を高める方法であって、本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体を得ることであって、当該結合体化合物または当該抗体結合体が、当該治療剤、リンカーを含み、当該抗体結合体がソルチリンを標的化する、得ることと、当該結合体化合物または当該抗体結合体の治療有効量を、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。

【0061】

例えば、本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体における、治療剤の忍容性を高めるための使用が提供される。

【0062】

さらなる態様において、血管凝態の阻害に使用するための、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体を含むリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子が提供される。

【0063】

さらなる態様において、ソルチリン受容体の標的化に使用するための、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体を含むリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子が提供される。

【0064】

また別の態様において、血管凝態の阻害に使用するための、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体でコーティングされたりポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子が提供される。

【0065】

また別の態様において、ソルチリン受容体の標的化に使用するための、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体でコーティングされたりポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0066】

本開示のさらなる特徴及び利点は、添付のスキーム及び図面での例によって示される、以下の特定の実施形態の説明からより容易に明らかになる。

【0067】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、参考文献24（ $n = 3062$ 臨床例）からの血管擬態（VM）を呈するヒト癌のパーセンテージを示すグラフを図示する先行技術を示すものである。血管擬態形成発現は、進行した腫瘍段階、高悪性度の癌、及び化学療法に対する非応答と関連付けられていた。また、血管擬態は、様々な癌の全生存期間が短くなることとも関連付けられていた。略語：BDMT：二方向性分化悪性腫瘍、HCC：肝細胞癌、NSCLC：非小細胞肺癌、OLSCC：口腔／喉頭扁平上皮癌。

【0068】

【図2】図2は、血管擬態（VM）を有する乳癌のパーセンテージを示すグラフを図示する先行技術を示すものである。乳癌の場合、血管擬態の存在は、管腔またはHER2＋陽性乳癌と比較した場合、トリプルネガティブ（TN）乳癌患者で最も高い。血管擬態は、現在の抗血管新生療法が十分に腫瘍根絶をもたらさないことの一因となる重要な生存機構に相当し得る（30）。

【0069】

【図3】図3は、SKOV3卵巣癌細胞を用いた血管擬態のX線マイクロトモグラフィーの*in vitro* 3D再構成を示す先行技術を示すものである（参考文献31より）。Matrigel上での卵巣癌細胞の4日間3D培養のランドスケープの再構築像は、管状の外観を有する隆起構造を示しており、明瞭に認識できる（パネルa）。白い四角形内の構造を、より高い倍率でパネルb及びcに示す。矢印は、平坦な細胞凝集物の上方に突出する外見的な管状構造を示す。この構造の断面は、推定直径50 μm の空気で満たされた空間を実証することを示す（パネルc）。

【0070】

【図4】図4は、従来技術における、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するSKOV3を用いた血管擬態の管状構造の共焦点顕微鏡像を示している（参考文献31より）。パネルa：管状構造を含む細胞の存在を実証する共焦点顕微鏡Zスタック再構成。Zスタックは連続的な上部の単層[1]と、中心が空洞の中心壁構造[2]と、連続的な下部の単層[3]とを示している。パネルb：内腔を含む管状構造を明確に示すコンピューター生成断面。

【0071】

【図5】図5は、ES-2卵巣癌細胞による3D-管状構造の形成を示している。ES-2卵巣癌細胞の管様構造は迅速に形成され、マトリゲルに播種後4時間以内に観察された。

【0072】

【図6】図6A、6B、6C、及び6Dは、ES-2卵巣癌細胞の3D-管状構造でソルチリンが検出されていることを示している。より詳細には、図6Aは、マトリゲルに播種したES-2卵巣癌細胞を示している。12時間後、ウサギ抗ソルチリン抗体を用いた共焦点顕微鏡により、3D-管状構造内でソルチリンが検出された。図6Bは、二次抗ウサギ抗体のみを用いた対照を示している。全体的な結果は、（図6A）におけるソルチリン検出が特異的であることを示すものである。図6C及び図6Dは、抗SORT1及び二次抗体の検出用に使用した条件下での、3D-管状構造におけるES2癌細胞核のDAPI染色を示している。

【0073】

【図7】図7A及び7Bは、ソルチリン遺伝子サイレンシングが血管擬態形成に及ぼす作用を示している。スクランブルしたsiRNA（siスクランブル）または特異的SORT1 siRNA（siSORT1）をES-2卵巣癌細胞に形質移入し、マトリゲルに播種した。12時間後、スクランブルsiRNAを形質移入したES-2癌細胞で3D-管状構造が観察された。特異的SORT1 siRNAを形質移入したES-2は3D-管状構造を形成しなかった。Wimasis画像解析ソフトウェアにより管の全長及びループ総数を定量化したところ、ソルチリン発現がsiSORT1によって低減した場合、これらの構造が90%超阻害されることが示された（ $n = 4$ ）。

【0074】

【図8】図8A及び8Bは、ドキソルビシン-結合体化合物（DoxKA）が血管擬態に

及ぼす作用を示している。より詳細には、図 8 A は、漸増濃度の D o x K A、ドキソルビシン、またはドキシル（リポソーム内に封入されたドキソルビシン）のいずれかの存在下で、E S 2 卵巣癌細胞をマトリゲル上に播種したことを示している。12 時間後、3 D 管状構造は D o x K A によって阻害され、ドキソルビシンまたはドキシル単独では阻害されなかった。図 8 B は、W i m a s i s 画像解析ソフトウェアによる総ループ数及び管の全長の定量化を示しており、これらの構造が低 n M 濃度の D o x K A で阻害されたことを示している。

【0075】

【図 9】図 9 は、アルドキソルビシン-結合体化合物（A l d o x K A）が血管擬態に及ぼす作用を示している。ドキソルビシン誘導体アルドキソルビシンを、酸性 pH に感受性であるリンカーを用いて K a t a n a ペプチドに結合させた。漸増濃度の A l d o x K A の存在下で、E S - 2 卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。12 時間後、3 D 管状構造は A l d o x K A によって阻害され、ドキソルビシン単独では阻害されなかった（図 8 を参照）。

【0076】

【図 10】図 10 A 及び 10 B は、ドセタキセル-結合体化合物（D o c e K A）が血管擬態に及ぼす作用を示している。ドセタキセルまたは D o c e K A いずれかの存在下で、E S - 2 卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。12 時間後、D o c e K A は、ドセタキセルの等価濃度において、ドセタキセル単独よりも強力な 3 D 管状構造への阻害を示した（600 p M；図 10 A）。総ループ数及び管の全長を定量化することにより、これらの構造が低 n M 濃度の D o c e K A で阻害されることが示された（図 10 B）。

【0077】

【図 11】図 11 は、クルクミン-結合体化合物（C u r K A）が血管擬態に及ぼす作用を示している。クルクミンまたは C u r K A いずれかの存在下で、E S - 2 卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。12 時間後、C u r K A は、クルクミンの等価濃度において、クルクミン単独よりも強力な 3 D 管状構造への阻害を示した。総ループ数及び管の全長により、これらの構造が n M 濃度の C u r K A で阻害されることが示された。

【0078】

【図 12】図 12 は、抗ソルチリン（抗 S O R T 1）m A b による血管擬態の阻害を示している。ビヒクル（対照）、マウス I g G（12 n M）、または抗 S O R T 1 m A b（12 n M）の存在下で、E S - 2 卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。4 時間後及び 12 時間後に画像を撮影した。抗 S O R T 1 m A b は 3 D 管状構造の形成を阻害し、管の全長及びループ数に強力に影響を及ぼしている（n = 2）。

【0079】

【図 13】図 13 A、13 B、13 C、及び 13 D は、E S - 2 卵巣癌細胞に対する抗 S O R T 1 m A b の結合及び内在化を示す一連のグラフに相当する。図 13 A は、I n v i t r o g e n 製の A l e x a F l u o r 488 タンパク質標識キットを用いて抗ソルチリン抗体の標識が実施されたことを示している。ヒト E S - 2 卵巣癌細胞を、抗ソルチリン-A l e x a 488（1 μ g / m l）と共に 4 °C で 30 分間インキュベートし、次にトリプシン処理を行いまたは行わずに、細胞表面での結合を評価した。結果は、トリプシン処理によって蛍光レベルが 90 % 超低減したことから、大部分の蛍光シグナルが細胞表面のソルチリン受容体への結合によって生じたことを明確に実証している。図 13 B は、ソルチリンリガンド（ニューロテンシン（N T）及びプログラニュリン（P G R N））の存在下ならびに K a t a n a ペプチド（K B P 106 及び K B P 201）の存在下で、ヒト E S - 2 卵巣癌細胞の細胞表面での抗ソルチリン-A l e x a 488 の結合（1 μ g / m l、30 分）を実施したことを示している。図 13 C は、抗ソルチリン抗体の E S - 2 癌細胞への内在化を示している。この実験では、ヒト E S - 2 卵巣癌細胞への抗ソルチリン-A l e x a 488 抗体の結合（1 μ g / m l、30 分）を最初に 4 °C で実施し、次いで細胞を洗浄して未結合の蛍光抗体を除去し、細胞を 37 °C で 1 時間または 2 時間インキュベートし、次いでトリプシン処理した。次いで、内在化した蛍光抗ソルチリン-A l e x

a 4 8 8に関連する蛍光を、フローサイトメトリーにより定量化した。結果は、細胞表面に最初に結合した抗ソルチリン-Alexa 4 8 8の約5 0 %が2時間以内に内在化したことを示している。図1 3 Dは、抗ソルチリン-Alexa 4 8 8の内在化を漸増濃度で図1 3 Cで説明のように測定したことを示している。結果は、抗ソルチリン-Alexa 4 8 8蛍光結合体の内在化が、蛍光結合体濃度の関数として増加し、飽和可能であったことを実証している。

【0 0 8 0】

【図1 4】図1 4は、ソルチリンの種々の領域と、本開示で使用される抗ソルチリン抗体が生成された領域との概略図を示している。

【0 0 8 1】

【図1 5】図1 5は、抗ソルチリン抗体による卵巣癌細胞の血管擬態の阻害を示している。抗ソルチリン（抗SORT1）mAbによる血管擬態の阻害。ビヒクル（対照）、マウスIgG（1 2 nM）、または抗SORT1 mAb # 1（1 2 nM）、または抗SORT1 mAb # 2（1 2 nM）の存在下で、ES-2卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。抗体処置から0時間時及び1 2時間後に画像を撮影した。結果は、抗SORT1 mAbが3 D-管状構造の形成を阻害し、管の全長及びループ数に強力に影響を及ぼすことを示している（n = 2）。

【0 0 8 2】

【図1 6】図1 6 A及び1 6 Bは、抗ソルチリン抗体がES-2卵巣癌細胞の血管擬態に及ぼす作用を示している。より詳細には、図1 6 Aは、抗ソルチリンmAb # 1及び# 2が血管擬態の総ループ数を減少させることを示している。図1 6 Bは、抗ソルチリンmAb # 1及び# 2が、血管擬態の管の全長を減少させることを示している。ソルチリン細胞外アミノ酸配列（3 0 0 ~ 4 2 2）に対し生成された抗ソルチリンmAb # 2は、血管擬態を強力に阻害する。

【0 0 8 3】

【図1 7】図1 7 A、1 7 B、1 7 C、及び1 7 Dは、正常細胞及び乳癌細胞におけるソルチリン発現の組織学的特徴と、MDA-MB-2 3 1細胞におけるAlexa 4 8 8標識KA-ペプチド取込み評価とを示している。より詳細には、図1 7 Aは、正常な隣接組織でソルチリン発現が見られないことと、IIIC期浸潤性管癌（IDC）及びリンパ節転移癌（LNMC）では過剰発現することとを示す、免疫組織化学検査の技法である。IS法を用いてソルチリンの染色強度を評価した。図1 7 Bは、正常組織ならびにIDC及びLNMC乳房腫瘍におけるソルチリンの分布を示している。図1 7 Cは、ソルチリンの遺伝子サイレンシングを方法セクションで説明されるように実施し、抗SORT1抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検証したことを示している。次に、対照（siスクランブル）またはソルチリン欠損（siSORT1）MDA-MB-2 3 1癌細胞において、2 0 0 nM Alexa 4 8 8標識KA-ペプチドの取込みを実施した。図1 7 Dは、過剰な非標識KA-ペプチド（5 0 μM）、ニューロテンシン（1 0 μM）、またはプログラニュリン（1 nM）の非存在下（白線）または存在下（黒線）のMDA-MB-2 3 1細胞においても、2 0 0 nm Alexa 4 8 8標識KA-ペプチドの取り込みを評価したことを示している。

【0 0 8 4】

【図1 8】図1 8 Aは、ドセタキセル-Katanaペプチド結合体の合成を示している。攪拌下のDMSO（5 ml）中のドセタキセル（0. 8 1 g、1. 0 mmol）及び無水コハク酸（1 0 5 mg、1. 0 5 mmol）の懸濁液に、ジイソプロピルエチルアミン（DIEA；0. 2 1 ml、1. 2 mmol）を滴下添加した。混合物を室温で攪拌し、UPLC-MSによってモニターした。2時間後、反応を完了した。溶媒を除去し、得られた残渣をジクロロメタンに溶解し、Biotageシリカカラムに装填して精製した。凍結乾燥後、DoceSuOHをUPLC-MS純度> 9 5 %の白色粉末として得た。DoceSuOHを予備活性化するため、DMSO（3 ~ 4 ml）中のDoceSuOH（2 1 3 mg、0. 2 3 4 mmol）及びTBTU（7 5 mg、0. 2 3 4 mmol）の溶

10

20

30

40

50

液に、DIEA (0.234 mmol) を滴下添加した。UPLC-MSによって予備活性化の完了をモニターし、次いでジメチルスルホキシド (0.2 ml) 中のKA-ペプチド (120 mg、0.062 mmol) の溶液を添加した。混合物を室温で攪拌した。UPLC-MSによって反応が完了するまで監視した。反応混合物を、3ORPC樹脂カラム及びAKTA精製システム (10%から80%のACN) を用いて精製して、凍結乾燥後、KA (Sudocce) 2またはDocceKAを白色粉末として得た。図18Bは、UPLC-MS純度によって評価された結合体の純度が95%より大きいことを示している。

【0085】

【図19】図19は、[3H]-チミジン取込みアッセイを用いた測定における、MDA-MB-231乳癌細胞に対するDocceKAの*in vitro*抗癌特性を示している。取り込まれた[3H]-チミジンを各薬物濃度に対しプロットした。GraphPad Prismソフトウェアを用いてIC50値 (nM) を計算した。DocceKAのIC50値は0.38 nM、ドセタキセルのIC50値は0.68 nMであった。図19は、MDA-MB-231細胞を2 μMドセタキセルまたは1 μM DocceKAで24時間処置した後に、フローサイトメトリーを用いて細胞DNA含量に基づき定量した細胞周期分布を示すグラフのセットである。

【0086】

【図20】図20A及び20Bは、ソルチリン遺伝子サイレンシングがDocceKAの抗移動能力に及ぼす影響を示している。より詳細には、図20Aは、ドセタキセルがソルチリンのSiRNA媒介性遺伝子サイレンシング後のMDA-MB-231細胞移動に及ぼす作用を示し、図20Bは、DocceKAがソルチリンのSiRNA媒介性遺伝子サイレンシング後のMDA-MB-231細胞移動に及ぼす作用を示している。形質移入した細胞を、DocceKA (1 μM) または結合体化されていないドセタキセル (2 μM) と共に2時間プレインキュベートした。次いで、細胞を回収し、Xcelligence装置を用いてこれらの移動能力をリアルタイムで評価した。

【0087】

【図21】図21A、21B、及び21Cは、MDA-MB-231細胞におけるドセタキセル及びDocceKA結合体の細胞死誘導を示している。MDA-MB-231細胞を、対照 (ビヒクル) または漸増濃度のドセタキセルもしくはDocceKAで5時間処置した。次いで、細胞を回収し、アネキシンV-FITC及びヨウ化プロピジウム (PI) で染色した後にアポトーシスの速度を定量した。フローサイトメトリーによって細胞を解析した。より詳細には、図21Aは、対照 (ビヒクル)、10 μMドセタキセル、または5 μM DocceKAでMDA-MB-231細胞を24時間処置し、光学顕微鏡下で細胞形態を調べたことを示している。図21Bは、様々な濃度のDocceKA及びドセタキセルに基づいたアポトーシス性細胞死のパーセンテージを示す折れ線グラフである。図21Cは、MDA-MB-231細胞において、過剰な遊離KA-ペプチド (50 μM) またはソルチリンリガンド、ニューロテンシン (10 μM)、もしくはプログラニュリン (1 nM) によってDocceKA取込みが競合したことを示している。5時間のインキュベート後、図21Aで示されているように、細胞をアネキシンV-FITC/PI染色に先行させた。

【0088】

【図22】図22A及び22Bは、MDA-MB-231細胞におけるDocceKAによる細胞死誘導の分子機序を示している。図22Aは、ドセタキセル及びDocceKAで処置した後のMDA-MB-231細胞におけるIL-6、サバイビン、Bcl-xi、及び変異p53の発現レベルを示す免疫ブロット実験を示している。GAPDHを対照として使用した。図22Bのデータは、3つの独立した実験を代表するものであり、棒グラフは、GAPDHと比較したIL-6、サバイビン、Bcl-xL、及びp53発現のデンストメトリー定量化を示している。対照群の平均値を1.0とした。

【0089】

【図23】図23A及び23Bは、DocceKAがチューブリン重合に及ぼす影響を示し

ている。より詳細には、図23Aは、ビヒクル(DMSO)、2 μ Mドセタキセル、または1 μ M DoceKAで24時間処置し、固定し、抗 α -チューブリン抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いてイメージングした細胞を示している。DNAをDAPIで染色し、共焦点顕微鏡を用いて細胞を可視化した。各条件からの代表的細胞が示されている。図23Bは、蛍光ベースの重合アッセイにおいて、ドセタキセル(2 μ M)及びDoceKA(1 μ M)が精製チューブリンの重合に及ぼす作用について*in vitro*で調べたことを示している。パクリタキセル(2 μ M)及びビンブラスチン(2 μ M)を、それぞれチューブリン重合剤及びチューブリン脱重合剤の対照として加えた。微小管へのチューブリン集合を蛍光の増加によって定量した(Ex. 340~360nm $\pm$ 20nm; Em. 410~460nm $\pm$ 20nm)。

10

【0090】

【図24】図24Aは、未処置(ビヒクル)、ドセタキセルによる処置(ドセタキセル)、またはドセタキセル結合体による処置(DoceKA)の後の残存腫瘍負荷を示している。図24Bは、未処置、ドセタキセルによる処置、またはDoceKAによる処置から14日後及び74日後の腫瘍のサイズを示している。図24Cは、ドセタキセルまたはDoceKAによる処置から74日後の残存腫瘍負荷を示している。

【0091】

【図25】図25A及び25Bは、DoceKAがMDA-MB231 TNBC異種移植片モデルに及ぼす作用を示している。より詳細には、図25Aは、ドセタキセルまたはDoceKAのいずれかで処置した後のマウスの腫瘍体積を示している。ドセタキセルで処置したマウスには、15mg/kg/週(MTD)を3回投与した。DoceKAで処置したマウスには、同等用量のドセタキセルを5回投与した。図25Bは、ドセタキセルまたはDoceKAで処置した後の様々な時点におけるマウスの体重を示している。ドセタキセルで処置したマウスには、15mg/kg/週(MTD)を3回投与した。DoceKAで処置したマウスには、同等用量のドセタキセルを5回投与した。15日目に、1頭のマウスを毒性(体重:-25%)のため 殺した。

20

【0092】

【図26】図26A及び26Bは、MDA-MB231 TNBCモデルに対するDoceKAの用量応答を示している。より詳細には、図26Aは、様々な薬用量のDoceKAで処置した後の腫瘍体積に及ぼす作用を示している。図26Bは、処置後15日目における様々な薬用量のDoceKAが腫瘍体積の進行に及ぼす作用を示している。

30

【0093】

【図27】図27A、27B、及び27Cは、DoceKAがヌードマウスの血球に作用しないことを示している。図27Aは、異なる濃度のドセタキセルまたはDoceKAで3回処置した後のリンパ球に対する作用を示している。図27Bは、異なる濃度のドセタキセルまたはDoceKAで3回処置した後の血小板に対する作用を示している。図27Cは、異なる濃度のドセタキセルまたはDoceKAで3回の処置した後の好中球に対する作用を示している。IPは腹腔内投与を意味し、IVは静脈内送達を意味する。

【0094】

【図28】図28は、DoceKAに関する予備的毒性データ、具体的には、異なる薬用量のドセタキセルまたはDoceKAで処置した後の好中球数(g/L)を示している。最大耐量の単回注射から4日後、ドセタキセルは好中球数の劇的な減少を誘導したが、6回のDoceKAを注射した後であっても、好中球数は正常範囲内にとどまった。

40

【0095】

【図29】図29Aは、進行的時間間隔におけるDoceKA及び放出ドセタキセル(BDL)の血漿濃度を示している。図29Bは、CD-1マウスのPKを示している。DoceKA(20mg/kg)をマウスに静脈内投与した。異なる時点で血漿を収集した。DoceKA及び放出ドセタキセルをアセトニトリルで抽出した。パクリタキセルを内部標準物質として用いたUPLC/MSによりDoceKA及び放出ドセタキセルを定量化した。2 μ L及び10 μ Lの上清を、DoceKA及びドセタキセルについて凍結乾燥せ

50

ずに直接注入した。放出ドセタキセルの濃度は、0.083時間、0.25時間、及び4時間時のドセタキセルにおいて定量化限界（LOQ）未満であった。20mg/kgで投与したドセタキセルについて報告されたCmaxは、約20μg/mlまたは25μMである。

【0096】

【図30】図30は、免疫組織化学検査によるヒト卵巣癌及び正常組織におけるソルチリン発現を示している。ソルチリン発現は、正常細胞から良性細胞、境界細胞、悪性細胞、転移性細胞へと次第に増加している。

【0097】

【図31】図31Aは、免疫組織化学検査を用いて測定したヒト卵巣癌及び正常組織におけるソルチリン発現を示している。図31Bは、正常、良性、低悪性度漿液性癌、高悪性度漿液性癌、明細胞癌、粘液性癌、類内膜癌、移行上皮癌、境界、転移性細胞、ならびに生殖細胞及び他の非上皮細胞についてのソルチリン発現を示している。

【0098】

【図32】図32は、cDNA組織マイクロアレイ（Origene）におけるヒト卵巣癌ソルチリン遺伝子発現を示している。具体的には、qPCR定量化を用いて、健康な組織及び卵巣腫瘍グレードI～IVにおけるソルチリン遺伝子発現を示している。

【0099】

【図33】図33Aは、抗SORT1 mAbに曝露した正常乳房組織及び乳癌組織の一連の免疫組織化学画像である。図33Bは、正常組織、浸潤性乳管癌、及びリンパ節転移癌組織におけるソルチリン発現を示している。

【0100】

【図34】図34は、3例の異なる患者の浸潤性乳管癌（IIIC期）、関連するリンパ節転移、及び隣接する正常組織の免疫組織化学検査における免疫組織化学画像を示している。IHC試料は、抗SORT1 mAbで染色されている。

【0101】

【図35】図35Aは、黒色腫におけるソルチリンの免疫組織化学画像を示している。具体的には、これらの画像は、正常組織ならびに黒色腫II、III、及びIV期の腫瘍を示している。図35Bは、正常組織及びI～IV期の黒色腫腫瘍組織におけるソルチリン発現を棒グラフで示したものである。

【0102】

【図36】図36は、正常組織ならびに黒色腫II、III、及びIV期の腫瘍を示す一連の画像である。

【0103】

【図37】図37A及び37Bは、子宮癌におけるソルチリンの免疫組織化学検査を示している。より詳細には、図37Aは、正常組織、子宮内膜癌組織、及び子宮頸癌組織におけるソルチリンの画像からなる。図37Bは、正常組織、子宮内膜組織、及び子宮頸癌組織におけるソルチリン発現のグラフ表現である。

【0104】

【図38】図38A及び38Bは、肺癌におけるソルチリンの免疫組織化学検査を示している。より詳細には、図38Aは、正常肺組織及び癌性肺組織におけるソルチリンの画像からなる。図38Bは、正常組織及び癌性肺組織におけるソルチリン発現のグラフ表現である。

【0105】

【図39】図39は、いくつかの異なる癌細胞株（卵巣、乳房、脳、及びその他の癌）におけるソルチリン発現を示す一連のウェスタンブロット画像である。

【0106】

【図40】図40A及び40Bは、OVCA3卵巣癌細胞における3D管状構造の共焦点顕微鏡イメージングを示している。ウサギ抗ソルチリン抗体を用いてソルチリンを検出した。より詳細には、図40Aは、細胞内に存在するソルチリンの染色を示す第1の画

10

20

30

40

50

像、細胞の核のヘキスト染色を示す第2の画像、及び先の2つの画像をマージしたものを示す最後の画像の3つでパネル化されている。図40Bは、細胞内に存在する対照抗体の染色を示す第1の画像、細胞の核のヘキスト染色を示す第2の画像、及び先の2つの画像をマージしたものを示す最終画像の3つでパネル化されている。これらの結果は、ソルチリン陽性細胞が *in vitro* の血管擬態に寄与することを示すものである。

【0107】

【図41】図41A、41B、及び41Cは、ES-2 卵巣癌細胞におけるドセタキセル-結合体化合物 (Docetaxel) による血管擬態の阻害を示している。より詳細には、図41Aは、異なる濃度のドセタキセルまたはDocetaxelが存在する場合に存在する総ループ数を示している。図41Bは、異なる濃度のドセタキセルまたはDocetaxelが存在する場合に存在する管の全長を示している。図41Cは、異なる濃度のドセタキセルまたはDocetaxelが存在する場合に存在する分岐点のパーセントを示している。これらの図は、低pM濃度のDocetaxelがES-2 卵巣癌細胞の血管擬態を阻害することを示すものである。

【0108】

【図42】図42A、42B、42C、42D、42E、及び42Fは、ソルチリン遺伝子サイレンシングがTNBC由来MDA-MB231細胞の *in vitro* 血管擬態に及ぼす作用を示している。より詳細には、図42Aは、スクランブルsiRNA (siScrambled) を一過性に形質移入した0時間時のMDA-MB231細胞を示している。図42Bは、特定のソルチリンsiRNA (siSortilin) を一過性に形質移入した0時間時のMDA-MB231細胞を示している。図42Cは、スクランブルsiRNA (siScrambled) を一過性に形質移入した24時間時のMDA-MB231細胞を示している。図42Dは、特定のソルチリンsiRNA (siSortilin) を一過性に形質移入した24時間時のMDA-MB231細胞を示している。図42Eは、24時間にわたるsiScrambled及びsiSortilin細胞の総ループ数のパーセンテージを示す棒グラフである。図42Fは、24時間にわたるsiScrambled細胞及びsiSortilin細胞の平均ループ領域のパーセントを示す棒グラフである。

【0109】

【図43】図43A及び43Bは、DocetaxelによるMDA-MB231血管擬態の阻害を示している。より詳細には、図43Aは、細胞に投与した異なる濃度のドセタキセル (上パネル) 及びDocetaxel (下パネル) の作用を示している。図43Bは、異なる濃度のドセタキセル及びDocetaxelに曝露した場合の、細胞内に存在する総ループ数を示すグラフである。

【0110】

【図44】図44Aは、0、2、6、12、及び24時間時におけるES-2 卵巣癌細胞の血管擬態を示している。図44Bは、0、2、6、12、及び24時間時におけるソルチリン (SORT1)、CD133、及びMMP9の遺伝子発現を示している。CD133は、腫瘍からの癌幹細胞 (CSC) 集団の単離で最も一般的に使用されるマーカーの1つである。CD133+癌細胞 (CSC) は、血管擬態形成、局所再発、及び遠隔転移と正方向に関連していた。

【0111】

【図45】図45Aは、0、2、6、12、及び24時間時におけるMDA-MB-231 TNBC細胞の血管擬態を示している。図45Bは、0、2、6、12、及び24時間時におけるソルチリン (SORT1)、CD133、及びMMP9の遺伝子発現を示している。

【0112】

【図46】図46A及び46Bは、抗ソルチリン抗体によるES-2 卵巣癌細胞の血管擬態の阻害を示している。より詳細には、図46Aは、ウサギIg、抗SORT1ウサギpAb、マウスIgG、及び抗SORT1マウスmAbの存在下で12時間後に撮影したE

10

20

30

40

50

S-2 卵巣癌細胞の画像を示している。図 46 B は、12 時間時のウサギ IgG、抗ソルチリンウサギ pAb、マウス IgG、及び抗ソルチリン mAb に曝露した細胞に存在する総ループ数を示している。抗 SORT1 mAb は 3D-管状構造の形成を阻害し、管の全長及びループ数に強力に影響を及ぼしている。

【0113】

【図 47】図 47 は、様々な濃度の対照または抗 SORT1 抗体の存在下での 0 及び 12 時間時における ES-2 細胞卵巣癌細胞のパネル画像を示している。

【0114】

【図 48】図 48 A 及び 48 B は、抗ソルチリンが ES-2 卵巣癌細胞の血管擬態に及ぼす作用を示している。図 48 A は、異なる濃度の抗 SORT1 抗体における細胞内に存在する総ループ数を示している。図 48 B は、異なる濃度の抗 SORT1 抗体に曝露した細胞における、抗ソルチリンに曝露しない対照と比べたパーセンテージ増殖を示している。

【0115】

【図 49】図 49 は、様々な濃度の K a t a n a ペプチド (KBP106) 単独に 0 及び 24 時間曝露した ES-2 卵巣癌細胞を示すパネル画像である。K a t a n a 結合体を使用したのと同じ実験条件下では、ペプチド (KBP106) は 50 µM までにおいて血管擬態に顕著な作用をもたらしていない。

【0116】

【図 50】図 50 は、KBP106 ペプチド及びドキシソルピシン結合体 (KBB106) に曝露した ES-2 卵巣癌細胞を示すパネル画像である。図 50 は、様々な濃度の KBP106 ペプチド及び KBB106 に 0 及び 24 時間曝露した ES-2 卵巣癌細胞の画像を示している。過剰な KBP106 を添加すると、KBB106 がもたらす血管擬態阻害が逆転することが示された。KBP106 が血管擬態に作用しないにもかかわらず、KBP106 を KBB106 に添加すると、KBB106 による血管擬態阻害が妨げられた。このことから、KBP106 がソルチリンに結合することによって KBB106 と受容体との相互作用が妨げられることが示唆される。

【0117】

【図 51】図 51 は、ソルチリンリガンド、ニューロテンシン、及びプログラニュリンに曝露した ES-2 卵巣癌細胞について、各リガンドへの 0 及び 12 時間の曝露時の画像を示している。この図は、ソルチリンリガンド、ニューロテンシン、及びプログラニュリンが血管擬態に作用しないことを実証するものである。

【0118】

【図 52】図 52 は、KBB106 結合体及びニューロテンシンリガンドまたはプログラニュリンリガンドのいずれかに曝露した、0 及び 12 時間の曝露時の ES-2 卵巣癌細胞を示すパネル画像である。これらの画像は、ソルチリンリガンド、ニューロテンシン、及びプログラニュリンを添加すると、KBB106 結合体による血管擬態阻害が逆転することを示している。

【0119】

【図 53】図 53 A、53 B、53 C、53 D、及び 53 E は、ヌードマウスにおける ES-2 異種移植片腫瘍からの組織切片の画像からなる。これらは、40X における単一標識の例である。図 53 A はカスパーゼ-3 の標識を示し、図 53 B は P A S の標識を示し、図 53 C は K i - 6 7 の標識を示し、図 53 D はマウス C D 3 1 の標識を示し、図 53 E は C D 1 3 3 の標識を示している。

【0120】

【図 54】図 54 は、免疫組織化学検査による血管擬態同定の例を示している。P A S 陽性及び C D 3 1 陽性は正常なマウス脈管構造を示す（画像内で「血管」として識別）。P A S 陽性及び C D 3 1 陰性は血管擬態を示す（画像内で「V M」として識別）。

【0121】

【図 55】図 55 A、55 B、及び 55 C は、それぞれ、マウス C D 3 1 - P A S（図 55 A）、ソルチリン - P A S（図 55 B）、及び C D 1 3 3 - P A S（図 55 C）に対し

10

20

30

40

50

染色したES-2腫瘍組織を示す画像のパネルからなる。全ての図は、染色した組織を徐々に拡大した4つの画像を示している。図55Aにおいて、血管は「血管」として識別され、血管擬態は「VM」として識別されている。

【0122】

【図56】図56A、56B、及び56Cは、それぞれ、マウスCD31-PAS（図56A）、ソルチリン-PAS（図56B）、及びCD133-PAS（図56C）に対し染色したES-2腫瘍組織を示す画像のパネルからなる。全ての図は、染色した組織を徐々に拡大した4つの画像を示している。図56Aにおいて、血管は「血管」という語によって識別され、血管擬態は「VM」という語によって識別されている。

【0123】

【図57】図57A、57B、及び57Cは、マウスCD31-PAS（図57A）、ソルチリン-PAS（図57B）、及びCD133-PAS（図57C）に対し染色したES-2腫瘍組織を示す画像からなる。これらの図は、ソルチリン及びCD133の血管擬態における免疫組織化学的検出を示している。

【0124】

【図58】図58は、非変性条件下でのウェスタンブロット解析の画像であり、様々なトリプルネガティブ乳癌（TNBC）細胞株（MDA-MB 231、MDA-MB 468、MDA-MB 157、DU4475、HCC70、BT-20）ならびにES-2卵巣細胞株におけるソルチリンの存在を示している。

【0125】

【図59】図59A及び59Bは、3D-管状構造を形成し得るBT-20 TNBC癌細胞の別の例を示している。より詳細には、図59Aは、血管擬態構造を発生する前の20,000 BT-20 TNBC癌細胞を示し、図59Bは、血管擬態構造を形成した後の同じ細胞を示している。

【発明を実施するための形態】

【0126】

本明細書で使用する場合、「ペプチド化合物」、または「Katanaペプチド」、「Katana Biopharmaペプチド」、もしくは「KBP」という用語は、例えば、細菌タンパク質から誘導される、または癌細胞（多剤耐性癌細胞を含む）上に発現する受容体を標的化する受容体のリガンドから誘導されるペプチドを意味する。例えば、ペプチド化合物は、細胞透過に關与する細菌タンパク質、またはソルチリンリガンド（例えば、プログラニユリン及びニューロテンシン）から誘導することができる。例えば、ペプチド化合物は環状であり得る。ある特定の実施形態において、ペプチド化合物は、（例えば、共有結合、原子、またはリンカーを介して）少なくとも1つの治療剤（例えば、抗癌剤または植物化学物質）に接続して結合体化合物を形成し、結合体化合物は、例えば、癌または攻撃的癌の治療のために使用され得る。ある特定の他の実施形態において、ペプチド化合物は、リボソームの表面で使用され得る。例えば、ペプチド化合物は、少なくとも1つの治療剤（例えば、抗癌剤もしくは植物化学物質、または遺伝子もしくはsiRNA）を装填することができるリボソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子をコーティングするために使用することができる。

【0127】

「Katana Biopharmaペプチドファミリー1ペプチド化合物」または「KBPファミリー1ペプチド化合物」という用語は、細菌細胞透過性タンパク質から誘導されるペプチド化合物を意味する。例えば、KBPファミリー1ペプチド化合物は、IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM（配列番号5）のアミノ酸配列を有するタンパク質から誘導することができる。KBPファミリー1ペプチド化合物の非限定的な例を以下に示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

アミノ酸配列

KBP-101	IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM: 式 (V) (配列番号 5 によって表される)
KBP-102	スクシニル- IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY: 式 (XXXVI) (スクシニル基が N 末端で結合している配列番号 6 を含む)
KBP-103	IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK (ビオチン): 式 (XXXVII) (ビオチン分子が C 末端で接続している配列番号 7 を含む)
KBP-104	GVQAKAGVINMFKSESY: 式 (VIIII) (配列番号 8 によって表される)
KBP-105	アセチル-GVRAKAGVRNMFKSESY: 式 (XXXVIIII) (配列番号 14 によって表される)
KBP-106	アセチル-GVRAKAGVRN (Nle) FKSESY: 式 (XXXIX) (配列番号 15 によって表される)

10

【0128】

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物 KBP-101 は、IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM (配列番号 5) のアミノ酸配列によって表される。

20

【0129】

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物 KBP-102 は、スクシニル基が N 末端で結合している配列番号 6 のペプチド配列を含むスクシニル- IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY のアミノ酸配列によって表される。

【0130】

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物 KBP-103 は、ビオチン分子が C 末端で接続している配列番号 7 のペプチド配列を含む IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK (ビオチン) のアミノ酸配列によって表される。

30

【0131】

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物 KBP-104 は、GVQAKAGVINMFKSESY (配列番号 8) のアミノ酸配列によって表される。

【0132】

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物 KBP-105 は、アセチル-GVRAKAGVRNMFKSESY (配列番号 14) のアミノ酸配列によって表される。

【0133】

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物 KBP-106 は、アセチル-GVRAKAGVRN (Nle) FKSESY (配列番号 15) のアミノ酸配列によって表される。

【0134】

「Katana Biopharma ペプチドファミリー 2 ペプチド化合物」または「KBP ファミリー 2 ペプチド化合物」という用語は、ソルチリンリガンド、プログラニュリン、及びニューロテンシンから誘導されるペプチドを意味する。例えば、ペプチドは、ヒト、ラット、またはマウスのプログラニュリンから誘導することができる。例えば、KBP ファミリー 2 ペプチド化合物は、(例えば、アミノ酸配列 KCLRREAPRWDA PLRDPALRQLL (配列番号 19) を有する) ヒトプログラニュリン、(例えば、アミノ酸配列 KCLRKKTPRWDILLRDPAPRPLL (配列番号 20) を有する) ラットプログラニュリン、(例えば、アミノ酸配列 KCLRKKIPRWDMFLRDPVPRPLL (配列番号 21) を有する) マウスプログラニュリン、または(例えば、アミノ酸配列 XLYENKPRRPYIL (配列番号 22) を有する) ニューロテンシ

40

50

【表 2】

KBP- 201	アセチル-YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL:式 (XXXX)(配列番号16によって表される)
KBP- 202	アセチル-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL:式 (XXXXI)(配列番号17によって表される)
KBP- 203	アセチル-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL:式 (XXXXII)(配列番号18によって表される)

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物KBP-201は、アセチル-YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL（配列番号16）のアミノ酸配列によって表される。

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物KBP-202は、アセチル-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL（配列番号17）のアミノ酸配列によって表される。

本明細書で使用する場合、ペプチド化合物KBP-203は、アセチル-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL（配列番号18）のアミノ酸配列によって表される。

本明細書で使用する場合、「ソルチリン」または「ソルチリン受容体」という用語は、受容体の液胞局在タンパク質１０タンパク質（V p s １０）ファミリーに属するS O R T １遺伝子によってコードされる、ニューロン１型膜糖タンパク質を意味する。ソルチリン（別名ニューロテンシン受容体３；アクセッション番号N P _ ０ ０ ２ ９ ５ ０（参照により本明細書に援用される））は、中枢神経系及び末梢神経系で豊富に発現し、他のタイプの組織でも発現する。例えば、ソルチリンの発現は、例えば卵巣癌、乳癌、結腸癌、及び前立腺癌を含めた複数の癌で上方制御される。コードされたプレプロタンパク質はフューリンによってタンパク質分解処理され、分子量１００～１１０k D a の成熟した受容体を生成する。ソルチリン（９５k D a）の切断された可溶性形態についても説明されており、これは、過去にソルチリン過剰発現細胞からの上清培地中で検出されたソルチリンの大きな管腔ドメイン（すなわち、細胞外ドメインまたは外部ドメイン）に対応する（４８）。本明細書で参照されるソルチリンのアミノ酸残基は、全長形態（すなわち、受託番号N P _ ０ ０ ２ ９ ５ ０）での位置に対応する。ソルチリンの細胞外ドメインは、全長形態のアミノ酸残基７８～７５５にある。本明細書で説明されるペプチド化合物、結合体化合物、抗体、及び結合体抗体は、ソルチリンに対し高い結合親和性を有し得るため、ソルチリンを発現または過剰発現する癌細胞を特異的に標的化することができる。

本明細書で使用する場合、「化合物」という用語は、式 (I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)、(XI)、(XII)、(XIII)、(XIV)、(XV)、(XVI)、(XVII)、(XVIII)、(XIX)、(XXI)、(XXII)、(XXIII)、(XXIV)、(XXV)、(XXVI)、(XXVII)、(XXVIII)、(XXIX)、(XXXI)、(XXXII)、(XXXIII)、(XXXIV)、(XXXV)、(XXXVI)、(XXXVII)、(XXXVIII)、(XXXIX)、(XL)、(XLI)、(XLII) の化合物、またはこれらの化合物の医薬的に許容される塩、溶媒和物、水和物、及び／もしくはプロドラッグ、これらの後者の化合物の異性体、もしくはこれらの後者の化合物のラセミ混合物、ならびに／または本開示で先に示されたような化合物（単数または複数）で作製された組成物（単数または複数）を意味する。また、「化合物」という表現は、本明

細書で開示される様々な化合物の混合物も意味する。

【0140】

本開示の化合物にはプロドラッグが含まれる。概して、このようなプロドラッグは、名目上由来する化合物に *in vivo* で容易に変換可能な化合物の機能的誘導体となる。本開示の化合物のプロドラッグは、利用可能なヒドロキシまたはアミノ基により形成された従来のエステルであり得る。例えば、本開示の化合物中の利用可能なOHまたは窒素は、塩基の存在下、活性化酸を用いて、任意選択で不活性溶媒中で、アシル化することができる（例えば、ピリジン中の酸塩化物）。プロドラッグとして利用されているいくつかの一般的なエステルとしては、フェニルエステル、脂肪族（C₈–C₂₄）エステル、アシルオキシメチルエステル、カルバメート、及びアミノ酸エステルがある。ある特定の場合には、本開示の化合物のプロドラッグは、化合物中の1つ以上のヒドロキシ基が *in vivo* でヒドロキシ基に変換され得る基としてマスクされている化合物である。好適なプロドラッグの選択及び調製を行うための従来の手順は、例えば、“Design of Prodrugs” (ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985) で説明されている。

10

【0141】

本開示の化合物には放射標識形態が含まれ、例えば、構造²H、³H、¹⁴C、¹⁵N、または放射性ハロゲン（例えば、¹²⁵I）内への取り込みによって標識された化合物が含まれる。本開示の化合物の放射標識化合物は、当技術分野で知られている標準的な方法を用いて調製することができる。

20

【0142】

本明細書で使用する場合、「アナログ」という用語は、本開示のペプチドまたは抗原と実質的に同じ方法で実質的に同じ機能を果たす、本開示のアミノ酸の一部、伸長物、置換物、バリエーション、修飾物、または化学的等価物、及びこれらの誘導体を含む。例えば、本開示のペプチド及び抗原のアナログとしては、限定されるものではないが、保存的アミノ酸置換物が挙げられる。また、本開示のペプチド及び抗原のアナログには、本開示のペプチド及び抗原に対する付加物及び欠失物も含まれる。

【0143】

本明細書で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」とは、ペプチドまたは抗原の所望の特性を損なうことなく1つのアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置き換えられる置換である。

30

【0144】

本明細書で、ある化合物に言及する際に使用される「その誘導体」という表現は、その化合物に類似する反応性を有し、同じ所望の結果を得るために化合物の代替物として使用され得る化合物の誘導体を意味する。

【0145】

本明細書で使用する場合、「癌」という用語は、原発性または続発性の癌を意味し、非転移性及び／または転移性癌を含む。癌に対する言及は、癌組織または細胞に対する言及を含む。例えば、癌は、卵巣癌、脳癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、黒色腫、結腸直腸癌、膵芽腫、肝臓癌、肺癌、前立腺癌、子宮頸癌、頭部癌、胃癌、腎臓癌、子宮内膜癌、精巣癌、尿路上皮癌、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、軟部組織癌、骨肉腫、甲状腺癌、移行細胞膀胱癌、ウィルムス腫瘍、神経膠腫、膵臓癌、または脾臓癌である。本明細書で使用する場合、「癌」という用語は、ソルチリンの発現を伴う任意の癌も含む。

40

【0146】

本明細書で使用する場合、「攻撃的癌」という用語は、急速に分裂及び増殖している癌細胞を有する癌を意味する。攻撃的癌は、浸潤性もしくは転移性であり得、または浸潤性もしくは転移性でありリンパ節及び／もしくは他の身体臓器に広がる可能性が高い。攻撃的癌に対する言及は、攻撃的癌組織または細胞に対する言及を含む。攻撃的癌は、本明細書で説明される癌種のいずれかであり得る。また、攻撃的癌は、血管擬態などの特徴も示

50

し得る。

【0147】

本明細書で使用する場合、「血管擬態」（またはVM）という用語は、癌細胞による微小血管チャネルの形成を意味する。血管擬態を伴う癌細胞は、典型的には攻撃的であり、転移性であり、そして遺伝子的に脱制御される。血管擬態は、内皮細胞の存在なしに *de novo* で起こるという点において、癌細胞が真の血管内皮を模した腫瘍血管の内側を覆う血管新生（*angiogenesis*）とは異なる。血管擬態には、管状及びパターン化という2つの主要なタイプが存在する。管状血管擬態は、正常な血管と形態学的に類似し、一方、パターン化血管擬態は、血管との吻合を経ることが可能だが視覚的には異なる。血管擬態は、様々な癌タイプ、例えば、黒色腫、卵巣癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、前立腺癌、骨肉腫、膀胱癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、胃癌、肺癌、及び本明細書で説明される他の癌タイプで認められる。

10

【0148】

本明細書で使用する場合、「治療剤」という表現は、対照と比較して、対象、癌性組織、または細胞における血管新生または血管擬態を阻害または減少させることによって、治療効果をもたらすことが可能な薬剤を意味する。例えば、治療剤は、本開示で説明される抗血管擬態剤である抗ソルチリン抗体である。抗ソルチリン抗体は、抗癌剤、例えば、ドセタキセル、ドキソルビシン、カバジタキセル、マイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、アマトキシシン、アマニチン、及びアルドキシソルビシン、または植物化学物質（クルクミン）と結合体化させることができる。また、抗血管擬態剤は、本明細書で説明されるペプチド、例えば、KBP-101、KBP-102、KBP-103、KBP-104、KBP-105、KBP-106、KBP-201、KBP-202、またはKBP-203とすることもできる。また、ペプチドは、抗癌剤、例えば、ドセタキセル、ドキソルビシン、カバジタキセル、マイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、アマトキシシン、アマニチン、及びアルドキシソルビシン、または植物化学物質（クルクミン）と結合体化させることもできる。例えば、KBC-106、KBC-201、KBP-106-Cys-アルドキシソルビシン（Aldorubicin）、ドセタキセル-Katanaペプチド結合体（DoxeKA）、またはドキソルビシン-Katanaペプチド結合体（DoxKA）。

20

【0149】

本明細書で使用する場合、「抗癌剤」という用語は、癌細胞において毒性を引き起こすことが可能な薬剤を意味する。例えば、イチイ科樹木（Pacific yew tree）*Taxus brevifolia* の樹皮から誘導されるタキサンは、抗癌剤として使用することができる。タキサンとしては、例えば、ドセタキセル及びカバジタキセルが挙げられる。その他の抗癌剤としては、例えば、DNAをインターカレートすることによって機能するアントラサイクリン化合物が挙げられる。例えば、アントラサイクリンとしては、ドキソルビシン及びアルドキシソルビシンが挙げられる。

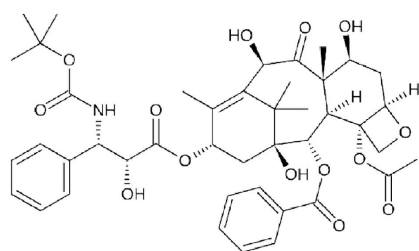
30

【0150】

本明細書で使用する場合、「ドセタキセル」または「doce」という用語は、以下の構造を有する抗癌剤：

40

【化1】



またはその医薬的に許容される塩、溶媒和物、またはプロドラッグ、及びこれらの混合物

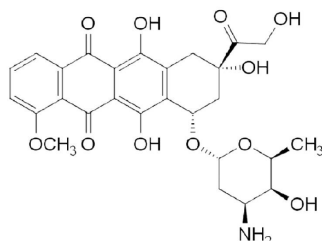
50

を意味する。例えば、ドセタキセルは、その側鎖の 2 位で炭素原子に結合した酸素原子を介し、本開示のペプチド化合物または単離抗体と結合体化させることができる。ドセタキセルは、ペプチド化合物または単離抗体と、直接的にまたはリンカーを介し、接続させることができる。

【0151】

本明細書で使用する場合、「ドキシソルピシン」、「dox」、または「doxo」という用語は、以下の構造を有する抗癌剤：

【化 2】



10

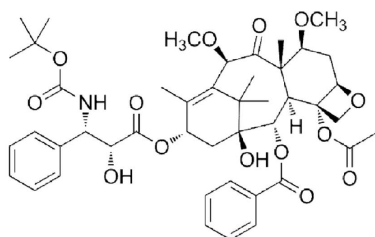
またはその医薬的に許容される塩、溶媒和物、またはプロドラッグ、及びこれらの混合物を意味する。例えば、ドキシソルピシンは、14位で炭素原子に結合した酸素原子を介し、本開示のペプチド化合物または単離抗体と結合体化させることができる。ドキシソルピシンは、ペプチド化合物または単離抗体と、直接的にまたはリンカーを介し、接続させることができる。

20

【0152】

本明細書で使用する場合、「カバジタキセル」または「cab」という用語は、以下の構造を有する抗癌剤：

【化 3】



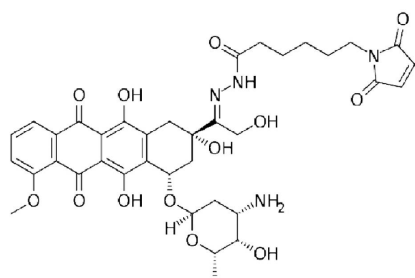
30

またはその医薬的に許容される塩、溶媒和物、またはプロドラッグ、及びこれらの混合物を意味する。例えば、カバジタキセルは、その側鎖の 2 位で炭素原子に結合した酸素原子を介し、本開示のペプチド化合物または単離抗体と結合体化させることができる。カバジタキセルは、ペプチド化合物または単離抗体と、直接的にまたはリンカーを介し、接続させることができる。

【0153】

本明細書で使用する場合、「アルドキシソルピシン」または「aldo」という用語は、以下の構造を有する抗癌剤：

【化 4】



40

またはその医薬的に許容される塩、溶媒和物、またはプロドラッグ、及びこれらの混合物を意味する。例えば、アルドキシソルピシンは、その側鎖の 13 位で炭素原子に結合した（

50

6-マレイミドカプロイル)ヒドラゾンを介し、本開示のペプチド化合物または単離抗体と結合体化させることができる。アルドキシソルピシンは、ペプチド化合物または単離抗体と、直接的にまたはそのリンカーを介し、接続させることができる。

【0154】

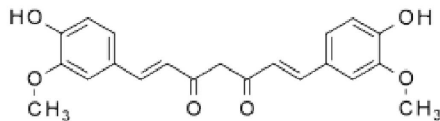
本明細書で使用する場合、「植物化学物質」という用語は、植物内に天然に存在し、血管擬態の阻害に使用することができる化合物を意味する。植物化学物質の例としては、例えば、クルクミンが挙げられる。クルクミン(ジフェルロイルメタン)は香辛料のウコン(*Curcuma longa*)に存在する黄色の色素であり、抗炎症と関連付けられている。抗炎症特性を有するその他の植物化学物質としては、例えば、オメガ-3、セイヨウシロヤナギ樹皮、緑茶、カテキン、ピクノジェノール、*Boswellia serrata*樹脂、レスベラトロール、*Uncaria tomentosa*、カプサイシン、アントシアニン/アントシアニンジン、フラボノイド、オリーブオイル化合物、クロロゲン酸、及びスルホラファン(*sulphoraphane*)が挙げられる。

10

【0155】

本明細書で使用する場合、「クルクミン」または「cur」という用語は、以下の構造を有する植物化学物質:

【化5】



20

またはその医薬的に許容される塩、溶媒和物、またはプロドラッグ、及びこれらの混合物を意味する。例えば、クルクミンは、そのフェノール基の酸素原子を介し、本開示のペプチド化合物または単離抗体と結合体化させることができる。クルクミンは、ペプチド化合物または単離抗体と、直接的にまたはリンカーを介し、接続させることができる。

【0156】

本明細書で使用する場合、「結合体化合物」、「ペプチド-薬物結合体」または「ペプチド結合体」という表現は、本明細書で開示されるペプチド化合物を含み、任意選択でリンカーを介し、少なくとも1つの治療剤と接続している化合物を意味する。結合体化合物は、例えば、1、2、3、または4個の接続している治療剤分子を含むことができる。これらの1~4個の治療剤分子は、同一であっても異なってもよい。すなわち、最大4つの異なる治療剤をペプチド化合物に接続できると考えられる。治療剤(単数または複数)は、少なくとも1つの共有結合、少なくとも1つの原子、または少なくとも1つのリンカーを介し、ペプチド化合物に接続している。結合体化合物は、血管擬態の阻害に使用することができる。結合体化合物の例としては、限定されるものではないが、以下に示す結合体化合物が挙げられる。

30

【表3】

KBC-106 (2:1)	アセチル-GVRAK (クルクミン) AGVRN (Nle) FK (クルクミン) SESY-式 (XVI) (各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号15を有するペプチド化合物を含む)
KBC-201 (2:1)	アセチル-YK (クルクミン) SLRRK (クルクミン) APRWDA PLRDPALRQLL-式 (XVII) (各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号16を有するペプチド化合物を含む)

40

【0157】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、キメラ型及びヒト化モノクローナル抗体を含めたモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ならび

50

にキメラ型抗体を意味する。抗体は、組換え供給源由来である場合も、かつ／またはトランスジェニック動物で産生される場合もある。本明細書で使用する場合、「抗体フラグメント」という用語は、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、2量体、ミニボディ、ダイアボディ、及びこれらの多量体、ならびに二重特異性抗体フラグメントを含むように意図されている。抗体は、従来の技術を用いて断片化することができる。例えば、F (a b')₂断片は、抗体をペプシンで処理することによって生成することができる。得られたF (a b')₂を処置してジスルフィド架橋を還元し、F a b'フラグメントを産生することができる。パイン消化は、F a bフラグメントの形成を導くことができる。F a b、F a b'及びF (a b')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、2量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメント、ならびにその他のフラグメントも、組換え技法によって合成することができる。抗体は、任意選択で、任意の有用なアイソタイプとすることができ、これには、1つの実施形態においては診断用途に使用されるI g M、ならびに1つの実施形態においては治療用途に使用されるI g G、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4が含まれる。

【0158】

「単離抗体」という用語は、抗体を産生した供給源（例えば、動物、ハイブリドーマ、またはその他の細胞株（抗体を産生する組換え細胞を含む））から取り出された、i n v i t r oまたはi n v i v oで産生される抗体を意味する。単離抗体は、任意選択で「精製され」ており、これは、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の純度、及び任意選択で医薬グレードの純度を意味する。

【0159】

「抗ソルチリンmAb #1」または「抗S O R T 1 mAb #1」という用語は、E M B M i l l i p o r e（クローンF 11；カタログ番号M A B N 1792）から得られるモノクローナル抗体を意味する。この抗体の免疫原は、ソルチリンの細胞外ドメイン、すなわちソルチリンのアミノ酸残基78～755にある。

【0160】

「抗ソルチリンmAb #2」または「抗S O R T 2 mAb #2」という用語は、B D B i o s c i e n c e s（クローン48；カタログ番号612100）から得られるモノクローナル抗体を意味する。この抗体の免疫原は、このタンパク質の細胞外ドメインの一部に対応するソルチリンのアミノ酸残基300～422である。

【0161】

ソルチリン内でアクセス可能な特定の抗原または分子（ソルチリンのアミノ酸残基300～422（配列番号25）を含む）に対し反応性を有する特異的抗体または抗体フラグメントは、細胞表面成分を用いて細菌内で発現させる免疫グロブリン遺伝子またはその部分をコードする発現ライブラリーをスクリーニングすることによって生成することもできる。例えば、完全なF a bフラグメント、V H領域、及びF V領域は、ファージ発現ライブラリーを用いて細菌内で発現させることができる（例えば、参考文献33を参照）。抗原性ソルチリン残基の例としては、限定されるものではないが、以下に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

10

20

30

40

50

【表 4】

配列番号 25 (ソルチリンのアミノ酸残基 300 ~ 422)	G V K I Y S F G L G G R F L F A S V M A D K D T T R R I H V S T D Q G D T W S M A Q L P S V G Q E Q F Y S I L A A N D D M V F M H V D E P G D T G F G T I F T S D D R G I V Y S K S L D R H L Y T T T G G E T D F T N V T S L R G V Y I T S V L S E D
配列番号 26 (ソルチリンのアミノ酸残基 300 ~ 330)	G V K I Y S F G L G G R F L F A S V M A D K D T T R R I H V S
配列番号 27 (ソルチリンのアミノ酸残基 315 ~ 345)	A S V M A D K D T T R R I H V S T D Q G D T W S M A Q L P S V
配列番号 28 (ソルチリンのアミノ酸残基 330 ~ 360)	S T D Q G D T W S M A Q L P S V G Q E Q F Y S I L A A N D D M
配列番号 29 (ソルチリンのアミノ酸残基 345 ~ 375)	V G Q E Q F Y S I L A A N D D M V F M H V D E P G D T G F G T
配列番号 30 (ソルチリンのアミノ酸残基 360 ~ 390)	M V F M H V D E P G D T G F G T I F T S D D R G I V Y S K S L
配列番号 31 (ソルチリンのアミノ酸残基 375 ~ 405)	T I F T S D D R G I V Y S K S L D R H L Y T T T G G E T D F T
配列番号 32 (ソルチリンのアミノ酸残基 390 ~ 422)	L D R H L Y T T T G G E T D F T N V T S L R G V Y I T S V L S E D
配列番号 33 (ソルチリンのアミノ酸残基 300 ~ 320)	G V K I Y S F G L G G R F L F A S V M A D
配列番号 34 (ソルチリンのアミノ酸残基 310 ~ 330)	G R F L F A S V M A D K D T T R R I H V S
配列番号 35 (ソルチリンのアミノ酸残基 320 ~ 340)	D K D T T R R I H V S T D Q G D T W S M A
配列番号 36 (ソルチリンのアミノ酸残基 330 ~ 350)	S T D Q G D T W S M A Q L P S V G Q E Q F
配列番号 37 (ソルチリンのアミノ酸残基 340 ~ 360)	A Q L P S V G Q E Q F Y S I L A A N D D M
配列番号 38 (ソルチリンのアミノ酸残基 350 ~ 370)	F Y S I L A A N D D M V F M H V D E P G D

10

20

30

40

50

配列番号 39 (ソルチリンのアミノ酸残基 360～380)	MVFMHVDEPGDTGFGTIFTSD
配列番号 40 (ソルチリンのアミノ酸残基 370～390)	DTGFGTIFTSDDRGIVYSKSL
配列番号 41 (ソルチリンのアミノ酸残基 380～400)	DRGIVYSKSLDRHLYTTTGG
配列番号 42 (ソルチリンのアミノ酸残基 390～410)	LDRHLYTTTGGGETDFTNVTSL
配列番号 43 (ソルチリンのアミノ酸残基 400～422)	GETDFTNVTSLRGVYITSVLSED
配列番号 44 (ソルチリンのアミノ酸残基 319～324)	ADKDTT
配列番号 45 (ソルチリンのアミノ酸残基 330～338)	STDQGDTWS
配列番号 46 (ソルチリンのアミノ酸残基 342～348)	LPSVGQE
配列番号 47 (ソルチリンのアミノ酸残基 366～373)	DEPGDTGF
配列番号 48 (ソルチリンのアミノ酸残基 378～379)	TS
配列番号 49 (ソルチリンのアミノ酸残基 382～384)	RGI
配列番号 50 (ソルチリンのアミノ酸残基 396～405)	TTTGGGETDFT

10

20

30

【0162】

40

いくつかの実施形態において、配列番号 25～50 のいずれか 1 つに示されるようなアミノ酸配列を有するまたは含むポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントに特異的に結合する単離抗体は、血管凝態の阻害に使用される。いくつかの実施形態において、単離抗体はソルチリン受容体を標的化する。他の実施形態において、単離抗体は、配列番号 25～50 のいずれか 1 つに示されるような少なくとも 2 個、任意選択で少なくとも 4 個の連続するアミノ酸残基、そのアナログ、またはそのフラグメントに結合する。

【0163】

本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、抗体またはフラグメントがヒトの保存的フレームワーク領域（代替的に定常領域と呼ばれる）を含み、超可変領域（代替的に抗原結合ドメインと呼ばれる）が非ヒト起源であることを意味する。例えば、超可

50

変領域は、マウス、ラット、またはその他の種由来とすることができる。非ヒト種由来の抗体のヒト化は、文献で十分に説明されている。たとえば、Carter & Merchant 1997 (34) を参照。ヒト化抗体は市販品も容易に入手できる。

【0164】

ヒト化形態のげっ歯類抗体は、CDR移植によって容易に生成される(35)。このアプローチでは、げっ歯類モノクローナル抗体の抗原結合部位を含む6つのCDRループを、対応するヒトフレームワーク領域に結合させる。フレームワーク領域のアミノ酸が抗原認識に影響を及ぼす場合があるため、CDR移植はしばしば親和性が低減した抗体をもたらす(36)。抗体の親和性を維持するため、ある特定のフレームワーク残基を部位特異的変異誘発または他の組換え技法によって置き換える必要がしばしばあり、抗原結合部位のコンピューターモデリングによって支援され得る(37)。ヒト化形態の抗体は、任意選択で、表面再建(resurfacing)によって得られる(38)。このアプローチでは、げっ歯類抗体の表面残基のみがヒト化される。

【0165】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、またはIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリン、ならびにIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む任意のアイソタイプから選択される。ヒト化またはヒト抗体は、1つまたは複数のアイソタイプまたはクラスに由来する配列を含み得る。さらに、これらの抗体は、典型的には、抗原結合フラグメント(例えば、Fab、Fab'F(ab')₂、Fd、Fv、及び単ドメイン抗体フラグメント)として、または重鎖及び軽鎖がスパーサーによって結合した1本鎖抗体として産生される。また、ヒト化抗体は、モノマー形態またはポリマー形態で存在してもよい。ヒト化抗体は、任意選択で、1つの非ヒト鎖及び1つのヒト化鎖(すなわち、1つのヒト化重鎖または軽鎖)を含む。

【0166】

加えて、配列番号25～50のいずれか1つで示されるようなアミノ酸配列を有するまたは含むポリペプチドに特異的な抗体、例えば、ソルチリンのアミノ酸残基300～422(アクセッション番号NP_002950)は、抗体ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって容易に単離される。例えば、抗体ファージライブラリーは、任意選択で、本開示の抗原の一部を用いてスクリーニングしてソルチリンに特異的な抗体フラグメントを同定する。同定された抗体フラグメントは、任意選択で、本開示の異なる実施形態で有用である様々な組換え抗体を産生するために使用される。抗体ファージディスプレイライブラリーは、例えば、Xoma(Berkeley, Calif.)により市販されている。抗体ファージライブラリーをスクリーニングする方法は、当技術分野において周知されている。

【0167】

抗体を生成するためのその他の方法は当技術分野で知られている。例えば、配列番号25～50のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有するまたは含む抗原性ポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントは、例えば、BALB/cマウスの免疫化のためにKLHと結合体化させて、ポリペプチド上のエピトープに反応するB細胞を生成することができる。代替的に、1つ以上の抗原決定基を含む配列番号25～50のペプチドのいずれかのアミノ酸配列を有するまたは含むポリペプチドの部分は、単独でまたはKLHに結合したときに免疫原性であるペプチド配列のいずれかの3個または5個の連続したアミノ酸を最小限含むKLHと結合体化させる。

【0168】

ソルチリンポリペプチド(例えば、配列番号25～50で示されるアミノ酸配列、そのアナログ、またはそのフラグメント)の抗原性調製物で動物を免疫化した後に抗血清を得ることができ、ポリクローナル抗体は、当該血清から単離することができる。モノクローナル抗体の産生については、抗体産生細胞(すなわち、Bリンパ球)を免疫化した動物から回収し、当技術分野で周知されている体細胞融合手順によって不死化細胞(例えば、骨髓腫細胞)と融合させてハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技法として

は、例えば、ハイブリドーマ技術（３９）、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技法（４０）、及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのＥＢＶ－ハイブリドーマ技法（４１）が挙げられる。ハイブリドーマ細胞は、ソルチリンポリペプチドと特異的に結合する抗体の産生、及びこのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離されたモノクローナル抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングすることができる。

【０１６９】

抗体に関して本明細書で使用する場合、「特異的に結合する」という用語またはその誘導体は、当技術分野で広く理解されているように、抗体が、目的抗原（例えば、ソルチリンポリペプチド）と他の非目的抗原との間で十分に選択的であること、抗体が特定のタイプの生物学的試料中で目的抗原の存在を検出するために有用であることを意味するように意図されている。理論に束縛されることは望まないが、抗体を用いるある特定の方法、例えば、治療用途においては、結合特異性の程度がより高いことが望ましい場合がある。モノクローナル抗体は、概して、所望の抗原及び交差反応ポリペプチドを有効に識別する傾向がポリクローナル抗体よりも大きい。抗原に対する抗体の親和性は、通常は解離定数で表現され、抗体：抗原相互作用の特異性に影響を及ぼす特徴である。所望される特異性は異なる親和性の範囲で到達することができ、概して好ましい抗体は、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、またはそれ以下の解離定数を有する。別の例では、抗体は、別の分子よりも３～５、５～７、７～１０、１０～１５、５～１５、または５～３０倍効率的に目的抗原に結合することができる。

【０１７０】

さらに、得られる抗体の特性は、抗体のスクリーニングに使用される技法によって影響される。例えば、抗体が溶液中の抗原を結合するために使用される場合、溶液結合が行われ得る。抗体と抗原との間の相互作用を試験して特に望ましい抗体を同定するために、種々の技法が利用できる。このような技法としては、ウェスタンブロット、免疫沈降アッセイ、免疫組織化学検査、ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴結合アッセイ（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ結合アッセイ（Ｂｉａ－ｃｏｒｅ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ））、及びサンドイッチアッセイ（例えば、常磁性ビーズシステム）が挙げられる。

【０１７１】

１つの態様において、本開示は、可溶性ソルチリンポリペプチドに結合する抗体を提供する。このような抗体は、配列番号２５～５０のいずれか１つに示される可溶性ソルチリンポリペプチド配列、そのアナログ、またはフラグメントを抗原として用いて、本明細書で説明されているように生成することができる。このタイプの抗体は、例えば、生物学的試料中のソルチリンポリペプチドを検出するために、及び／または対象の可溶性ソルチリンポリペプチドレベルをモニターするために使用することができる。別の態様において、可溶性ソルチリンポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用してソルチリンポリペプチド及び関連経路の活性を調節し、それによって血管凝態を阻害することができる。

【０１７２】

本明細書で使用する場合、「抗体－薬物結合体（ＡＤＣ）」または「結合体抗体」という表現は、任意選択でリンカーを介し、少なくとも１つの治療剤と接続している、本明細書で開示される抗体を意味する。抗体－薬物結合体は、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２個の接続している治療剤分子を含むことができる。これらの１～１２個の治療剤分子は、同一であっても異なってもよい。すなわち、最大４つの異なる治療剤を抗体に接続できると考えられる。治療剤（単数または複数）は、少なくとも１つの共有結合、少なくとも１つの原子、または少なくとも１つのリンカーを介し、抗体に接続している。抗体－薬物結合体は、血管凝態の阻害に使用することができる。抗体－薬物結合体の例としては、限定されるものではないが、抗癌薬（例えば、ドセタキセル、ドキソルビシン、カバジタキセル、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、アマトキシシン、アマニチン、及びアルドキシソルビシン）ならびに／または植物化学物質（例えば、クルクミン）と結合体化した抗ソルチリン抗体が挙げられる。以下の表は、抗ソルチリン抗体と結合体化させることができる抗癌薬をまとめたものである。

【表 5】

A) 細胞傷害性物質（細胞傷害性薬剤）	
1.	アルキル化剤
2.	白金配位：シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン
3.	代謝拮抗薬
4.	微小管損傷剤：ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、パクリタキ
5.	トポイソメラーゼ-2 阻害薬：エトポシド
6.	トポイソメラーゼ-1 阻害薬：トポテカン、イリノテカン
7.	抗生物質：アクチノマイシンD、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビ
8.	その他：ヒドロキシウレア、L-アスパラギナーゼ、トレチノイン
B) 毒素	
1.	マイタンシノイド
2.	アウリスタチン
3.	カリケアミシン
4.	アマトキシシン
5.	アマニチン
C) 抗癌ペプチド	
1.	D-ペプチドA、B、C、及びD、D-K6L9、NRC-03、NRC-07、ゴメシン、ヘプシジンTH2-3、ダーマセプチンB2、PTP7、MG
D) 標的化薬物	
1.	チロシンタンパク質キナーゼ阻害薬：イマチニブ、ダサチニブ
2.	EGFR受容体阻害薬：ゲフィチニブ、エルロチニブ
3.	血管新生阻害薬：ベバシズマブ、サリドマイド、エンドスタチン、アンジオスタチン、アンジオポエチン（Angiopoietin）、カンナビノイド
4.	プロテアソーム阻害薬：ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ（Carfilzomib）、イキサゾミブ（Ixazomib）、マリゾミブ、エボキシオミシン
5.	モノクローナル抗体（mAb）：リツキシマブ、トラスツズマブ
E) 免疫療法薬	
1.	チェックポイント阻害薬
2.	CAR-T細胞療法
3.	抗体
4.	抗体薬物結合体
5.	二重特異性T細胞エンゲージャー及び二重特異性抗体
6.	遺伝子操作されたT細胞媒介性細胞殺傷
7.	腫瘍溶解性ウイルス
8.	T細胞媒介性細胞溶解
F) 植物化学物質	
1.	アルカロイド：クロロゲン酸、テオブロミン、テオフィリン
2.	アントシアニン：シアニジン、マルビジン
3.	カロテノイド：ベータカロテン、ルテイン、リコピン
4.	クメスタン
5.	フラバン-3-オール
6.	フラボノイド：エピカテキン、ヘスペリジン、イソラムネチン、ケンフェロール、ミリセチン、ナリンギン、ノビレチン、プロアントシアニジン、ケルセチン、ルチン、タンゲレチン
7.	ヒドロキシケイ皮酸：チコリ酸、クマリン、フェルラ酸、スコボレチン
8.	イソフラボン：ダイゼイン、ゲニス테인
9.	リグナン：シリマリン
10.	モノテルペン：ゲラニオール、リモネン

10

20

30

40

50

1 1 .	オルガノスルフィド：アリシン、グルタチオン、インドール-3-カルビノー
1 2 .	その他の植物化学物質：ダムナカンタール、ジゴキシン、フィチン酸
1 3 .	フェノール酸：カプサイシン、エラグ酸、没食子酸、ロスマリン酸、タンニン
1 4 .	フィトステロール：ベータ-シトステロール
1 5 .	サポニン
1 6 .	スチルベン：プテロスチルベン、レスベラトロール
1 7 .	トリテルペノイド：ウルソル酸
1 8 .	キサントフィル：アスタキサンチン、ベータ-クリプトキサンチン
1 9 .	モノフェノール：ヒドロキシチロソール
G) オリゴペプチドミメティック	
1 .	ツブリシン

10

【 0 1 7 3 】

本明細書で使用する場合、「結合体化」という用語は、例えば、上記で定義されるような結合体の調製を意味する。このような作用は、ペプチド化合物または抗体を、任意選択でリンカーを介し、少なくとも1つの治療剤と共に接続することを含む。

【 0 1 7 4 】

本明細書で使用する場合、「CD133陽性細胞（単数または複数）」とは、CD133細胞表面マーカーを発現する単数または複数の細胞を意味する。

【 0 1 7 5 】

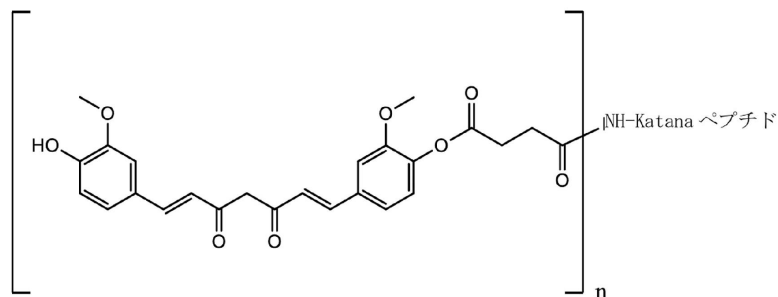
例えば、以下は、本明細書で開示されるいくつかのペプチド結合体化合物の一般化学式である。

20

【 0 1 7 6 】

クルクミン-K a t a n a 結合体化合物：

【化 6】



$n=1, 2, 3$, または 4

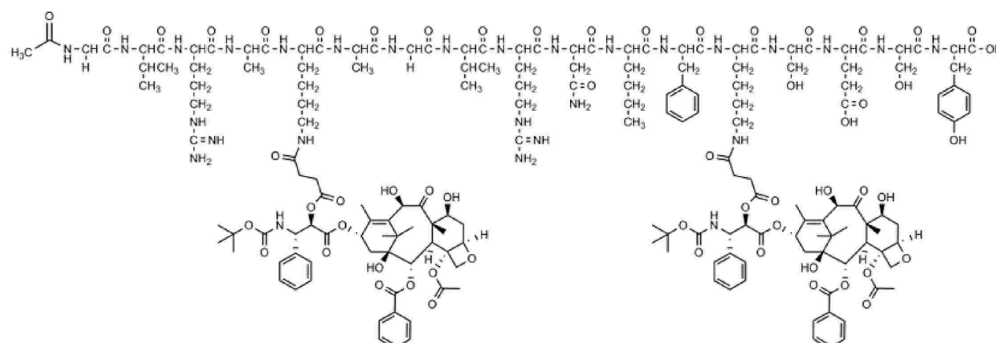
30

【 0 1 7 7 】

例えば、以下は、本明細書で開示されるいくつかの結合体化合物の化学構造である。

ドセタキセル-Katanaペプチド結合体 (DocetKA) :

【化 7】



DoceKA

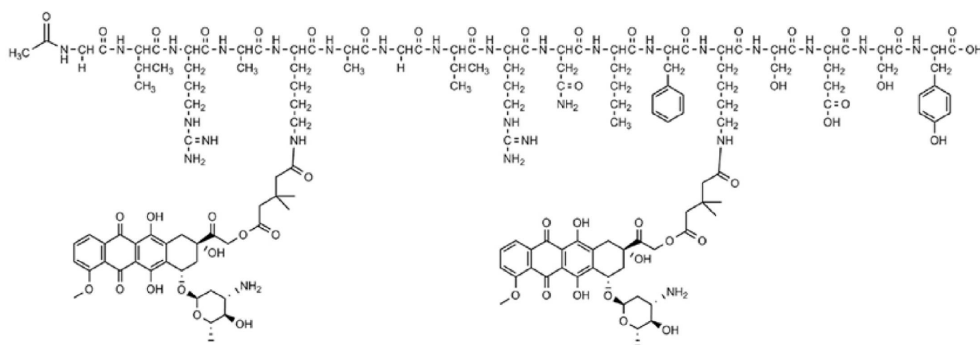
分子量：3703.8 g/mol

40

50

ドキシソルピシン-Katanaペプチド結合体 (DoxKA) :

【化8】



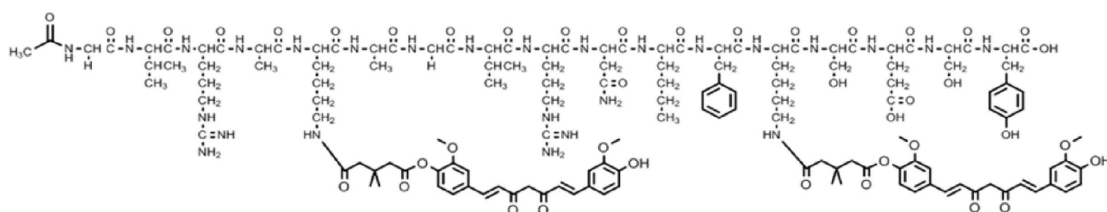
10

化学式 : $C_{153}H_{212}N_{28}O_{51}$

分子量 : 3259.52

KBC-106 :

【化9】



20

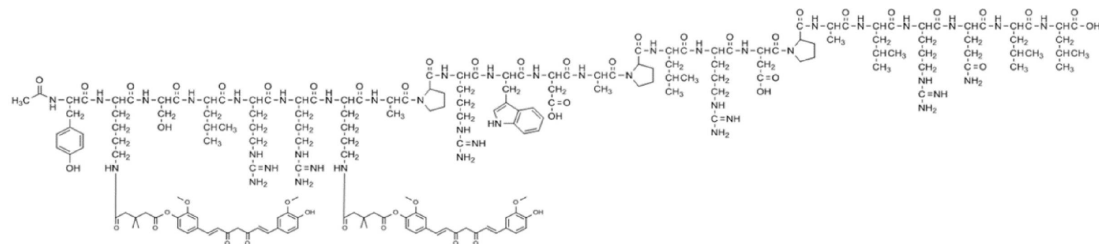
化学式 : $C_{141}H_{194}N_{26}O_{41}$

分子量 : 2909.24

クルクミン-Katanaペプチド結合体 :

KBC-201 :

【化10】



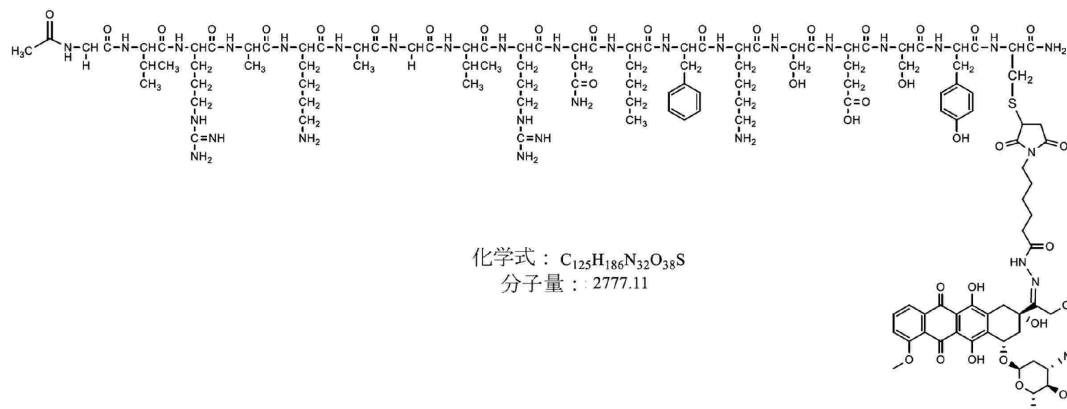
30

化学式 : $C_{190}H_{277}N_{43}O_{49}$

分子量 : 3947.56

KBP-106-Cys-アルドキシソルピシン (Aldorubicin) :

【化11】



40

化学式 : $C_{125}H_{186}N_{32}O_{38}S$

分子量 : 2777.11

50

【0178】

本明細書で使用する場合、「リンカー」という用語は、本明細書で開示されるペプチド化合物または抗体を少なくとも1つの治療剤に接続する化学構造を意味する。リンカーは、ペプチド化合物または抗体上の異なる官能基で、ペプチド化合物または単離抗体に接続させることができる。例えば、リンカーは、1級アミン（アミン（ $-NH_2$ ））でペプチド化合物または単離抗体に接続させることができ、この基は、各ポリペプチド鎖のN末端（アルファアミンと呼ばれる）及びリジン（Lys、K）残基の側鎖（イプシロンアミンと呼ばれる）に存在する。例えば、リンカーは、カルボキシル（ $-COOH$ ）でペプチド化合物または単離抗体に接続させることができ、この基は、各ポリペプチド鎖のC末端ならびにアスパラギン酸（Asp、D）及びグルタミン酸（Glu、E）の側鎖に存在する。例えば、リンカーは、スルフヒドリル（ $-SH$ ）でペプチド化合物または単離抗体に接続させることができ、この基は、システイン（Cys、C）の側鎖に存在する。多くの場合、タンパク質の二次構造または三次構造の一部として、システインはその側鎖間でジスルフィド結合（ $-S-S-$ ）を介し共に連結している。これらは、ほとんどのタイプの反応基による架橋に利用できるようにするために、スルフヒドリルに還元されなければならない。例えば、リンカーは、カルボニル（ $-CHO$ ）でペプチド化合物または単離抗体に接続させることができ、ケトンまたはアルデヒド基は、糖タンパク質内で、多糖の翻訳後修飾（グリコシル化）をメタ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化することによって作出され得る。例えば、リンカーは切断可能なリンカーであり得る。例えば、リンカーは切断不可能なリンカーであり得る。

【0179】

以下の表は、標準的な化学的結合体化のためのいくつかの主要なリンカーの反応性クラス及び化学基をまとめたものである。

【表6】

反応性クラス	化学基
カルボキシルアミン反応基	カルボジイミド（例えば、EDC）
アミン反応性基	NHS エステル イミドエステル ペンタフルオロフェニルエステル ヒドロキシメチルホスフィン
スルフヒドリル反応性基	マレイミド ハロアセチル（ブロモまたはヨード） ピリジルジスルフィド チオスルホネート ビニルスルホン
アルデヒド反応性基 すなわち、酸化糖（カルボニル）	ヒドラジド アルコキシアミン
光反応性基	ジアジリン アリアルアジド

【0180】

例えば、ホモ二官能性及びヘテロ二官能性架橋剤を使用することができる。例えば、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）は、短いスペーサーアームのいずれかの末端に同一のアミン反応性NHS-エステル基を有するホモ二官能性架橋剤である。例えば、スルホスクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）は、シクロヘキサンスペーサーアームの一方の末端にアミン反応性スルホ-NHS-エステル基、反対側の末端にスルフヒドリル反応性マレイミド基を有するヘテロ二官能性架橋剤である。これにより、連続した2ステップの結合体化手順が可能になる。市販されているホモ二官能性架橋剤には、以下のものがある：BSOCOES（ビス（2-〔スクシンイミドオキシカルボニルオキシ〕エチル）スルホン；DPDPB（1,4-ジ-（3'-〔2ピリジルジチオ〕-プロピオンアミド）ブタン；DSS（ジス

クシンイミジルスベレート) ; D S T (ジスクシンイミジルタルトレート) ; スルホ D S T (スルホジスクシンイミジルタルトレート) ; D S P (ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) ; D T S S P (3, 3' -ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) ; E G S (エチレングリコールビス (スクシンイミジルスクシネート)) ; 及び B A S E D (ビス (β - [4 -アジドサリチルアミド] -エチル) ジスルフィドヨウ素化可能 (i o d i n a t a b l e))) 。

【0181】

ペプチド化合物または抗体は、様々なリンカー、例えば、スルフヒドリル基、アミノ基 (アミン)、または任意の適切な反応性基を介し、結合体化させることができる。リンカーは、共有結合であってもよい。リンカー基は、柔軟なアーム、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の炭素原子を含むことができる。

【0182】

例示的なリンカーとしては、限定されるものではないが、ピリジンジスルフィド、チオスルホネート、ビニルスルホネート、イソシアネート、イミドエステル、ジアジン、ヒドラジン、チオール、カルボン酸、マルチペプチドリンカー、及びアセチレンが挙げられる。代替的に、使用され得るその他のリンカーとしては、B S³ [ビス (スルホスクシンイミジル) スベレート] (アクセス可能な1級アミンを標的化するホモ二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである)、N H S / E D C (N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (N H S / E D C は、1級アミン基とカルボキシル基との結合体化を可能にする)、スルホ- E M C S ([N-ε-マレイミドカプロン酸] ヒドラジド (スルホ- E M C S は、スルフヒドリル及びアミノ基に反応性であるヘテロ二官能性反応性基である)、ヒドラジド (ほとんどのタンパク質は露出した炭水化物を含み、ヒドラジドはカルボキシル基を1級アミンに結合するための有用な試薬である) が挙げられる。

【0183】

共有結合を形成するには、化学反応基として、ヒドロキシル部分がペプチド化合物または抗体を修飾するのに必要なレベルで生理学的に許容される多種多様な活性カルボキシル基 (例えば、エステル) を使用することができる。特定の薬剤としては、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド (N H S)、N-ヒドロキシースルホスクシンイミド (スルホ- N H S)、マレイミド-ベンゾイル-スクシンイミド (M B S)、ガンマーマレイミド-ブチリルオキシスクシンイミドエステル (G M B S)、マレイミドプロピオン酸 (M P A)、マレイミドヘキサ酸 (M H A)、及びマレイミドウンデカン酸 (M U A) が挙げられる。

【0184】

1級アミンはN H S エステルの主要な標的であり、N H S エステルは1級アミンと反応してアミド共有結合を形成する。タンパク質のN末端に存在するアクセス可能なα-アミン基及びリジンのε-アミンは、N H S エステルと反応する。したがって、本明細書で開示される結合体化合物は、ペプチド化合物もしくは抗体のN末端アミノ、またはリジンのε-アミンと結合体化したN H S エステルを有するリンカーを含むことができる。アミド結合は、N H S エステルが1級アミンと反応してN-ヒドロキシスクシンイミドを放出するときに形成される。スクシンイミド含有反応性基は、より単純にスクシンイミジル基と称され得る。いくつかの実施形態において、ペプチド化合物または抗体上の官能基はチオール基であり、化学反応基は、マレイミド含有基 (例えば、ガンマーマレイミド-ブチルアミド (G M B A または M P A)) である。このようなマレイミド含有基は、本明細書ではマレイミド (m a l e i d o) 基と称され得る。

【0185】

アミン-アミンリンカーとしては、N H S エステル、イミドエステルその他が挙げられ、例を以下に挙げる。

10

20

30

40

50

【表 7】

例示的な NHS エステル：
DSG (ジスクシンイミジルグルタレート)
DSS (ジスクシンイミジルスベレート)
BS ³ (ビス [スルホスクシンイミジル] スベレート)
TSAT (トリス-スクシンイミジルアミノトリアセテート)
ビス-スクシンイミドエステル活性化化合物のパリアント (BS (PEG) _n (式中、n は 1～20 である) (例えば、BS (PEG) ₅ 及び BS (PEG) ₉) などのポリエチレングリコールスパーサーを含む)
DSP (ジチオビス [スクシンイミジルプロピオネート])
DTSSP (3, 3'-ジチオビス [スルホスクシンイミジルプロピオネート])
DST (ジスクシンイミジルトアルタレート)
BSOCOES (ビス [2- (スクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン)
EGS (エチレングリコールビス [スクシンイミジルスクシネート])
スルホ-EGS (エチレングリコールビス [スルホスクシンイミジルスクシネート])
例示的なイミドエステル：
DMA (アジプイミド酸ジメチル・2HCl)
DMP (ピメルイミド酸ジメチル・2HCl)
DMS (スベルイミド酸ジメチル・2HCl)
DTBP (ジメチル 3, 3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル・2HCl)
その他の例示的なアミン間リンカー：
DFDNB (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン)
THPP (β- [トリス (ヒドロキシメチル) ホスフィノ] プロピオン酸 (ベタイン))

10

20

【0186】

また、リンカーはスルフヒドリル-スルフヒドリルリンカー、例えば、以下に挙げるマレイミド及びピリジルジチオールとすることもできる。

【表 8】

例示的なマレイミド：	もう 1 つのスルフヒドリルリンカー：
BMOE（ビス-マレイミドエタン）	HBVS（1，6-ヘキサ-ビス-ビニルスルホン）
BMB（1，4-ビスマレイミドブタン）	
BMH（ビスマレイミドヘキサン）	
TMEA（トリス〔2-マレイミドエチル〕アミン）	
BM（PEG） ₂ 1，8-ビス-マレイミドジエチレングリコール）	
BM（PEG） _n （式中、nは1～20（例えば、2または3）である）	
BMDB（1，4-ビスマレイミド-2，3-ジヒドロキシブタン）	
DTME（ジチオ-ビスマレイミドエタン）	
例示的なピリジルジチオール：	
DPDPB（1，4-ジ-〔3'-（2'-ピリジルジチオ）-プロピオンアミド〕ブタン）	

30

40

【0187】

リンカーは、NHS エステル/マレイミド化合物を含めたアミン-スルフヒドリルリンカーとすることができる。これらの化合物の例を以下に示す。

【表 9】

アミンースルフヒドリルリンカー：	
AMAS (N- (α -マレイミドアセトキシ) スクシンイミドエステル)	
BMP S (N- [β -マレイミドプロピルオキシ] スクシンイミドエステル)	
GMB S (N- [γ -マレイミドブチルオキシ] スクシンイミドエステル)	
スルホ-GMB S (N- [γ -マレイミドブチルオキシ] スルホスクシンイミドエステル)	
MB S (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)	
スルホ-MB S (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル)	10
SMCC (スクシンイミジル 4- [N-マレイミドメチル] シクロヘキサノ-1-カルボキシレート)	
スルホ-SMCC (スルホスクシンイミジル 4- [N-マレイミドメチル] シクロヘキサノ-1-カルボキシレート)	
EMCS ([N- ϵ -マレイミドカプロイルオキシ] スクシンイミドエステル)	
スルホ-EMCS (N- [ϵ -マレイミドカプロイルオキシ] スルホスクシンイミドエステル)	
SMPB (スクシンイミジル 4- [p-マレイミドフェニル] ブチレート)	
スルホ-SMPB (スルホスクシンイミジル 4- [p-マレイミドフェニル] ブチレート)	
SMPH (スクシンイミジル-6- [β -マレイミドプロピオンアミド] ヘキサノエート)	20
LC-SMCC (スクシンイミジル-4- [N-マレイミドメチル] シクロヘキサノ-1-カルボキシ- [6-アミドカプロエート])	
スルホ-KMUS (N- [κ -マレイミドウンデカノイルオキシ] スルホスクシンイミドエステル)	
SM (PEG) _n (スクシンイミジル- ([N-マレイミドプロピオンアミド-ポリエチレングリコール) エステル) (式中、n は 1~30 (例えば、2、4、6、8、12、または 24) である)	
SPDP (N-スクシンイミジル 3- (2-ピリジルジチオ) -プロピオネート)	
LC-SPDP (スクシンイミジル 6- (3- [2-ピリジルジチオ] -プロピオンアミド) ヘキサノエート)	30
スルホ-LC-SPDP (スルホスクシンイミジル 6- (3'- [2-ピリジルジチオ] -プロピオンアミド) ヘキサノエート)	
SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- α - [2-ピリジルジチオ] トルエン)	
スルホ-LC-SMPT (4-スルホスクシンイミジル-6- [α -メチル- α - (2-ピリジルジチオ) トルアミド] ヘキサノエート)	
SIA (N-スクシンイミジルヨードアセテート)	
SBAP (スクシンイミジル 3- [プロモアセトアミド] プロピロネート)	
SIA B (N-スクシンイミジル [4-ヨードアセチル] アミノベンゾエート)	
スルホ-SIA B (N-スルホスクシンイミジル [4-ヨードアセチル] アミノベンゾエート)	40

【0188】

リンカーは、アミノ基及び非選択的実体と反応することができる。このようなリンカーとしては、NHS エステル／アリアルアジド及び NHS エステル／ジアジリンリンカーが挙げられ、例を以下に挙げる。

【表 10】

NHS エステル／アリアルアジドリンカー：	
NHS-ASA (N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸)	
ANB-NOS (N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド)	
スルホ-HSAB (N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート)	
スルホ-NHS-LC-ASA (スルホスクシンイミジル [4-アジドサリチルアミド] ヘキサノエート)	10
SANPAH (N-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ) ヘキサノエート)	
スルホ-SANPAH (N-スルホスクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ) ヘキサノエート)	
スルホ-SFAD (スルホスクシンイミジル- (パーフルオロアジドベンズアミド) -エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート)	
スルホ-SAND (スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド) -エチル-1, 3'-プロピオネート)	
スルホ-SAED (スルホスクシンイミジル 2-[7-アミノ-4-メチルクマリン-3-アセトアミド] エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート)	20
NHS エステル／ジアジリンリンカー：	
スクシンイミジル 4, 4'-アジペンタノエート	
LC-SDA (スクシンイミジル 6-(4, 4'-アジペンタンアミド) ヘキサノエート)	
SDAD (スクシンイミジル 2-([4, 4'-アジペンタンアミド] エチル) -1, 3'-ジチオプロピオネート)	
スルホ-SDA (スルホスクシンイミジル 4, 4'-アジペンタノエート)	
スルホ-LC-SDA (スルホスクシンイミジル 6-(4, 4'-アジペンタンアミド) ヘキサノエート)	
スルホ-SDAD (スルホスクシンイミジル 2-([4, 4'-アジペンタンアミド] エチル) -1, 3'-ジチオプロピオネート)	30

【0189】

例示的なアミン-カルボキシルリンカーとしては、カルボジイミド化合物（例えば、DCC (N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド) 及び EDC (1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド)) が挙げられる。例示的なスルフヒドリル-非選択的リンカーとしては、ピリジルジチオール／アリアルアジド化合物（例えば、APDP ((N-[4-(p-アジドサリチルアミド) ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ) プロピオンアミド)) が挙げられる。例示的なスルフヒドリル-炭水化物リンカーとしては、マレイミド／ヒドラジド化合物（例えば、BMPH (N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド)、EMCH ([N-ε-マレイミドカブロン酸] ヒドラジド)、MPBH 4-(4-N-マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジド)、及び KMH (N-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド))、ならびにピリジルジチオール／ヒドラジド化合物（例えば、PDPH (3-(2-ピリジルジチオ) プロピオニルヒドラジド)) が挙げられる。例示的な炭水化物-非選択的リンカーとしては、ヒドラジド／アリアルアジド化合物（例えば、ABH (p-アジドベンゾイルヒドラジド)) が挙げられる。例示的なヒドロキシル-スルフヒドリルリンカーとしては、イソシアネート／マレイミド化合物（例えば、(N-[p-マレイミドフェニル] イソシアネート)) が挙げられる。例示的なアミン-DNAリンカーとしては、NHS エステル／ソラレン化合物（例えば、SPB (スクシンイミジル-[4-(ソラレン-8-イルオキシ)] -酪酸)) が挙げられ

10

20

30

40

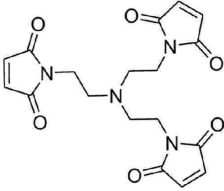
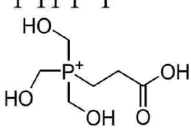
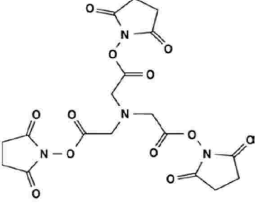
50

る。

【0190】

結合体ペプチド化合物または抗体において様々な複雑な分岐点を生成するため、リンカーは3～7個の実体を結合可能である。

【表11】

例示的な三官能性リンカー：		
TMEA：(トリス [2-マレイミドエチル] アミン) 	THPP 	LC-TSAT (トリスースクシンイミジル (6-アミノカプロイル) アミノトリアセテート)
		MDSI (マレイミド-3, 5-ジスクシンイミジルイソフタレート)
TSAT；トリスースクシンイミジルアミノトリアセテート 		SDMB (スクシンイミジル-3, 5-ジマレイミドフェニルベンゾエート)
		Mal-4 (テトラキス- (3-マレイミドプロピル) ペンタエリスリトール、NHS-4 (テトラキス- (N-スクシンイミジルカルボキシプロピル) ペンタエリスリトール))

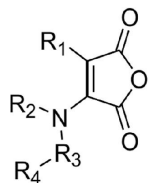
【0191】

TMEA及びTSATは、スルフヒドリル基によってマレイミド基に到達する。THPPのヒドロキシル基及びカルボキシ基は、1級または2級アミンと反応することができる。その他の有用なリンカーは、式 $Y=C=N-Q-A-C(O)-Z$ に適合し、式中、Qは、ホモ芳香族またはヘテロ芳香族環系であり、Aは、単結合、または非置換もしくは置換2価 C_{1-30} 架橋基であり、Yは、OまたはSであり、Zは、Cl、Br、I、 N_3 、N-スクシンイミジルオキシ、イミダゾリル、1-ベンゾトリアゾリルオキシ、OAr (式中、Arは電子不足活性化アリール基である)、または $OC(O)R$ (式中、Rは、 $-A-Q-N=C=Y$ または C_{4-20} 3級アルキルである) である (米国特許第4,680,338号を参照)。

【0192】

その他の有用なリンカーは、以下の式：

【化12】



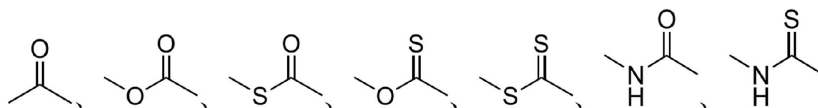
を有し、式中、 R_1 は、H、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{6-12} アリール、もしくはアラルキル、または2価の有機 $-O-$ 、 $-S-$ 、もしくは

【化13】



と結合したもの（式中、 R' は、 C_{6-12} アルキル、結合部分である）であり、 R_2 は、 H 、 C_{1-12} アルキル、 C_{6-12} アリール、または C_{6-12} アラルキルであり、 R_3 は、

【化14】



または隣接する窒素の孤立電子対を非局在化することができる別の化学構造であり、 R_4 は、 R_3 をペプチド化合物、抗体、または薬剤に結合可能なペンダント反応基である（例えば、米国特許第5,306,809号を参照）。

【0193】

リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸残基を含むことができ、少なくともまたは約2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、30、40、または50個のアミノ酸残基のペプチドであり得る。リンカーが単一のアミノ酸残基である場合、リンカーは、任意の天然または非天然アミノ酸（例えば、 Gly または Cys ）であり得る。リンカーが短いペプチドである場合、リンカーは、グリシンリッチペプチド（柔軟である傾向がある）、例えば、配列 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n$ （式中、 n は1～6の整数であり、両端値を含む）を有するペプチド（米国特許第7271149号を参照）、またはセリンリッチペプチドリンカー（米国特許第5,525,491号を参照）であり得る。セリンリッチペプチドリンカーとしては、式 $[X-X-X-X-X-Gly]_y$ のリンカーが挙げられ、式中、 X のうちの2つまでが Thr であり、残りの X は Ser であり、 y は1～5の整数であり、両端値を含む（例えば、 $Ser-Ser-Ser-Ser-Gly$ （ y は1より大きい）。その他のリンカーとしては、剛性リンカー（例えば、 $PAPAP$ 及び $(PT)_nP$ （式中、 n は、2、3、4、5、6、または7である）及び α -ヘリックスリンカー（例えば、 $A(EAAAK)_nA$ （式中、 n は、1、2、3、4、または5である）が挙げられる。

【0194】

リンカーは、脂肪族リンカー（例えば、ポリペプチドとのアミド結合及び治療剤とのエステル結合を有する）であってもよい。脂肪族リンカーが使用される場合、脂肪族リンカーは、長さ（例えば、 C_1-C_{20} ）及びそれが含む化学部分（例えば、アミノ基またはカルバメート）に関して変化し得る。

【0195】

好適なアミノ酸リンカーの例としては、コハク酸、 Lys 、 Glu 、及び Asp 、または $Gly-Lys$ などのジペプチドがある。リンカーがコハク酸である場合、一方のカルボキシル基は、アミノ酸残基のアミノ基とアミド結合を形成する場合があります、他方のカルボキシル基は、例えば、ペプチドまたは置換基のアミノ基とアミド結合を形成する場合があります。リンカーが Lys 、 Glu 、または Asp である場合、そのカルボキシル基は、アミノ酸残基のアミノ基とアミド結合を形成する場合があります、そのアミノ基は、例えば、置換基のカルボキシル基とアミド結合を形成する場合があります。 Lys がリンカーとして使用される場合、 Lys の ϵ -アミノ基と置換基との間にさらなるリンカーが挿入されてもよい。さらなるリンカーはコハク酸であってもよく、コハク酸は、 Lys の ϵ -アミノ基及び置換基内に存在するアミノ基とアミド結合を形成することができる。1つの実施形態において、さらなるリンカーは、 Glu または Asp （例えば、 Lys の ϵ -アミノ基とのアミド結合、及び置換基内に存在するカルボキシル基との別のアミド結合を形成する）であり、すなわち、置換基は $N\epsilon$ -アシル化リジン残基である。

【0196】

また、リンカーは、分枝状ポリペプチドであってもよい。例示的な分枝状ペプチドリンカーは、米国特許第6,759,509号（参照により本明細書に援用される）で説明されている。

【0197】

リンカーは、切断可能な結合（例えば、チオエステル結合）または切断不可能な結合（例えば、マレイミド結合）をもたらす得る。例えば、細胞傷害性タンパク質は、修飾された遊離アミンと反応するリンカーに結合することができる。修飾された遊離アミンは、ポリペプチド内のリジン残基及びポリペプチドのアミノ末端に存在する。したがって、本発明の結合体化合物における有用なリンカーは、治療剤成分が結合体化されているポリペプチドまたは修飾ポリペプチド上の1級アミンと反応性である基を含むことができる。より具体的には、リンカーは、モノフルオロシクロオクチン（MFCO）、ビシクロ[6.1.0]ノニン（BCN）、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート（SAT A）、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオプロピオネート（SATP）、マレイミド、及びジベンゾシクロオクチンエステル（DBCOエステル）からなる群より選択することができる。所与のリンカー内の有用なシクロオクチンとしては、OCT、ALO、MFOFO、DIFO、DIBO、BARAC、DIBAC、及びDIMACが挙げられる。

【0198】

リンカーは、柔軟なアーム、例えば、短いアーム（炭素2個の鎖）、中程度のアーム（炭素2～5個の鎖）、または長い腕（炭素3～6個の鎖）を含むことができる。

【0199】

また、ペプチド上での結合体化にクリック化学も使用することができる（DBCO、TCO、テトラジン、アジド、及びアルキンリンカー）。これらのリンカーのファミリーは、アミン、カルボキシル、及びスルフヒドリル基に対し反応性であり得る。さらに、これらのリンカーは、オリゴヌクレオチド配列に組み込むために、ビオチン化、ペグ化、蛍光イメージング色素による修飾、またはホスホロアミド化を行ってもよい。

【0200】

本明細書で使用する場合、「中間体」という用語は、リンカーと反応して治療剤の中間体または活性化形態を形成している治療剤を意味する。この中間体は、本明細書で開示されるペプチド化合物または抗体と反応させて、癌または攻撃的癌の治療に使用され得る本明細書で開示される結合体化合物を形成することができる。

【0201】

「アミノ酸」という表現は、当業者に知られている一般的な天然（遺伝的にコードされた）または合成のアミノ酸及びその一般的な誘導体を意味する。アミノ酸に適用される場合、「標準的」または「タンパク質構成」とは、これらの天然の立体配置において遺伝的にコードされた20種のアミノ酸を意味する。同様に、アミノ酸に適用される場合、「非標準的」、「非天然」、または「異常」とは、非天然、希少、または合成アミノ酸の広範な選択、例えば、Hunt, SによりChemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Barrett, G. C., ed., Chapman and Hall: New York, 1985で説明されているようなものを意味する。非標準アミノ酸のいくつかの例としては、非アルファアミノ酸、D-アミノ酸が挙げられる。

【0202】

アミノ酸について使用される略語及びペプチドの名称は、J. Biol. Chem. 1972, 247, 977-983におけるIUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclatureの規則に従う。この文書は以下のように更新されている: Biochem. J., 1984, 219, 345-373; Eur. J. Biochem., 1984, 138, 9-37; 1985, 152, 1; Int. J. Pept. Prot. Res., 1984, 24, p84以降; J. Biol. Chem., 1985, 260, 14-42; Pure Appl. Chem. 1984, 56, 595-624; Amino acids and Peptides, 1985, 16, 387-410; 及びBiochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd edition, Portland Press, 1992, pp39-67。規則の拡張は、JCBN/NC-IUB Newsletter 1985, 1986, 1989で公表されている。Biochemi

cal Nomenclature and Related Documents, 2nd edition, Portland Press, 1992, pp 68-69を参照。

【0203】

「アンタゴニスト」という用語は、タンパク質、受容体、酵素、相互作用などの内在性リガンドの作用の少なくとも一部を低減する化合物を意味する。

【0204】

「阻害薬」という用語は、タンパク質、受容体、酵素、相互作用などの正常な活性を低減する化合物を意味する。

【0205】

「インバースアゴニスト」という表現は、構成的に活性の受容体の活性をその基礎レベル未満に低減する化合物を意味する。

【0206】

「ライブラリー」という用語は、例えば、創薬目的で 사용할 ことができる化合物の集合を意味する。例えば、ライブラリー化合物は、本明細書で開示されるペプチド化合物、抗体、ペプチド-結合体、及び／または抗体-結合体とすることができる。

【0207】

本明細書で使用する 場合、「混合物」という用語は、2つ以上のペプチド化合物または抗体を含む組成物を意味する。1つの実施形態において、混合物は、2つ以上の別個のペプチド化合物または抗体の混合物である。さらなる実施形態において、ペプチド化合物または抗体が「混合物」と称される 場合、これは、ペプチド化合物または抗体の2つ以上の「形態」、例えば、任意の比のペプチド化合物の塩、溶媒和物、プロドラッグ、または適用可能な 場合は立体異性体を含み得ることを意味する。当業者は、混合物中のペプチド化合物または抗体が形態の混合物としても存在し得ることを理解するであろう。例えば、ペプチド化合物または抗体は、塩の水和物として、またはペプチド化合物もしくは抗体のプロドラッグの塩の水和物として存在し得る。本明細書で開示されるペプチド化合物及び抗体の全ての形態は、本出願の範囲内である。

【0208】

「モジュレーター」という用語は、生物学的または化学的なプロセスまたは機序に影響を及ぼすペプチド化合物または抗体を意味する。例えば、モジュレーターは、生物学的または化学的なプロセスまたは機序の増大、促進、上方制御、活性化、阻害、減少、遮断、防止、遅延、脱感作、不活性化、下方制御などを行 得る。したがって、モジュレーターは「アゴニスト」または「アンタゴニスト」であり得る。モジュレーターによる影響を請ける例示的な生物学的プロセスまたは機序としては、限定されるものではないが、酵素結合、受容体結合、及びホルモンの放出または分泌が挙げられる。モジュレーターによる影響を請ける例示的な化学的プロセスまたは機序としては、限定されるものではないが、触媒作用及び加水分解が挙げられる。

【0209】

「ペプチド」という用語は、アミド結合を用いて共に共有結合した少なくとも2つのアミノ酸を含む化合物を意味する。

【0210】

本明細書で使用する 場合、「プロドラッグ」という用語は、既知の化合物または組成物の活性形態の誘導体を意味し、このような誘導体が対象に投与されると、より良好な治療応答及び／または毒性レベルの低減をもたらすように徐々に活性形態に変換される。概して、プロドラッグは、本明細書で開示される化合物の機能的誘導体であり、名目上由来する化合物に *in vivo* で容易に変換可能である。プロドラッグとしては、限定されるものではないが、アシルエステル、カーボネート、ホスフェート及びウレタンが挙げられる。これらの群は例示的なものであり、網羅的なものではなく、当業者は他の既知のプロドラッグのパラエティーを調製することができる。プロドラッグは、例えば、利用可能なヒドロキシ、チオール、アミノ、またはカルボキシル基を用いて形成され得る。例えば、本開示の化合物中の利用可能なOH及び／またはNH₂は、塩基の存在下、活性化酸を用い

10

20

30

40

50

て、任意選択で不活性溶媒中で、アシル化することができる（例えば、ピリジン中の酸塩化物）。プロドラッグとして利用されているいくつかの一般的なエステルとしては、フェニルエステル、脂肪族（ C_1-C_{24} ）エステル、アシルオキシメチルエステル、カルバメート、及びアミノ酸エステルがある。ある特定の場合には、本開示の化合物のプロドラッグは、化合物中の1つ以上のヒドロキシ及び／またはアミノ基が *in vivo* でヒドロキシ及び／または基に変換され得る基としてマスクされている化合物である。好適なプロドラッグの選択及び調製を行うための従来的な手順は、例えば、“*Design of Prodrugs*” (ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985) で説明されている。

【0211】

「保護基」という表現は、分子上の潜在的に反応性の官能基（例えば、アミン、ヒドロキシル、またはカルボキシル）が分子の他の場所で化学変化が生じる間に化学反応を経るのを防止するために使用され得る任意の化合物を意味する。複数のこのような保護基が当業者に知られており、*Protective Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. Wuts, eds., John Wiley & Sons, New York, 4th edition, 2006, 1082 pp, ISBN 9780471697541 で例を見出すことができる。アミノ保護基の例としては、限定されるものではないが、フタルイミド、トリクロロアセチル、ベンジルオキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニル、及びアダマンチル-オキシカルボニルが挙げられる。いくつかの実施形態において、アミノ保護基は、カルバメートアミノ保護基であり、これはアミノ基に結合した場合にカルバメートを形成するアミノ保護基として定義される。他の実施形態において、アミノカルバメート保護基は、アリルオキシカルボニル (Alloc)、ベンジルオキシカルボニル (Cbz)、9フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc)、*tert*-ブトキシカルボニル (Boc)、及び α , α ジメチル-3, 5ジメトキシベンジルオキシカルボニル (Ddz) である。新規の窒素保護基の最近の議論については、*Tetrahedron* 2000, 56, 2339-2358 を参照。ヒドロキシル保護基の例としては、限定されるものではないが、アセチル、*tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、トリチル (Trit)、*tert*-ブチル、及びテトラヒドロピラニル (THP) が挙げられる。カルボキシル保護基の例としては、限定されるものではないが、メチルエステル、*tert*-ブチルエステル、ベンジルエステル、トリメチルシリルエチルエステル、及び 2, 2, 2-トリクロロエチルエステルが挙げられる。

【0212】

本明細書で使用する場合、「配列同一性」という表現は、2つのポリペプチド配列または2つの核酸配列間の配列同一性のパーセンテージを意味する。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントを定量するには、配列を最適な比較の目的でアラインメントする（例えば、第1のアミノ酸配列または核酸配列にギャップを導入して第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントを得ることができる）。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列内の位置を、同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが第2の配列内の対応する位置として占有している場合、その位置の分子は同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、これらの配列が共有する同一の位置の数の関数（すなわち、同一性% = 同一の重複位置の数 / 位置の総数 $\times 100\%$ ）である。1つの実施形態において、2つの配列は同じ長さである。2つの配列間の同一性パーセントの定量は、数学的アルゴリズムを用いて遂行することもできる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、参考文献52（参考文献53のように修正）のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、参考文献49の NBLAST 及び XBLAST プログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTヌクレオチドプログラムパラメーターを例えば *score* = 100、*wordlength* = 12 に設定して、本出願の核酸分子に相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検

10

20

30

40

50

索は、XBLASTプログラムパラメーターを例えば、score=50、wordlength=3で実施して、本開示のタンパク質分子に相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較の目的でギャップありアラインメントを得るには、参考文献47で説明されているようなギャップありBLASTを利用することができる。代替的に、PSI-BLASTは、分子間の遠い関係を検出する反復検索を実施するために使用することができる(同上)。BLAST、ギャップありBLAST、及びPSI-Blastプログラムを利用する際は、それぞれのプログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる(例えば、NCBIウェブサイトを参照)。配列比較に利用される数学的アルゴリズムのもう1つの好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれる。アミノ酸配列の比較でALIGNプログラムを利用する際は、PAM120加重残基表(weight residue table)、ギャップ長ペナルティー12、及びギャップペナルティー4を使用することができる。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップの許容ありまたはなしで、上記で説明されているものと同様の技法を用いて定量することができる。同一性パーセントを計算する際には、典型的には完全マッチのみがカウントされる。

【0213】

本明細書で使用する場合、「～から本質的になる」という表現は、記載された特徴、要素、成分、群、整数、及び／またはステップ、ならびに特徴、要素、成分、群、整数、及び／またはステップの基本的及び新規の特性(単数または複数)に実質的に影響しないものの存在を指定するように意図されている。

【0214】

「固相化学」という表現は、反応の1つの成分がポリマー材料(以下で定義されるような固相支持体)と共有結合する化学反応を行うことを意味する。固相で化学を実施するための反応方法は、ペプチド及びオリゴヌクレオチド化学の伝統的分野外でより広く知られ確立されている(Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, F. Albericio, ed., CRC Press, 2000, 848 pp, ISBN: 978-0824703592; Organic Synthesis on Solid Phase, 2nd edition, Florencio Zaragoza Dorwald, Wiley-VCH, 2002, 530 pp, ISBN: 3-527-30603-X; Solid-Phase Organic Synthesis: Concepts, Strategies, and Applications, P. H. Toy, Y. Lam, eds., Wiley, 2012, 568 pp, ISBN: 978-0470599143)。

【0215】

「固体支持体」、「固相」、または「樹脂」という用語は、固相化学を行うために利用される機械的及び化学的に安定なポリマーマトリックスを意味する。これは、「樹脂」、「P-」、または以下の記号：

【化15】



で示される。

【0216】

適切なポリマー材料の例としては、限定されるものではないが、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリエチレングリコール(PEG; 限定されるものではないが、ChemMatrix(登録商標)(Matrix Innovation, Quebec, Quebec, Canada; J. Comb. Chem. 2006, 8, 213-220)を含む)、ポリスチレンに移植または共有結合したポリエチレン(PEG-ポリスチレン、TentaGel(商標)とも称される(Rapp, W.; Zhang, L.; Bayer, E

. In Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis. Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides; Epton, R., ed.; SPCC Ltd.: Birmingham, UK; p 205)、ポリアクリレート (CLEAR (商標))、ポリアクリルアミド、ポリウレタン、PEG A [ポリエチレングリコールポリ (N, N ジメチル-アクリルアミド) コポリマー (Tetrahedron Lett. 1992, 33, 3077-3080)、セルロースなどが挙げられる。これらの材料は、任意選択で、架橋結合を形成して構造を機械的に安定化するためのさらなる化学剤、例えば、ジビニルベンゼン (DVB、通常 0.1~5%、好ましくは 0.5~2%) で架橋されたポリスチレンを含むことができる。この固体支持体は、非限定的な例として、アミノメチルポリスチレン、ヒドロキシメチルポリスチレン、ベンズヒドリルアミンポリスチレン (BHA)、メチルベンズヒドリルアミン (MBHA) ポリスチレン、及びさらなる誘導体化または反応のための遊離化学官能基 (最も典型的には、NH₂または-OH) を含むその他のポリマー骨格を含むことができる。また、この用語は、高い割合 (「負荷」) のポリエチレンイミン及び架橋分子から調製されるような官能基を有する「ウルトラ樹脂 (Ultras resin)」も含むように意図されている (J. Comb. Chem. 2004, 6, 340-349)。合成の最後に、樹脂は典型的には廃棄されるが、樹脂が再利用できることが示されている (Tetrahedron Lett. 1975, 16, 3055)。

【0217】

概して、樹脂として使用される材料は不溶性ポリマーであるが、ある特定のポリマーは溶媒に応じて異なる溶解度を有し、固相化学に用いることもできる。例えば、ポリエチレングリコールは、化学反応を行うことができる多くの有機溶媒に可溶であるがジエチルエーテルなどの他の溶媒には不溶であるため、この方式で利用することができる。したがって、反応は溶液中で均一に行われ、次いでポリマー上の生成物がジエチルエーテルの添加によって沈殿し、固体として処理され得る。これは「液相」化学と称されている。

【0218】

「医薬的に許容される」という表現は、対象 (例えば、動物またはヒト) の治療に適合することを意味する。

【0219】

「医薬的に許容される塩」という表現は、対象 (例えば、動物またはヒト) の治療に適しているまたは適合する酸付加塩または塩基付加塩を意味する。

【0220】

本明細書で使用する場合、「医薬に許容される酸付加塩」という表現は、本開示の任意の化合物もしくは抗体の任意の無毒性有機もしくは無機塩、または任意のその中間体を意味する。好適な塩を形成する例示的な無機酸としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、及びリン酸、ならびにオルトリン酸一水素ナトリウム及び硫酸水素カリウムなどの金属塩が挙げられる。好適な塩を形成する例示的な有機酸としては、モノ-、ジ-、及びトリカルボン酸、例えば、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、マレイン酸、安息香酸、フェニル酢酸、桂皮酸、及びサリチル酸、ならびに p-トルエンスルホン酸及びメタンスルホン酸などのスルホン酸が挙げられる。モノまたは二酸塩のいずれかを形成することができ、このような塩は、水和形態、溶媒和形態、または実質的に無水形態のいずれかで存在することができる。概して、本開示の化合物または抗体の酸付加塩は、水及び様々な親水性有機溶媒でより可溶性が高く、概して、これらの遊離塩基形態よりも高い融点を示す。適切な塩の選択は、当業者の知るところとなるであろう。その他の医薬的に許容されない塩、例えば、シュウ酸塩は、例えば、本開示の化合物または抗体の単離の際、実験室での使用向け、またはこの後の医薬的に許容される酸付加塩への変換に使用することができる。

【0221】

本明細書で使用する場合、「医薬に許容される延期付加塩」という表現は、本開示の任

意の酸化合物の任意の無毒性有機もしくは無機塩基付加塩、または任意のその中間体を意味する。塩基性付加塩を形成し得る本開示の酸性化合物には、例えば、 CO_2H が官能基である場合が含まれる。好適な塩を形成する例示的な無機塩基としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムまたは水酸化バリウムが挙げられる。好適な塩を形成する例示的な有機塩基としては、脂肪族、脂環式、または芳香族の有機アミン、例えば、メチルアミン、トリメチルアミン、及びピコリンまたはアンモニアが挙げられる。適切な塩の選択は、当業者の知るところとなるであろう。その他の医薬的に許容されない塩基付加塩は、例えば、本開示の化合物、抗体、もしくは結合体化合物の単離の際、実験室での使用向け、またはこの後の医薬的に許容される酸付加塩への変換に使用することができる。

10

【0222】

所望の化合物塩の形成は、標準的な技法を用いて達成される。例えば、中性化合物を好適な溶媒中で酸または塩基で処置し、形成された塩を濾過、抽出、またはその他の好適な方法によって単離する。

【0223】

本明細書で使用する場合、「溶媒和物」という用語は、好適な溶媒の分子が結晶格子中に取り込まれる化合物もしくは抗体、またはその医薬的に許容される塩を意味する。好適な溶媒は、投与される薬用量において生理学的に許容される。好適な溶媒の例は、エタノール、水などである。水が溶媒である場合、当該分子は「水和物」と称される。溶媒和物の形成は、化合物及び溶媒和物に応じて様々である。概して、溶媒和物は、化合物または抗体を適切な溶媒に溶解し、冷却または反溶媒の使用により溶媒和物を単離することによって形成される。溶媒和物は、典型的には、周囲条件下で乾燥または共沸される。

20

【0224】

本明細書で使用する場合、「対象」という用語は、哺乳類（例えば、マウス、ラット、イヌ、及びヒト）を含めた動物界の全てのメンバーを含む。

【0225】

「好適な」及び「適切な」という用語は、特定の基または条件の選択が、実施すべき特定の合成操作及び分子の内容に依存すると考えられるが、選択は当業者の技量の範囲内と考えられることを意味する。本明細書で説明される全てのプロセスステップは、示される生成物を提供するのに適した条件下で行われるものとする。当業者であれば、全ての反応条件（例えば、反応溶媒、反応時間、反応温度、反応圧力、反応物比、及び反応が無水または不活性雰囲気下で実施するべきかを含む）は、所望の生成物の収率を最適化するように変えることができ、そのようにすることが当業者の技量の範囲内であることを理解するであろう。

30

【0226】

本開示の化合物または組成物の「治療有効量」、「有効量」、または「十分な量」という表現は、対象（哺乳類、例えば、ヒトを含む）に投与されたときに、臨床結果を含めた有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量であり、そのため、「治療有効量」または「有効量」は、それが適用される文脈に依存する。例えば、癌を治療する文脈においては、これは、化合物、ペプチド化合物-結合体、抗体、抗体-結合体、または組成物の投与なしで得られる応答に比べて、癌のこのような治療を達成するのに十分な化合物、ペプチド化合物-結合体、抗体、抗体-結合体、または組成物の量である。有効量に対応する本開示の所与の化合物、ペプチド化合物-結合体、抗体、抗体-結合体、または組成物の量は、様々な因子、例えば、所与の薬物、ペプチド化合物-結合体、抗体、抗体-結合体、医薬製剤、投与経路、疾患または障害のタイプ、治療する対象または宿主の内容などに応じて変化するが、それでも当業者がルーチン的に決定することができる。また、本明細書で使用する場合、本開示の化合物、ペプチド化合物-結合体、抗体、抗体-結合体、または組成物の「治療有効量」または「有効な量」は、対照に比べて、（例えば、臨床症状または癌性細胞の量による定量において）対象の癌を阻害、抑制、または低減する量である。

40

50

【0227】

本明細書で使用する場合、また当技術分野で十分に理解されているように、「治療」または「治療すること」は、臨床結果を含めた有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。有益なまたは所望の臨床結果としては、限定されるものではないが、血管擬態の阻害を挙げることができる。例えば、対象、癌性組織、及び／または細胞における血管擬態の管の長さを、未治療の対照対象、癌性組織、及び／または細胞よりも少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少させることである。例えば、対象、癌性組織、及び／または細胞における血管擬態のループ数を、未治療の対照対象、癌性組織、及び／または細胞よりも少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少させることである。また、「治療」とは、1つ以上の症状または状態の緩和または改善、疾患の程度の減弱、疾患状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の拡散防止、疾患進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善または軽減、及び寛解（部分的または全体的）も意味し、検出可能か検出不可能かを問わない。

10

【0228】

本明細書で使用する場合、「忍容性」または「忍容される」という用語は、治療剤で治療した対象が治療剤に耐え得るまたは受け入れ得る程度を意味する。例えば、忍容性は、異なるパラメーター、例えば、(i) 体重減少の維持または欠如、(ii) 治療に耐える持続期間、及び(iii) 副作用の減少または欠如を測定することにより、評価することができる。例えば、治療剤を用いた治療中に体重減少が観察されない場合に、このような治療剤が対象に忍容されていることは十分に確立されている。例えば、(少なくとも1つの治療剤を含む) 本開示の結合体は、受容体に対し、単独で摂取される治療剤よりも選択的であるため、所与の治療剤の忍容性を高めることができる。結合体化されていない毒素は、対象に単独で投与または使用するには毒性が強すぎる場合がある。そのため、非常に強力な毒素を抗体-薬物結合体で使用して忍容性を高めることができる。例えば、本開示の結合体は、本明細書で説明される抗体結合体である。いくつかの実施形態において、結合体は、本明細書で説明される少なくとも1つの治療剤を含む結合体抗体であり、当該少なくとも1つの治療剤の忍容性を高める。いくつかの実施形態において、治療剤は、マイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、アマトキシシン、及びアマニチンからなる群より選択される毒素である。

20

30

【0229】

本明細書で使用する場合、「投与される」または「投与する」という用語は、*in vivo*（例えば、細胞培養）または*in vitro*（例えば、対象内）のいずれかで細胞に適用する化合物、ペプチド化合物結合体、抗体、抗体結合体、または組成物の治療有効量を投与することを意味する。

【0230】

本開示の範囲を理解する上で、本明細書で使用する場合、「含む (comprising)」という用語及びその派生語は、記載の特徴、要素、成分、群、整数、及び／またはステップの存在を指定するが、他の記載されていない特徴、要素、成分、群、整数、及び／またはステップの存在を排除するわけではないオープンエンドの用語であるように意図されている。また、上記のことは、「含む (including)」、「有する (having)」、及びこれらの派生語などの同様の意味を有する語にも適用される。最後に、本明細書で使用する場合、「実質的に」、「約」、及び「およそ」などの程度についての用語は、修飾された用語における最終結果が顕著に変化しない程度の合理的な量のずれを意味する。これらの程度についての用語は、修飾された用語の少なくとも±5%のずれを含むと解釈されるべきであるが、このずれが修飾する用語の意味を否定しない場合に限る。

40

【0231】

50

本明細書及び付属の請求項で使用する単数形「1つの (a / a n)」及び「当該 (t h e)」は、内容による別段の明確な定めがない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば「1つの化合物」を含む1つの組成物には、2つ以上の化合物の混合物が含まれる。また、「及び」という用語または「または」という用語は、文脈による別段の定めがない限り、概して、「及び／または」を含めた意味で用いられることにも留意されたい。

【0232】

「追加の」または「第2の」構成成分を含む組成物において、本明細書で使用する場合、第2の成分は、他の構成成分または第1の構成成分と化学的に異なる。「第3の」構成成分は他の第1の及び第2の構成成分とは異なり、またさらに挙げられた構成成分または「追加の」構成成分も同様に異なる。

【0233】

特定のセクションに記載の定義及び実施形態は、当業者によって理解されるように、このような定義及び実施形態が適切である他の本明細書に記載の実施形態にも適用可能であることが意図されている。

【0234】

本明細書において、終点による数値範囲の記載は、その範囲内に含まれる全ての数及び端数を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4、及び5を含む）。また、全ての数及びその端数は、「約」という用語による修飾が推定されることも理解されたい。

【0235】

過去に、原発性及び続発性腫瘍に対する新規の治療向けに、癌細胞への治療剤の輸送を可能にするプラットフォームが開発された。このアプローチは、細菌タンパク質から誘導される、または癌細胞で発現する受容体のリガンド（例えば、ソルチリン／シンデカン）から誘導される、ペプチド化合物を利用する。本開示では、血管凝態の阻害で使用するために、治療薬をこれらのペプチド化合物のうちの1つと結合体化させることについて説明される。例えば、植物化学物質（例えば、クルクミン）をペプチド化合物に結合させることができる。

【0236】

本明細書では、血管凝態の阻害で使用するための、ペプチド化合物、及びペプチド化合物に接続した少なくとも1つの治療剤を含む結合体化合物が開示される。

【0237】

したがって、第1の態様は、式 (I)、式 (II)、式 (III)、式 (IV)、式 (V)、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII)、式 (IX)、式 (X)、式 (XI)、式 (XII)、及び式 (XIII) の化合物：

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY(I)$ (配列番号1)

$(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY(II)$ (配列番号2)

$YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L(III)$ (配列番号3)

$YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L(IV)$ (配列番号4)

$IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)$ (配列番号5)

$IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)$ (配列番号6)

$IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)$ (配列番号7)

$GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)$ (配列番号8)

$GVRKAGVRNMFKSESY(IX)$ (配列番号9)

$GVRKAGVRN(Nle)FKSESY(X)$ (配列番号10)

$YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)$ (配列番号11)

$YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)$ (配列番号12)

$YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)$ (配列番号13)

から選択される化合物に対し、少なくとも60%の配列同一性を有するペプチド化合物であって、式中、

10

20

30

40

50

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} が、独立的に、任意のアミノ酸から選択され、
 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、及び X_{21} が、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択され、
 n が、0、1、2、3、4、または5であり；

X_9 が2回以上存在する場合、当該 X_9 の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 X_{19} が2回以上存在する場合、当該 X_9 の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 少なくとも1つの保護基及び／または少なくとも1つの標識剤が、任意選択で、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続している、
 血管凝態の阻害に使用するための、ペプチド化合物である。

【0238】

別の態様は、式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、及び式(XIII)の化合物：

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (配列番号1)

(X_9) $_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (配列番号2)

$YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (配列番号3)

$YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (配列番号4)

$IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (配列番号5)

$IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (配列番号6)

$IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (配列番号7)

$GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (配列番号8)

$GVRAKAGVRNMFKSESY$ (IX) (配列番号9)

$GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY$ (X) (配列番号10)

$YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (配列番号11)

$YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (配列番号12)

$YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (配列番号13)

に対し、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、または少なくとも80%の配列同一性を有するペプチド化合物であって、式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} が、独立的に、任意のアミノ酸から選択され、
 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、及び X_{21} が、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択され、
 n が、0、1、2、3、4、または5であり；

X_9 が2回以上存在する場合、当該 X_9 の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 X_{19} が2回以上存在する場合、当該 X_9 の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 少なくとも1つの保護基及び／または少なくとも1つの標識剤が、任意選択で、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続している、

血管凝態の阻害に使用するための、ペプチド化合物である。

【0239】

また別の態様は、式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、及び式(XIII)の化合物：

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (配列番号1)

(X_9) $_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (配列番号2)

$YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (配列番号3)

10

20

30

40

50

$YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L(IV)$ (配列番号 4)
 $IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)$ (配列番号 5)
 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)$ (配列番号 6)
 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)$ (配列番号 7)
 $GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)$ (配列番号 8)
 $GVRAKAGVRNMFKSESY(IX)$ (配列番号 9)
 $GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY(X)$ (配列番号 10)
 $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)$ (配列番号 11)
 $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)$ (配列番号 12)
 $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)$ (配列番号 13)
 に対し、少なくとも 80% の配列同一性を有するペプチド化合物であって、式中、
 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} が、独立的に、任意のアミノ酸から選択され、
 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、及び X_{21} が、独立的に、Q、P、Y、I、及び L から選択され、
 n が、0、1、2、3、4、または 5 であり；
 X_9 が 2 回以上存在する場合、当該 X_9 の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 X_{19} が 2 回以上存在する場合、当該 X_{19} の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 少なくとも 1 つの保護基及び／または少なくとも 1 つの標識剤が、任意選択で、N 末端及び／または C 末端で当該ペプチドに接続している、
 血管凝態の阻害に使用するための、ペプチド化合物である。

【0240】

いくつかの実施形態において、ペプチド化合物はソルチリン受容体を標的化する。いくつかの実施形態において、ペプチド化合物は、ソルチリン受容体の標的化に使用される。

【0241】

例えば、ペプチド化合物は、以下を含むペプチド化合物である。

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY(I)$ (配列番号 1)
 $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY(II)$ (配列番号 2)
 $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L(III)$ (配列番号 3)
 $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L(IV)$ (配列番号 4)
 $IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)$ (配列番号 5)
 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)$ (配列番号 6)
 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)$ (配列番号 7)
 $GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)$ (配列番号 8)
 $GVRAKAGVRNMFKSESY(IX)$ (配列番号 9)
 $GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY(X)$ (配列番号 10)
 $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)$ (配列番号 11)
 $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)$ (配列番号 12) または
 $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)$ (配列番号 13)

【0242】

例えば、ペプチド化合物は、以下から本質的になるペプチド化合物である。

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY(I)$ (配列番号 1)
 $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY(II)$ (配列番号 2)
 $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L(III)$ (配列番号 3)
 $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L(IV)$ (配列番号 4)
 $IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)$ (配列番号 5)
 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)$ (配列番号 6)
 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)$ (配列番号 7)
 $GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)$ (配列番号 8)

G V R A K A G V R N M F K S E S Y (I X) (配列番号 9)
 G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y (X) (配列番号 10)
 Y K S L R R K A P R W D A P L R D P A L R Q L L (X I) (配列番号 11)
 Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R Q L L (X I I) (配列番号 12) または
 Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R P L L (X I I I) (配列番号 13)
 【 0 2 4 3 】

例えば、ペプチド化合物は、以下からなるペプチド化合物である。

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 G V X_6 A K A G V X_7 N X_8 F K S E S Y (I)$ (配列番号 1)
 $(X_9)_n G V X_{10} A K A G V X_{11} N X_{12} F K S E S Y (I I)$ (配列番号 2)
 $Y K X_{13} L R R X_{14} A P R W D X_{15} P L R D P A L R X_{16} X_{17} L (I I I)$ (配列番号 3)

10

$Y K X_{18} L R R (X_{19})_n P L R D P A L R X_{20} X_{21} L (I V)$ (配列番号 4)
 $I K L S G G V Q A K A G V I N M D K S E S M (V)$ (配列番号 5)
 $I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y (V I)$ (配列番号 6)
 $I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y K (V I I)$ (配列番号 7)
 $G V Q A K A G V I N M F K S E S Y (V I I I)$ (配列番号 8)
 G V R A K A G V R N M F K S E S Y (I X) (配列番号 9)
 G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y (X) (配列番号 10)
 Y K S L R R K A P R W D A P L R D P A L R Q L L (X I) (配列番号 11)
 Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R Q L L (X I I) (配列番号 12) または
 Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R P L L (X I I I) (配列番号 13)
 【 0 2 4 4 】

20

別の態様によれば、式 (I)、式 (I I)、式 (I I I)、式 (I V)、式 (V)、式 (V I)、式 (V I I)、式 (V I I I)、式 (I X)、式 (X)、式 (X I)、式 (X I I)、及び式 (X I I I) の化合物：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 G V X_6 A K A G V X_7 N X_8 F K S E S Y (I)$ (配列番号 1)
 $(X_9)_n G V X_{10} A K A G V X_{11} N X_{12} F K S E S Y (I I)$ (配列番号 2)
 $Y K X_{13} L R R X_{14} A P R W D X_{15} P L R D P A L R X_{16} X_{17} L (I I I)$ (配列番号 3)

30

$Y K X_{18} L R R (X_{19})_n P L R D P A L R X_{20} X_{21} L (I V)$ (配列番号 4)
 $I K L S G G V Q A K A G V I N M D K S E S M (V)$ (配列番号 5)
 $I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y (V I)$ (配列番号 6)
 $I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y K (V I I)$ (配列番号 7)
 $G V Q A K A G V I N M F K S E S Y (V I I I)$ (配列番号 8)
 G V R A K A G V R N M F K S E S Y (I X) (配列番号 9)
 G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y (X) (配列番号 10)
 Y K S L R R K A P R W D A P L R D P A L R Q L L (X I) (配列番号 11)
 Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R Q L L (X I I) (配列番号 12)
 Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R P L L (X I I I) (配列番号 13)

40

から選択される化合物を含むペプチド化合物であって、式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} が、独立的に、任意のアミノ酸から選択され、
 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、及び X_{21} が、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択され、
 n が、0、1、2、3、4、または5であり；

X_9 が2回以上存在する場合、当該 X_9 の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 X_{19} が2回以上存在する場合、当該 X_{19} の各々が独立的に任意のアミノ酸から選択され、
 少なくとも1つの保護基及び／または少なくとも1つの標識剤が、任意選択で、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続している、

血管凝態の阻害に使用するための、ペプチド化合物が提供される。

【 0 2 4 5 】

50

10

20

30

40

50

10

例えば、へ

20

例えば、へ

30

例えば、へ

40

例えば、へ

50

10

20

30

40

50

50

50

50

例えば、ペプチド化合物は、式 (XII) または配列番号 12 によって表されるペプチド化合物に対し、少なくとも 60 %、少なくとも 61 %、少なくとも 62 %、少なくとも 63 %、少なくとも 64 %、少なくとも 65 %、少なくとも 66 %、少なくとも 67 %、少なくとも 68 %、少なくとも 69 %、少なくとも 70 %、少なくとも 71 %、少なくと

も 72 %、少なくとも 73 %、少なくとも 74 %、少なくとも 75 %、少なくとも 76 %、少なくとも 77 %、少なくとも 78 %、少なくとも 79 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0258】

例えば、ペプチド化合物は、式 (XIII) または配列番号 13 によって表されるペプチド化合物に対し、少なくとも 60 %、少なくとも 61 %、少なくとも 62 %、少なくとも 63 %、少なくとも 64 %、少なくとも 65 %、少なくとも 66 %、少なくとも 67 %、少なくとも 68 %、少なくとも 69 %、少なくとも 70 %、少なくとも 71 %、少なくとも 72 %、少なくとも 73 %、少なくとも 74 %、少なくとも 75 %、少なくとも 76 %、少なくとも 77 %、少なくとも 78 %、少なくとも 79 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0259】

例えば、ペプチド化合物は、式 (LI) または配列番号 23 によって表されるペプチド化合物に対し、少なくとも 60 %、少なくとも 61 %、少なくとも 62 %、少なくとも 63 %、少なくとも 64 %、少なくとも 65 %、少なくとも 66 %、少なくとも 67 %、少なくとも 68 %、少なくとも 69 %、少なくとも 70 %、少なくとも 71 %、少なくとも 72 %、少なくとも 73 %、少なくとも 74 %、少なくとも 75 %、少なくとも 76 %、少なくとも 77 %、少なくとも 78 %、少なくとも 79 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0260】

1つの実施形態において、n は 0 である。1つの実施形態において、n は 1 である。1つの実施形態において、n は 2 である。1つの実施形態において、n は 3 である。1つの実施形態において、n は 4 である。1つの実施形態において、n は 5 である。

【0261】

1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (I) または式 (II) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (I) または配列番号 1 によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (II) または配列番号 2 によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (III) または式 (IV) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (III) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (V)、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII)、式 (IX)、または式 (X) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (V) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (VI) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (VII) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (VIII) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (IX) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (X) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (XI)、式 (XII)、または

式 (X I I I) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (X I) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (X I I) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (X I I I) によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、式 (L I) によって表される。

【0262】

1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号1のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号2のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号3のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号4のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号5のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号6のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号7のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号8のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号9のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号10のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号11のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号12のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号13のアミノ酸配列によって表される。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、配列番号23のアミノ酸配列によって表される。

【0263】

1つの実施形態において、少なくとも1つの保護基が、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続している、

【0264】

1つの実施形態において、スクシニル基はペプチド化合物に接続している。例えば、ペプチド化合物は、配列番号6に対応しN末端でスクシニル基が結合している配列：スクシニル-I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Yを有する。

【0265】

1つの実施形態において、アセチル基がペプチド化合物に接続している。例えば、ペプチド化合物は、アセチル-G V R A K A G V R N M F K S E S Y (配列番号14)の配列を有する。例えば、ペプチド化合物は、アセチル-G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y (配列番号15)の配列を有する。例えば、ペプチド化合物は、アセチル-Y K S L R R K A P R W D A P L R D P A L R Q L L (配列番号16)の配列を有する。例えば、ペプチド化合物は、アセチル-Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R Q L L (配列番号17)の配列を有する。例えば、ペプチド化合物は、アセチル-Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R P L L (配列番号18)の配列を有する。

【0266】

1つの実施形態において、少なくとも1つの標識剤が、N末端及び／またはC末端で当該ペプチドに接続している、

【0267】

当業者は、一般的に使用されている標識剤が使用され得ることを理解するであろう。例えば、標識剤はビタミンである。例えば、標識剤はビオチンである。例えば、標識剤は、蛍光プローブとして、及び／または造影剤として使用される。

【0268】

1つの実施形態において、ペプチド化合物はビオチン化されている。例えば、ペプチド化合物は、配列番号7に対応しC末端でビオチン分子が結合している配列：I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y K (ビオチン)を有する。

【0269】

例えば、ペプチド化合物は、式 (X X X V I) :
スクシニル-I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y (X X X V I)

(スクシニル基がN末端で結合している配列番号6を有するペプチド化合物を含む)
によって表される。

【0270】

1つの実施形態において、 X_{16} は、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択される。

【0271】

例えば、 X_{16} はQである。例えば、 X_{16} はPである。例えば、 X_{16} はYである。例えば、 X_{16} はIである。

【0272】

1つの実施形態において、 X_{17} は、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択される。

10

【0273】

例えば、 X_{17} はQである。例えば、 X_{17} はPである。例えば、 X_{17} はYである。例えば、 X_{17} はIである。

【0274】

1つの実施形態において、 X_{20} は、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択される。

【0275】

例えば、 X_{20} はQである。例えば、 X_{20} はPである。例えば、 X_{20} はYである。例えば、 X_{20} はIである。

20

【0276】

1つの実施形態において、 X_{21} は、独立的に、Q、P、Y、I、及びLから選択される。

【0277】

例えば、 X_{21} はQである。例えば、 X_{21} はPである。例えば、 X_{21} はYである。例えば、 X_{21} はIである。

【0278】

1つの実施形態において、ペプチド化合物は、以下から選択される。

$X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (配列番号1)

(X_9) $_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (配列番号2)

30

$YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (配列番号3)

$YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (配列番号4)

$IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (配列番号5)

スクシニル- $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (スクシニル基がN末端で結合している配列番号6を含む)

$IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (ビオチン) (ビオチン分子がC末端で結合している配列番号7を含む)

$GVQAKAGVINMFKSESY$ (配列番号8)

アセチル- $GVRAKAGVRNMFKSESY$ (配列番号14)

アセチル- $GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY$ (配列番号15)

40

アセチル- $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (配列番号16)

アセチル- $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (配列番号17)

アセチル- $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (配列番号18)

$GVRAKAGVRN(Nle)FKSESYC$ (配列番号23) 及び

アセチル- $GVRAKAGVRN(Nle)FKSESYC$ (配列番号24)

【0279】

1つの実施形態において、ペプチド化合物は、ペプチド末端における優先的結合部位を得るまたは増加させるために、C末端及び／またはN末端に1つ以上のアミノ酸残基を付加することによって修飾され得る。例えば、アミノ酸はシステインとすることができる。例えば、アミノ酸はリジンとすることができる。例えば、アミノ酸は、ペプチドのC末端

50

に付加されたシステインとすることができる。1つの実施形態において、ペプチド化合物は、C末端にシステインを付加することによって修飾される。特定の実施形態において、配列番号15に対応するアセチル-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESYの配列を有するペプチド化合物は、C末端にシステインを付加することによって修飾される。

【0280】

1つの実施形態において、本明細書で説明されるペプチド化合物またはその誘導体は、配列番号25～50のいずれか1つに示されるようなアミノ酸配列を有する、血管擬態の阻害に使用するためのポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントに特異的に結合する。別の態様において、本明細書で説明されるペプチド化合物またはその誘導体は、ソルチリン受容体を標的化する。別の態様において、本明細書で説明されるペプチド化合物またはその誘導体は、配列番号25～50のいずれか1つに示されるような少なくとも2、3、4、または5個の連続するアミノ酸残基、そのアナログ、またはそのフラグメントに結合する。例えば、ペプチド化合物またはその誘導体は、配列番号25に示されるような少なくとも2個の連続したアミノ酸残基に結合する。例えば、ペプチド化合物またはその誘導体は、配列番号25に示されるような少なくとも3個の連続したアミノ酸残基に結合する。例えば、ペプチド化合物またはその誘導体は、配列番号25に示されるような少なくとも4個の連続したアミノ酸残基に結合する。例えば、ペプチド化合物またはその誘導体は、配列番号25に示されるような少なくとも5個の連続したアミノ酸残基に結合する。

【0281】

本明細書で説明されるペプチド化合物は、小分子、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、診断薬剤、造影剤もしくは放射性核種剤、モノクローナル抗体などの大分子、植物化学物質などの治療剤に対し、または薬物送達システム（治療剤、造影剤、遺伝子、siRNAを装填したナノ粒子、リポソーム、ナノチューブ、グラフェン粒子を含む）に対し、接続、結合、混合、または結合体化することができる。得られた結合体化合物は、例えば、血管擬態を阻害するための単剤療法または併用療法として使用することができる。

【0282】

したがって、本明細書で開示される別の態様は、式A-(B)_nを有する結合体化合物であって、

式中、

nが、1、2、3、または4であり、

Aが、本明細書で定義されるようなペプチド化合物であって、当該ペプチドが任意選択で保護基によって保護されている、ペプチド化合物であり、

Bが、少なくとも1つの治療剤であって、Aに接続している、治療剤であり、

任意選択で、当該ペプチド化合物が環状である、

血管擬態の阻害に使用するための、結合体化合物である。

【0283】

本明細書で開示されるまた別の態様は、式A-(B)_nを有する結合体化合物であって、式中、

nが、1、2、3、または4であり、

Aが、本開示で定義されるようなペプチド化合物であって、任意選択で保護基によって保護されている、ペプチド化合物であり、

Bが、少なくとも1つの治療剤であって、任意選択で当該ペプチド化合物の遊離アミンで、当該ペプチド化合物のN末端位置で、当該ペプチド化合物の遊離-SHで、または当該ペプチド化合物の遊離カルボキシルでAに接続している、治療剤であり、

任意選択で、当該ペプチド化合物が環状である、

血管擬態の阻害に使用するための、結合体化合物である。

【0284】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明される結合体ペプチドは、ソルチリン受

容体を標的化する。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される結合体ペプチドは、ソルチリン受容体の標的化に使用される。

【0285】

本明細書で開示されるまた別の態様は、式 $A - (B)_n$ を有する結合体化合物であって、式中、

n が、1、2、3、または4であり、

A が、本明細書で定義されるようなペプチド化合物であり、

B が、少なくとも1つの治療剤であって、当該ペプチド化合物のリジン残基の遊離アミンで、任意選択でリンカーを介し、または当該ペプチド化合物のN末端位置で、任意選択でリンカーを介し、Aに接続している、治療剤であり、

任意選択で、当該ペプチド化合物が環状である、

癌または攻撃的癌の治療に使用するための、結合体化合物である。

【0286】

1つの実施形態において、Bは、リンカーを介し、任意選択で切断可能なリンカーを介し、Aに接続している。

【0287】

例えば、少なくとも1つの治療剤は、クルクミン、オメガ-3、セイヨウシロヤナギ樹皮、緑茶、カテキン、ピクノジェノール、*Boswellia serrata* 樹脂、レスベラトロール、*Uncaria tomentosa*、カプサイシン、アントシアニン／アントシアニンジン、フラボノイド、オリーブオイル化合物、クロロゲン酸、及びスルホラファンから選択される植物化学物質である。

【0288】

1つの実施形態において、治療剤は、植物化学物質または抗癌剤である。

【0289】

1つの実施形態において、植物化学物質はクルクミンである。

【0290】

1つの実施形態において、結合体化合物は、以下：

G V R A K (クルクミン) A G V R N (N l e) F K (クルクミン) S E S Y - 式 (X I V)

(各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号10を有するペプチド化合物を含む)

及び

Y K (クルクミン) S L R R K (クルクミン) A P R W D A P L R D P A L R Q L L - 式 (X V)

(各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号11を有するペプチド化合物を含む)

から選択される。

【0291】

例えば、結合体化合物は、式 (X I V) によって表される。

【0292】

例えば、結合体化合物は、式 (X V) によって表される。

【0293】

1つの実施形態において、結合体化合物は、以下：

アセチル-G V R A K (クルクミン) A G V R N (N l e) F K (クルクミン) S E S Y - 式 (X V I)

(各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号15を有するペプチド化合物を含む)

及び

アセチル-Y K (クルクミン) S L R R K (クルクミン) A P R W D A P L R D P A L R Q L L - 式 (X V I I)

10

20

30

40

50

(各リジン残基にクルクミン分子が接続している配列番号 16 を有するペプチド化合物を含む)
から選択される。

【0294】

例えば、結合体化合物は、式 (XVI) によって表される。

【0295】

例えば、結合体化合物は、式 (XVII) によって表される。

【0296】

1つの実施形態において、治療剤は抗癌剤である。

【0297】

1つの実施形態において、抗癌剤はドセタキセルである。

【0298】

1つの実施形態において、結合体化合物は、式 (XIX) によって表される。

GVRAK (ドセタキセル) AGVRN (Nle) FK (ドセタキセル) SESY-式 (XIX)

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号 10 を有するペプチド化合物を含む)

【0299】

別の実施形態において、結合体化合物は、式 (XXII) によって表される。

アセチル-GVRAK (ドセタキセル) AGVRN (Nle) FK (ドセタキセル) SESY-式 (XXII)

(各リジン残基にドセタキセル分子が接続している配列番号 15 を有するペプチド化合物を含む)

【0300】

1つの実施形態において、抗癌剤はドキソルビシンである。

【0301】

1つの実施形態において、結合体化合物は、式 (XXVI) によって表される。

GVRAK (ドキソルビシン) AGVRN (Nle) FK (ドキソルビシン) SESY-式 (XXVI)

(各リジン残基にドキソルビシン分子が接続している配列番号 10 を有するペプチド化合物を含む)

【0302】

別の実施形態において、結合体化合物は、式 (XXVII) によって表される。

アセチル-GVRAK (ドキソルビシン) AGVRN (Nle) FK (ドキソルビシン) SESY-式 (XXVII)

(各リジン残基にドキソルビシン分子が接続している配列番号 15 を有するペプチド化合物を含む)

【0303】

1つの実施形態において、抗癌剤はカバジタキセルである。

【0304】

1つの実施形態において、抗癌剤はアルドキソルビシンである。

【0305】

1つの実施形態において、結合体化合物は、式 (LI) によって表される。

GVRAKAGVRN (Nle) FKSESYC (アルドキソルビシン)-式 (LI)

(システイン残基にアルドキソルビシン分子が接続している配列番号 23 を有するペプチド化合物を含む、または

C末端にシステイン残基が付加され、当該システイン残基にアルドキソルビシン分子が接続している、配列番号 10 を有するペプチド化合物を含む)

【0306】

1つの実施形態において、結合体化合物は、式 (LII) によって表される。

10

20

30

40

50

アセチル-G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y C (アルドキソルビン) - 式 (L I I)

(システイン残基にアルドキソルビン分子が接続している配列番号 2 4 を有するペプチド化合物を含む、または C 末端にシステイン残基が付加され、当該システイン残基にアルドキソルビン分子が接続している、配列番号 1 5 を有するペプチド化合物を含む)

【 0 3 0 7 】

1 つの実施形態において、少なくとも 1 つの治療剤 B は、ペプチド化合物 A に、当該ペプチド化合物の当該リジン残基の当該遊離アミンで、リンカーを介し接続している。

【 0 3 0 8 】

1 つの実施形態において、少なくとも 1 つの治療剤 B は、ペプチド化合物 A に、当該ペプチド化合物の当該 N 末端位置で、リンカーを介し接続している。

【 0 3 0 9 】

1 つの実施形態において、リンカーは、コハク酸及びジメチルグルタル酸リンカーから選択される。

【 0 3 1 0 】

例えば、リンカーは切断可能なリンカーである。例えば、リンカーは切断不可能なリンカーである。

【 0 3 1 1 】

例えば、結合体化合物は、少なくとも 1 つの治療剤をペプチド化合物または抗体に接続する切断可能なリンカーを含むことができる。例えば、少なくとも 1 つの治療剤は、エステル結合上のエステラーゼの作用によってペプチド化合物または抗体から放出され得る。

【 0 3 1 2 】

例えば、治療剤は、ペプチド結合などの結合を形成することにより、リジンまたはアミノ末端のペプチドまたは抗体上で利用可能な遊離アミンにおいて、ペプチド化合物または抗体と結合体化させることができる。

【 0 3 1 3 】

1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 2 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 3 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 4 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 5 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 6 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 7 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 8 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 9 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 10 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 11 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 12 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 13 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 14 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少なくとも 15 個の連続した残基に結合する。1 つの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 5 ~ 5 0 のいずれか 1 つの少

10

20

30

40

50

なくとも16個の連続に結合する。1つの実施形態において、単離抗体は、配列番号25～50のいずれか1つの少なくとも17個の連続した残基に結合する。1つの実施形態において、単離抗体は、配列番号25～50のいずれか1つの少なくとも18個の連続した残基に結合する。1つの実施形態において、単離抗体は、配列番号25～50のいずれか1つの少なくとも19個の連続した残基に結合する。1つの実施形態において、単離抗体は、配列番号25～50のいずれか1つの少なくとも20個の連続に結合する。

【0314】

1つの実施形態において、単離抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ型、またはヒト化型である。1つの実施形態において、単離抗体は抗体フラグメントである。1つの実施形態において、抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、2量体、ミニボディ、ダイアボディ、もしくはこれらの多量体、または二重特異性抗体フラグメントである。1つの実施形態において、単離抗体はモノクローナル抗体である。1つの実施形態において、mAbは、抗ソルチリンmAb #1または抗ソルチリンmAb #2である。1つの実施形態において、mAbは抗ソルチリンmAb #1である。2つの実施形態において、mAbは抗ソルチリンmAb #1である。

【0315】

当業者は、ソルチリンに特異的に結合する他の既知の抗体またはその結合フラグメントが使用されてもよいことを理解するであろう。例えば、ソルチリンのC末端にアミノ酸残基800を結合させる抗ソルチリン抗体ab6640 (abcam社製)を使用することができる。

【0316】

ソルチリンに結合する使用され得る抗体またはそのフラグメントの非限定的な例としては、カタログ番号PA5-77535、カタログ番号OSS00052W、カタログ番号MA5-31438、カタログ番号OSS00011W、カタログ番号PA1-18312、カタログ番号PA5-29195、カタログ番号PA5-96865、カタログ番号703207、カタログ番号PA5-47462、カタログ番号PA5-19481、カタログ番号OSS00010W、カタログ番号MA5-31437、カタログ番号OSS00041G (Invitrogen製)；カタログ番号ab16640、カタログ番号ab188586 (abcam製)；カタログ番号AF3154、カタログ番号AF2934、カタログ番号MAB3154、カタログ番号BAF3154、カタログ番号BAF2934、カタログ番号FAB3154 (R&D Systems製)；クローンW16078A (BioLegend製)；カタログ番号A56294、カタログ番号A56295、カタログ番号A56296 (Epigentek製)；クローンCL6526、クローンCL6528、HPA006889 (Atlas Antibodies製)；カタログ番号12369-1-AP (Proteintech製)；sc-376561、sc-376576、sc-376561 HRP、sc-376561 AC (Santa Cruz Biotechnology製)；カタログ番号N2177-52A、カタログ番号N2177-51A、カタログ番号N2177-52、カタログ番号133710、カタログ番号133710-HRP、カタログ番号133710-Biotin、カタログ番号133710-FITC (United States Biological製)；カタログ番号A01666 (Boster Biological Technology製)；カタログ番号LS-C198140、カタログ番号LS-C672508、カタログ番号LS-C672507、カタログ番号LS-C672506、カタログ番号LS-C672509、カタログ番号LS-C37627、カタログ番号LS-C37628、カタログ番号LS-C73437、カタログ番号LS-C94842、カタログ番号LS-C94818、カタログ番号LS-C94912、カタログ番号LS-C94806、カタログ番号LS-C668404 (Lifespan biosciences製)；カタログ番号A7926、カタログ番号A4101 (ABclonal Technology製)；カタログ番号NBP2-76498、カタログ番号NBP2-765

10

20

30

40

50

01、カタログ番号NBP2-89745、カタログ番号H00006172-M01 (Novus Biologicals製)；カタログ番号orb525096、カタログ番号orb525097、カタログ番号orb331290、カタログ番号orb243645、カタログ番号orb243644、カタログ番号orb243646、カタログ番号orb243643、カタログ番号orb255650、カタログ番号orb412666、カタログ番号orb416271、カタログ番号orb416270、カタログ番号orb416272、カタログ番号orb416269、カタログ番号orb446447、カタログ番号orb468236、カタログ番号orb101927、カタログ番号orb373861、カタログ番号orb103522、カタログ番号orb484107 (Biorbyt製)；カタログ番号H00006272-M01、カタログ番号H00006272-A01 (Abnova製)；カタログ番号DPAB-DC2767、カタログ番号CABT-B1343 (Creative Diagnostics Incorporation製)；カタログ番号OAGA03665、カタログ番号OAAAN03744、カタログ番号ARP64630_P050、カタログ番号ARP87664_P050、カタログ番号ARP81139_P050、カタログ番号OACD07428、カタログ番号OACA03712 (Aviva Systems Biology製)；カタログ番号TA351744、カタログ番号TA813064、カタログ番号CF813064、カタログ番号TA328904 (Origene製)；カタログ番号R-150-100 (Biosensis製)；カタログ番号AB9712 (Millipore製)；カタログ番号67531 (NovaTeinBio製)、カタログ番号612100、及びカタログ番号612101 (BD Biosciences製)が挙げられ、これらは全て参照によりその全体が必然的に本明細書に援用される。

10

20

【0317】

1つの態様において、本明細書で説明される単離抗体を作製する方法であって、当該単離抗体が、i) 免疫原性形態の単離ポリペプチドで動物を免疫化すること、ii) 発現ライブラリーをスクリーニングすること、またはiii) ファージディスプレイを使用することにより、配列番号25～50のいずれか1つに示されるような配列を含む単離ポリペプチド、そのアナログ、またはそのフラグメントに特異的に結合する、方法も提供される。

【0318】

1つの態様において、式A'-(B)nを有する結合体抗体であって、式中、

30

nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12であり、

A'が、本明細書で説明されるような単離抗体であって、任意選択で保護基によって保護されている、単離抗体であり、

Bが、少なくとも1つの治療剤であって、任意選択で当該単離抗体の遊離アミンで、当該単離抗体のN末端位置で、当該単離抗体の遊離-SHで、または当該単離抗体の遊離カルボキシルでA'に接続している、治療剤である、

血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、結合体抗体も提供される。

【0319】

さらなる態様において、式A'-(B)nを有する結合体抗体であって、式中、

40

nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12であり、

A'が、本明細書で説明されるような単離抗体であって、任意選択で保護基によって保護されている、単離抗体であり、

Bが、少なくとも1つの治療剤であって、当該単離抗体のリジン残基の遊離アミンで、任意選択でリンカーを介し、または当該単離抗体のN末端位置で、任意選択でリンカーを介し、A'に接続している、治療剤である、

血管凝態の阻害及び／または癌の治療に使用するための、結合体抗体も提供される。

【0320】

1つの実施形態において、結合体抗体はソルチリン受容体を標的化する。1つの実施形

50

態において、結合体抗体は、ソルチリン受容体の標的化に使用される。

【0321】

1つの実施形態において、Bは、リンカーを介し、任意選択で切断可能または切断不可能なリンカーを介し、A'に接続している。1つの実施形態において、少なくとも1つの治療剤は抗癌剤である。1つの実施形態において、抗癌剤は、ドセタキセル、ドキソルビシン、カバジタキセル、アルドキソルビシン、マイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、アマトキシシン、アマニチン、及びオリゴペプチドミメティック（例えば、ツプリシン）である。1つの実施形態において、少なくとも1つの治療剤は植物化学物質であり、任意選択でクルクミンである。1つの実施形態において、抗癌剤はドセタキセルである。1つの実施形態において、抗癌剤はドキソルビシンである。1つの実施形態において、抗癌剤はカバジタキセルである。1つの実施形態において、抗癌剤はアルドキソルビシンである。

10

【0322】

抗体結合体中の治療剤の数は不均一であってもよい。例えば、トラスツズマブ・エムタンシンについては、抗体の分子当たりマイタンシン0から8分子の間で変動し、平均で抗体当たりマイタンシン3.5〜4分子となる。

【0323】

1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した1個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した少なくとも1個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した最大8個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、抗体結合体は、単離抗体に接続した10個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、抗体結合体は、単離抗体に接続した12個の治療剤分子を含む。

20

【0324】

1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した2個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した3個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した4個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、ペプチド化合物または単離抗体に接続した1〜8個の治療剤分子を含む。1つの実施形態において、抗体結合体は、単離抗体に接続した0〜12個、任意選択で0〜10個、任意選択で0〜8個の治療剤分子を含む。別の実施形態において、抗体結合体は、単離抗体に接続した1個以上かつ12個まで、任意選択で10個まで、任意選択で8個までの治療剤分子を含む。別の実施形態において、抗体結合体は、単離抗体に接続した1〜12個、任意選択で1〜10個、任意選択で1〜8個の治療剤分子を含む。

30

【0325】

1つの実施形態において、結合体抗体は、細胞傷害性薬剤、毒素、抗癌ペプチド、標的化薬物、免疫療法薬、植物化学物質、及び／またはオリゴペプチドミメティックからなる群より選択される治療剤を含む。別の実施形態において、治療剤は、アルキル化剤；シスプラチン、カルボプラチン、及びオキサリプラチンからなる群より選択される白金配位剤；代謝拮抗薬；ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、パクリタキセル、及びドセタキセルからなる群より選択される微小管損傷剤；トポイソメラーゼ2阻害薬、例えば、エトポシド；トポテカン及びイリノテカンからなる群より選択されるトポイソメラーゼ1阻害薬；アクチノマイシンD、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、及びミトマイシンCからなる群より選択される抗生物質；ヒドロキシウレア；L-アスパラギナーゼ；トレチノイン；マイタンシノイド；アウリスタチン；カリケアミシン；アマトキシシン；アマニチン；D-ペプチドA；D-ペプチドB；D-ペプチドC；D-ペプチドD；D-K6L9；NRC-03；NRC-07；ゴメシン；ヘプシジンTh2-3；ダーマセプチンB2；PTP7；MGA2；HNp-1；タキプレシ

40

50

ン；テンポリン-1 C e a；NK-2；セクロピンC b 1；D a s a t i n i bイマチニブ及びダサチニブからなる群より選択されるチロシントキナーゼ阻害薬；ゲフィチニブ及びエルロチニブからなる群より選択されるE F G受容体阻害薬；ペバシズマブ、サリドマイド、エンドスタチン、アンジオスタチン、アンジオポエチン（A n g i o p o o i t e i n）、及びカンナビノイドからなる群より選択される血管新生阻害薬；ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ（C a r f i z o m i b）、イキサゾミブ（I z a z o m i b）、マリゾミブ、及びエポキシオミシンからなる群より選択されるプロテアソーム阻害薬；リツキシマブ及びトラスツズマブからなる群より選択されるm A b；チェックポイント阻害薬；C A R-T細胞療法薬；抗体；抗体薬物結合体；二重特異性T細胞エンゲージャー及び二重特異性抗体；遺伝子操作されたT細胞媒介性細胞殺傷；腫瘍溶解性ウイルス；T細胞媒介性細胞溶解；クロロゲン酸、テオブロミン、及びテオフィリンからなる群より選択されるアルカロイド；シアニジン及びマルビジンからなる群より選択されるアントシアニン；ベーターカロテン、ルテイン、及びリコピンからなる群より選択されるカロテノイド；クメスタン；フラバン-3-オール；エピカテキン、ヘスペリジン、イソラムネチン、ケンフェロール、ミリセチン、ナリンギン、ノビレチン、プロアントシアニジン、ケルセチン、ルチン、及びタンゲレチンからなる群より選択されるフラボノイド；チコリ酸、クマリン、フェルラ酸、及びスコボレチンからなる群より選択されるヒドロキシケイ皮酸；ダイゼイン及びゲニステインからなる群より選択されるイソフラボン；リグナン、例えばシリマリン；ゲラニオール及びリモネンからなる群より選択されるモノテルペン；アリシン、グルタチオン、インドール-3-カルビノール、イソチオシアネート、及びスルホラファンからなる群より選択されるオルガノスルフィド；ダムナカンタール；ジゴキシン；フィチン酸；カプサイシン、エラグ酸、没食子酸、ロスマリン酸、及びタンニン酸からなる群より選択されるフェノール酸；フィトステロール、例えばベーターシトステロール；サポニン；プテロスチルベン及びレスベラトロールからなる群より選択されるスチルベン；トリテルペノイド、例えばウルソル酸；アスタキサンチン及びベータークリプトキサンチンからなる群より選択されるキサントフィル；モノフェノール、例えばヒドロキシチロソール；またはツブリシンである。

【0326】

例えば、癌または攻撃的癌を治療することは、ソルチリンを発現する細胞における血管擬態を阻害することを含む。

【0327】

1つの態様において、本明細書で説明される化合物、単離抗体、または抗体結合体は、血管擬態の阻害で使用される。1つの態様において、本明細書で説明される化合物、単離抗体、または抗体結合体は、ソルチリン受容体を標的化する。1つの態様において、本明細書で説明される化合物、単離抗体、または抗体結合体は、ソルチリン受容体の標的に使用される。

【0328】

さらなる態様において、本明細書で説明される化合物、単離抗体、または抗体結合体は、血管擬態の阻害及び／またはC D 1 3 3 陽性細胞の癌の治療で使用される。

【0329】

1つの実施形態において、化合物、単離抗体、または抗体結合体は、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さを、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約5%～約50%、約10%～約50%、約15%～約45%、約20%～約45%、または約30%～約40%大きく減少させる。

【0330】

1つの実施形態において、化合物、単離抗体、または抗体結合体は、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態のループ数を、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約4

10

20

30

40

50

0%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約5%～約50%、約10%～約50%、約15%～約45%、約20%～約45%または約30%～約40%大きく減少させる。

【0331】

1つの実施形態において、化合物、単離抗体、または抗体結合体は、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さを、少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、約1.2～約2.4倍、または約1.2～約2.0倍大きく減少させる。

10

【0332】

1つの実施形態において、1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体は、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態ループの数を、少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、約1.2～約2.4倍、または約1.2～約2.0倍大きく減少させる。

【0333】

1つの態様において、本明細書で説明される化合物、単離抗体、または抗体結合体は、癌または攻撃的癌の治療に使用される。

20

【0334】

例えば、癌または攻撃的癌を治療することは、対象、ソルチリンを発現する癌性組織及び／または細胞における血管擬態の管の長さを、未治療の対照対象、ソルチリンを発現する癌性組織及び／または細胞よりも少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少させることを含む。

【0335】

例えば、癌または攻撃的癌を治療することは、対象、ソルチリンを発現する癌性組織及び／または細胞における血管擬態のループ数を、未治療の対照対象、ソルチリンを発現する癌性組織、及び／または細胞よりも少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少させることを含む。

30

【0336】

例えば、癌または攻撃的癌を治療することは、対象、ソルチリンを発現する癌性組織及び／または細胞における血管擬態の管の長さを、少なくとも1つの治療剤で治療したソルチリンを発現する細胞よりも少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、または少なくとも2.4倍大きく減少させることを含む。

40

【0337】

例えば、癌または攻撃的癌を治療することは、対象、ソルチリンを発現する癌組織及び／または細胞における血管擬態ループ数を、少なくとも1つの治療剤で治療したソルチリンを発現する細胞よりも少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍または少なくとも2.4倍大きく減少させることを含む。

【0338】

例えば、ソルチリンを発現する細胞は、免疫細胞、任意選択でマクロファージ、CD4+、CD8+、B220+、骨髄由来細胞、好塩基球、好酸球、及び細胞傷害性Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、Tヘルパー1型（Th1）細胞である。

50

【0339】

例えば、ソルチリンを発現する細胞は、癌細胞、卵巢癌細胞、子宮内膜癌細胞、乳癌細胞（例えば、トリプルネガティブ乳癌細胞）、前立腺癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、皮膚癌細胞、脳（神経膠腫）癌細胞、尿路上皮癌細胞、カルチノイド細胞、腎臓癌細胞、精巣癌細胞、下垂体癌細胞、及び血液癌細胞（例えば、骨髓癌細胞、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫癌細胞、骨髓腫癌細胞、または慢性B細胞白血病癌細胞）である。

【0340】

例えば、血管擬態を提示する細胞は、癌細胞、任意選択で乳癌細胞（例えば、トリプルネガティブ乳癌細胞）、神経膠腫細胞、肝細胞癌細胞、結腸直腸癌細胞、髄芽腫細胞、二方向性分化悪性腫瘍細胞、胃癌細胞、前立腺癌細胞、肉腫細胞、胆嚢癌細胞、口腔／喉頭扁平上皮癌細胞、黒色腫細胞、非小細胞肺癌細胞、または卵巢癌細胞である。

10

【0341】

例えば、トリプルネガティブ乳癌細胞は、HCC1599、HCC1937、HCC1143、MDA-MB468、HCC38、HCC70、HCC1806、HCC1187、DU4475、BT-549、Hs578T、MDA-MB231、MDA-MB436、MDA-MB157、MDA-MB453、BT-20、またはHCC1395細胞である。

【0342】

例えば、細胞はCD133陽性細胞である。

20

【0343】

本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体は、排出ポンプ（例えば、多剤耐性薬物細胞から他の治療剤を汲み出すP-糖タンパク質膜輸送体ポンプ）の基質ではないので、治療剤を細胞に輸送するために使用することができる。

【0344】

1つの態様において、ペプチド化合物を得るための方法であって、i) 結合剤ペプチドのライブラリーを準備することと、ii) 標的を用いた親和性選択によって、当該ライブラリーからソルチリン結合ペプチドを選択することとを含み、当該標的が、固体支持体上に固定化され、当該標的が、配列番号25～50のいずれか1項に示されるようなアミノ酸配列、そのアナログ、またはそのフラグメントから構成され、当該標的が、当該ソルチリン結合ペプチドと相互作用する、方法が提供される。

30

【0345】

さらなる態様において、本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体を調製するための方法であって、リンカーを当該治療剤と共に反応させて中間体を得ることと、任意選択で、当該中間体を精製することと、当該中間体をペプチド化合物と共に反応させて当該結合体化合物を得る、または当該中間体を単離抗体と反応させて当該抗体結合体を得ることと、任意選択で、当該結合体化合物または抗体結合体を精製することとを含み、当該治療剤が、リジン残基の遊離アミンまたはN末端で当該ペプチド化合物または当該単離抗体に接続し、当該ペプチド化合物が、当該ペプチド化合物に接続している1、2、3、または4個の治療剤分子を含み、当該単離抗体が、当該単離抗体に接続している1～12個、任意選択で1～10個、任意選択で1～8個の治療剤分子を含む、方法が提供される。

40

【0346】

例えば、ペプチド化合物または単離抗体は、接続している1個の治療剤分子を含む。例えば、ペプチド化合物または単離抗体は、接続している2個の治療剤分子を含む。例えば、ペプチド化合物または単離抗体は、接続している3個の治療剤分子を含む。例えば、ペプチド化合物または単離抗体は、接続している4個の治療剤分子を含む。

50

【0347】

例えば、リンカーはコハク酸である。例えば、リンカーはジメチルグルタル酸リンカーである。

【0348】

1つの実施形態において、ペプチド化合物または単離抗体は、当該中間体と反応する前に、当該N末端で保護される。

【0349】

例えば、F M O Cなどの保護基は、リンカーと組み込む前に、治療剤上の遊離アミンに対する保護基として付加することができる。合成された後、結合体化合物または抗体結合体は、保護基からの脱保護を経ることができる。例えば、保護剤F M O Cを含む結合体化合物または抗体結合体は、ピペリジンを用いて脱保護することができる。当業者は、他の既知の化学試薬が、結合体化合物または抗体結合体の脱保護のために使用され得ることを容易に理解する。

【0350】

例えば、治療剤、ペプチド化合物、及び／または抗体のN末端は、そのアセチル化によってキャップしてN末端に非可逆的保護基をもたらすことができる。

【0351】

1つの実施形態において、中間体は、当該ペプチド化合物または当該抗体と反応する前に活性化される。

【0352】

例えば、中間体は、当該化合物と反応する前に、N，N，N'，N'-テトラメチル-O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)、(2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)(HBTU)、及び(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-オキシドヘキサフルオロホスフェート)(HATU)から任意選択で選択されるカップリング剤で活性化される。

【0353】

例えば、リンカーに接続した治療剤を含む中間体は、ペプチド化合物または抗体と結合体化する前に、ペプチド結合試薬であるTBTUで活性化することができる。

【0354】

1つの実施形態において、結合体化合物または抗体結合体は、その合成後に精製される。

【0355】

本明細書で開示されるペプチド化合物及び抗体は、融合タンパク質の文脈において有用である。例えば、融合タンパク質は、本明細書で開示されるペプチド化合物または抗体、例えば、ペプチド化合物を、1つ以上のタンパク質、またはその一部(例えば、機能的ドメイン)と融合させることにより、操作することができる。融合タンパク質は、例えば、組換えDNA技術によって操作することができ、タンパク質発現系(例えば、細菌または哺乳類タンパク質発現系)を用いて発現させることができる。いくつかの実施形態において、ペプチドリinkerはタンパク質の間に付加される。他の実施形態において、融合タンパク質は、タンパク質を接続するリンカーを含まない。

【0356】

一般的に使用されるタンパク質発現系としては、細菌、酵母、バキュロウイルス／昆虫、植物、及び哺乳類細胞、ならびにより最近では糸状菌(例えば、Myceliophthora thermophila)から誘導されるものが挙げられる。

【0357】

本明細書で開示される1つの態様は、血管凝態の阻害に使用するための、本明細書で開示される少なくとも1つのペプチド化合物または抗体を含むリボソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子である。

【0358】

本明細書で開示される1つの態様は、ソルチリン受容体を標的とする、本明細書で開示される少なくとも1つのペプチド化合物または抗体を含むリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子である。

【0359】

本明細書で開示される1つの態様は、ソルチリンの標的化に使用するための、本明細書で開示される少なくとも1つのペプチド化合物または抗体を含むリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子である。

【0360】

別の態様は、血管擬態の阻害に使用するための、本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体でコーティングされたリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子である。

10

【0361】

別の態様は、ソルチリン受容体の標的化に使用するための、本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体でコーティングされたリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子である。

【0362】

別の態様は、ソルチリン受容体の標的化に使用するための、本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体でコーティングされたリポソーム、グラフェン、ナノチューブ、またはナノ粒子である。

【0363】

別の態様は、少なくとも1つの治療剤、遺伝子、またはsiRNAを装填したリポソーム、グラフェン、ナノチューブまたはナノ粒子であり、リポソームまたはナノ粒子は、血管擬態の阻害で使用するために、本明細書で定義される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体でコーティングされる。例えば、少なくとも化合物、結合体化合物、単離抗体、または抗体結合体は、リポソームまたはナノ粒子の表面に接続させることができる。

20

【0364】

リポソーム、ナノチューブ、グラフェン、またはナノ粒子の異なる実施形態は、当業者に想定され得るものである。例えば、リポソームまたはナノ粒子は、リポソームまたはナノ粒子の表面にコーティングされた本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体と、リポソームまたはナノ粒子内の治療剤（例えば、抗癌剤）とを含むことができる。例えば、リポソームまたはナノ粒子は、リポソームまたはナノ粒子の表面にコーティングされた本明細書で開示される少なくとも1つの化合物と、リポソームまたはナノ粒子内の治療剤（例えば、抗癌剤）とを含むことができる。例えば、リポソームまたはナノ粒子は、リポソームまたはナノ粒子の表面にコーティングされた本明細書で開示される少なくとも1つのペプチド化合物と、リポソームまたはナノ粒子内の治療剤（例えば、例えば抗癌剤）とを含むことができる。例えば、リポソームまたはナノ粒子は、リポソームまたはナノ粒子の表面にコーティングされた本明細書で開示される少なくとも1つの結合体化合物と、リポソームまたはナノ粒子内の治療剤（例えば、抗癌剤）とを含むことができる。例えば、リポソームまたはナノ粒子は、リポソームまたはナノ粒子の表面にコーティングされた本明細書で開示される少なくとも1つの単離抗体と、リポソームまたはナノ粒子内の治療剤（例えば、抗癌剤）とを含むことができる。例えば、リポソームまたはナノ粒子は、リポソームまたはナノ粒子の表面にコーティングされた本明細書で開示される少なくとも1つの抗体結合体と、リポソームまたはナノ粒子内の治療剤（例えば、例えば抗癌剤）とを含むことができる。加えて、いくつかの実施形態において、本明細書で説明される化合物、ペプチド化合物、結合体化合物、単離抗体、または抗体結合体は、1つ以上の他の化合物と会合、結合、または接続して多量体（例えば、2量体、3量体、または4量体）及び分枝状ペプチドを形成することができ、任意選択でペプチド化合物は環状である。このような化合物、単離抗体、または抗体結合体は、例えば、共有結合、原子、またはリンカーを介し、共に接続させることができる。例えば、多量体は、2

30

40

50

つ以上の化合物、単離抗体、または抗体結合体を含む。ペプチド化合物または抗体の多量体（例えば、2量体、3量体）形態を作製するため方法は、米国特許第9,161,988号で説明されており、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0365】

本開示の他の態様は、概して、血管擬態を阻害する方法であって、本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体の治療有効量をそれを必要とする対象に投与すること、ならびに／またはソルチリンを発現する細胞を本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／もしくは抗体結合体に接触させることを含む、方法を含む。他の態様は、本明細書で説明されるペプチド化合物、結合体化合物、抗体、及び／または抗体結合体における、血管擬態を阻害するための、及び血管擬態を阻害するための医薬品の製造における使用を含む。

10

【0366】

1つの態様において、血管擬態を阻害する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体の治療有効量を投与することを含む、方法が提供される。

【0367】

別の態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体に接触させることを含む、方法が提供される。

【0368】

別の態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体と接触させることを含む、血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数が、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少する、方法が提供される。

20

【0369】

別の態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体に接触させることを含む、血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数が、少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍大きく減少する、方法が提供される。

30

【0370】

別の態様において、癌性組織またはCD133陽性細胞の血管擬態を阻害する方法であって、当該癌性組織またはCD133陽性細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体に接触させることを含む、方法が提供される。

40

【0371】

1つの態様において、癌または攻撃的癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体の治療有効量を投与することを含む、方法が提供される。

【0372】

別の態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞を有する対象の癌または攻撃的癌を治療する方法であって、当該ソルチリンを発現する癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体に接触させることを含む、方法が提供される。

【0373】

50

別の態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞を有する対象の癌または攻撃的癌を治療する方法であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体と接触させることを含み、血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数が、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少する、方法が提供される。

【0374】

別の態様において、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞を有する対象の癌または攻撃的癌を治療する方法であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体に接触させることを含み、血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数が、少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍大きく減少する、方法が提供される。

【0375】

別の態様において、治療剤の安定性及び／またはバイオアベイラビリティを高める方法であって、

本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体を得ることであって、当該結合体化合物または抗体結合体が当該治療剤を含む、得ることと、

当該結合体化合物または抗体結合体の治療有効量を、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。

【0376】

別の態様において、治療剤の安定性及び／またはバイオアベイラビリティを高める方法であって、

当該治療剤を本明細書で定義されるようなペプチド化合物または抗体と結合体化させて、結合体化合物または抗体結合体を得ることと、

当該結合体化合物または抗体結合体の治療有効量を、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。

【0377】

また、本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体は、結合体化されていない治療剤よりも大きな忍容性ももたらし得る。例えば、WO2017/088058として公開された「PEPTIDE COMPOUNDS AND CONJUGATE COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF CANCER THROUGH RECEPTOR-MEDIATED CHEMOTHERAPY」という表題の国際出願（2016年11月24日出願）（その全体が参照により本明細書に援用される）では、Katana-薬物結合体が、特異的受容体標的化により、等価用量の結合体化されていない治療剤よりも忍容性が良好であることが示されている。詳細には、*in vivo*試験は、結合体化合物による処置が試験対象マウスの体重にほとんど影響しないことを示しており、よって結合体化合物の忍容性が実証された。

【0378】

例えば、本明細書では、治療剤の忍容性を高める方法であって、

当該治療剤を本明細書で開示されるペプチド化合物または単離抗体と結合体化させて、結合体化合物または抗体結合体を得ることと、

当該結合体化合物または当該抗体結合体の治療有効量を、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。

【0379】

例えば、本明細書では、治療剤の忍容性を高める方法であって、

本明細書で開示される結合体化合物または抗体結合体を得ることであって、当該結合体化合物または抗体結合体が当該治療剤を含む、を得ることと、

当該結合体化合物または当該抗体結合体の治療有効量を、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。

【0380】

例えば、本明細書で開示されるペプチド化合物、結合体化合物、抗体、及び／または抗体結合体における、治療剤の忍容性を高めるための使用が提供される。

【0381】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、血管凝態を阻害するための使用が提供される。

【0382】

別の態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリン受容体を標的化するための使用が提供される。

10

【0383】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリン発現を伴う血管凝態を阻害するための使用が提供される。

【0384】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管凝態を阻害するための使用が提供される。

20

【0385】

別の態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、癌または攻撃的癌を治療するための使用が提供される。

【0386】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリン発現を伴う癌または攻撃的癌を治療するための使用が提供される。

【0387】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の癌または攻撃的癌を治療するための使用が提供される。

30

【0388】

別の態様において、少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管凝態の管の長さを、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約5%～約50%、約10%～約50%、約15%～約45%、約20%～約45%、または約30%～約40%大きく減少させるための使用が提供される。

【0389】

別の態様において、少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管凝態のループ数を、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約5%～約50%、約10%～約50%、約15%～約45%、約20%～約45%または約30%～約40%大きく減少させるための使用が提供される。

40

【0390】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管凝態

50

の管の長さを、当該少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、約1.2～約2.4倍、または約1.2～約2.0倍大きく減少させるための使用が提供される。

【0391】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態のループ数を、当該少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、約1.2～約2.4倍、または約1.2～約2.0倍大きく減少させるための使用が提供される。

10

【0392】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態を阻害するための使用であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体と接触させることを含み、血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数が、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少する、使用が提供される。

20

【0393】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害するための使用であって、当該癌性組織または細胞を、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体に接触させることを含み、血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数が、少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍大きく減少する、使用が提供される。

30

【0394】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数を、未治療のソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%大きく減少させるための使用が提供される。

【0395】

別の態様において、本明細書で定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞における血管擬態の管の長さまたは血管擬態のループ数を、当該少なくとも1つの治療剤で治療されたソルチリンを発現する癌性組織または細胞よりも、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、または少なくとも2.4倍大きく減少させるための使用が提供される。

40

【0396】

別の態様において、本明細書に定義されるような少なくとも1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、CD133陽性細胞の癌または攻撃的癌を治療するための使用が提供される。

【0397】

50

別の態様において、本明細書で定義されるような結合体化合物または抗体結合体における、少なくとも1つの治療剤の安定性及び／またはバイオアベイラビリティを高めるための使用が提供される。

【0398】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、血管擬態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0399】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、血管擬態を標的化するための、医薬品の製造における使用が提供される。

10

【0400】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリン発現を伴う血管擬態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0401】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の血管擬態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0402】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、CD133陽性細胞の血管擬態を阻害するための、医薬品の製造における使用が提供される。

20

【0403】

別の態様において、本明細書に定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、癌または攻撃的癌を治療するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0404】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリン発現を伴う癌または攻撃的癌を治療するための、医薬品の製造における使用が提供される。

30

【0405】

別の態様において、本明細書で定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、ソルチリンを発現する癌性組織または細胞の癌または攻撃的癌を治療するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0406】

別の態様において、本明細書に定義されるような1つの化合物、単離抗体、及び／または抗体結合体における、CD133陽性細胞の癌または攻撃的癌を治療するための、医薬品の製造における使用が提供される。

【0407】

例えば、血管擬態を阻害するために、結合体化合物または抗体結合体に含まれる、及び／または医薬の製造において使用される少なくとも1つの治療化合物は、抗癌剤である。例えば、抗癌剤は、ドセタキセル、カバジタキセル、アルドキシソルピシン、マイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアミシン、アマトキシシン、アマニチン、及びドキシソルピシンから選択される。

40

【0408】

例えば、血管擬態を阻害するために、結合体化合物または抗体結合体に含まれる、及び／または医薬の製造において使用される少なくとも1つの治療化合物は、植物化学物質である。例えば、植物化学物質はクルクミンである。

【0409】

50

例えば、植物化学物質は、クルクミン、オメガー3、セイヨウシロヤナギ樹皮、緑茶、カテキン、ピクノジェノール、*Boswellia serrata* 樹脂、レスベラトロール、*Uncaria tomentosa*、カプサイシン、アントシアニン／アントシアニン、フラボノイド、オリーブオイル化合物、クロロゲン酸、及びスルホラファンから選択される。

【0410】

別の対応において、本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、本明細書で開示される少なくとも1つの単離抗体、または本明細書で開示される少なくとも1つの結合体化抗体における、治療剤、例えば、細胞傷害性物質、毒素、及び抗癌ペプチド；免疫調節薬、例えば、抗PD1及び抗PDL1；抗癌送達系、抗血管新生剤、ならびに／または放射線療法と組み合わせて血管凝態を阻害するための使用が提供される。

10

【0411】

さらなる態様において、本明細書で開示される少なくとも1つの化合物、本明細書で開示される少なくとも1つの単離抗体、または本明細書で開示される少なくとも1つの結合体化抗体における、治療剤、例えば、細胞傷害性物質、毒素、及び抗癌ペプチド；免疫調節薬、例えば、抗PD1及び抗PDL1；抗癌送達系、抗血管新生剤、ならびに／または放射線療法と組み合わせてソルチリン受容体を標的化するための使用が提供される。

【0412】

次に、さらなる本開示の実施形態を以下の実施例を参照しながら説明する。これらの実施例は、本開示の実施形態を例示することが目的であり、本開示の範囲を限定するものではないことを理解されたい。

20

実施例

実施例1：組成物

ソルチリンを標的化するペプチド

【0413】

ソルチリンを標的化するKatanaペプチドの第1のファミリーは細菌細胞浸透性タンパク質から誘導されるが、第2のファミリーはこれとは異なり、ソルチリンリガンド、プログラニュリン、及びニューロテンシンから誘導される最適化された一次配列に基づいている（表1）。これらのペプチドは、PCT/CA2016/051379：PEPTIDE COMPOUNDS AND CONJUGATE COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF CANCER THROUGH RECEPTOR-MEDIATED CHEMOTHERAPY及び米国特許出願第62/510,381号：CONJUGATES AND USES THEREOF FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASESで説明されており、これらは参照により本明細書に援用される。

30

40

50

【表 1 2】

表 1. K a t a n a ペプチドファミリーのアミノ酸配列。

アミノ酸配列	アミノ酸長
K a t a n a B i o p h a r m a ペプチド [*] (KBP) ファミリー 1 :	
KBP-101: I K L S G G V Q A K A G V I N M D K S E S M	22
KBP-102: スクシニル-I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y	22
KBP-103: I K L S G G V Q A K A G V I N M F K S E S Y K (ビオチン)	23
KBP-104: G V Q A K A G V I N M D K S E S M Y	17
KBP-105: アセチル-G V R A K A G V R N M F K S E S Y	17
KBP-106: アセチル-G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y	17
KBP-106-C y s : アセチル-G V R A K A G V R N (N l e) F K S E S Y	18
K a t a n a B i o p h a r m a ペプチド [*] (KBP) ファミリー 2 :	
KBP-201: Y K S L R R K A P R W D A P L R D P A L R Q L L	24
KBP-202: Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R Q L L	24
KBP-203: Y K S L R R K A P R W D A Y L R D P A L R P L L	24

【0414】

方法

K a t a n a ペプチド薬物結合体 (単数または複数) の生成

細胞傷害性薬物の原理を証明するためにまずドセタキセル及びドキソルビシンが選択され、植物化学物質の中からクルクミンが選択された。ドセタキセルはパクリタキセルの半合成アナログであり、希少なイチイ科樹木 (P a c i f i c y e w t r e e) T a x u s b r e v i f o l i a の樹皮からの抽出物である。この薬物は、局所進行性または転移性癌 (乳癌、卵巣癌、頭頸部癌、胃癌、ホルモン抵抗性前立腺癌、及び非小細胞肺癌を含む) の治療向けに F D A (N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e) によって承認されている。ドセタキセルは、特定の癌のタイプ及び病期に応じて、単剤として、または他の化学療法薬と併用して使用することができる。ドキソルビシンはアントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質であり (注: この文脈では、これは細菌感染の治療に使用されることを意味しない)、天然物であるダウノマイシンと密接に関連しており、全てのアントラサイクリンと同様、DNA にインターカレートすることによって作用し、最も重篤な有害作用は生命を脅かす心臓損傷である (N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e)。ドキソルビシンは、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、乳癌、胃癌、ホジキンリンパ腫、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、小細胞肺癌、軟部組織及び骨肉腫、甲状腺癌、移行上皮膀胱癌、ならびにウィルムス腫瘍の治療に、単独使用または他の薬剤との使用が承認されている。クルクミン (ジフェルロイルメタン) は香辛料のウコン (C u r c u m a l o n g a) に存在する黄色の色素であり、抗酸化、抗炎症、抗癌、抗ウイルス、及び抗菌活性と関連付けられている (23)。

【0415】

細胞傷害性薬物 (ドセタキセル、カバジタキセル、ドキソルビシン) または植物化学物質 (クルクミン) は、アミン結合体戦略を用いてペプチドと結合体化させることができる。簡潔に述べると、ドセタキセルは、活性化ドセタキセルとペプチド結合 (アミド結合) を形成することによって、ペプチド (リジンまたはアミノ末端) 上で利用可能な遊離アミン上の K a t a n a ペプチド (単数または複数) と結合体化させることができる。ペプチドについての様々な結合体化戦略は、P C T / C A 2 0 1 6 / 0 5 1 3 7 9 及び U S 6 2

／510, 381で過去に説明されており、これらは参照により本明細書に援用される。

【0416】

抗体標識

抗ソルチリン抗体の標識は、製造業者の指示に従ってInvitrogen製のAlexa Fluor 488タンパク質標識キットを用いて実施した。

【0417】

細胞表面結合アッセイ

ヒトES-2 卵巣癌細胞を、抗ソルチリン-Alexa488抗体(1 µg/ml)と共に4℃で30分間インキュベートし、次にトリプシン処理を行いまたは行わずに、細胞表面での抗体の結合を評価した。

【0418】

血管擬態

悪性固形腫瘍は、成長及び転移を促進するために血液供給を必要とする。過去には、胚の発生における新血管形成(neovascularization)の一種である血管新生(angiostasis)が、腫瘍への血液供給を支える唯一の形態と考えられていた(24)。内皮細胞を標的化する抗血管新生療法が、可能性のある有望な標的として多くの注目及び研究の対象となっている。腫瘍増殖及び転移を防止するために、多くの抗血管新生薬が使用されてきた。しかし、これらの薬物の癌進行に対する作用は限定的かつ不十分であった。このことから、腫瘍組織に血管新生以外の血液供給形態が存在する可能性が示された。1999年には、非常に攻撃的かつ転移性のヒト黒色腫で高度にパターン化された容器様チャネル構造が観察され、その構造内で赤血球が検出された(28)。このようなチャネル内では、光学顕微鏡でも、透過電子顕微鏡でも、内皮細胞マーカー(例えば、CD34及びCD31)の免疫組織化学検出法でも、内皮細胞が検出されなかった。その後、この構造が、血管新生とは異なり、基底膜から構成されており、主に腫瘍細胞に覆われていることが報告された。他の研究でも、血管擬態が、十分な血液及び栄養供給を介し悪性腫瘍の重要な灌流経路をもたらすことが確認された(24-27)。現在では、血管擬態が腫瘍増殖で重要な役割を果たすことが認識されている。

【0419】

血管擬態は、浸潤及び転移を含めた腫瘍の悪性度に関連している(24-27)。腫瘍組織には、腫瘍で覆われた血管チャネルと内皮で覆われた血管との間に接合部が存在する。この構造を通じて、内部ネットワークチャネル表面を覆う腫瘍細胞が血液に直接曝露され、移動の機会が著しく増加する。血管擬態は、癌細胞が内皮細胞を伴わない方式で代替的な灌流経路を確立させるのに用いられるプロセスを説明する。血管性腫瘍細胞は、胚性血管形成の方法を採用しており、様々な毛細血管様構造、管、及びネットワークからなる原始的で未熟な血管を直接的に形成する。血管擬態は様々な悪性腫瘍で報告されており、癌の進行及び転移で役割を果たすことが知られている。血管擬態は、黒色腫、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、骨肉腫、膀胱癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、胃癌、及び肺癌を含めた様々な悪性腫瘍に存在し得る(24、28、29)。乳癌の場合には、血管擬態がトリプルネガティブ乳癌(TNBC)検体で最も高いことが報告されている(30)。この後者の研究では、癌幹細胞の特徴を有するCD133+細胞がTNBCの血管擬態と関連付けられた。15タイプの悪性腫瘍に關与する3062例の癌症例の5年生存率に血管擬態が及ぼす影響を評価するメタ解析では、血管擬態が、より攻撃的な腫瘍表現型及び癌患者の不良な5年全生存率に關連することが示された(24)。限定的な理論であることは望まないが、血管擬態は、成長する腫瘍に新たな血液灌流機序及び潜在的な播種経路を提供する。さらに、ソルチリン受容体は、癌細胞の増殖、癌の成長、ならびに癌細胞の移動及び浸潤に關与し得る。

【0420】

本開示では、血管擬態におけるソルチリンの潜在的役割が調べられた。本明細書で開示されているように、ソルチリンは、血管擬態の管状構造の形成に必須である。より重要なことには、抗癌薬(ドキソルビシン、カバジタキセル、アルドキシソルビシン、ドセタキセ

10

20

30

40

50

ル) または植物化学物質 (クルクミン) とソルチリンを標的化するペプチド (単数または複数) との結合体は、血管擬態の形成を強力に阻害する。さらに、本明細書で説明される結果は、血管擬態に関連する 3D-管状構造の形成が、ソルチリンに対する mAb によって阻害されることを示すものである。

結果

【0421】

図1及び図2は、それぞれ、異なるヒトの癌及び乳癌における血管擬態の程度を示している (24、30)。卵巣癌及びトリプルネガティブ (TN) 乳癌は、最も高いレベルの血管擬態を呈している。

【0422】

図3及び図4は、卵巣癌細胞について *in vitro* で観察された血管擬態の形成を説明している (31)。4日間のマトリゲル上での卵巣癌細胞の3D培養のランドスケープに対するX線マイクロトモグラフィーの3D再構成 (図3A) は、管状様外観を有する隆起構造の再構成像を示している。加えて、白い四角形内の構造を、より高い倍率で図3B及び図3Cに示す。矢印は、平坦な細胞凝集物の上方に突出する外見的な管状構造を示す。この構造の断面は、推定直径50 μ mの空気で満たされた空間を実証している (図3C)。図4は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するSKOV3を用いた血管擬態の管状構造の共焦点顕微鏡像を示している。全体的には、図4AのZスタック再構成画像は、連続的な上部の単層 [1] と、中心が空洞の中心壁構造 [2] と、連続的な下部の単層 [3] とを有する管状構造を含む細胞の存在を実証するものである。図4Bのコンピューター生成断面は、内腔を含む管状構造を明確に示している。

【0423】

図5は、ES-2卵巣癌細胞が血管擬態を形成していることを実証する顕微鏡画像を示している。ES-2細胞の3D-管状構造が迅速に形成され、マトリゲルに播種後4時間以内に観察された。

【0424】

図6は、ES2卵巣癌細胞の3D-管状構造でソルチリンが検出されていることを示している。ES-2卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。図6Aは、12時間後、ウサギ抗ソルチリン抗体を用いた共焦点顕微鏡により、3D-管状構造内でソルチリン (SORT1) が検出されたことを示している。図6Bは、二次抗ウサギ抗体のみを用いて行った対照実験を示している。全体的な結果は、ソルチリン検出が特異的であることを示すものである。図6C及び図6Dは、抗ソルチリン (図6A) 及び二次抗体の (図6B) 検出用に使用した条件下で3D-管状構造の存在を実証するための、対照としての役割を果たすES-2癌細胞核のDAPI染色を示している。

【0425】

図7は、ソルチリン遺伝子サイレンシングがES-2卵巣癌細胞による血管擬態の形成に及ぼす作用を示している。ソルチリン発現を特異的に抑制したところ、血管擬態形成中に観察された3D-管状構造は、スクランブル siRNA に比べて強力に阻害された (図7A)。画像をOnimagin Technologiesに送り、Wimasys画像解析ソフトウェアを用いて総ループ数及び管の全長を定量分析した (図7B)。結果は、siRNAによるSortilin遺伝子サイレンシング後、ループ数及び管の全長が共に90%以上阻害されたことを示している。これらの結果は、ソルチリンが血管擬態における3D-管状構造の形成で重要な役割を果たすことを明らかに実証するものである。

【0426】

図8、図9、図10、及び図11は、抗癌薬 (ドキソルビシン、カバジタキセル、アルドキソルビシン、ドセタキセル) または植物化学物質 (クルクミン) と、ソルチリンを標的化するペプチド (単数または複数) との間の新規の結合体による、血管擬態阻害の例を示している。図8では、マトリゲル上のES-2卵巣癌の血管擬態を、非結合体化ドキソルビシンまたはドキソルビシン結合体化合物 (DoxKA) の存在下で実施した。図8Aは、24時間後に、漸増濃度のDoxKAが血管擬態の形成を強く阻害したことを示して

いる。図8Bは、W i m a s i s 画像解析ソフトウェアで解析された3D-管状構造を示している。結果を薬物濃度の関数としてプロットした。管の全長及びループ数について得られたD o x K A の I C ₅₀ 値は、図8Bに示すように、低いnM範囲(5~10nM)にある。ドキソルビシン誘導体(A l d o x o r u b i c i n) - 薬物結合体化合物の第2の例を図9に示す。アルドキソルビシンのペプチドに対する結合は、ドキソルビシンとは異なる。アルドキソルビシンの場合、薬物は、ペプチドのC末端に付加されたシステインアミノ酸残基で結合体化していた。使用したリンカーは、ドキソルビシンの場合のようにエステラーゼよりも酸性pHに感受性である。D o x K A 結合体における2個のドキソルビシン分子に対し、1個のみのアルドキソルビシン分子がペプチド上で結合体化したため、A l d o x K A は取込みの比も異なる。このことは、2個の異なるドキソルビシン分子から出発するプラットフォームの柔軟性を実証するものである。抗癌剤-薬物結合体化合物の第3の例を、図10A及び図10Bに示す。ドセタキセル-結合体化合物(D o c e K A) は、ドセタキセルよりも強力に血管擬態形成を阻害した。ループ数についてのI C ₅₀ 値は、この結合体の場合約30pMである。植物化学物質-結合体化合物を用いた別の例を図11に示す。このクラスの分子については、クルクミンをソルチリン標的ペプチドと結合体化させた(C u r K A)。クルクミンは、S K - H e p - 1 肝細胞癌細胞の管形成を阻害することが示唆されている(32)。3~30μMの範囲内において、クルクミンは用量依存的に細胞の管形成を阻害し、18~92%の阻害が観察された。図11は、C u r K A 結合体がnM濃度でE S - 2 卵巣血管擬態の形成に影響を及ぼすことを明確に示している。C u r K A は、結合体化されていないクルクミンに比べると、E S - 2 卵巣癌細胞の3D-管形成により強い影響を及ぼす。

【0427】

図12は、抗ソルチリンmAbが血管擬態を阻害することを実証するものである。12nMの濃度の非特異的マウスI g Gまたは抗ソルチリンmAbのいずれかの存在下で、E S - 2 卵巣癌細胞をマトリゲルに播種した。12時間後に撮影した画像からは、対照と比べた場合に、抗ソルチリンmAbはE S - 2 卵巣癌細胞の3D-管状構造の形成を妨げたが、マウスI g Gは作用が認められなかったことが示される。この抗ソルチリンmAbによる血管擬態阻害は、s i R N A によるソルチリン遺伝子サイレンシングを実施したときに観察されたものと非常に類似している(図6)。

【0428】

図13Aは、抗S O R T 1 mAbの結合及び内部移行を示している。図13Aは、蛍光色素A l e x a 4 8 8 で標識した抗ソルチリン抗体が、卵巣癌細胞の細胞表面で受容体ソルチリンに結合することを実証している。抗ソルチリン抗体をA l e x a F l u o r 4 8 8 で標識して、抗ソルチリン-A l e x a 4 8 8 抗体を生成した。ヒトE S - 2 卵巣癌細胞を、抗ソルチリン-A l e x a 4 8 8 抗体(1μg/ml)と共に30分間インキュベートし、次にトリプシン処理を行いまたは行わずに、細胞表面での結合を評価した。結果は、トリプシン処理によって蛍光レベルが90%超低減したことから、大部分の蛍光シグナルが細胞表面のソルチリン受容体への結合によって生じたことを明確に実証している。図13Bでは、ヒトE S - 2 卵巣癌細胞の細胞表面での抗ソルチリン-A l e x a 4 8 8 の結合(1μg/ml、30分)がソルチリンリガンド(ニューロテンシン(NT)及びプログラニリン(PGRN))によって阻害された。加えて、K a t a n a ペプチド(K B P 1 0 6 及びK B P 2 0 1) (ソルチリンにも認識される)の存在下でのインキュベートによって、蛍光抗体の結合が強力に低減した。全体的には、これらの結果は、ソルチリンリガンドとK a t a n a ペプチドとの相互作用が、蛍光抗ソルチリン抗体による受容体の標識及び認識を妨げることを示すものである。

【0429】

図13Cの結果は、抗ソルチリン抗体が蛍光色素結合体を癌細胞に内在化させ得ることを示している。この実験では、ヒトE S - 2 卵巣癌細胞への抗ソルチリン-A l e x a 4 8 8 抗体の結合(1μg/ml、30分)を最初に4℃で実施し、次いで細胞を洗浄して未結合の蛍光抗体を除去し、細胞を37℃で1時間または2時間インキュベートし、次い

でトリプシン処理した。これにより、抗ソルチリン-Alexa 488 結合体の細胞への経時的な内部移行が可能になる。次いで、内在化された蛍光抗体に関連する蛍光をフローサイトメトリーによって定量化した。結果は、最初に細胞表面に結合した抗ソルチリン-Alexa 488 抗体の約 50% が 2 時間以内に内在化したことを示している。抗ソルチリン-Alexa 488 抗体の内部移行を漸増濃度で測定した (図 13D)。結果は、抗ソルチリン-Alexa 488 蛍光結合体の内在化が、蛍光結合体濃度の関数として増加し、飽和可能であったことを実証している。

【0430】

図 14 は、ソルチリンの種々の領域と、本開示で使用される抗ソルチリン抗体が生成された領域との概略図を示している。抗ソルチリン mAb #1 (抗 SORT1 mAb #1) は、EMB Millipore (カタログ番号 MABN1792) から入手した。この抗体の免疫原は、ソルチリンの細胞外ドメイン、すなわちアミノ酸残基 78~755 にある。抗ソルチリン mAb #2 (抗 SORT1 mAb #2) は、BD Bioscience (カタログ番号 612100) から入手した。この抗体の免疫原は、このタンパク質の細胞外ドメインの一部に対応するソルチリンのアミノ酸残基 300~422 である。

【0431】

図 15 は、抗ソルチリン抗体による卵巢癌細胞の血管擬態の阻害を示している。ビヒクル (対照)、マウス IgG ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 25 nM))、または抗 SORT1 mAb #1 ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 25 nM))、または抗 SORT1 mAb #2 ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 25 nM)) の存在下で、ES-2 卵巢癌細胞をマトリゲルに播種した。ES-2 細胞を抗体に 12 時間曝露した後、3D-管状構造の形成は、抗ソルチリン mAb #1 及び抗ソルチリン mAb #2 によって強力に阻害された。このことは、これらの mAb が総ループ数 (図 16A) 及び管の全長 (図 16B) に及ぼす影響から分かる。

考察

【0432】

理論に束縛されることは望まないが、血管擬態は、様々な癌の患者におけるより攻撃的な腫瘍表現型及び不良な予後に関連する現象であると考えられる。多くのタイプの癌におけるソルチリンの過剰発現が、癌の生存、浸潤、及び進行に関連しているため、この受容体を結合体化合物、抗体、または結合体抗体で標的化することで、これらの腫瘍内の抗癌剤の結合/内在化を高める効率的な方法がもたらされ得る。本明細書で開示される結果は、ソルチリンを標的化する/ソルチリンと相互作用する結合体化合物、mAb、及びこれらの誘導体が血管擬態を強力に阻害したことを明確に示すものである。

実施例 2：ソルチリン受容体媒介性癌治療：卵巢癌及び乳癌における血管擬態阻害のための標的化アプローチ

背景

【0433】

血管擬態は、攻撃的、転移性、及び遺伝的に脱制御された腫瘍細胞による微小血管チャネルの形成として定義される。この微小循環系は、内皮細胞に非依存的に、酸素及び栄養を腫瘍細胞に提供する。血管擬態は、卵巢癌及びトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) で発生しており、癌患者の全生存率低下と相関することが示されている。このようなプロセスは、部分的には現在の化学療法抵抗性に寄与し、腫瘍の進行及び癌転移の伝播を促進する。そのため、卵巢及び TNBC 腫瘍における血管擬態を標的化することは、癌治療に寄与し得る。スカビンジング受容体であるソルチリンは、癌細胞において主要な機能を果たすことがすでに知られているが、本明細書では、ソルチリンがさらに、血管擬態において新たな役割を果たしていることを報告する。ソルチリンを介したペプチド-薬物結合体による血管擬態を標的化することが、卵巢及び TNBC において検討された。

【0434】

方法

癌細胞の *in vitro* 血管擬態を、マトリゲル管形成アッセイを用いて評価した。

簡潔に説明すると、96ウェルプレートの各ウェルをマトリゲルでプレコーティングした。ES-2 卵巣癌またはMDA-MB-231 TNBC細胞浮遊液をマトリゲル上部に播種した。3D-管状構造を解析し、Wimasiss解析ソフトウェアを用いて定量化した。xCeLLigenceシステムを用いて、リアルタイム細胞移動を評価した。特異的siRNAを用いて、ソルチリン遺伝子サイレンシングを実施した。ソルチリンを標的化する式：アセチル-GVRAK（ドキシソルピシン）AGVRN（Nle）FK（ドキシソルピシン）SESY（式（XXVII））で表されるドキシソルピシン-KA-ペプチド結合体（DoxKA）KBA-106及び式：アセチル-GVRAK（ドセタキセル）AGVRN（Nle）FK（ドセタキセル）SESY（式（XXII））で表されるドセタキセル-KA-ペプチド結合体（DocKA）が、血管擬態及び細胞移動に及ぼす作用を定量化した。

10

【0435】

結果

ソルチリンは、マトリゲル上の3D-管状構造で発現し、卵巣癌及びTNBCにおける血管擬態に必須であることが分かった。ソルチリン発現を特異的に抑制したところ、血管擬態中に観察された3D-管状構造が強く阻害された。さらに、抗ソルチリンmAbは血管擬態の発生を妨げたが、非特異的IgGには作用が認められなかった。興味深いことには、ソルチリンを標的化するペプチド-薬物結合体、DoxKAまたはDocKAは、結合体化されていない遊離薬物よりも強力に血管擬態を阻害した。血管擬態阻害についてのDoxKA及びDocKAのIC₅₀値は、低nM〜pM濃度の範囲内であった。また、DoxKA及びDocKA結合体は共に、ソルチリン依存的プロセスにおけるES-2及びMDA-MB-231癌細胞移動も阻害した。

20

【0436】

結論

これらの結果は、血管擬態におけるソルチリン受容体の重要な役割を同定するものである。さらに重要なことには、ソルチリンを標的化するペプチド-薬物結合体の設計は、TNBC及び卵巣癌の患者におけるより攻撃的な腫瘍表現型及び不良な予後に関連する現象である血管擬態を強力に阻害することが判明している。本発明者らのペプチド-薬物結合体プラットフォームは、受容体媒介性化学療法及びソルチリン陽性癌のより効率的な治療管理に対し、前臨床の分子的な見識をもたらすものである。

30

実施例3：ソルチリン受容体媒介性癌療法による抗癌剤の効力及び安全性の増大：卵巣癌治療のための標的化アプローチ

【0437】

背景

卵巣癌に対する個別化療法の開発は、現在の腫瘍学では依然として非常に困難である。癌細胞に対するより高い選択性を達成しより良好に抗癌剤送達を達成するための1つの戦略は、癌細胞上で豊富かつ／または排他的に発現する標的受容体を選択的に標的化する特定のペプチドリガンドに細胞傷害性薬剤を結合体化させることである。スカビンジン受容体であるソルチリンの発現増加は、浸潤性卵巣癌生検において臨床的に観察されており、腫瘍悪性度と相関している。これを踏まえて、本発明者らは、抗癌剤の細胞標的選択性及び細胞送達有効性を高めるためのペプチド結合体プラットフォーム及びソルチリン受容体媒介性ベクター化戦略を開発した。

40

方法

【0438】

概念実証として、ドキシソルピシンをソルチリン結合ペプチド（KA-ペプチド）に結合体化させた。in vitroで、式アセチル-GVRAK（ドキシソルピシン）AGVRN（Nle）FK（ドキシソルピシン）SESY（式（XXVII））で表されるドキシソルピシン-KA-ペプチド結合体（DoxKA）KBB-106の細胞内送達を、ES-2及びSKOV-3卵巣癌細胞株モデルでフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡を用いて評価した。特異的siRNAを用いて、ソルチリン遺伝子サイレンシングを実施した。E

50

S-2 (CD1ヌードマウス) 及びSKOV-3 (無胸腺マウス) 皮下異種移植片モデルを用いて、DoxKAの有効性及び安全性を*in vivo*で評価した。

【0439】

結果

DoxKAの取込みは、試験した両方のソルチリン陽性卵巣癌細胞株で観察され、これは、ソルチリン発現が特異的にサイレンシングされたとき、またはソルチリンリガンドであるニューロテンシン及びプログラニュリンと競合したときに減少した。結果は、DoxKAの取込みが、ドキソルビシンの単純な拡散とは対照的に、ソルチリン媒介性エンドサイトーシスを介し発生することを示している。DoxKAの取込みはP-糖タンパク質 (P-gp) 阻害薬シクロスポリンAの影響を受けず、そのためDoxKAは、P-gpを過剰発現するMDCK-MDR1細胞におけるP-gp排出ポンプをバイパスすることが分かった。*in vivo*では、DoxKAはドキソルビン単独よりも低い潜在的副作用を示し、心臓及び卵巣などの健康な組織への蓄積が減少した。DoxKAは、マウスにおいてヒト卵巣腫瘍異種移植片の増殖をより強力に阻害し、等価用量の結合体化されていないドキソルビンよりも忍容性が良好であった (白血球減少及び好中球減少が認められず)。

【0440】

結論

これらの結果は、第1相臨床試験における開発の次の段階において、ソルチリン陽性腫瘍を特異的に標的化する新規の個別化治療薬を生成するために、将来的にこのプラットフォームを臨床使用することを支持するものである。

実施例4：ソルチリン陽性トリプルネガティブ乳癌の治療のためのドセタキセル-ペプチド結合体

【0441】

背景

トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は、定義された分子バイオマーカーが未だに欠如している不均質な疾患である。過去10年間に於いて、最も優れた抗癌戦略の中で、腫瘍の特異的遺伝子/タンパク質分子シグネチャーの標的化が浮上した。最近、TNBC患者においてソルチリン (SORT1) 受容体の発現増加が報告されている。本発明者らは、タンパク質の内在化、選別、及び輸送におけるSORT1の機能を考慮し、SORT1を特異的に標的化するペプチド (KA-ペプチド) にドセタキセルを結合することにより、SORT1陽性乳癌を標的化するペプチド-抗癌剤結合体化プラットフォームを開発した。

【0442】

方法

MDA-MB-231細胞を、*in vitro*及び*in vivo*異種移植片 (CD1ヌードマウス) アッセイのためのTNBC細胞モデルとして使用した。細胞移動はxCELLigenceリアルタイムシステムを用いて評価し、細胞増殖解析にMTTアッセイを使用した。アポトーシスバイオマーカー発現を免疫ブロット法により評価した。

【0443】

結果

MDA-MB-231細胞において、ドセタキセル-KA-ペプチド結合体 (DocEKA) KBA-106 (式: アセチル-GVRAK (ドセタキセル) AGVRN (Nle) FK (ドセタキセル) SESY-式 (XXIII) によって表される) は、*in vitro*で強力な抗増殖活性及び抗移動活性を発揮した。実験結果を図17~29に示す。DocEKAは、遊離ドセタキセル単独よりも迅速かつ高い細胞死の機序を誘発した。アポトーシス及び抗移動作用は、SORT1リガンドであるニューロテンシン及びプログラニュリンによって、ならびにSORT1のsiRNA媒介性サイレンシングによって逆転された。DocEKAは微小管重合を改変し、IL-6、サバイビン、Bcl-xL、及び変異p53生存促進バイオマーカーの下方制御を誘発した (詳細には図22を参照)。*in vivo*では、DocEKAは、マウスMDA-MB-231異種移植片腫瘍モデ

ルにおいて、ドセタキセルよりも長い生存率と共により大きな腫瘍退行能力を示した。

【0444】

結合体化ドセタキセル（D o c e K A）と比べたドセタキセルの薬物動態（P K）パラメーターを以下の表2に示す。

【表13】

表2：ドセタキセルと結合体化ドセタキセル（D o c e K A）の薬物動態パラメーターの比較

パラメーター	ドセタキセル (10mg/kg)	D o c e K A (50mg/kg)
Cmax (μg/ml) Cmax (μmol/ml)	9.76 12.5	1617 437
AUC (μg/L*h) AUC (μmol/L*h)	4.8~17 6~21	2276 614
t1/2吸着分布(分)	7	6~20
t1/2消失(時)	1.2	1.5~2.5
CL (mL/h/kg)	2100	18
Vd (L/Kg)	2.2~5	0.04

【0445】

ドセタキセルのP Kデータは参考文献50及び51から入手した。P K s o l u t i o n s ソフトウェアを用いてD o c e K AのP K解析を行った。マウスにおけるドセタキセルのP Kは二相性であり、13~62mg/kgで線形である。CmaxはD o c e K Aではドセタキセル（20mg/kg）に比べて約1.8倍高い。曲線下面積（AUC）（組織曝露量）はD o c e K Aで約2.9倍高く、ドセタキセルに比べてD o c e K Aの組織曝露量が高いことを示している。両者の半減期は類似している。D o c e K Aの方がクリアランス（CL）及び分布容積（Vd）が低い。これらの予備データは、より多くのデータ（より短い時点及びより長い時点）で確認する必要がある。

【0446】

結論

まとめると、結果から、D o c e K Aが受容体媒介性機序を介し特異的に内在化されることが実証された。このような特性によって、S O R T 1陽性乳癌の標的化が可能になり、D o c e K AはT N B Cの治療のための有望な新規療法となる。

実施例5：様々な癌におけるS O R T 1の過剰発現

【0447】

図30~図40において、ソルチリンは、様々な癌、病理学的サブタイプ、及び癌サブタイプで過剰発現することが示されており、このような癌には、例えば、卵巣癌（例えば、上皮卵巣癌）、乳癌（例えば、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、管腔A、管腔B、H E R 2+、T N B C）、脳癌、黒色腫、子宮癌（例えば、子宮内膜癌及び子宮頸部癌）、ならびに肺癌が含まれる。乳癌におけるS O R T 1発現及び臨床病理学的パラメーターとの関連が示されている。これを下記の表3に示す。

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 3：乳癌における S O R T 1 発現と臨床病理学的パラメーターとの間の関連

乳癌	ソルチリン+
病理学的タイプ	
・浸潤性乳管癌	7 9 %
・浸潤性小葉癌	5 4 %
乳癌のサブタイプ	
・管腔 A	6 6 %
・管腔 B	7 3 %
・H E R 2 +	7 9 %
・T N B C	5 9 %

10

【 0 4 4 8】

ソルチリンは、胃腸管、膵臓、骨髄、脳、及び腎臓などの正常組織で発現する。H E R 2 は、肝臓、胃腸管、膵臓、骨髄、乳房などの正常組織で発現する。全ての卵巣癌がソルチリンを過剰発現する（1 0 0 %）のに対し、H E R 2 では 7 %である。S O R T 1 は乳癌の 6 6 %で過剰発現するのに対し、H E R 2 での発現は 1 0 ～ 1 5 %である。ソルチリン及び H E R 2 両方の標的は、以下の表 4 に示すように、種間で保存されている。

20

【表 1 5】

表 4：ヒトと比較した配列相同性

	マウス	ラット
ソルチリン	9 1 %	9 3 %
H e r 2	8 9 %	9 5 %

【 0 4 4 9】

実施例 6：卵巣癌及び乳癌の血管擬態ならびに i n v i t r o 及び i n v i v o の血管擬態阻害におけるソルチリンの役割

図 4 0 及び 4 4 では、ソルチリン受容体が卵巣癌及びトリプルネガティブ乳癌細胞における血管擬態の形成を導く初期事象に関与することが示されている。ソルチリンは、O V C A R - 3 及び E S - 2 卵巣癌細胞によって形成された 3 D - 管状構造で発現した（図 4 0 及び 4 4）。これらの結果は、ソルチリン陽性細胞が i n v i t r o の血管擬態に寄与することを示すものである。

30

【 0 4 5 0】

s i R N A 遺伝子サイレンシングによる血管擬態の阻害

ソルチリン発現を特定のソルチリン s i R N A によって特異的に抑制したところ、3 D - 管状構造は、M D A - M B 2 3 1 T N B C 細胞におけるスクランブル s i R N A に比べて強力に阻害された（図 4 2 A ～ D）。総ループ数及び管の全長の定量分析を、先の実施例で説明されているように実施した。結果は、s i R N A による S o r t i l i n 遺伝子サイレンシングにより、ループ数及び管の全長が 8 0 % 以上阻害されたことを示している（図 4 2 E 及び F）。これらの結果は、ソルチリンが 3 D - 毛細管様構造の形成にとって重要であることを確認するものである。

40

【 0 4 5 1】

ペプチド結合体による血管擬態の阻害

低 p M 濃度の D o c e K A は、E S - 2 卵巣癌細胞の血管擬態を阻害する（図 4 1）。D o c e K A は、ドセタキセル単独よりも強力に血管擬態を阻害した（図 4 3）。

【 0 4 5 2】

図 4 9 ～ 5 0 では、ソルチリンを標的化する K A - ペプチド薬物結合体が、卵巣癌細胞及び乳癌細胞の浸潤性表現型を抑制することにより、強力な抗血管擬態作用を示したことが示されている。E S - 2 卵巣癌の血管擬態を、K B P 1 0 6 ペプチドまたは結合体化ドキ

50

ソルビシン（KBB106）の存在下、マトリゲル上で評価した（図49及び50）。Katana結合体を使用した実験条件下では、ペプチド（KBP106）は50 μ Mまでにおいて血管擬態に顕著な作用をもたらしていない（図49）。ペプチド単独（KBP106）では血管擬態に作用しないという事実にもかかわらず、KBB106にペプチドを付加すると、ドキシソルビシン結合体（KBB106）の血管擬態阻害が妨げられる（図50）。これらの結果は、KBP106が、ソルチリンに結合することにより、KBB106と受容体との相互作用を妨げることを示唆するものである。

【0453】

図51～52では、ES-2 卵巣癌細胞において、ソルチリンリガンド、ニューロテンシン、及びプログラニュリンは血管擬態に作用しない（図51）が、KBB106への細胞曝露によって生じる血管擬態阻害を逆転させることが示されている。

【0454】

抗ソルチリンmAbによる血管擬態の阻害

図46～48において、血管擬態形成が抗ソルチリンmAbによってほぼ無効化されたことが示されている。ES-2 卵巣癌細胞を、非特異的マウスIgG、ウサギIgG、抗ソルチリンウサギpAb、または抗ソルチリンmAbのいずれかの存在下で、マトリゲル上部に播種した（図46）。結果は、抗ソルチリンmAbとのインキュベートにより、ES-2 卵巣癌における3D-管状構造の形成が妨げられたが、試験した他の抗体は作用が認められなかったことを示している（図46）。ES-2 卵巣癌細胞を漸増濃度の抗Sort1に曝露したところ、漸増濃度の抗Sort1が、より低い濃度よりも有効に3D-管状構造の形成を防止することが実証された（図47）。血管擬態を阻害する濃度の場合（12～24時間）、抗ソルチリンは、ES-2 癌細胞の増殖に対する作用が認められない。このことは、血管擬態阻害が細胞毒性作用に関連しないことを示すものである（図48）。以下の表5は、ES-2 卵巣癌細胞において様々な濃度の抗Sort1が管の長さ、分岐、及びループ数に及ぼす作用を示している。

【表16】

表5：様々な濃度の抗Sort1が血管擬態中に存在する管の長さ、分岐、及びループ数に及ぼす作用

試料名	対照 (n=1)	対照 (n=2)	SORT 0.25 μ g/mL (n=1)	SORT 0.25 μ g/mL (n=2)	SORT 0.5 μ g/mL (n=1)	SORT 0.5 μ g/mL (n=2)
管の全長（ピクセル）	34102	32769	33065	33384	33558	33281
総分岐点数	455	417	408	418	411	431
総ループ数	173	160	171	166	168	157

【表17】

表5（続き）

試料名	SORT 1 μ g/mL (n=1)	SORT 1 μ g/mL (n=2)	SORT 2 μ g/mL (n=1)	SORT 2 μ g/mL (n=2)	SORT 4 μ g/mL (n=1)	SORT 2 μ g/mL (n=2)
管の全長（ピクセル）	29793	30395	28759	27470	11887	4307
総分岐点数	350	360	324	321	148	65
総ループ数	129	126	104	119	5	0

【0455】

実施例7：血管擬態形成中のソルチリン及びCD133の発現

図53～57では、ソルチリン及びCD133の両方が、ES-2 腫瘍異種移植片によって形成された血管擬態構造に存在することが示されている。腫瘍組織切片を最初にソルチリン、CD31、及びCD133に対する一次抗体とハイブリダイズさせるか、または

過ヨウ素酸シッフ（PAS）で染色した（図53）。次いで、切片を、PAS-抗-CD31、PAS-抗-ソルチリン、またはPAS-抗-CD133のいずれかで共染色した（図54～57）。観察された血管擬態構造は、PAS陽性でCD31陰性であり、「VM」という語によって示されている。一方、血管は「血管」という語によって示され、CD31陽性である。ソルチリン及びCD133の染色はいずれも癌細胞と関連し、PAS染色にも部分的に関連していた。

【0456】

免疫組織化学検査による血管擬態の同定は以下のように行った。ホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍組織切片を、適切な一次抗体で染色して、CD31、CD133、及びソルチリンを検出した。次いで、切片を0.5%過ヨウ素酸溶液で15分間処置した。蒸留水で2分間すすいだ後、組織切片を暗室で15～30分間シッフ溶液に入れ、次いで蒸留水で3回すすいだ。その後、切片をヘマトキシリンで対比染色した。3D-管状構造は、ヘマトキシリン-エオシン染色スライド中のCD31陰性腫瘍細胞によって形成されることが認められた。次いで、CD31/過ヨウ素酸シッフ（PAS）二重染色により血管擬態が確認され、腫瘍細胞（内皮細胞ではない）に囲まれたPAS陽性ループの検出により同定された。CD133及びソルチリンに対する免疫組織化学染色については、癌組織切片からのホルマリン固定及びパラフィン包埋スライドを脱パラフィンし、従来の方法で再水和した。その後、内在性ペルオキシダーゼを遮断するためにスライドを3% H₂O₂と共にインキュベートし、次いで非特異的結合を低減するために20%ヤギ血清と共にインキュベートした。マウス抗ヒトCD133モノクローナル抗体（クローンCD133、Miltenyi Biotec）を、リン酸緩衝食塩水で洗浄した後、1:50の希釈度でスライドに添加した。次いで、スライドを4℃で終夜インキュベートした。翌日、スライドをペルオキシダーゼ結合体化ウサギ抗マウス二次抗体（DakoCytomation, Carpinteria, Calif, USA）中で30分間、1:200でインキュベートした。反応を可視化するためにジアミノベンジジンを使用した。最後に、スライドをヘマトキシリンで対比染色した。

【0457】

図44及び45では、血管擬態3D-管状構造の形成中にソルチリン及び癌幹様CD133遺伝子の発現が増加することが示されている。

【0458】

ソルチリン、CD133、及びMMP9の遺伝子発現は、ES-2卵巣癌細胞（図44）及びMDA-MB-231細胞（図45）による3D-管状構造の形成中の逆転写及び定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）によって評価した。ES-2卵巣癌細胞によるこれらの毛細管様構造の形成中、ソルチリン遺伝子発現は2時間後に急速に増加し、24時間にわたって高いまま保たれた（図44）。CD133及びMMP9遺伝子発現は、血管擬態形成中に4倍以上経時的に増加した。CD133は、腫瘍からの癌幹細胞（CSC）集団の単離で最も一般的に使用されるマーカーの1つである。CD133+癌細胞（CSC）は、血管擬態形成、局所再発、及び遠隔転移と正方向に関連していた。MDA-MB-231における血管擬態の場合（図45）、ソルチリン及びCD133遺伝子発現は、経時的にわずかに増加し、MMP9は約2倍増加した。このことは、MDA-MB-231の場合、血管擬態におけるCD133の寄与は、ES-2癌細胞がCD133遺伝子発現ではるかに強力な増加が観察されたのとは対照的に、控えめであり得ることを示唆するものである。

【0459】

実施例8：追加的なソルチリン陽性TNBC株モデルのスクリーニング

追加的なTNBC細胞株発現ソルチリンがスクリーニングされている。図58～59では、様々なトリプルネガティブ乳癌（TNBC）細胞株がソルチリン陽性細胞株であることが示されており（図58及び表6）、特に1つの株が3D-管状血管構造を形成することが確認されている（BT-20 TNBC細胞）（図59）。

10

20

30

40

50

【表 18】

表 6：TNBC 細胞株モデルの一覧

タイプ	サブタイプ	名称	組織診断
基底様形態	BL-1	HCC1599	原発性乳管癌
		HCC1937	原発性乳管癌
		HCC1143	原発性乳管癌
		MDA-MB468	腺癌
		HCC38	原発性乳管癌
	BL-2	HCC70	原発性乳管癌
		HCC1806	原発性棘融解型扁平上皮癌
	IM	HCC1187	原発性乳管癌
		DU4475	癌腫
間葉様形態	M	BT-549	乳管癌
	MSL	Hs578T	癌腫
		MDA-MB231	腺癌
		MDA-MB436	腺癌
		MDA-MB157	髄様癌
LAR	LAR	MDA-MB453	癌腫
未分類の形態		BT-20	癌腫
		HCC1395	原発性乳管癌

【0460】

本開示の段落【0062】～【0458】の実施形態は、適用可能な場合、実施形態のあらゆる組合せがなされ得ることを実証できるように、本開示においてそのような方式で提示されている。したがって、これらの実施形態は、全ての実施形態に対し、（先に提示された実施形態を網羅する）先行する請求項のいずれかに依存する従属請求項を作成するのと同等の方式で本明細書に提示され、それにより、これらがあらゆる可能な方法と一緒に組み合わせられ得ることを示している。例えば、段落【0062】～【0458】の実施形態及び段落【0005】～【0064】に提示された様々な態様との間の全ての可能な組合せは、適用可能な場合、本開示によって網羅される。

参考文献

1. World Cancer Report, 2014.
2. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. Recent advances in cancer therapy: an overview. Curr Pharm Des 2010;16:3-10.
3. Fisher R, Puzstai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. Brit J Cancer 2013;108:479-485.
4. Zhao P, Astruc D. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. Chem Med Chem 2012;7:952-72.
5. Ophir E, Bobisse S, Coukos G, Harari A, Kandalaft LE. Personalized approaches to active immunotherapy in cancer. Biochim Biophys Acta 2016;1865:72-82.
6. Sapiezynski J, Taratula O, Rodriguez-Rodriguez L, Minko T. Precision targeted therap

y of ovarian cancer. *J Cont Rel* 2016;243:250–268.

7. Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloue F, Jauberteau MO. The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014;13:1354–65.

8. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:302–309.

9. Carlo AS, Nykjaer A, Willnow TE. Sorting receptor sortilin—a culprit in cardiovascular and neurological diseases. *J Mol Med* 2014;92:905–11.

10. Schmidt V, Willnow TE. Protein sorting gone wrong—VPS10P domain receptors in cardiovascular and metabolic diseases. *Atheroscler* 2016;245:194–9.

11. Wilson CM, Naves T, Al Akhrass H, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloue F, Jauberteau MO. A new role under sortilin's belt in cancer. *Com Integr Biol* 2016;9:e1130192.

12. Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasyvoulou C, Simons P, Cowen T. ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1119:208–15.

13. Lewin GR, Nykjaer A. Pro-neurotrophins, sortilin, and nociception. *Eur J Neurosci* 2014;39:363–74.

14. Mazella J, Vincent JP. Internalization and recycling properties of neurotensin receptors. *Peptides* 2006;27:2488–92.

15. Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M, Richner M, Erdmann B, Nyengaard JR, Tessarollo L, et al. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* 2011;14:54–61.

16. Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO, Mathonnet M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PloS One* 2011;6:e25097.

17. Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, Botto JM, Mazella J, Vincent JP. Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 2001;92:503–9.

18. Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, Pincelli C. Neurot

10

20

30

40

50

rophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008;128:2031–40.

19. Giorgi RR, Chile T, Bello AR, Reyes R, Fortes MA, Machado MC, Cescato VA, Musolino NR, Bronstein MD, Giannella-Neto D, et al. Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol* 2008;20:1052–7.

20. Xiong J, Zhou L, Yang M, Lim Y, Zhu YH, Fu DL, Li ZW, Zhong JH, Xiao ZC, Zhou XF. ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro Oncol* 2013;15:990–1007.

21. Hemmati S, Zarnani AH, Mahmoudi AR, Sadeghi MR, Soltanghoraee H, Akhondi MM, Tarahomi M, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H. Ectopic Expression of Sortilin 1 (NTR-3) in Patients with Ovarian Carcinoma. *Avicenna J Med Biotechnol* 2009;1:125–31.

22. Ghaemimanesh F, Ahmadian G, Talebi S, Zarnani AH, Behmanesh M, Hemmati S, Hadavi R, Jeddi-Tehrani M, Farzi M, Akhondi MM, Rabbani H. The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells. *Avicenna J Med Biotechnol* 2014;6:169–77.

23. Hosseini A, Ghorbani A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna J Phytomed.* 2015;5:84–97.

24. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013 49:3914–23.

25. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2726–32.

26. Clarijs R, Otte-Holler I, Ruiter DJ, de Waal RM. Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:912–8.

27. Kobayashi H, Shirakawa K, Kawamoto S, Saga T, Sato N, Hiraga A, Watanabe I, Heike Y, Togashi K, Konishi J, Brechbiel MW, Wakasugi H. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculoge

10

20

30

40

50

nic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6- (1B4M-Gd) (256). *Cancer Res.* 2002;62:860-6.

28. Maniotis AJ¹, Chen X, Garcia C, DeChristopher PJ, Wu D, Pe'er J, Folberg R. Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix. *Lab Invest.* 2002;82:1031-43.

29. Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med.* 2015;19:315-26.

30. Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong XY, Zhao N, Liu N. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2013;32:544-53.

31. Racordon D, Valdivia A, Mingo G, Erices R, Aravena R, Santoro F, Bravo ML, Ramirez C, Gonzalez P, Sandoval A, Gonzalez A, Retamal C, Kogan MJ, Kato S, Cuello MA, Osorio G, Nualart F, Alvares P, Gago-Arias A, Fabri D, Espinoza I, Sanchez B, Corvalan AH, Pinto MP, Owen GI. Structural and functional identification of vasculogenic mimicry in vitro. *Sci Rep.* 2017;7:6985.

32. Chiablaem K, Lirdprapamongkol K, Keerati chamroen S, Surarit R, Svasti J. Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition. *Anticancer Res.* 2014;34:1857-64.

33. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554.

34. Carter P, Merchant AM. Engineering antibodies for imaging and therapy. *Current Opinion in Biotechnology* 1997;8:449-454.

35. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988;332:323-327.

36. Foote J, Winter G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *Journal of Molecular Biology* 1992;224:487-499.

37. Yano S, Hsu RK, Landolfi NF, Vasquez M, Cole M, Tso JT, Bringman T, Laird W, Hudson D. A

10

20

30

40

50

humanized antibody specific for the platelet integrin gpIIb/IIIa. *The Journal of Immunology* 1994;152:2968-2976.

38. Pedersen JT, Henry AH, Searle SJ, Guild BC, Roguska M, Rees AR. Comparison of surface accessible residues in human and murine immunoglobulin Fv domains: implication for humanization of murine antibodies. *Journal of molecular biology* 1994;235:959-973.

39. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256:495-497.

40. Kozbor D, Roder JC. The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes. *Immunology Today* 1983, 4:72-79.

41. Cole SPC, Kozbor D, Roder JC. The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer. In: Reisfeld RA, Sell S, eds. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. New York: Alan R. Liss Inc. (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology) 1985, 27:77-96.

42. Ge H, Luo H. Overview of advances in vasculogenic mimicry - a potential target for tumor therapy. *Cancer Manag Res.* 2018;10:2429-2437.

43. Zhou Q, Zhifei C, Meimei B, Miele L, Sarkar FH, Wang Z. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2013 ;49 :3914-3923.

44. Yang, J. P. et al. Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis. *Angiogenesis* 2016 ;19:191-200.

45. Sun B, Zhang D, Zhao N and Zhao X. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget* 2017;8:30502-30510.

46. Liang J, Yang B, Cao Q, Wu X. Association of Vasculogenic Mimicry Formation and CD133 Expression with Poor Prognosis in Ovarian Cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2016;81:529-536.

47. Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

48. Navarro et al., 2002.

49. Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:40

10

20

30

40

50

3.

50. Bissery et al. 1995.

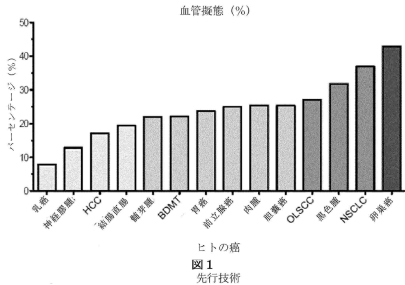
51. Clarke et al. 1999.

52. Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:2264-2268.

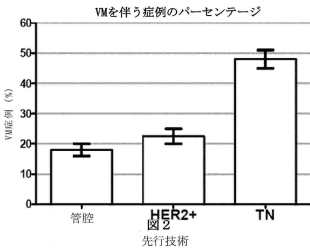
53. Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:5873-5877.

【図面】

【図 1】

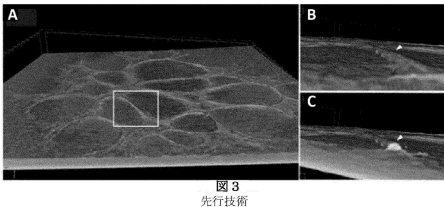


【図 2】

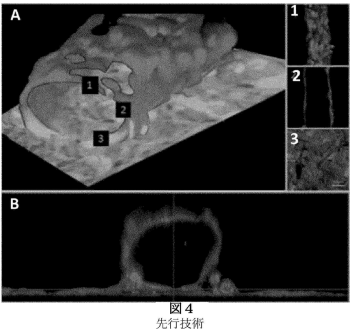


10

【図 3】



【図 4】



20

30

40

50

【図 5】

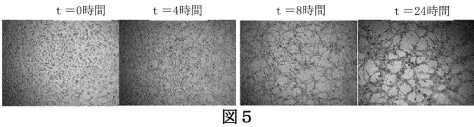


図 5

【図 6】

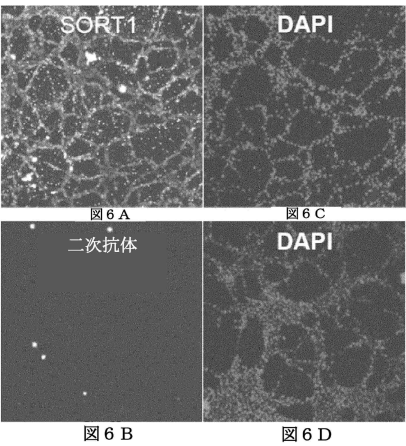


図 6 A

図 6 C

図 6 B

図 6 D

【図 7】

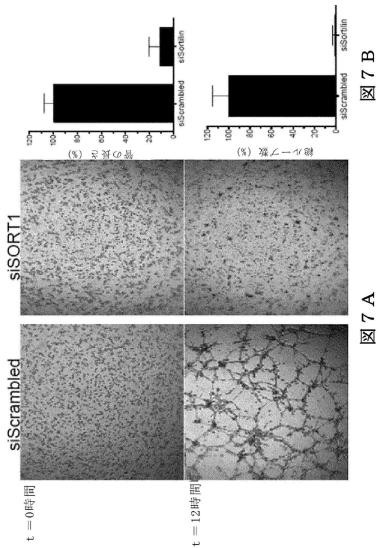


図 7 A

図 7 B

【図 8】

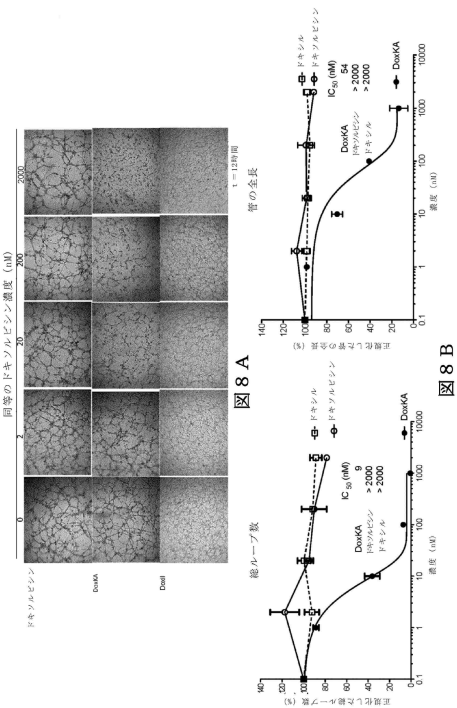


図 8 A

図 8 B

10

20

30

40

50

【図 9】

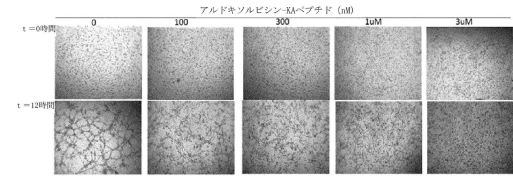
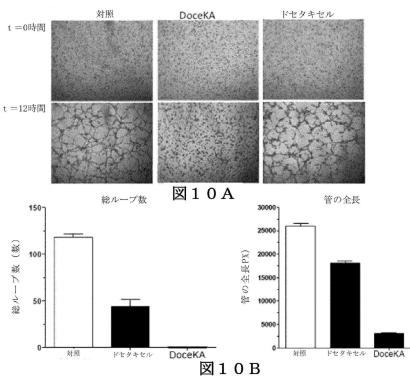


図 9

【図 10】



10

【図 11】

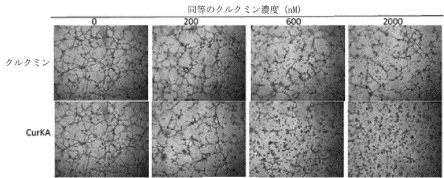
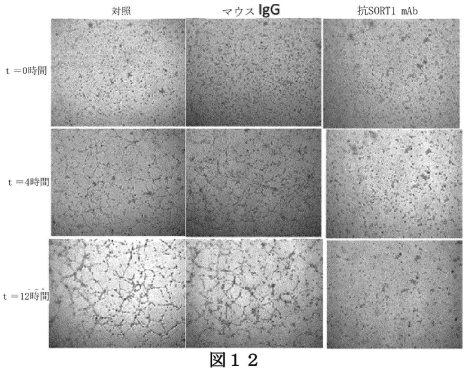


図 11

【図 12】



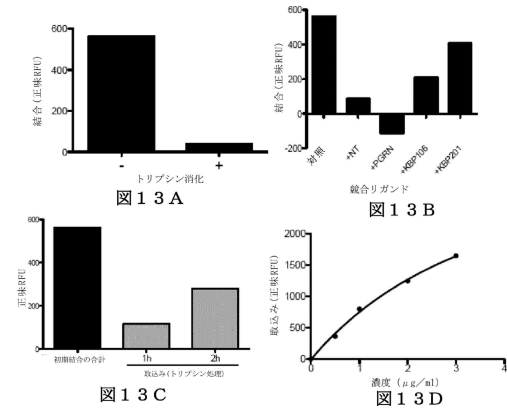
20

30

40

50

【図 1 3】



【図 1 4】

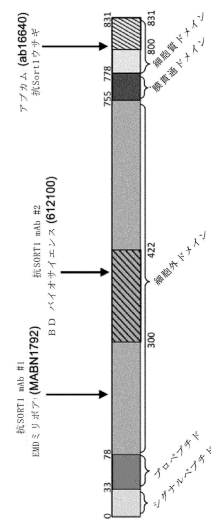


図 1 4

【図 1 5】

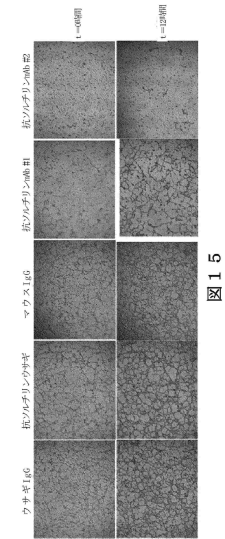


図 1 5

【図 1 6】

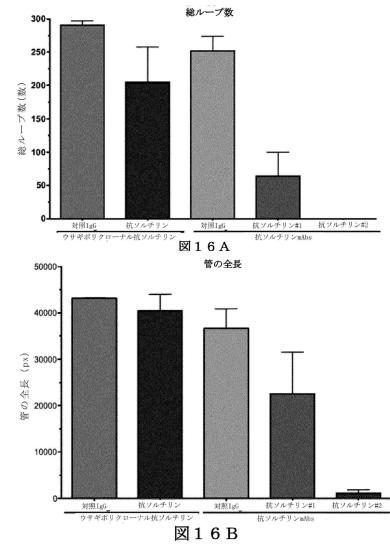


図 1 6 B

10

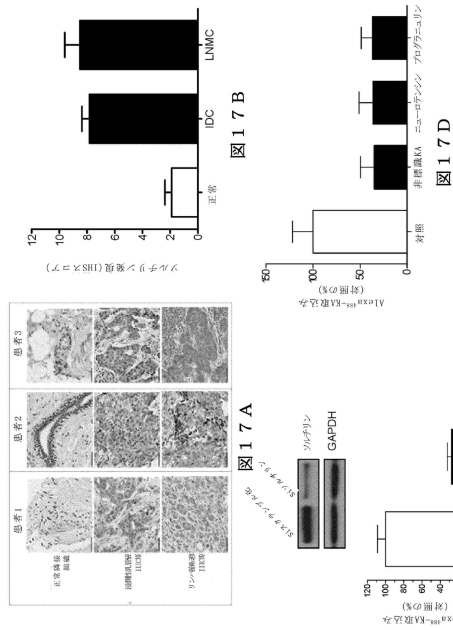
20

30

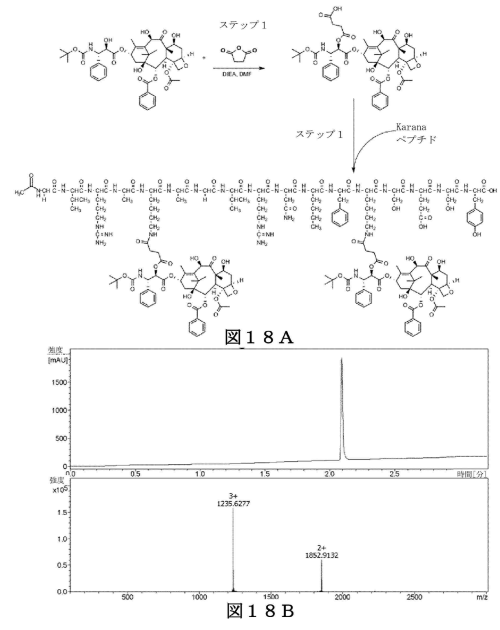
40

50

【図 17】

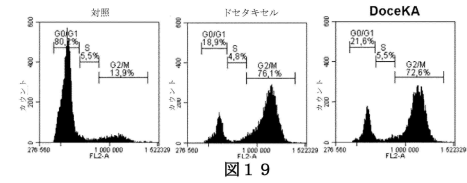


【図 18】

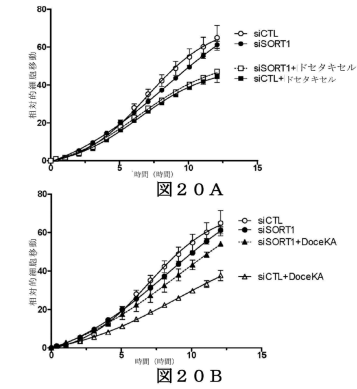


10

【図 19】



【図 20】



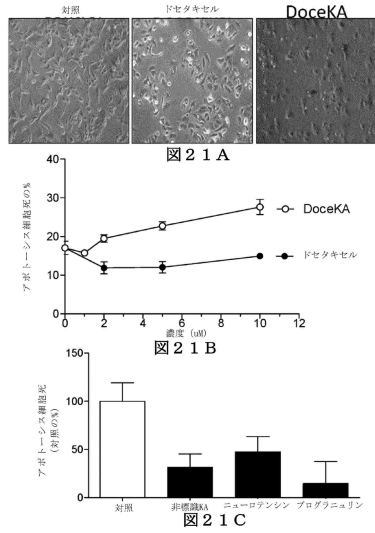
20

30

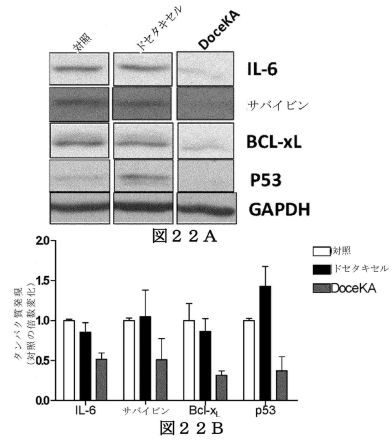
40

50

【図 2 1】

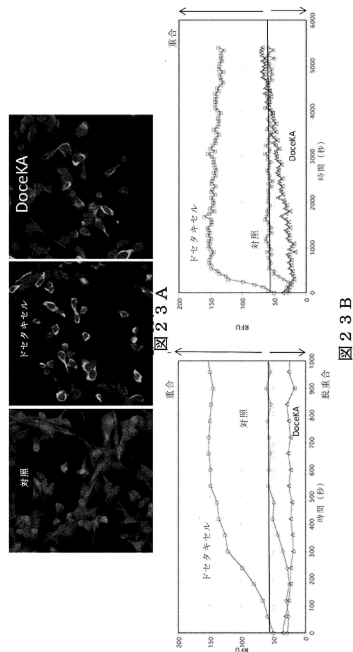


【図 2 2】

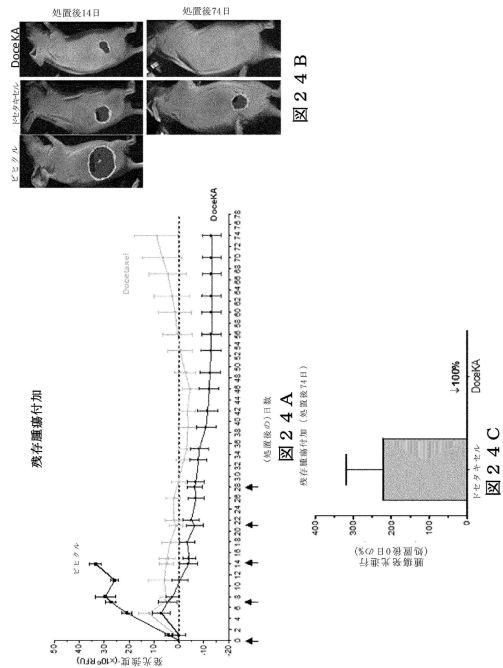


10

【図 2 3】



【図 2 4】



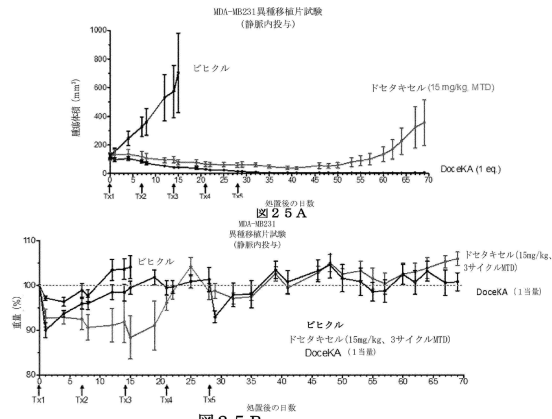
20

30

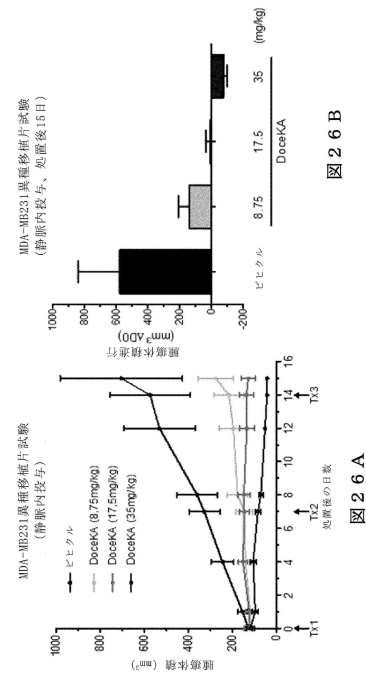
40

50

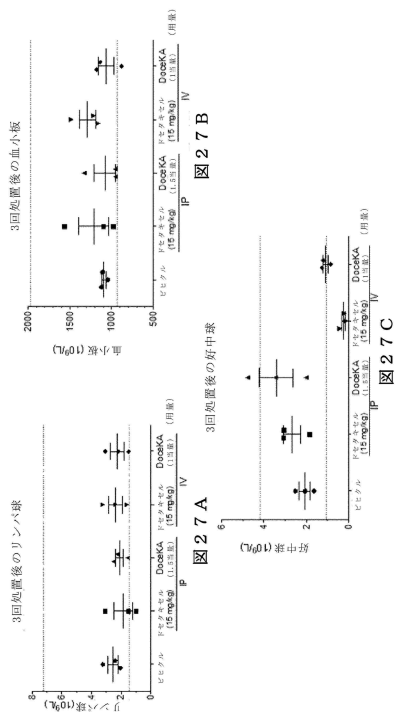
【図 2 5】



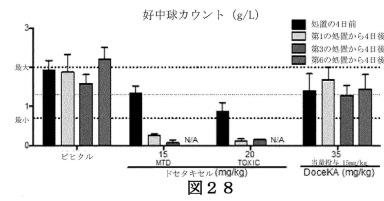
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

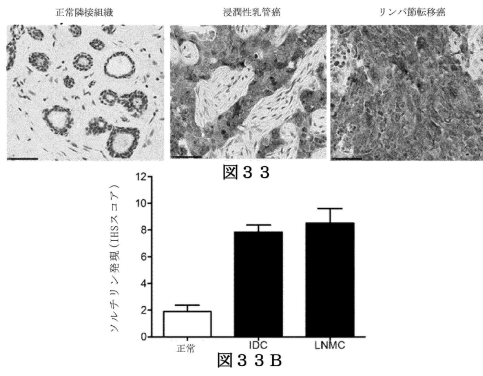
20

30

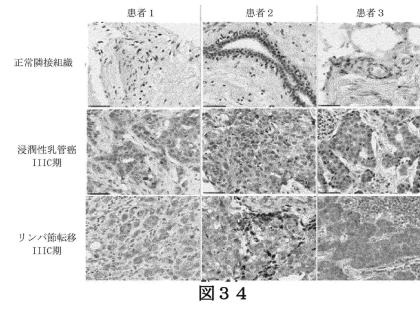
40

50

【図 3 3】

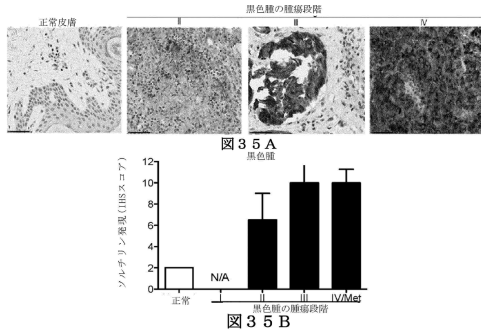


【図 3 4】

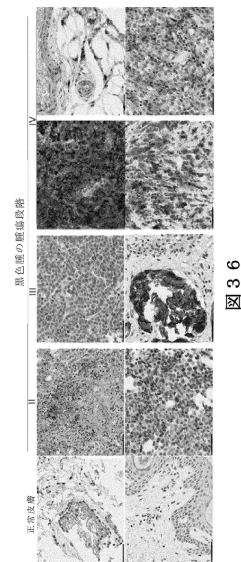


10

【図 3 5】



【図 3 6】



20

30

40

50

【図 37】

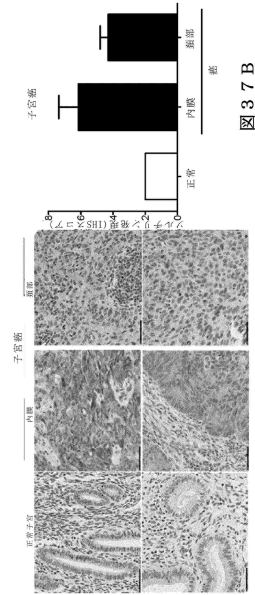


図 37 B

図 37 A

【図 38】

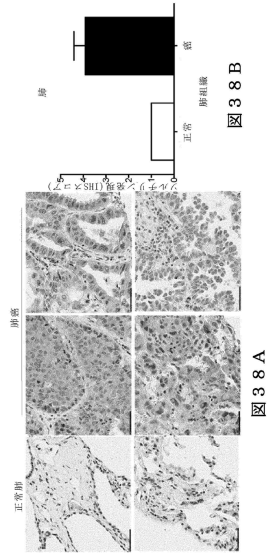


図 38 B

図 38 A

【図 39】

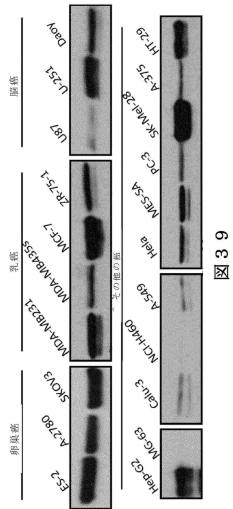


図 39

【図 40】

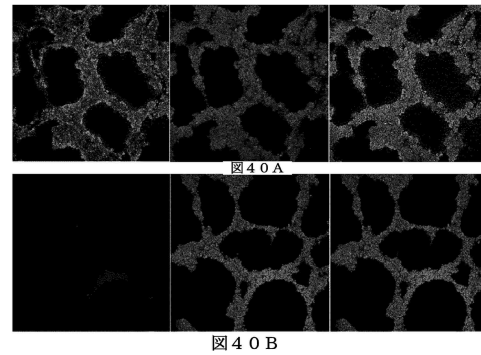


図 40 A

図 40 B

10

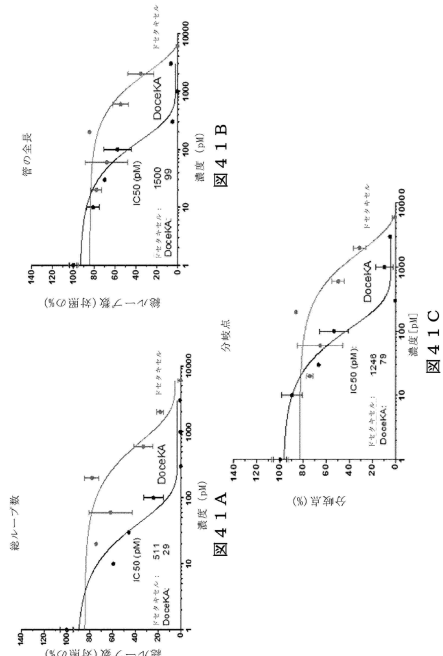
20

30

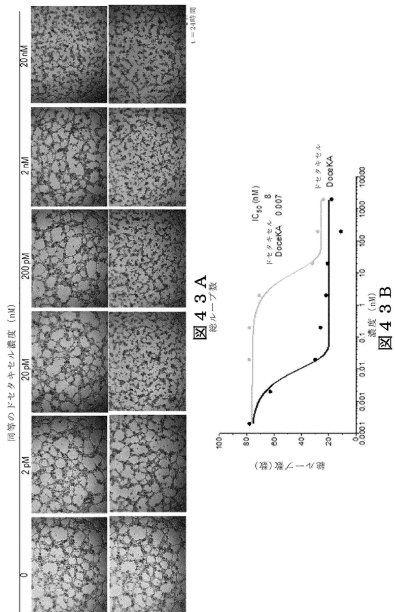
40

50

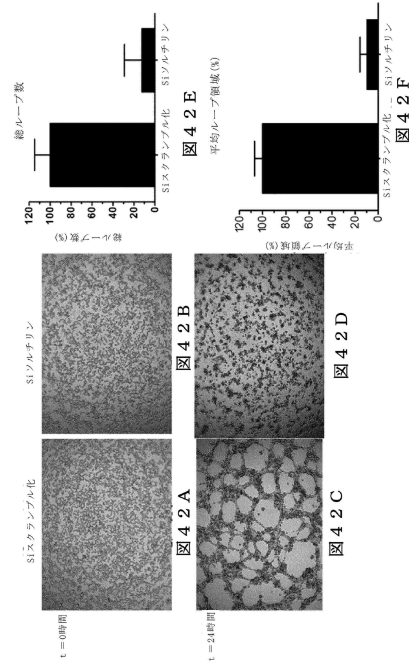
【図 4 1】



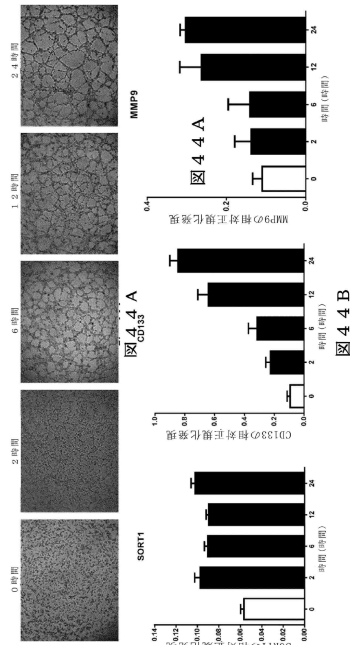
【図 4 3】



【図 4 2】



【図 4 4】



10

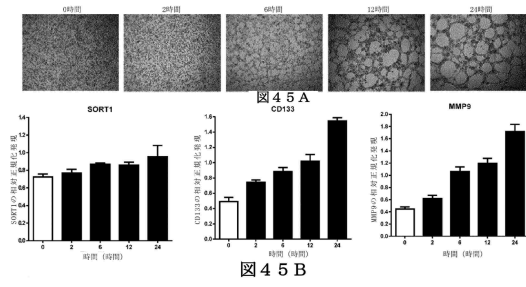
20

30

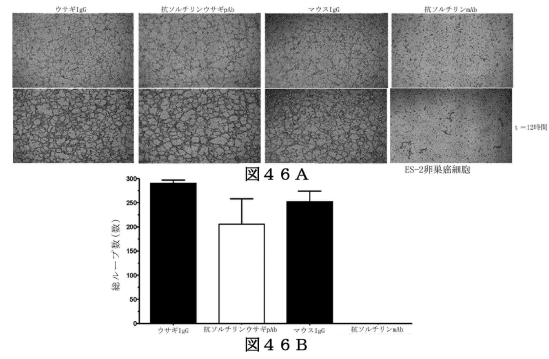
40

50

【図 4 5】



【図 4 6】



10

【図 4 7】

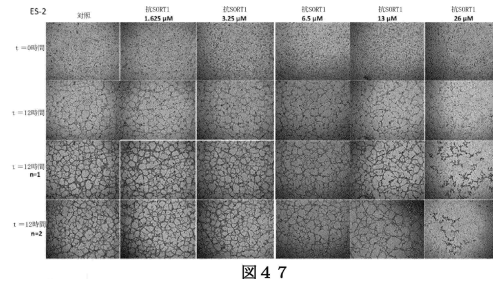


図 4 7

【図 4 8】

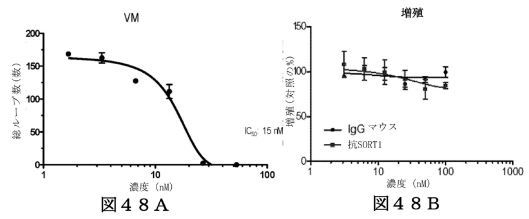


図 4 8 A

図 4 8 B

20

【図 4 9】

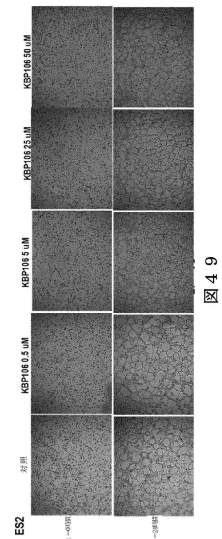


図 4 9

【図 5 0】

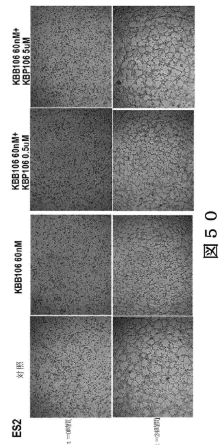


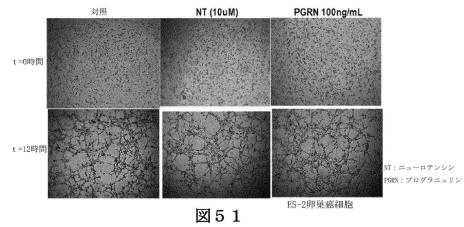
図 5 0

30

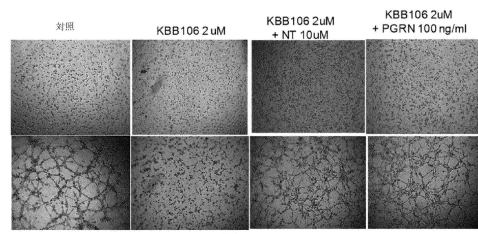
40

50

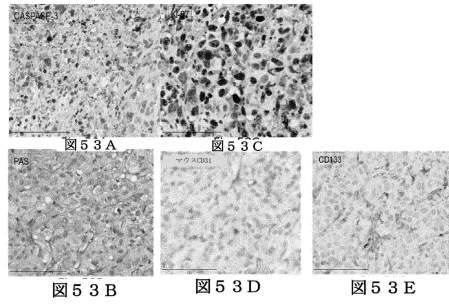
【図 5 1】



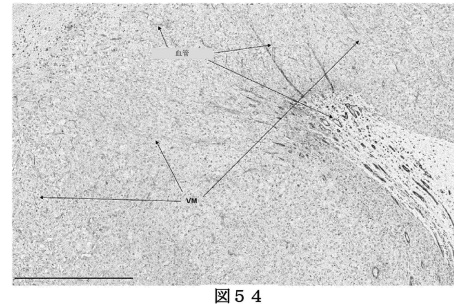
【図 5 2】



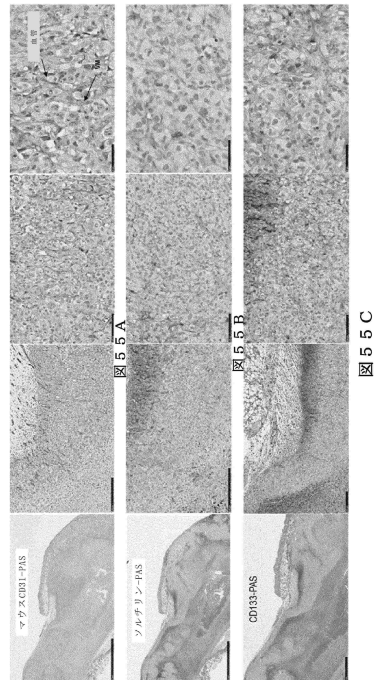
【図 5 3】



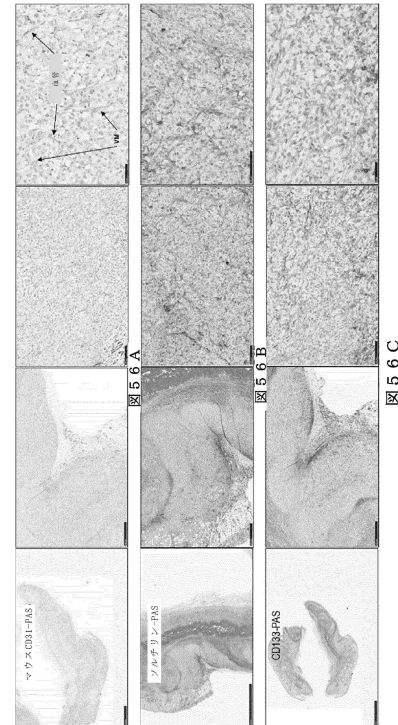
【図 5 4】



【図 5 5】



【図 5 6】



10

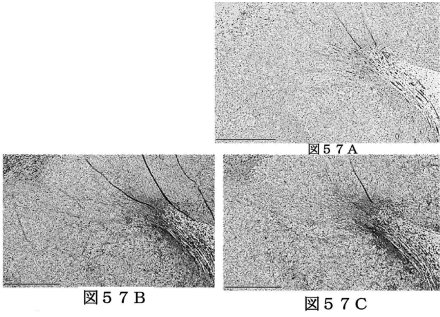
20

30

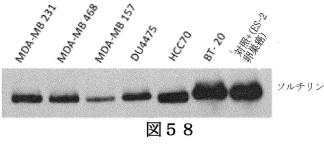
40

50

【図 5 7】

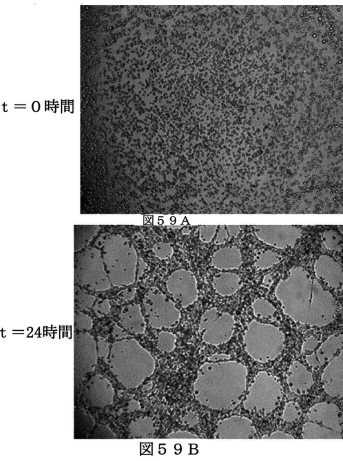


【図 5 8】



10

【図 5 9】



20

【配列表】

0007592320000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/12 (2006.01)	A 6 1 K	31/12	
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	31/706 (2006.01)	A 6 1 K	31/706	
A 6 1 K	31/454 (2006.01)	A 6 1 K	31/454	
A 6 1 K	31/5386 (2006.01)	A 6 1 K	31/5386	
A 6 1 K	38/07 (2006.01)	A 6 1 K	38/07	
A 6 1 K	31/7036 (2006.01)	A 6 1 K	31/7036	
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(72)発明者 デムール ミシェル

カナダ国 ケベック州 アシュ9ドゥブルヴェ 5ドゥブルヴェ7 ビーコンズフィールド モントロ
ーズ ドライブ 504

(72)発明者 ラロック アラン

カナダ国 ケベック州 アシュ4エール 2エール1 サン ローラン リュ ギイ ホフマン 2911

(72)発明者 キュリー ジャン クリストフ

カナダ国 ケベック州 ジ6ア 6セ9 ルパンティニー ルパンティニー リュ ロルド 2

(72)発明者 ズゲーブ アラン

カナダ国 ケベック州 アシュ2イクス 2エル6 モントリオール リュ サント ファミーユ 36
01 アパルトマン 1004

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 国際公開第2017/088058 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C 1 2 N

C 0 7 K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)