

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7579057号

(P7579057)

(45)発行日 令和6年11月7日(2024.11.7)

(24)登録日 令和6年10月29日(2024.10.29)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/166 (2006.01)

A 6 1 K 31/166

A 6 1 K 31/603 (2006.01)

A 6 1 K 31/603

A 6 1 K 31/618 (2006.01)

A 6 1 K 31/618

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00

請求項の数 6 (全100頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-534124(P2019-534124)

(86)(22)出願日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(65)公表番号 特表2020-506884(P2020-506884
A)

(43)公表日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(86)国際出願番号 PCT/AU2017/051439

(87)国際公開番号 WO2018/112545

(87)国際公開日 平成30年6月28日(2018.6.28)

審査請求日 令和2年12月10日(2020.12.10)

審判番号 不服2022-16116(P2022-16116/J
1)

審判請求日 令和4年10月7日(2022.10.7)

(31)優先権主張番号 2016905362

(32)優先日 平成28年12月23日(2016.12.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 505167565

ザ ユニバーシティ オブ クイーンズ
ランド
オーストラリア クイーンズランド州 セ
ントルシア

(74)代理人 110000109

弁理士法人特許事務所サイクス

(72)発明者 フランソワ マティアス

オーストラリア国 クイーンズランド州
4 0 7 2 セント ルシア (番地なし)

(72)発明者 ゴイッグ ヨハネス

オーストラリア国 クイーンズランド州
4 1 7 8 ワイナンワラ ストリート 4 9

(72)発明者 オーヴェルマン イェルン

オランダ国 ザ ハーグ 2 5 6 3 カーハ
最終頁に続く(54)【発明の名称】 血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病の処置のためのSOX18タンパク質
活性の阻害剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)の化合物、または、その薬学的に許容できる塩若しくは溶媒和物を含む、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病または障害の処置のための剤であって、前記血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病または障害が、肉腫、癌腫、リンパ腫、白血病および芽細胞腫からなる群から選択されるSOX18-依存性の癌であり、

式(I)の化合物は、

(Z)-N,N-ジエチル-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)ベンズアミド；

(E)-N,N-ジエチル-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)ベンズアミド；

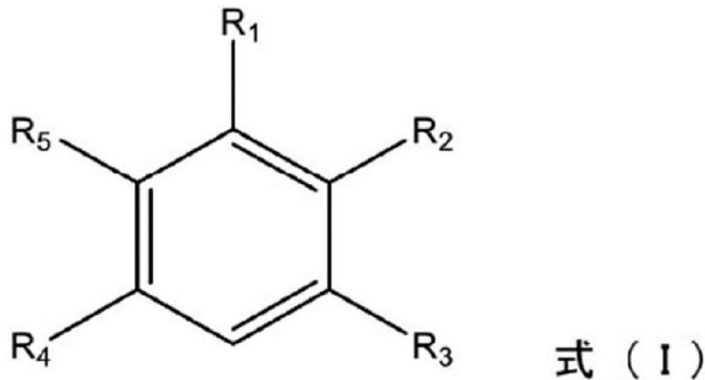
2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)安息香酸；および

2-(3,4,5-トリメトキシフェネチル)ナフタレン

から選択される化合物ではない、剤。

10

【化 1】



10

式中、

R_1 は、OH および OR_6 からなる群から選択され、ここで、 R_6 は $C_1 \sim C_4$ アルキルであり；

R_2 は、 $COOR_7$ および $C(O)NR_8R_9$ からなる群から選択され、ここで、 R_7 、 R_8 および R_9 は、独立して H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され；

R_3 は、 $L-A$ であり、ここで、 L は、 C_2 アルキレンおよび C_2 アルケニレンから選択されるリンカーであり、そして、 A は、ハロ、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $OC_1 \sim C_4$ アルキル、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4$ アルキル)、および $N(C_1 \sim C_4$ アルキル) $_2$ から選択される 1 以上の置換基で所望により置換されたナフチルであり；

20

R_4 は、H、 OR_{10} 、ハロおよび $C_1 \sim C_4$ アルキルからなる群から選択され、ここで、 R_{10} は、H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され；そして、

R_5 は、H、 OR_{11} 、ハロおよび $C_1 \sim C_4$ アルキルからなる群から選択され、ここで、 R_{11} は、H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択される。

【請求項 2】

癌が、前立腺癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、腎癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、結腸癌、結腸直腸癌、胃癌、頭頸部癌、肝臓癌、腎臓癌、皮膚癌、脾臓癌、下垂体癌、筋骨格系癌、血管腫(hemangioma、angioma)、血管肉腫、肝細胞腫および肝細胞癌腫からなる群から選択される、請求項 1 に記載された剤。

30

【請求項 3】

前記癌の転移が、予防および / または阻害される、請求項 1 または請求項 2 に記載の剤。

【請求項 4】

式 (I) の化合物が、

R_1 は、OH および OR_6 からなる群から選択され、ここで、 R_6 は $C_1 \sim C_4$ アルキルであり；

R_2 は、 $COOR_7$ および $C(O)NR_8R_9$ からなる群から選択され、ここで、 R_7 、 R_8 および R_9 は、独立して H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され；

R_3 は、 $L-A$ であり、ここで、 L は、 C_2 アルキレンおよび C_2 アルケニレンから選択されるリンカーであり、そして、 A は、ハロ、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $OC_1 \sim C_4$ アルキル、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4$ アルキル)、および $N(C_1 \sim C_4$ アルキル) $_2$ から選択される 1 以上の置換基で所望により置換されたナフチルであり；

40

R_4 は、H であり；そして、

R_5 は、H である、

請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載された剤。

【請求項 5】

式 (I) の化合物が、

R_1 は、OH であり；

R_2 は、 $COOR_7$ であり、ここで、 R_7 は、H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され

；

50

R_3 は、 $L - A$ であり、ここで、 L は、 C_2 アルキレンおよび C_2 アルケニレンから選択されるリンカーであり、そして、 A は、ハロ、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $OC_1 \sim C_4$ アルキル、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4$ アルキル)、および $N(C_1 \sim C_4$ アルキル) $_2$ から選択される 1 以上の置換基で所望により置換されたナフチルであり；

R_4 は、 H であり；そして、

R_5 は、 H である、

請求項 1 ～ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載された剤。

【請求項 6】

式 (I) の化合物が、

R_1 は、 OH であり；

R_2 は、 $COOH$ であり；

R_3 は、 $L - A$ であり、ここで、 L は、 C_2 アルキレンおよび C_2 アルケニレンから選択されるリンカーであり、そして、 A は、所望により、1 以上の、ハロ、 $C_1 - 4$ アルキル、 $OC_1 - 4$ アルキル、 NH_2 、 $NH(C_1 - 4$ アルキル)、および $N(C_1 - 4$ アルキル) $_2$ から選択された基で置換されたナフチルであり；

R_4 は、 H であり；そして、

R_5 は、 H である、

請求項 1 ～ 請求項 5 のいずれか 1 項に記載された剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療の分野に関する。より詳細には、本発明は、 $SOX18$ 転写因子活性の阻害における使用のための化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

本明細書における背景技術に対する任意の参照は、そのような技術がオーストラリアまたはそれ以外の場所における通常の一般的知識を構成することの承認として解釈されるべきではない。

【0003】

小分子による転写因子 (TF) の直接調節は、長い間探求されている。

初期の成果は、小分子により標的可能なリガンド結合ドメインを含む核受容体に限定されていた。

これらの知見は、ホルモン依存性癌の治療的用途へ翻訳される (translated) (Perissi および Rosenfeld, 2005)。

現在の課題は、核受容体を越えて、小分子薬物の結合ポケットを欠く、より広い範囲の転写因子に到達することである。

この課題は、多くの TF が決まった三次元構造、特にそれらのタンパク質 - タンパク質結合ドメイン、の不足 (lack)、TF を、組換えにより発現することの困難さ、およびそれらの作用機序を研究するためのアッセイ技術の不足 (lack) により困難である (Fontaine ら、2015)。

TF 活性の調節は、一般に、核内でのそれらの遺伝子発現レベルまたは濃度を变化させることにより、または DNA 若しくはパートナータンパク質のいずれかに対するそれらの結合能力を变化させることにより達成され、後者は TF 選択性を達成するより有望な戦略である。

パートナータンパク質の TF 採用 (recruitment) を邪魔する (disrupting) 小分子に関するいくつかの出版物は、この手法の可能性を証明するものである (Miyoshi ら、2011、Vassilev ら、2004、Filippakopoulos ら、2010、Vogler ら、2009、Liu ら、2014)。

【0004】

ヒトゲノムにおける TF の中でも、発達 TF (developmental TFs)

は、それらの発現が、多くの場合、成人において特定の病理学的条件下で調節不全とされる一方、生理学的条件下で発現停止される（たとえば、成人期における表現型維持には必要とされない）ため、魅力的な分子標的として注目（stand out）されている（BoyadjievおよびJabs、2000、Darnell、2002、Lopez-Bigasら、2006、Vaquerizasら、2009）。

発達因子（developmental factors）の1つのクラス、SOX（SR Y関連のHMG - ボックス）TFは、最近、幹細胞プログラミングの重要なレギュレーター、および癌関連状態における分子スイッチであることが明らかとなった（SarkarおよびHochedlinger、2013、Niwaら、2009）。

SOXタンパク質を標的とする以前の試みでは、主として、様々な癌における潜在的な癌遺伝子（Bassら、2009）である、SOX2（Narasimhanら、2011）、および、血管発達のための重要な分子スイッチである（Cermenatiら、2008、Francoisら、2008、Pennisiら、2000）、SOX18（Klausら、2016）、に焦点を当てていた。

Dawsonポリオキソメタレートは、SOX2のDNA結合を阻害することが示されているが、様々なTFファミリーに対して低い選択性のみを示し、そして、インビトロまたはインビボでの機能的アッセイのいずれでも全く試験されなかった（Narasimhanら、2014、Narasimhanら、2011）。

より最近になって、SOXのDNAデコイ（SOX DNA decoys）が、SOX18のDNA結合およびSOX18 - 依存性転写促進の選択的阻害剤として使用されている。

これらのデコイは、非SOXのTFよりも高い選択性を示すが、それ自体では細胞膜を通して拡散することができず、それらの適用範囲は限定されている（Klausら、2016）。

SOXのTFの薬理的調節の、研究されていない態様は、これらのタンパク質がどのようにそれらのパートナーを採用（recruit）し、そして、その結果、様々なタンパク質 - タンパク質相互作用（PPI）の範囲を介して転写を調節するかに関する。

おそらく、合成ライブラリーは、標的PPIに必要な構造的多様性を有さない（HopkinsおよびGroom、2002、FeherおよびSchmidt、2003）。

【0005】

転写因子（TF）のSOXFグループ（SOX7、SOX17およびSOX18）は、発達（development）中の内皮細胞分化の重要なレギュレーターであり（Francoisら、2008、Coradaら、2013、Hoskingら、2009、Matsuiら、2006、Cermenatiら、2008、Herpersら、2008）、そして、したがって、脈管構造の形成に重要である。

SoxF遺伝子の突然変異または欠失は、動静脈特定化（arteriovenous specification）、血管完全性およびリンパ脈管新生を損ない、癌の動物モデルにおいて腫瘍成長および転移を阻害する（Duongら、2012、Yangら、2013、Zhangら、2009、Youngら、2006）。

より最近になって、高いレベルのSOX18が、ヒト患者における癌の不十分な予後に関連付けられた（Eomら、2012、Pulara、2013、Jethonら、2015）。

したがって、SOX18タンパク質機能の薬理的阻害は、癌における血管応答の管理、および血管癌における潜在的な治療的標的のための潜在的な手段を提示する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、たとえば、SOX18タンパク質に直接結合し、またはそのDNA結合ドメインの近接に直接結合して、たとえば、SOX18 - タンパク質パートナーの採用（SOX18 - protein partner recruitment）および / またはS

10

20

30

40

50

OX18のDNA結合を攪乱する(perturb)ことにより、SOX18タンパク質活性を阻害する化合物が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

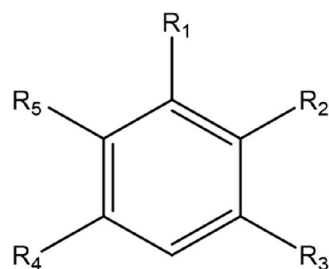
本発明は、少なくとも部分的に、本明細書で提供される式の特定の化合物が、SOX18タンパク質活性の阻害、特に、SOX18がDNAおよび/または特定のタンパク質パートナーに結合する能力に関連して、有効性を有するという発見に基づくものである。

その延長線上で、これらの化合物は、更に、癌転移および血管癌等の血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の処置に有効であることが示される。

【0008】

本発明の第1の態様では、式(I)、またはその薬学的に許容できる塩、溶媒和物若しくはプロドラッグを提供する：

【化1】



式(I)

(式中、

R₁は、OHおよびOR₆からなる群から選択され、

R₆はC₁～C₄アルキルであり；

R₂は、H、COOR₇およびC(O)NR₈R₉からなる群から選択され、

R₇、R₈およびR₉は、独立してHおよびC₁～C₄アルキルから選択され；

R₃は、L-Aであり、

Lは、C₂～C₈アルキル、C₂～C₈アルケニルおよびC₂～C₈アルコキシアルキルから選択されるリンカーであり、そして、

Aは、所望により置換されたフェニルおよび所望により置換されたナフチル(naphthyl)から選択され；

R₄は、H、OR₁₀、ハロおよびC₁～C₄アルキルからなる群から選択され、

R₁₀は、HおよびC₁～C₄アルキルから選択され；そして、

R₅は、H、OR₁₁、ハロおよびC₁～C₄アルキルからなる群から選択され、

R₁₁は、HおよびC₁～C₄アルキルから選択され、

前記化合物は、SOX18活性の阻害に使用されるためのものである。

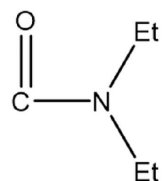
【0009】

実施形態において、R₁は、OHおよびOMeからなる群から選択される。

【0010】

好適には、R₂は、H、COOH、COOMeおよび

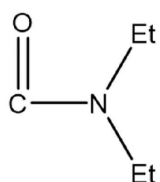
【化2】



からなる群から選択される。

【0011】

好ましくは、 R_2 は、 $COOH$ および
【化 3】



から選択される。

【0012】

実施形態において、 R_4 は、 H 、 OH 、 OMe 、 Cl および Me からなる群から選択される。

【0013】

好適には、 R_5 は、 H 、 OH および OMe からなる群から選択される。

【0014】

特定の実施形態において、 R_4 および R_5 は H である。

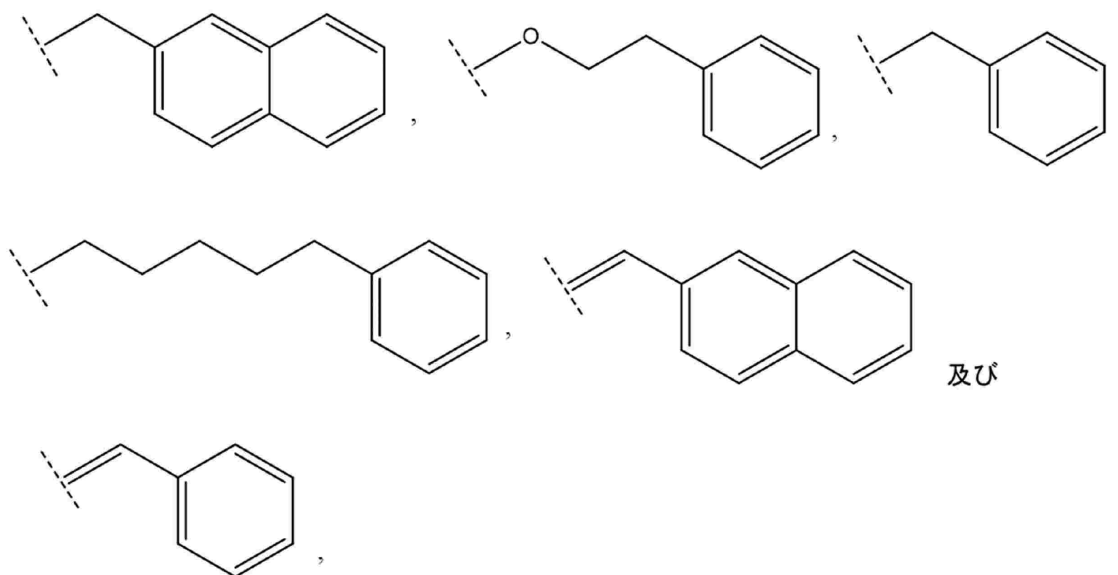
【0015】

実施形態において、 L は、 $C_2 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニルおよび $C_2 \sim C_6$ アルコキシアルキルから選択されるリンカーである。

【0016】

列挙した実施形態のいずれかにおいて、
 R_3 は：

【化 4】



からなる群から選択される。

式中、破線は、隣接する原子から式 I の環への結合を示し、示される構造は、その E/Z 異性体を含む。

【0017】

一実施形態において、第 1 の態様の化合物は：

10

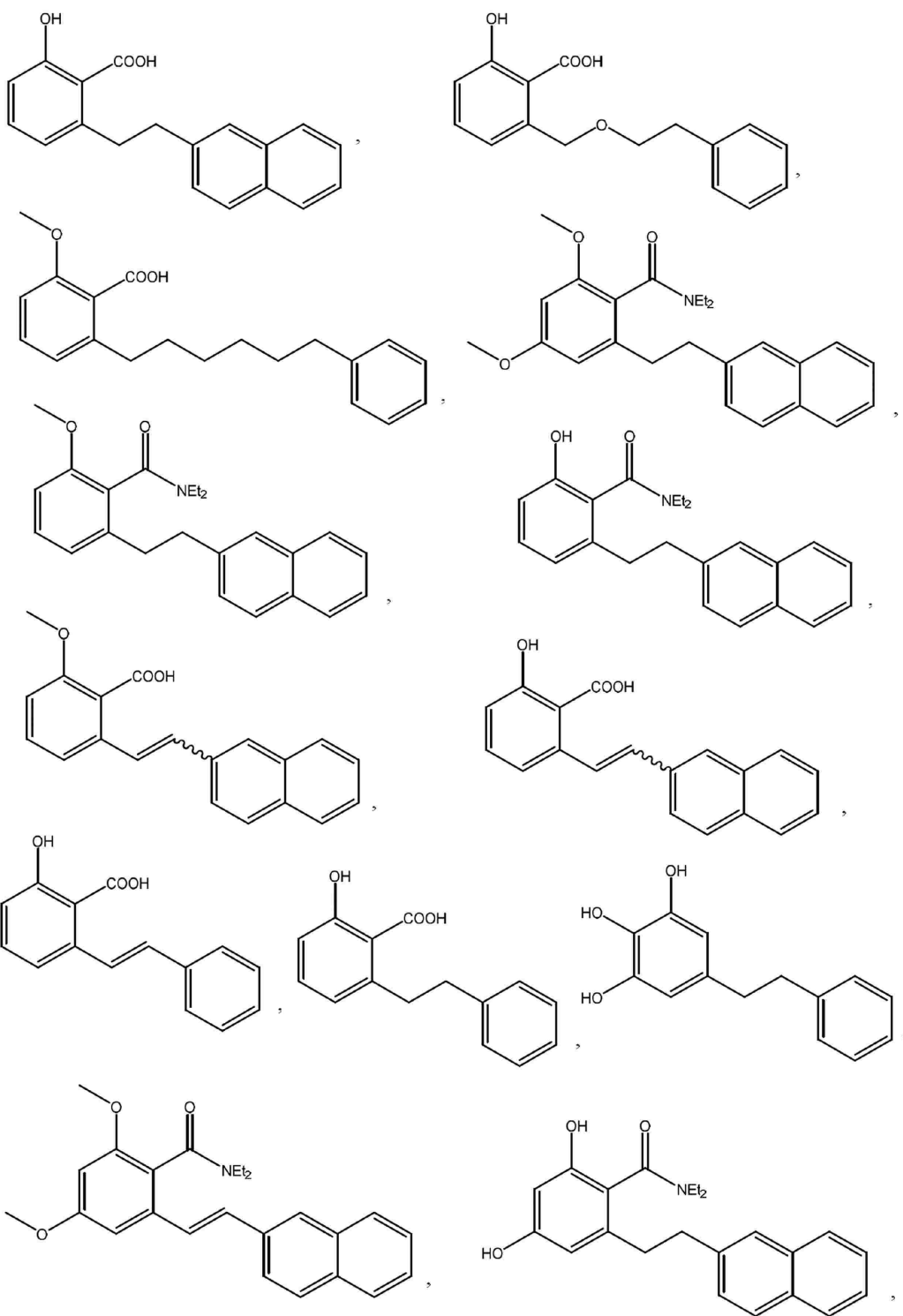
20

30

40

50

【化 5】



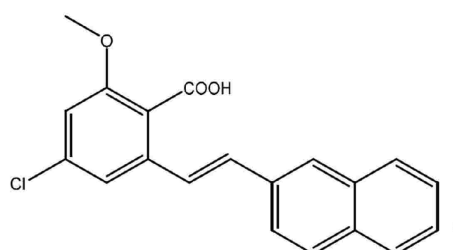
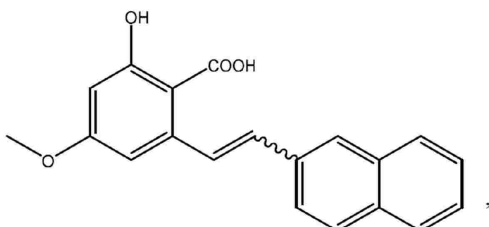
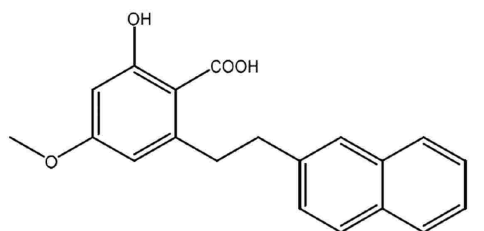
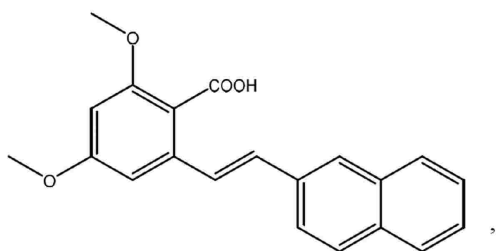
10

20

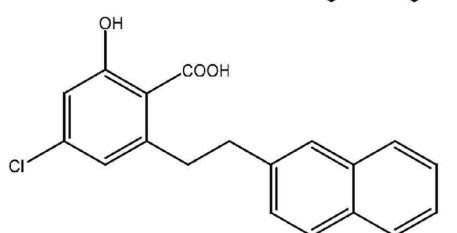
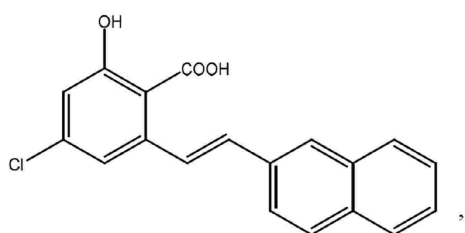
30

40

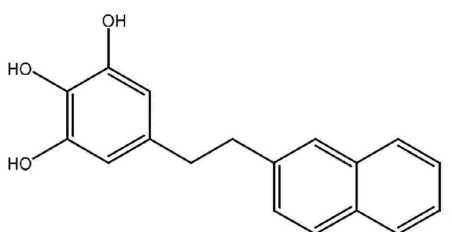
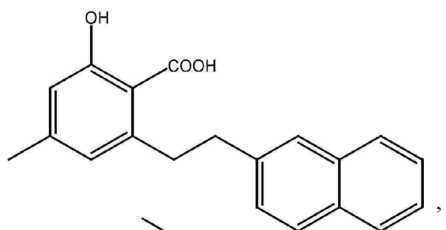
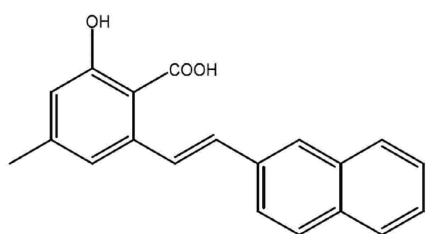
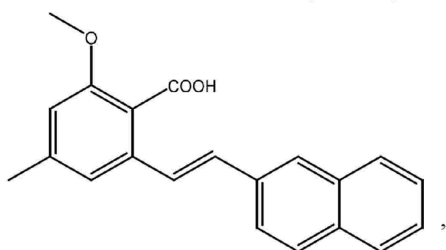
50



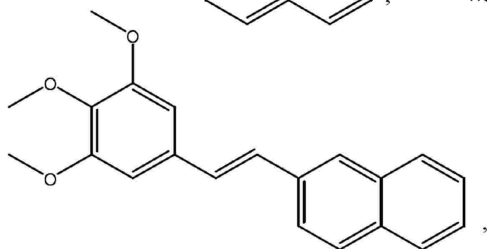
10



20

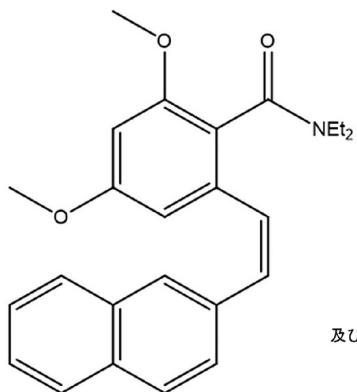
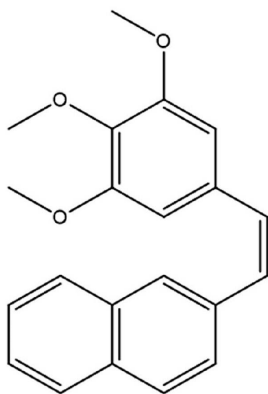


30

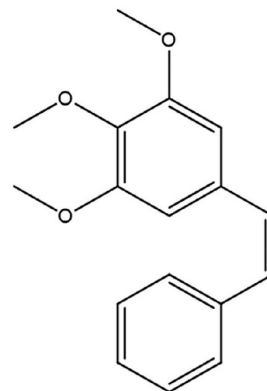


40

50



及び



10

からなる群から選択される。

【 0 0 1 8 】

より好ましくは、第 1 の態様の化合物は：

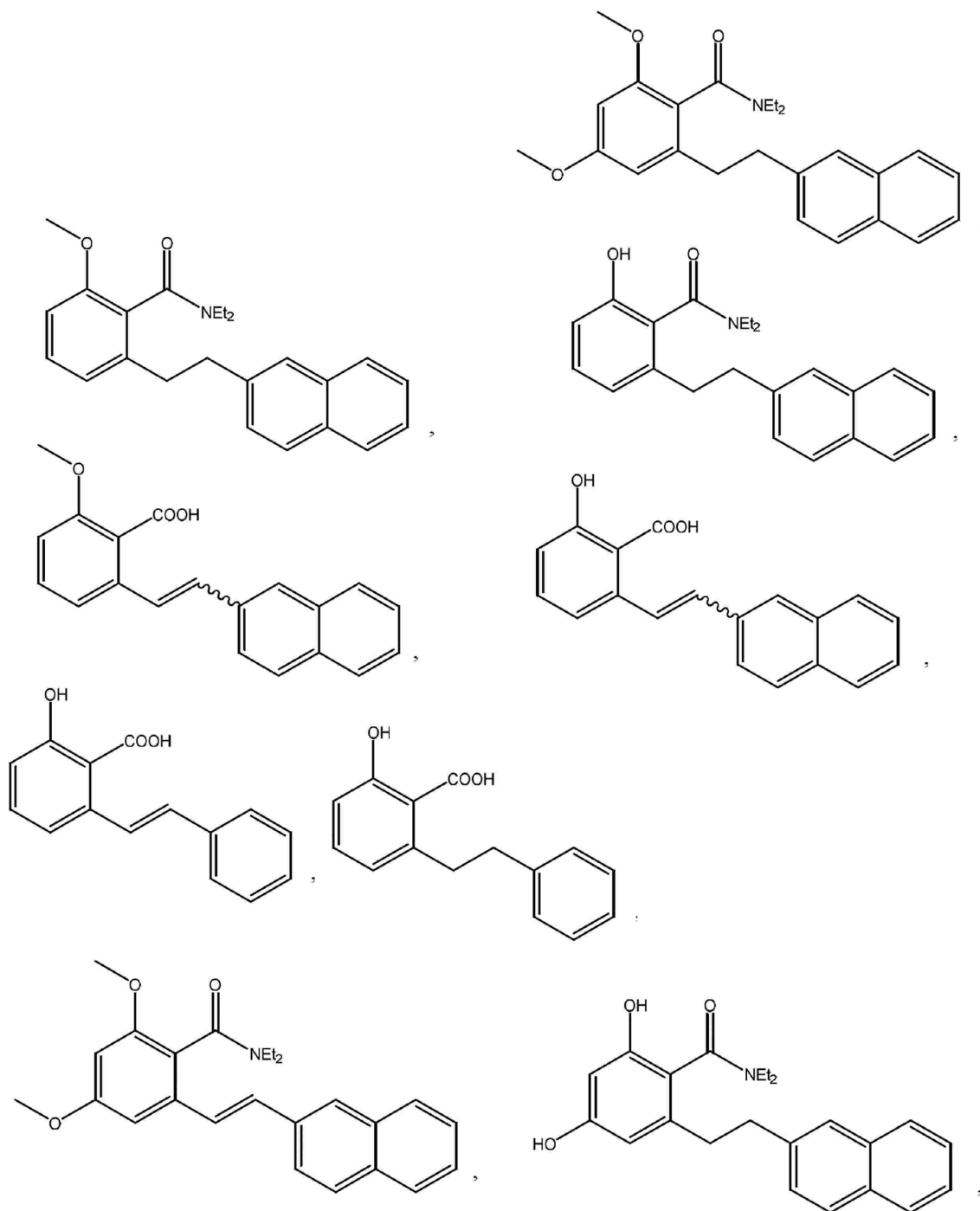
20

30

40

50

【化 6】



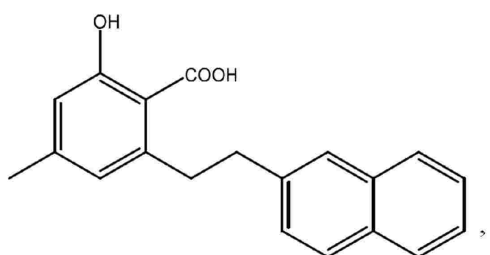
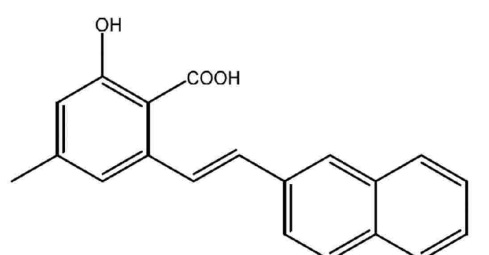
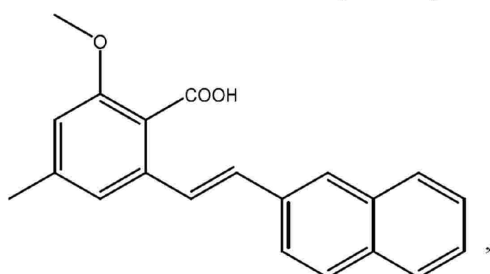
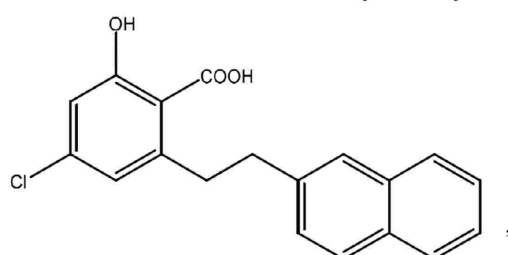
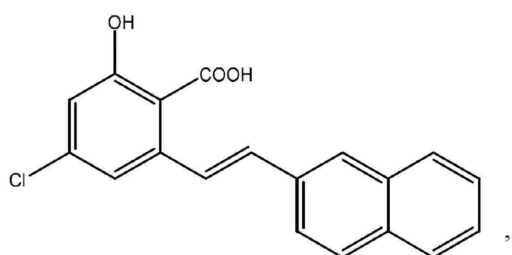
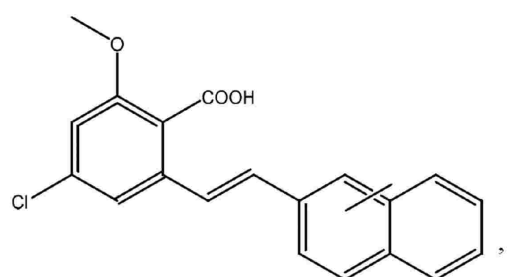
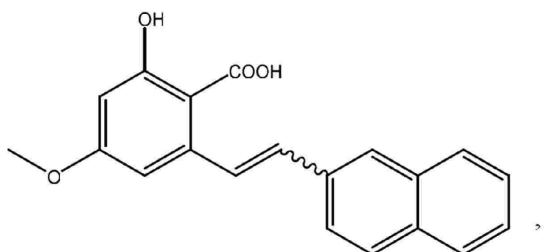
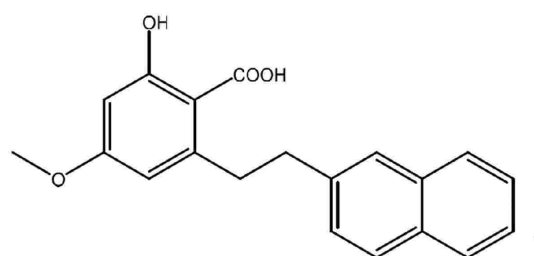
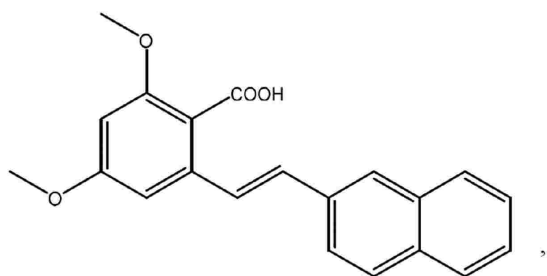
10

20

30

40

50



及び

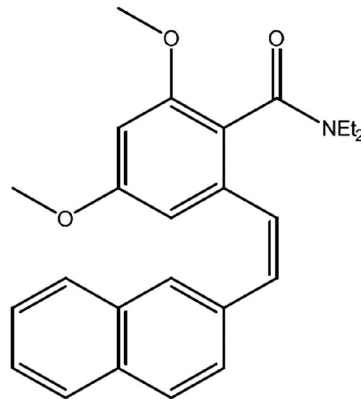
10

20

30

40

50



10

からなる群から選択される。

【 0 0 1 9 】

好適には、本態様の化合物に関連して、SOX 18の活性は、DNA配列および/またはタンパク質に対する接触および/または結合を含む。

好ましくは、タンパク質は、SOX 7、RBP J、XRCC 5、SOX 18、ILF 3、DDX 17およびそれらの任意の組み合わせからなるリストから選択される。

【 0 0 2 0 】

20

本発明の第2の態様では、第1の態様の化合物、またはその薬学的に許容できる塩、溶媒和物若しくはプロドラッグと、薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明の第3の態様では、対象における、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の処置または予防方法を提供し、この方法は、有効量の第1の態様の化合物、若しくはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ、または第2の態様の医薬組成物を対象に投与することにより、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態を処置または予防することを含む。

【 0 0 2 2 】

30

本発明の第4の態様では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の処置または予防のための医薬の製造における、第1の態様の化合物、またはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグの使用を提供する。

【 0 0 2 3 】

第3および第4の態様の参照において、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、好適には、眼科疾病、疾患若しくは状態でありまたはこれらを含む。

好ましくは、眼科疾病、疾患または状態は、加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、未熟児の網膜症、血管新生緑内障、虹彩血管新生 (iritis rubeosis)、角膜血管新生、毛様体炎、鎌状細胞網膜症、翼状片、角膜損傷中の血管応答およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

40

【 0 0 2 4 】

第3および第4の態様の本発明の代替的な実施形態では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、癌でありまたは癌を含む。

好ましくは、癌は、前立腺癌、肺癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、結腸癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、黒色腫、肝細胞腫、肝細胞癌腫、肉腫、白血病、急性T細胞リンパ腫、血管新生物およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

特定の実施形態では、第1の態様の化合物または第2の態様の医薬組成物は、前記癌の転移を予防および/または阻害する。

【 0 0 2 5 】

50

前述した２つの態様の更なる実施形態では、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、腎疾病、疾患若しくは状態でありまたはそれを含む。

好ましくは、腎疾病、疾患または状態は、慢性腎移植片機能不全、原発性腎線維化疾患（primary renal fibrotic disorder）、蛋白尿、糖尿病性腎症、腎炎症およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【００２６】

前述した２つの態様の別の実施形態では、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、アテローム性動脈硬化症でありまたはそれを含む。

【００２７】

前述した２つの態様の更に別の実施形態では、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、乏毛症・リンパ水腫・毛細血管拡張症症候群（Hypotrichosis - Lymphedema - Telangiectasia Syndrome）でありまたはそれを含む。

10

【００２８】

本発明の第５の態様では、対象における癌の転移の阻害または予防方法を提供し、この方法は、有効量の第１の態様の化合物、若しくはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ、または第２の態様の医薬組成物を対象に投与することにより、癌の転移を阻害または予防するステップを含む。

【００２９】

好適には、癌は、前立腺癌、肺癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、結腸癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、黒色腫、肝細胞腫、肉腫、白血病、リンパ腫、血管新生物（たとえば、血管腫、血管肉腫、血管腫）およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

20

【００３０】

本発明の第６の態様では、対象におけるSOX18活性の阻害、予防または低減方法を提供し、この方法は、有効量の第１の態様の化合物、若しくはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ、または第２の態様の医薬組成物を対象に投与することにより、対象におけるSOX18活性を阻害、予防または低減するステップを含む。

【００３１】

好適には、SOX18活性は、DNA配列および／またはタンパク質に対する接触および／または結合を含む。

30

好ましくは、タンパク質は、SOX7、RBPJ、XRCC5、SOX18、ILF3、DDX17およびそれらの任意の組み合わせからなるリストから選択される。

【００３２】

本発明を容易に理解でき、実際効果に移るために、ここで好ましい実施形態を付随する図面を参照して実施例により説明する。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】は、天然産物、SOX18-DNA結合の阻害剤を示す。Aは、0.25 mg/mLの2688海産物抽出物のハイスループットFPスクリーニングからの代表的なデータセットである。そのスクリーニングは、FAM標識SOX応答エレメント（マウスProx1イントロン1）を有する完全長マウスSOX18に対して行った。SOX18に対するリガンドの競合的結合は、FP指数を低下させる（赤点の活性抽出物を指す矢印）。Bは、Sm1およびSm2の化学構造である。Cは、Sm1およびSm2のFP濃度応答曲線（完全長マウスSOX18、平均±S.D. N=3）である。

40

【図２-１】は、構造類似体にフォーカスしたライブラリー、およびインシリコ凝集予測因子を用いた対抗スクリーニング（counter-screen）、および臨界ミセル濃度（CMC）アッセイである。Aは、第１のグループは、化合物Sm1およびSm2に明らかなオルト-ヒドロキシ安息香酸（サリチル酸）モチーフに基づく。第２のグループは、同様のレゾルシノール骨格に基づく。第３のグループは、同様のサリチル酸またはアントラニル酸骨格を含む承認されたNSAIDからなる。Bは、中性洗剤Triton

50

X 1 0 0 のコントロール並びに 2 つの化合物 S m 4 および S m 1 0 に関する典型的な C M C データである。C は、S m 4、メクロフェナム酸、ニフルミン酸およびフルフェナミン酸による S O X 1 8 - D N A 結合阻害である。

【図 2 - 2】は、構造類似体にフォーカスしたライブラリー、およびインシリコ凝集予測因子を用いた対抗スクリーニング (c o u n t e r - s c r e e n)、および臨界ミセル濃度 (C M C) アッセイである。A は、第 1 のグループは、化合物 S m 1 および S m 2 に明らかなオルト - ヒドロキシ安息香酸 (サリチル酸) モチーフに基づく。第 2 のグループは、同様のレゾルシノール骨格に基づく。第 3 のグループは、同様のサリチル酸またはアントラニル酸骨格を含む承認された N S A I D からなる。B は、中性洗剤 T r i t o n X 1 0 0 のコントロール並びに 2 つの化合物 S m 4 および S m 1 0 に関する典型的な C M C データである。C は、S m 4、メクロフェナム酸、ニフルミン酸およびフルフェナミン酸による S O X 1 8 - D N A 結合阻害である。

【図 3】は、S O X タンパク質と相互作用するが、D N A とはしない化合物である。A および B は、ゲノム D N A に隣接した、S O X 1 8 コンセンサスエレメント (A) またはスクランブル配列 (B) を有する、ピオチン化二本鎖 D N A プローブ (およそ 4 0 塩基対長) を使用して、小分子の D N A 結合を試験した。プローブは、S P R ストレプトアビジンチップに固定化した。ポジティブコントロール D A P I、臭化エチジウム、およびアクチノマイシン D は、文献と一致した方法で D N A に結合する。小分子阻害剤 (S m 4、5 および 1 4) は、コンセンサス、またはスクランブル D N A に結合しない。C は、2 5 から 8 0 に加熱したタンパク質複合体の差分静的光散乱 (d i f f e r e n t i a l s t a t i c l i g h t s c a t t e r i n g) により測定した、P r o x 1 - D N A、S m 4、5 または S m 1 4 のいずれかの存在下での S O X 1 8 [1 0 9] H M G 断片の熱安定性である。小分子の結合により、タンパク質安定性が促進される (T a g g > 3 は、有意な安定化と見なされる)。正規化した光散乱三重データのボルツマン曲線適合 (適合度 R 2 > 0 . 9 7)。D は、F P ベースの D N A 結合競合アッセイを用いて測定したように、S m 4 は S O X 2、6、9、1 1、1 5 および 1 8 - H M G 断片の D N A 結合を阻害する。

【図 4】は、S O X 1 8 タンパク質 - タンパク質相互作用に対する、S m 4、ニフルミン酸、フルフェナム酸およびメクロフェナム酸の効果である。A の左パネルは、X R C C 6 (ネガティブコントロール) 並びに S O X 1 8、R B P J および M E F 2 C と相互作用することが既知の 2 つのタンパク質に関する、A L P H A S c r e e n により試験した S O X 1 8 ペアワイズタンパク質 - タンパク質相互作用のヒートマップである。A の右パネルは、タンパク質複合体の共免疫沈降である。S O X 1 8 - m C h e r r y - c M y c を、細胞フリー条件下で、G F P - R B P J、G F P - M E F 2 C または G F P のみ (ネガティブコントロール) のいずれかと共に共発現させ、そして、G F P N a n o t r a p ビーズを用いて免疫沈降させた。バンドは以下の通りである：1 . R B P J - G F P、2 . M E F 2 C - G F P、3 . S O X 1 8 - m C h e r r y、4 . G F P。B は、M E F 2 C および R B P J との、S O X 1 8 の相互作用に対する、S m 4、ニフルミン酸、フルフェナム酸およびメクロフェナム酸の効果を示す。

【図 5 - 1】は、S O X 1 8 の D N A 結合阻害、S O X 1 8 - R B P J 結合阻害、細胞毒性および凝集に対する、S m 4 化学モチーフの寄与である。上パネルの表は、S m 1 4 ~ 4 4 化合物を示し、そして、4 つの活性マーカー、即ちタンパク質 - D N A およびタンパク質 - タンパク質結合阻害、細胞毒性並びに凝集リスクに関して得られた結果を色コードでまとめる。第 2 の下の棒グラフは、入手可能な場合、5 0 μ M および 5 μ M での S O X 1 8 - R B P J タンパク質 - タンパク質結合阻害結果を詳細する (N = 4、平均 ± S D)。(D N A 結合阻害、細胞毒性および c L o g P 生データを表 3 にまとめる)。下の棒グラフは、A L P H A S c r e e n アッセイにより測定した S O X 1 8 - R B P J タンパク質 - タンパク質相互作用 (P P I) 阻害を示す。結果は 5 0 μ M (P B S C t r l、D M S O C t r l および S m 4 は左側の棒グラフ) および 5 μ M (S m 4 ~ S m 4 4 は右側の棒グラフ) にて示す。結果は、化合物が入手可能な場合に示されることに留意された

10

20

30

40

50

い ($N = 4$ 、平均 \pm SD)。ALPHA Screen アッセイにおける読み取りとしての、SOX18 ホモ二量体および SOX18 / RBPJ ヘテロ二量体形成を用いた、 $5 \mu M$ で試験した Sm4 シリーズの PPI における邪魔 (disruption) の比較である。いくつかの化合物は、SOX18 ホモ二量体形成を優先的に邪魔 (disrupt) した一方、いくつかのその他は、SOX18 ヘテロ二量体形成に対してより特異的であり、そして、いくつかのその他は、ホモ - およびヘテロ二量体複合体の両方の汎攪乱物 (pan disruptors) である。

【図5 - 2】は、SOX18 の DNA 結合阻害、SOX18 - RBPJ 結合阻害、細胞毒性および凝集に対する、Sm4 化学モチーフの寄与である。上パネルの表は、Sm14 ~ 44 化合物を示し、そして、4 つの活性マーカー、即ちタンパク質 - DNA およびタンパク質 - タンパク質結合阻害、細胞毒性並びに凝集リスクに関して得られた結果を色コードでまとめる。第2の下の方の棒グラフは、入手可能な場合、 $50 \mu M$ および $5 \mu M$ での SOX18 - RBPJ タンパク質 - タンパク質結合阻害結果を詳細する ($N = 4$ 、平均 \pm SD)。 (DNA 結合阻害、細胞毒性および cLogP 生データを表3にまとめる)。下の棒グラフは、ALPHA Screen アッセイにより測定した SOX18 - RBPJ タンパク質 - タンパク質相互作用 (PPI) 阻害を示す。結果は $50 \mu M$ (PBS Ctrl、DMSO Ctrl および Sm4 は左側の棒グラフ) および $5 \mu M$ (Sm4 ~ Sm44 は右側の棒グラフ) にて示す。結果は、化合物が入手可能な場合に示されることに留意されたい ($N = 4$ 、平均 \pm SD)。ALPHA Screen アッセイにおける読み取りとしての、SOX18 ホモ二量体および SOX18 / RBPJ ヘテロ二量体形成を用いた、 $5 \mu M$ で試験した Sm4 シリーズの PPI における邪魔 (disruption) の比較である。いくつかの化合物は、SOX18 ホモ二量体形成を優先的に邪魔 (disrupt) した一方、いくつかのその他は、SOX18 ヘテロ二量体形成に対してより特異的であり、そして、いくつかのその他は、ホモ - およびヘテロ二量体複合体の両方の汎攪乱物 (pan disruptors) である。

【図6】は、SOX18 - HMG および RBPJ の間の界面における、Sm4 のインシリコモデリングである。インビトロでの SOX18 依存性転写促進の阻害である。A および B は、タンパク質と DNA の間の「開放」ポケット内に阻害剤を置く、SOX18 / Prox1 DNA X 線結晶構造における Sm4 に関する安定な結合ポーズである。C は、Nottch 転写複合体の構造内への SOX18 / DNA 構造のドッキングを示す。D は、SOX18 およびホタルルシフェラーゼ遺伝子に融合した Vcam1 プロモーターを含むベクターで一過的にトランスフェクトされた COS7 細胞における、ルシフェラーゼレポーターアッセイ (Hosking ら、2004) である。最大 1 % の DMSO (v / v) を含む培養培地中で、CC10 (10 % 細胞毒性) 未満の濃度で、小分子を用いて、細胞を 24 時間処理した。結果を、Sm4 およびニフルミン酸に関して示す。メクロフェナム酸およびフルフェナミン酸は、CC10 未満の濃度で不活性であった。

【図7】は、COX - 1 / 2 酵素阻害を示す。ポジティブコントロールとしてのメクロフェナム酸を含む SOX18 阻害剤による COX - 1 および COX - 2 酵素の阻害を示す。COX 酵素の阻害は、アラキドン酸変換から生じた PGH₂ プロスタノイドの量により測定される。

【図8 - 1】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 2】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 3】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 4】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 5】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 6】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 7】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 8】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 9】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8 - 10】は、Sm14 ~ 44 の NMR スペクトルを示す。

【図8-11】は、Sm14~44のNMRスペクトルを示す。

【図8-12】は、Sm14~44のNMRスペクトルを示す。

【図8-13】は、Sm14~44のNMRスペクトルを示す。

【図8-14】は、Sm14~44のNMRスペクトルを示す。

【図8-15】は、Sm14~44のNMRスペクトルを示す。

【図9】は、SOX18の網羅的相互作用(interactome)およびSm4による相互作用の邪魔(disrupt)のマッピングを示す。(A)クロマチン免疫沈降-質量分析(ChIP-MS)および増幅ルミネッセンス近接均質アッセイ(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)(ALPHA-Screen)方法を組み合わせた、SOX18依存性タンパク質-タンパク質相互作用(PPi)を解析(deconvolute)するための実験戦略の概略を示す。(B)ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)において、SOX18-cMyc ChIP-MSにより特定された、289タンパク質に関する分子機能に関するGO-term分析を示す。Myc-tagのみをトランスフェクトされた細胞に見出された非特異的相互作用物質を減算した。継続的相互作用研究に関して、直接の相互作用物を特定する可能性を向上させるために、核酸結合またはタンパク質結合能力を有するタンパク質(紫色)を考慮した。(C)左列:ChIP-MS SOX18関連タンパク質、内皮転写因子およびポジティブ/ネガティブコントロールのタンパク質の選択に関して、ALPHA-Screenにより試験されたSOX18ペアワイズPPiのヒートマップ表示である。右列:100μMで試験した、SOX18依存性タンパク質-タンパク質相互作用に対する、Sm4活性のヒートマップ表示である。相互作用および邪魔(disruption)の閾値は、スケールバーにて黒線で示す。閾値を上回る相互作用および邪魔(disruption)のレベルは、「+」で画定され、閾値を下回るレベルは「-」で画定される。タグ化タンパク質は、リーシュマニア・タレントラエ(Leishmania tarentolae)細胞フリータンパク質発現システム内で発現させた。(D)Sm4によるSOX18のPPiを邪魔(disruption)に関する代表的なALPHA-Screen濃度応答曲線を示す。示されるデータは、平均±s.e.mである。

【図10】は、SOX18のPPiのQCおよびSm4の効果を示す。(A)HUVECにおいて、抗cMyc抗体を用いた、cMyc-SOX18免疫沈降から特定された、配列KAPILIAITDVASRGを有する、代表的な二重荷電DDX17ペプチド(Muscattイオンスコア51.6)に関する質量分析スペクトル。(B)ChIP-MSから選択された、SOX18および相互作用タンパク質の特定されたペプチドの適用範囲。(C)緑色で示された、特定されたChIP-MSペプチドを有する、DDX17のアミノ酸配列。(D)SOX9-SOX9およびSOX18-SOX18を示す、タンパク質希釈最適化に関する、典型的なALPHA-Screen曲線である。ピーク(フック効果)の存在は、相互作用を示し、そして、継続的結合研究のための理想的なタンパク質濃度を表す。タンパク質は、リーシュマニア・タレントラエ(Leishmania tarentolae)細胞フリータンパク質発現システム内で発現された。(E)SOX18阻害剤であるSm4の分子構造。(F)Sm4による、SOX18のPPiの邪魔(disruption)に関する、ALPHA-Screen濃度応答曲線。示されるデータは、平均±s.e.mである。

【図11】は、Sm4による、SOXFのPPiの異なる邪魔(Differential disruption)を示す。左パネルは、ALPHA-Screenにより測定した、SOXF、MEF2CおよびRBPJおよびOCT4の間のタンパク質-タンパク質相互作用のマトリクスを示す。右パネルは、PPiに対する50uMのSm4の効果を示す(青色=PPi/邪魔(disruption)なし、緑色/黄色=低いPPi/邪魔(disruption)、橙色/赤色=強いPPi/完全邪魔(disruption)、灰色=閾値未満のPPi、Sm4効果は決定できない)。

【図12】は、Sm4は、インビトロで、SOX18転写出力に選択的に影響を及ぼすこ

10

20

30

40

50

とを示す。(A)ゲノムワイドTF ChIP-seqデータとトランスクリプトミクスデータからのSm4影響遺伝子との間の相関分析の概略図。Sm4影響遺伝子(紫色)の転写開始部位(TSS)の付近のクロマチンを、転写因子結合ピーク(灰色)に関して研究して、所定の転写因子に関する最も近い結合部位までの「TSSからの距離」を計算した。このTSSからの距離を、転写調節の可能性の代理物として使用し、そして、かくしてSm4影響遺伝子と転写因子との関連性を形成した(Cusanovichら、PLoS Genetics、2014; Verbistら、Drug Discov Today、2015)。SOX18およびSOX7、およびEncodeコンソーシアムから入手可能な全転写因子(GATA2、c-FOS、c-JUN、CTCF、EZH2、MAXおよびc-MYC)のChIP-seqピークが、HUVECにおいて行われた分析に含まれた。遺伝子のランダムグループを、偶然により見出されるように、コントロール分布として分析した。(B)Sm4影響遺伝子を、下方調節(Sm4-下方)、非影響(Sm4-不変)および上方調節(Sm4-上方)にグループ化した。プロットは、Sm4影響遺伝子(紫色の線、絶対倍数変化 2)のTSSと、SOX18、並びにコントロール転写因子SOX7およびGATA2に関する結合部位の最も近いゲノム位置までの距離の累積的な分布を示す。差次的に発現した遺伝子のTSSから特定の転写因子の最も近い結合イベントまでの距離の中央値を、ランダムな遺伝子セットから偶然に予想される距離の中央値(緑色の線)と比較した。Sm4下方調節遺伝子は、SOX18ピークに有意に近く(太字)、しかしSOX7またはGATA2ピークには近くなかった。

10

【図13】は、インビトロでのSm4選択性のトランスクリプトーム全体の分析(Transcriptome-wide analysis)を示す。(A)HUVECで行われた、SOX18 ChIP-seqピーク(MEMEソフトウェア)から特定されたトップモチーフである。(B)既知のSOX18標的遺伝子VCAMおよびPROX1に関する、代表的なChIP-seqピーク(矢頭)のUCSCブラウザビューである。(C)は、Sm4のトランスクリプトーム全体の分析に関する条件である。SOX18過剰発現HUVECにおいて、DESeq2を使用して、ビヒクルDMSO(SOX18oe)と25 μMのSm4(Sm4)を受容した細胞の間の差次的発現(DE)を計算した。(D)4重RNA-seqサンプルの主要成分分析である。同じ条件(コントロール、SOX18oe、Sm4)クラスターからの合わせた反復サンプルである。(E)DESeq2およびedgeR方法の比較を示すプロットであり、SOX18oeおよびSm4条件の間のDE遺伝子の有意性をマークキングする。DESeq2のLog2倍数変化 1または -1(破線)を有する転写産物を、更なる分析について考慮した。(F)Sm4の影響を受ける遺伝子(紫色)と、特定の転写因子の結合部位の最も近いゲノム位置との間の距離は、累積分布としてプロットされる。差次的に発現した遺伝子のTSSから転写因子の結合イベントの最も近い結合イベントまでの距離の中央値は、偶然に予想される中央値の距離に対する比率として表されました(ランダム遺伝子、緑色)。

20

30

【図14】は、c-JUNモチーフがSOX18結合部位内で濃縮されていることを示す。(A)SOX18 ChIP-seqピークに関するHOMERモチーフ分析は、c-JUNモチーフ5'-TGAC/GTCA-3'の濃縮を明らかにした。(B)SOX18-c-JUNおよびSOX18-SOX18(ポジティブコントロール)に関するALPHA-Screen結合曲線を示し、c-JUNは、インビトロで、SOX18と直接相互作用する能力を有することを示す。タンパク質は、リーシュマニア・タレントラエ(Leishmania tarentolae)細胞フリータンパク質発現システム内で発現した。

40

【図15】は、Sm4は、インビトロで、SOX9またはSOX17活性を妨害しないことを示す。(A)SOX9ホモ二量体活性に関する細胞ベースのレポーターアッセイを示す。COS-7細胞を、Sox9およびCol2a1:lucレポーターコンストラクトでトランスフェクトした。Sox9過剰発現は、Col2a1活性化の>8倍の誘導をもたらした。高濃度のSm4で変化は観察されなかった。(B)SOX17活性に関する細胞ベースのレポーターアッセイ(Robinsonら、2014)を示す。ウシ大動脈内

50

皮細胞 (BAEC) を、pTK - - gal (pTK) またはECE1 - TK - - gal (ECE1) レポーターでトランスフェクトし、SOX17 (ECE1のみ) の内因性活性を測定した。いずれの試験濃度でも変化は観察されなかった。x軸上の数字は、 μM での [Sm4] である。

【図16】は、Sm4は、インビボでSoxF転写活性を遮断することを示す。(A) tg (-6.5kdr1:eGFP) SoxFレポーターを保有する、60hpfのゼブラフィッシュ幼生の側方明視野 (上) および蛍光 (下) 画像を示す。処置は、後期 (20hpf) に、DMSO (ネガティブコントロール) 若しくは $1\mu\text{M}$ のSm4のいずれかで開始し、または、幼生には、sox7およびsox18 (dMO sox7/18) の両方に対して、モルホリノを用いて注入した。蛍光強度は、ヒートマップとして示される。スケールバーは、 $200\mu\text{m}$ である。(B) 処置したtg (-6.5kdr1:eGFP) 幼生およびsox7/18モルファントにおけるgfp転写産物レベルに関するqRT-PCR分析であり、この導入遺伝子に関する活性の低下を示す。(C) RbpjおよびSoxF転写因子に関する多数の結合部位を持つtg (D114in3:eGFP) SoxF/Notchレポーターを保有するゼブラフィッシュ幼生の側面画像である。幼生に、rbpjに対するモルホリノを注入し、および/または幼生を13hpfから $2\mu\text{M}$ のSm4で処置した。(D) tg (D114in3:eGFP) 幼生におけるgfp転写産物についてのqRT-PCR分析であり、Sm4処置幼生における組み合わされたSoxF/Notch活性の抑圧を示す。(E) Sm4またはDMSOコントロールで、初期段階 (16hpf) から72hpfまで処置した幼生における胚死亡率の定量化を示す。(F) 16hpfから $1.5\mu\text{M}$ のSm4で処置した48hpf幼生における血管表現型 (動脈シャント) の浸透率を示す。(G) 16hpfから $1.5\mu\text{M}$ のSm4で処置した48hpf幼生における血行路欠陥の浸透率を示す。(H) DMSOコントロール (点線) に対する、16hpfに、 $1.5\mu\text{M}$ のSm4で処置した幼生における、48hpfでの内因性内皮転写産物レベルのqRT-PCR分析を示す。示されるデータは、平均 \pm s.e.m. である。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。

【図17】は、Sox9活性は、インビボでの処置により攪乱 (perturbed) されないことを示す。(A) 処置の予定表: ゼブラフィッシュ幼生を軟骨形成中、4日間継続して処置した。実験全体を通して培地を毎日リフレッシュして、Sm4のレベルを維持した。(B) 軟骨 (cartilage) を示す、tg (col2a1:YFP) Sox9レポーター幼生 (Mitchellら、2013) を示す。YFPレベルは、Sm4の存在下で影響を受けず、そして、軟骨形成における変化は観察されなかった。mc: メッケル軟骨 (Meckel's cartilage)、ch: 角舌骨 (ceratohyal)、hs: 舌顎骨 (hyosymplectic)。(C) 軟骨形成全体の一連の段階における、DMSOコントロールおよびSm4処置幼生のyfp転写産物レベルのqRT-PCR。

【図18】は、Sm4は、インビボでSoxF活性を妨害することを示す。(A) ゼブラフィッシュ幼生におけるSm4処置の予定表である。SOXFレポーター遺伝子研究のための処置を、20hpfで開始した一方、表現型研究の場合、動脈特定化の正しい発達時間中 (during the right developmental window for arteriovenous specification) に作用するように、処置をそれに先行して開始した。(B) DMSOコントロールおよびSm4処置tg (fli1:eGFP、-6.5kdr1:mCherry) 幼生の躯幹領域 (trunk region) の側面像 (Lateral view) および横行部分 (transverse section)。コントロールDMSO幼生は、明瞭に分離した背側大動脈 (dorsal aorta、DA) および後主静脈 (PCV) を形成した。Sm4処置幼生では、DAが狭窄し、および/またはPCVに融合した (矢頭)。動脈マーカーefnb2aに対するホールマウントインサイチュハイブリダイゼーションは (Whole mount in situ hybridization)、48hpfのSm4処置幼生において、発現の低下およびDA形成の不全を示した (矢)。切片をDAPI染色した

(青色で)。スケールバー明視野：0.5 mM、蛍光およびインサイチュー 25 μ m。(C) Sm4 の濃度依存性効果、72 hpf における優勢な表現型の定量化を示す：軽度(尾湾曲)、中度(PCVの拡張)または重度(動静脈欠陥および/または血行路欠陥(circulation defect))。示した時間枠は、Sm4 処置時間および終点を指す。(D) Sm4 (1.5 μ M) で処置した幼生における心臓浮腫の頻度の定量化。(E) DMSOコントロール(点線)に対する、Sm4 処置幼生における Sox18 依存性 - 6.5 kdr1 : mCherry および内因性内皮転写産物レベルの qRT-PCR 分析は、24 hpf における動脈および静脈マーカーに対する効果を示す。全ての発現レベルを内皮マーカー cdh5 の発現に対して正規化した。示されるデータは、平均 \pm s.e.m である。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

10

【図19-1】は、転移および腫瘍血管新生は、Sm4 処置により抑制されることを示す。(A) 乳癌転移に関するマウスモデルの予定表。4T1.2 腫瘍を0日目に接種し、そして、12日目に切除した。Sm4 (25 mg/kg/日)、アスピリン (25 mg/kg/日) またはビヒクルコントロール(PBS)を、3日目~12日目に毎日経口投与した。独立して、実験を行って、生存および転移率を評価した。(B) 処置スキームの過程中(7日目および12日目)のSm4 の血漿濃度は、薬物の良好な全身送達を示す。(C) インサイチューハイブリダイゼーションにより示される、腫瘍の脈管構造内のSOX18 の発現。スケールバー 100 μ m。(D) マウスの生存を監視した($n = 6 \sim 12$ マウス/グループ)。ビヒクルコントロールおよびアスピリンの両方を超える、Sm4 処置マウスにおける改善された生存が、Log-ランク試験により分析された($p < 0.001$)。(E) 腫瘍サイズの有意な差異は、いかなる段階でも見出されなかった。(F) ビヒクルコントロールまたはSm4 処置動物のいずれかが癌負荷に屈する前に、肺の表面上の転移性腫瘍小結節を28日目に定量化した。示されるデータは、12~14 マウス/グループの平均 \pm s.e.m である。(G) 血管密度は、全腫瘍の300 μ m切片で研究した。明視野の画像は、腫瘍の全体的な形態(破線で概略される)と、主な血管および出血範囲(星形)をマーキングする赤血球の存在とを示す。スケールバー 1 mM。(H) 内皮特異的マーカーERGおよびエンドムチン(EMCN)に関する二重免疫蛍光染色は、腫瘍内および腫瘍周辺の領域内の血管パターン形成および浸透を明らかにする。左：全腫瘍切片(スケールバー 1 mM)、中央および右：取り囲んだ領域の引き伸ばし(スケールバー 200 μ m)。(I) $n = 6$ 腫瘍/条件のEMCN体積(血管密度)およびERG-陽性核(内皮細胞の数)の定量化。各データポイントは、3~4つの代表的な領域(パネルHの取り囲んだ領域)/腫瘍の平均を表す。両方の条件の平均 \pm s.e.m を示す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

20

30

【図21】は、4T1.2 腫瘍への血管の浸透は、Sm4 により損なわれることを示す。PBS ビヒクルまたはSm4 で処置したマウスの全4T1.2 乳房腫瘍からの連続ビブラトーム切片(300 μ m)の明視野画像である。主血管および出血範囲は、赤色で特定される。

【図22】は、Sm4 処置マウスは、腫瘍血管密度の低下を有することを示す。腫瘍切片に対するERGおよびエンドムチン(EMCN)に関する免疫蛍光染色である。ビヒクルPBSおよびSm4 の両方に関する2つの代表的な領域を示す。詳細な引き伸ばしにより、ERGに関する明瞭な核染色、およびEMCNに関する膜状内皮染色が示される。内皮細胞数および血管体積の定量化を、Imarisにおいて、同一のXYZ寸法を有する画像上で行った。総EMCN+脈管構造および総ERG+核(ERG数およびEMCN体積は、黄色で示される)を正確に捕捉するために閾値を選択した。

40

【図23】は、Sm4 処置は、腫瘍誘導リンパ脈管新生を邪魔(disrupts)する。PBS ビヒクルまたはSm4 (25 mg/kg/日) で処置したマウスの全4T1.2 乳房腫瘍からの連続ビブラトーム切片(200 μ m)のリンパ管画像。リンパ特異的マーカーPROX1およびポドプラニン(PDPN)並びに血管ECマーカー エンドムチン(EMCN)に関する免疫蛍光は、腫瘍内および腫瘍周辺の領域内の脈管パターン形成および浸透を明らかにする。コントロールグループ(上パネル)、およびSm4 処置グルー

50

ブ(下パネル)の全腫瘍切片。n = 6 腫瘍/条件の P D P N + リンパ管面積(密度、上グラフ)および P R O X 1 + 核(リンパ内皮細胞の数、下グラフ)の定量化。スケールバー左: 0.5 mm、右: 0.1 mm。両方の条件に関する平均 ± s.e.m を示す。* p < 0.01、*** p < 0.001。

【図24-1】は、(A)単分子追跡(SMT)実験の原理を示す。SMTは、生細胞における、SOX18等の転写因子のクロマチン結合動態のリアルタイム画像化を可能にする。SMTは、SOX18タンパク質のサーチパターンを決定する一方、その標的遺伝子の特異的応答エレメントに結合するゲノムを走査する。(B)パネルBは、分子軌跡の二次元追跡と、MATLABを使用した分析とを含む実験ワークフローを示す。SOX18分子は、DNAに結合し(不動)、または結合せず、そして、核内を自由に拡散する。不動の画分内で、クロマチン上の滞在時間に基づいて、特異的結合または非特異的結合のいずれかの2集団を規定することが可能である。(C)上; Sm4は、非特異的結合画分を犠牲にして、SOX18特異的結合画分を濃度依存的に増大させる。下; Sm4は、特異的に結合したSOX18画分の滞在時間を増大する一方、非特異的に結合した画分の滞在時間を低下させる。(D): 上; Sm4は、逆に、濃度依存的に非特異的結合画分の利益で、Ra^{OP}特異的結合画分を低下させるため、その部分的救済に寄与するSOX18ドミナントネガティブ変異体Ra^{OP}「Ragged Opossum」変異体に選択的に結合する。下; Sm4は、特異的におよび非特異的に結合したRa^{OP}画分の滞在時間に対して、SOX18画分に対するものと同じ効果を有するが、効果はより顕著である。

【図24-2】は、(A)単分子追跡(SMT)実験の原理を示す。SMTは、生細胞における、SOX18等の転写因子のクロマチン結合動態のリアルタイム画像化を可能にする。SMTは、SOX18タンパク質のサーチパターンを決定する一方、その標的遺伝子の特異的応答エレメントに結合するゲノムを走査する。(B)パネルBは、分子軌跡の二次元追跡と、MATLABを使用した分析とを含む実験ワークフローを示す。SOX18分子は、DNAに結合し(不動)、または結合せず、そして、核内を自由に拡散する。不動の画分内で、クロマチン上の滞在時間に基づいて、特異的結合または非特異的結合のいずれかの2集団を規定することが可能である。(C)上; Sm4は、非特異的結合画分を犠牲にして、SOX18特異的結合画分を濃度依存的に増大させる。下; Sm4は、特異的に結合したSOX18画分の滞在時間を増大する一方、非特異的に結合した画分の滞在時間を低下させる。(D): 上; Sm4は、逆に、濃度依存的に非特異的結合画分の利益で、Ra^{OP}特異的結合画分を低下させるため、その部分的救済に寄与するSOX18ドミナントネガティブ変異体Ra^{OP}「Ragged Opossum」変異体に選択的に結合する。下; Sm4は、特異的におよび非特異的に結合したRa^{OP}画分の滞在時間に対して、SOX18画分に対するものと同じ効果を有するが、効果はより顕著である。

【図24-3】は、(A)単分子追跡(SMT)実験の原理を示す。SMTは、生細胞における、SOX18等の転写因子のクロマチン結合動態のリアルタイム画像化を可能にする。SMTは、SOX18タンパク質のサーチパターンを決定する一方、その標的遺伝子の特異的応答エレメントに結合するゲノムを走査する。(B)パネルBは、分子軌跡の二次元追跡と、MATLABを使用した分析とを含む実験ワークフローを示す。SOX18分子は、DNAに結合し(不動)、または結合せず、そして、核内を自由に拡散する。不動の画分内で、クロマチン上の滞在時間に基づいて、特異的結合または非特異的結合のいずれかの2集団を規定することが可能である。(C)上; Sm4は、非特異的結合画分を犠牲にして、SOX18特異的結合画分を濃度依存的に増大させる。下; Sm4は、特異的に結合したSOX18画分の滞在時間を増大する一方、非特異的に結合した画分の滞在時間を低下させる。(D): 上; Sm4は、逆に、濃度依存的に非特異的結合画分の利益で、Ra^{OP}特異的結合画分を低下させるため、その部分的救済に寄与するSOX18ドミナントネガティブ変異体Ra^{OP}「Ragged Opossum」変異体に選択的に結合する。下; Sm4は、特異的におよび非特異的に結合したRa^{OP}画分の滞在時間に対して、SOX18画分に対するものと同じ効果を有するが、効果はより顕著である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 4 】

定義

本特許明細書では、用語「含む (comprise)」、「含んでいる (comprising)」、「含む (includes)」、「含んでいる (including)」、または同様の用語は、非排他的な包含を意味することが意図され、したがって、要素のリストを含む方法または組成物は、それらの要素のみを含むものではなく、列挙されていない他の要素も含み得る。

【 0 0 3 5 】

特に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語の全ては、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される用語「アルキル」は、たとえば、1～約8個の炭素原子、好ましくは1～約7個の炭素原子、より好ましくは1～約6個の炭素原子、更により好ましくは1～約4個の炭素原子を含む直鎖または分枝状アルキル置換基を指す。

そのような置換基の例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソアミル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、ヘキシル、ヘプチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、2-エチルブチル、3-エチルブチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル等からなる群から選択され得る。

参照される炭素数は炭素骨格および炭素分枝に関するが、任意の置換基に属する炭素原子、たとえば、主炭素鎖から分岐するアルキルまたはアルコキシ置換基の炭素原子を含まない。

20

【 0 0 3 7 】

用語「アルケニル」は、2～8個の炭素原子、好ましくは2～7個の炭素原子、より好ましくは2～6個の炭素原子または2～4個の炭素原子を有し、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する、所望により置換された不飽和の直鎖状または分枝状炭化水素基を指す。

適切な場合、アルケニル基は、特定数の炭素原子、たとえば、C₂～C₆アルケニルを含み得、これは直鎖状または分枝状配置における、2、3、4、5または6個の炭素原子を有するアルケニル基を含む。

30

参照される炭素数は、炭素骨格および炭素分枝に関するが、任意の置換基に属する炭素原子を含まない。

そのような置換基の例は、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、s-およびt-ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプタ-1,3-ジエン、ヘキサ-1,3-ジエン、ノナ-1,3,5-トリエン等からなる群から選択され得る。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される用語「アルコキシアリル」は、酸素原子により連結された直鎖または分枝鎖アルキル基（即ち、「エーテル」基とも称されるアルキル-O-アルキル）を意味し、アルキルは上述されている。

特定の実施形態において、アルコキシアリルは、1～8個の炭素原子（「C₁～8アルコキシアリル」）を含む、酸素結合基を指す。

40

更なる実施形態において、アルコキシアリルは、2～8個の炭素原子（「C₂～8アルコキシアリル」）、2～6個の炭素原子（「C₂～6アルコキシアリル」）、2～4個の炭素原子（「C₂～4アルコキシアリル」）または2～3個の炭素原子（「C₂～3アルコキシアリル」）を含む酸素架橋基を指す。

列挙した炭素原子数は、アルコキシアリル/エーテル鎖全体におけるものを指す。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される用語「所望により置換された」は、フェニルまたはナフチル (naphthyl) 基等の関連基から延び得る置換基を指し、F、ClおよびBrを含むハロゲン；C₁～C₄アルキル；OR₁₂（R₁₂はC₁～C₄アルキルである）；およびNR₁₃R

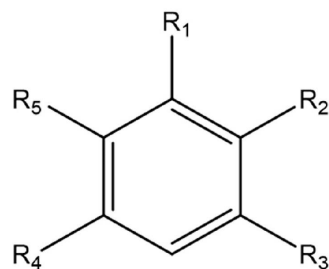
50

14 (R_{13} および R_{14} は、独立して、 H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択される)等の官能基を含み得る。

【0040】

本発明の第1の態様によれば、式(I)の化合物、またはその薬学的に許容できる塩、溶媒和物若しくはプロドラッグが提供される：

【化7】



式(I)

10

式中、

R_1 は、 OH および OR_6 からなる群から選択され、

R_6 は $C_1 \sim C_4$ アルキルであり；

R_2 は、 H 、 $COOR_7$ および $C(O)NR_8R_9$ からなる群から選択され、

R_7 、 R_8 および R_9 は、独立して H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され；

R_3 は、 $L-A$ であり、

L は、 $C_2 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニルおよび $C_2 \sim C_8$ アルコキシアルキルから選択されるリンカーであり、そして、

A は、所望により置換されたフェニルおよび所望により置換されたナフチル(naphtyl)から選択され；

R_4 は、 H 、 OR_{10} 、ハロおよび $C_1 \sim C_4$ アルキルからなる群から選択され、

R_{10} は、 H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され；そして、

R_5 は、 H 、 OR_{11} 、ハロおよび $C_1 \sim C_4$ アルキルからなる群から選択され、

R_{11} は、 H および $C_1 \sim C_4$ アルキルから選択され、

化合物は、 $SOX18$ 活性の阻害における使用のためのものである。

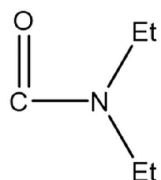
【0041】

実施形態において、 R_1 は、 OH および OMe からなる群から選択される。

【0042】

好適には、 R_2 は、 H 、 $COOH$ 、 $COOMe$ および

【化8】



40

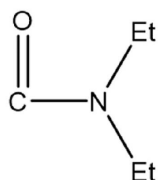
からなる群から選択される。

【0043】

好ましくは、 R_2 は、 $COOH$ および

50

【化 9】



から選択される。

【0044】

実施形態において、

R_4 は、H、OH、OMe、Cl および Me からなる群から選択される。

10

【0045】

好適には、 R_5 は、H、OH および OMe からなる群から選択される。

【0046】

特定の実施形態において、 R_4 および R_5 は H である。

【0047】

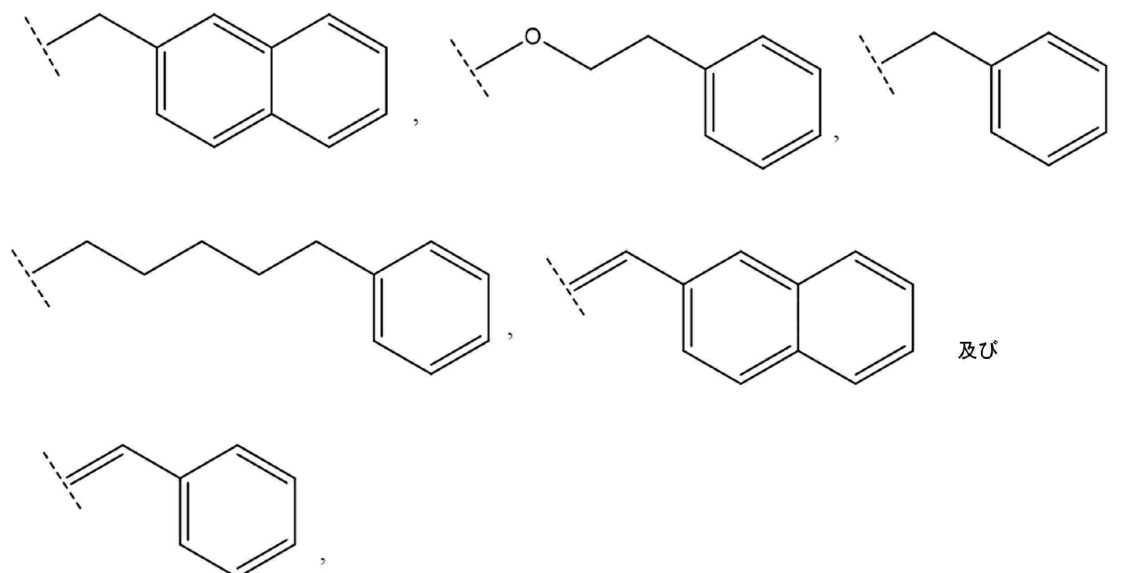
実施形態において、L は、 $C_2 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニルおよび $C_2 \sim C_6$ アルコキシアルキルから選択されるリンカーである。

【0048】

列挙した実施形態のいずれかにおいて、 R_3 は：

20

【化 10】



30

からなる群から選択される。

式中、破線は、隣接する原子から式 I の環への結合を示し、示される構造は、その E / Z 異性体を含む。

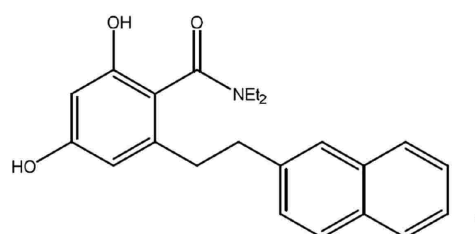
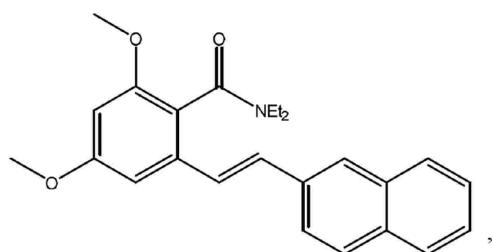
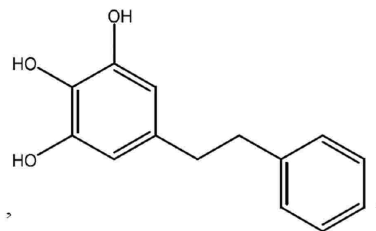
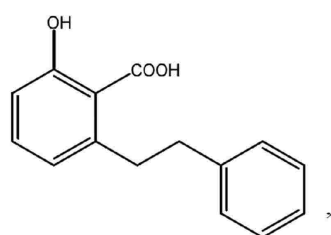
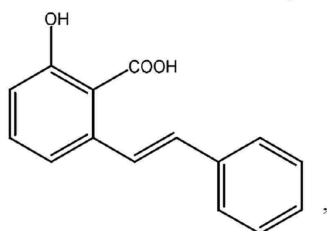
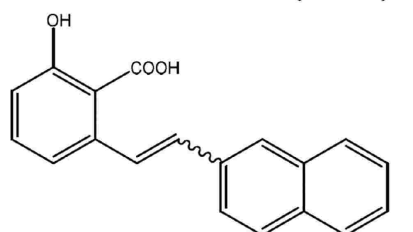
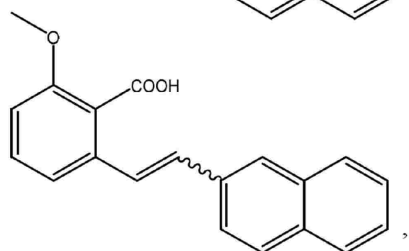
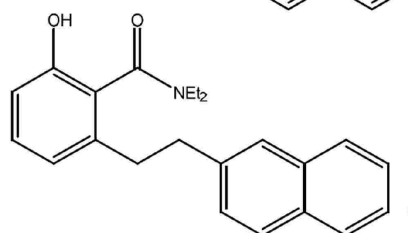
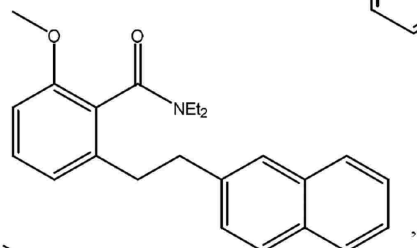
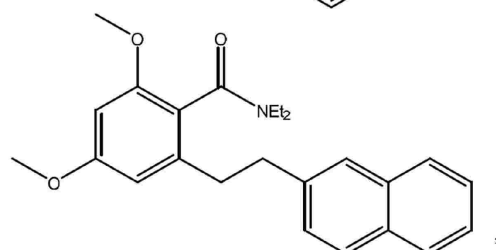
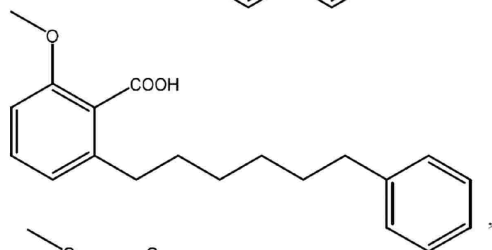
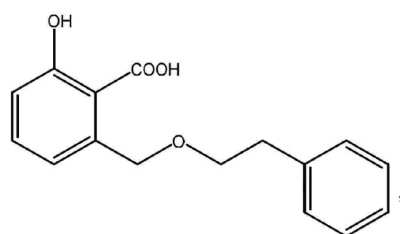
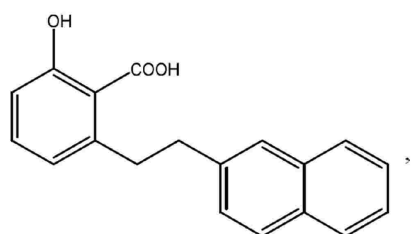
40

【0049】

一実施形態において、第 1 の態様の化合物は：

50

【化 1 1】



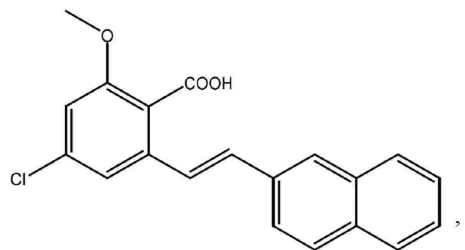
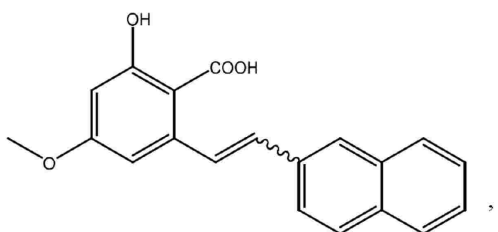
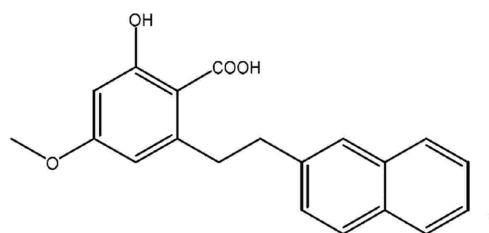
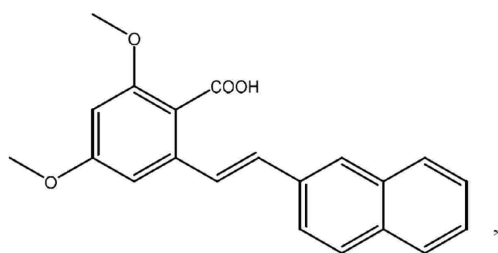
10

20

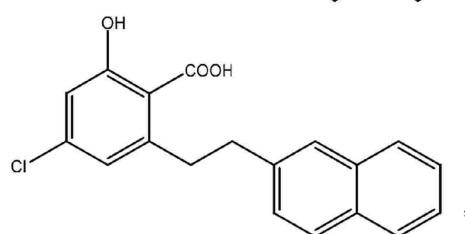
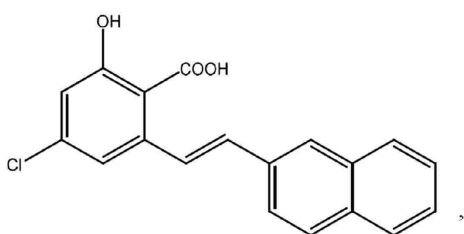
30

40

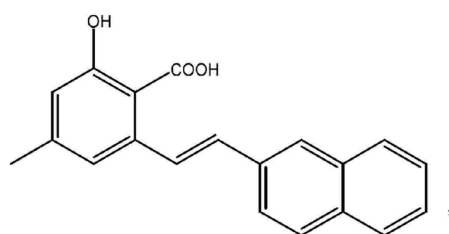
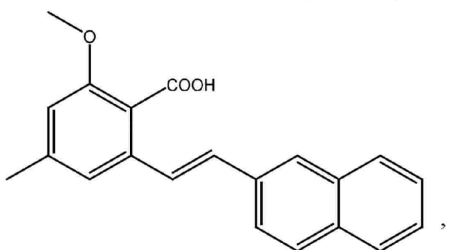
50



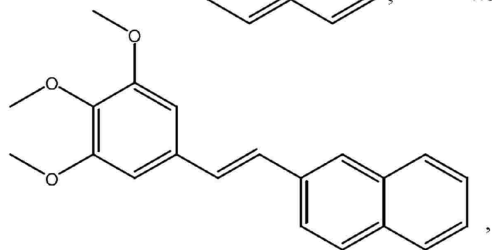
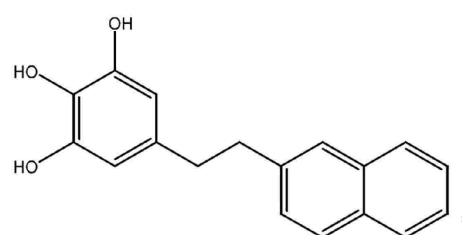
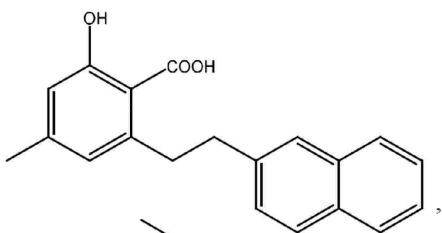
10



20

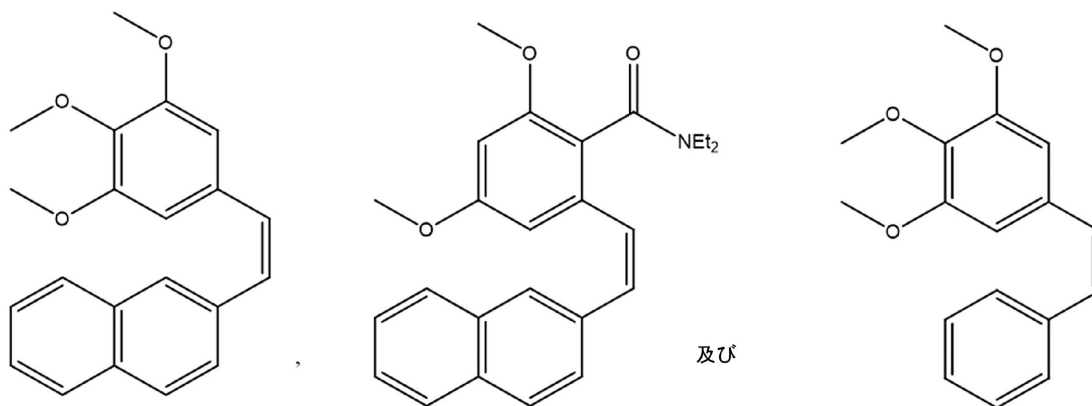


30



40

50



からなる群から選択される。

【 0 0 5 0 】

好ましい一実施形態において、本態様の化合物は：

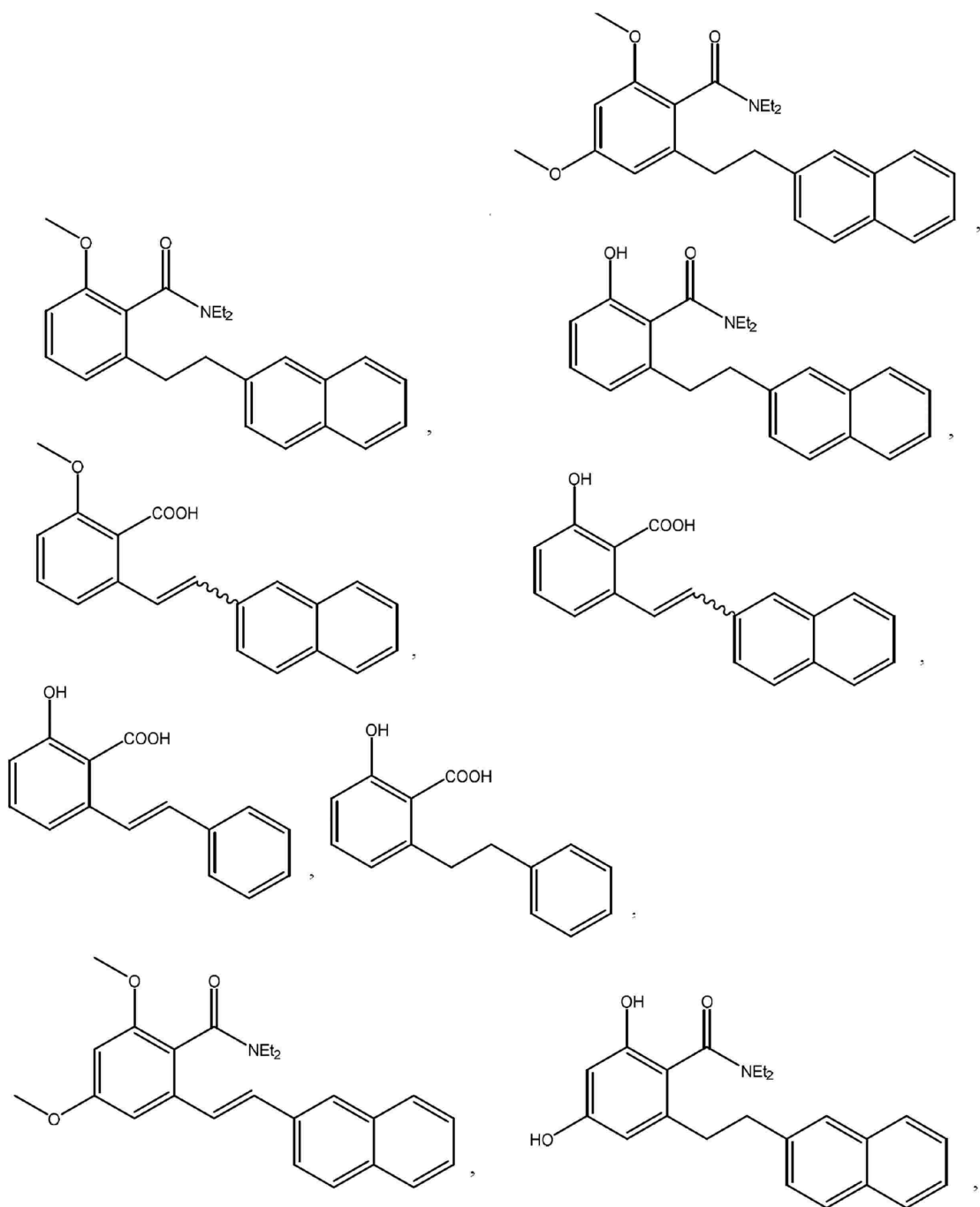
20

30

40

50

【化 1 2】



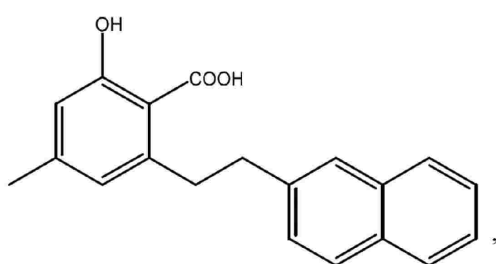
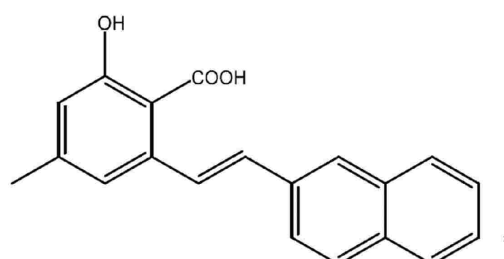
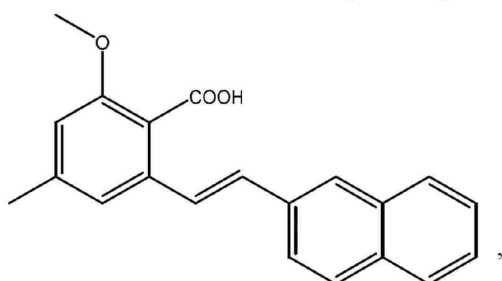
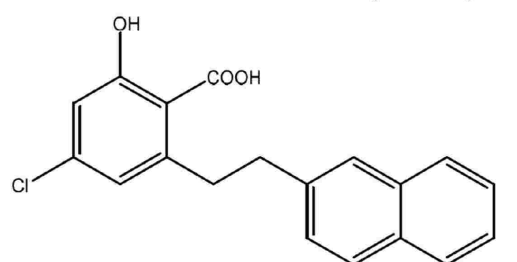
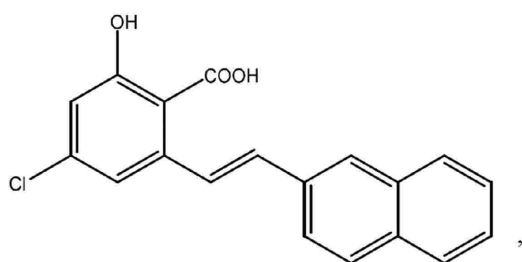
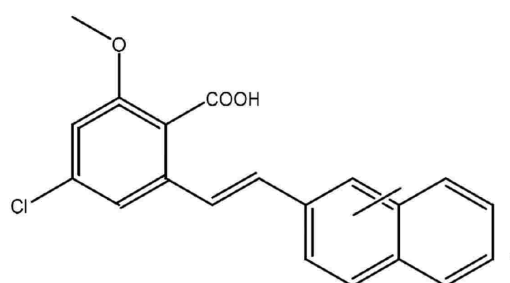
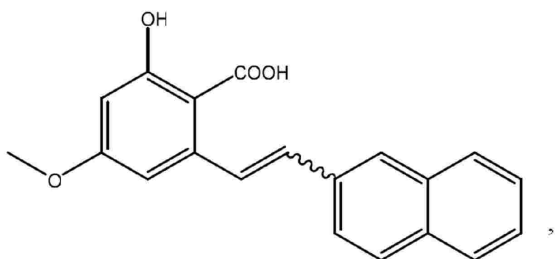
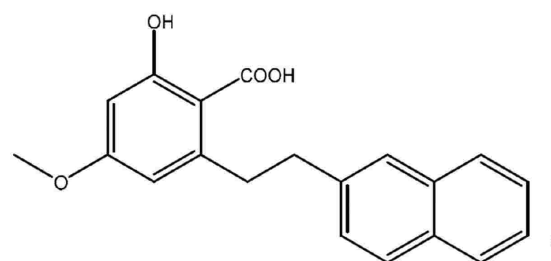
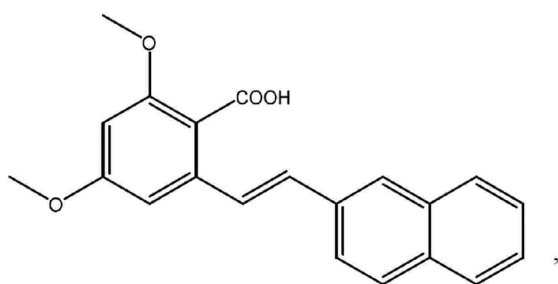
10

20

30

40

50



及び

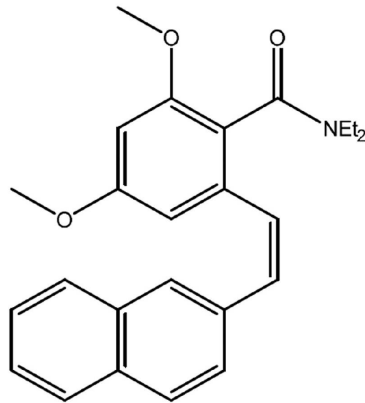
10

20

30

40

50



10

からなる群から選択される。

【0051】

当業者は、SOX18が転写因子のSOX（SRY関連のHMG-ボックス）ファミリーのメンバーであることを理解するであろう。

これらの転写因子は、典型的には、胚発達の調節および細胞運命の決定に関与する。

特に、SOX18タンパク質は、他のタンパク質とタンパク質複合体を形成した後、転写レギュレーターとして機能し得る。

20

SOX18は毛髪、血管、およびリンパ管発達に役割を果たすことが示されている。

SASH1の別名としては、SRY-ボックス18、HLTSおよびHLTRSを挙げることができる。

ヒトにおけるSOX18遺伝子のヌクレオチド配列、またはそのコードされたタンパク質を参照する受入番号の非限定的な例は、当該技術分野で十分理解されているように、NG_008095.1、NM_018419.2およびNP_060889.1を含む。

本明細書で一般的に使用される「SOX18」は、特に明記しない限り、SOX18核酸またはコードされたタンパク質を指し得る。

【0052】

好適には、調節されるSOX18活性は、リンパ脈管新生（即ち、現存するリンパ管からの新たなリンパ管の成長）、脈管形成（即ち、胚循環系の新規形成）および/または血管新生（即ち、既存の血管構造からの血管の成長）のものである。これを目的として、第1の態様の実施形態では、式(I)の1つ以上の化合物は、リンパ脈管新生（lymphangiogenesis）、血管新生（angiogenesis）および/または脈管形成（vasculogenesis）の処置、低減または予防に有用であり得る。

30

【0053】

したがって、式(I)の1つ以上の化合物は、好適には、血管新生 - および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の症状の重篤さの予防および/または軽減に効果を有する。

【0054】

一実施形態において、SOX18活性は、DNA配列および/またはタンパク質に対する接触および/または結合を含む。

40

この関連で、第1の態様の化合物は、SOX18 DNA結合および/またはタンパク質-タンパク質相互作用の阻害を含むがこれに限定されない、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の、根底にある細胞シグナル伝達経路の1つ以上に対する効果を有し得る。

【0055】

DNA結合に関連して、SOX18は、そのHMGボックスにより、DNAに、たとえば、コンセンサス配列5'-AACAAAG-3'に結合して、この結合を介して転写を転写促進することが可能な転写因子であると理解されるであろう。

50

更に、SOX18タンパク質は、1つ以上のタンパク質とタンパク質複合体を形成した後、転写レギュレーターとして機能することができる。

【0056】

本明細書で使用される「遺伝子」は、非限定的に、1つ以上のアミノ酸コード化ヌクレオチド配列と、プロモーターおよび他の5'非翻訳配列、イントロン、ポリアデニル化配列および他の3'非翻訳配列を含む1つ以上の非コード化ヌクレオチド配列とを含み得る、ゲノムの構造的な遺伝子単位である核酸である。殆どの細胞生物において、遺伝子は、二本鎖DNAを含む核酸である。

【0057】

本明細書で使用される用語「核酸」は、単鎖または二本鎖DNAおよびRNAを示す。

DNAは、ゲノムDNAおよびcDNAを含む。

RNAは、mRNA、RNA、RNAi、siRNA、cRNAおよび自己触媒RNAを含む。

核酸は、DNA-RNAハイブリッドでもあり得る。

核酸は、A、G、C、TまたはU塩基を含むヌクレオチドを一般に含むヌクレオチド配列を含む。

しかしながら、ヌクレオチド配列は、非限定的に、イノシン、メチルシトシン(methylcytosine)、メチルイノシン、メチルアデノシンおよび/またはチオウリジン等の他の塩基を含むことができる。

【0058】

「タンパク質」は、アミノ酸ポリマーを意味する。

当業者が認識するように、用語「タンパク質」は、その範囲内に、タンパク質のリン酸化形態(即ち、リン酸化タンパク質)および/またはタンパク質のグリコシル化形態(即ち、糖タンパク質)も含む。

「ペプチド」は、50以下のアミノ酸を有するタンパク質である。

「ポリペプチド」は、50を超えるアミノ酸を有するタンパク質である。

【0059】

天然に存在する(たとえば、アレル変異体)およびそのオルソログ等の、SOX18のタンパク質「変異体」も提供される。

好ましくは、タンパク質変異体は、本明細書に開示したまたは当該技術分野で既知のSOX18のアミノ酸配列と、少なくとも70%若しくは75%、好ましくは少なくとも80%若しくは85%、またはより好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を共有する。

【0060】

本明細書で使用される用語「タンパク質-タンパク質相互作用」または「PI」は、2つ以上のタンパク質の間の密接なおよび安定した結合を指す。

これは通常、水素結合等の非共有化学結合の形成を含む。

PP1は、2成分(2つのタンパク質結合パートナー;二量体)または3成分(3つ以上のタンパク質結合パートナー、たとえば、三量体)であり得る。

PP1内のタンパク質(即ち、結合パートナー)は、同じタンパク質(ホモ二量体またはホモ三量体等)または異なるタンパク質(ヘテロ二量体またはヘテロ三量体等)であり得る。

好ましくは、タンパク質相互作用は、好適な条件下で、タンパク質またはタンパク質サブユニットからのSOX18の解離が起こり得るように、可逆的である。

好ましくは、そのような力は弱く、たとえば、 μM 範囲内の K_d 'sを有し、したがって、本発明の化合物は、SOX18とタンパク質との間の相互作用を邪魔(disrupt)することができる。

【0061】

好ましくは、タンパク質は、SOX7、RBPJ、XRCC5、SOX18、ILF3、DDX17およびそれらの任意の組み合わせからなるリストから選択される。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

上記に鑑みれば、コアフェニル環の周囲の基の選択に応じて、S O X 1 8 によるDNA結合および/または特定のタンパク質 - タンパク質相互作用の阻害に対して化合物が示す臨床効果を、基の選択に応じて幾分調整することができるのは、第1の態様の化合物の1つの利点である。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、1つ以上のキラル中心を有する化合物を提供することができる。本発明の化合物のラセミ混合物は、活性で、選択的およびバイオアベイラブルであり得るが、単離された異性体も関心対象であり得る。

【 0 0 6 4 】

本発明の化合物は、本明細書に記載する化合物の立体異性体も含み、1つを超える本発明の化合物を含む組成物は、適宜、そのような立体異性体、たとえば、E / Z 異性体を、個々にまたは任意の割合で混合されて含むことができる。

立体異性体は、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ混合物、およびそれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。そのような立体異性体は、従来の技術を用いて、エナンチオマー出発物質を反応させることにより、または本発明の化合物およびプロドラッグの異性体を分離することにより調製および分離することができる。

異性体は、幾何異性体を含むことができる。幾何異性体の例としては、二重結合において、t r a n s 異性体またはc i s 異性体 (E / Z) が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の化合物の中で他の異性体が想定される。

異性体は、純粋な形態、または本明細書に記載する化合物の他の異性体との混合物のいずれかで使用することができる。

【 0 0 6 5 】

光学活性形態の調製と、活性の決定のための様々な方法が当該技術分野で既知である。そのような方法としては、本明細書に記載する標準的な試験、および当該技術分野で周知の他の同様の試験が挙げられる。本発明による化合物の光学異性体を得るのに使用できる方法の例としては、以下が挙げられる：

i) 個々のエナンチオマーの巨視的結晶を手動で分離する、結晶の物理的分離。この技術は、特に、別々のエナンチオマーの結晶が存在する (即ち、材料は集合体である) 、および結晶が視覚的に区別される場合に使用することができる；

i i) 個々のエナンチオマーがラセミ体の溶液から別々に結晶化される同時晶析。ラセミ体が固体状態の集合体である場合のみ可能である；

i i i) エナンチオマーと酵素との反応速度の違いによる、ラセミ体の部分的または完全な分離である酵素的分離；

i v) 合成の少なくとも1つのステップが、所望のエナンチオマーのエナンチオマー的に純粋なまたは富んだ合成前駆体を得るために酵素反応を用いる合成技術である酵素不斉合成；

v) キラル触媒またはキラル補助剤を使用して達成され得る、生成物に不斉 (即ち、キラリティー) をもたらす条件下で、所望のエナンチオマーがアキラルな前駆体から合成される化学不斉合成；

v i) 個々のエナンチオマーをジアステレオマーに変換する、エナンチオマー的に純粋な試薬 (キラル補助剤) とラセミ化合物を反応させるジアステレオマー分離。次いで、得られたジアステレオマーを、それらの現時点ではより異なる構造的差異により、クロマトグラフィーまたは結晶化により分離し、キラル補助剤を後に除去して所望のエナンチオマーを得る；

v i i) ラセミ体からのジアステレオマーを平衡化して、所望のエナンチオマーからのジアステレオマーを溶液中で優勢にし、または所望のエナンチオマーからのジアステレオマーの優位な結晶化が平衡を攪乱 (p e r t u r b s) し、それにより最終的に、原則として全ての材料が所望のエナンチオマーからの結晶ジアステレオマーに変換される、第

10

20

30

40

50

1 および第 2 種不斉転換。

次いで、ジアステレオマーから所望のエナンチオマーが解放される；

v i i i) 速度論的条件下でのキラル、非ラセミ試薬または触媒とのエナンチオマーの相異なる反応速度による、ラセミ体の部分または完全分割（または、部分的に分割された化合物の更なる分割）を含む速度論的分割；

i x) 非キラル出発物質から所望のエナンチオマーが得られ、そして、立体化学的完全性は、合成の過程に亘って損なわれずまたは最小限にのみ損なわれる、非ラセミ前駆体からのエナンチオ特異的合成；

x) ラセミ体のエナンチオマーが、固定相とのそれらの異なる相互作用により液体移動相中に分離される、キラル液体クロマトグラフィー。

10

固定相は、キラル材料から作製されてもよく、または移動相は、異なる相互作用を引き起こすために追加のキラル材料を含んでもよい；

x i) ラセミ体が揮発し、気体移動相中での固定非ラセミキラル吸着剤相を含むカラムとのそれらの異なる相互作用によりエナンチオマーが分離される、キラルガスクロマトグラフィー；

x i i) 特定のキラル溶媒への 1 つのエナンチオマーの優先的な溶解によりエナンチオマーが分離される、キラル溶媒を用いた抽出；並びに

x i i i) ラセミ体が薄膜バリアと接触して置かれる、キラル膜を通した輸送。バリアは一般に、一方がラセミ体を含む 2 つの混和性流体を分離し、濃度差または圧力差等の推進力により膜バリアを通した優先的な輸送が起きる。ラセミ体の一方のエナンチオマーのみを通過させる、膜の非ラセミキラル特性の結果として、分離が生じる。

20

【 0 0 6 6 】

第 1 の態様の化合物は、所望により、1 つのエナンチオマーまたはジアステレオマーが過剰に存在し、特に、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上（100%を含む）の程度まで過剰に存在する、エナンチオマー的にまたはジアステレオマー的に富んだ組成物、たとえば、エナンチオマーまたはジアステレオマーの混合物等で提供され得る。

【 0 0 6 7 】

第 1 の態様の化合物は、それ自体で使用され、または、適宜、薬学的に許容できるエステル、アミド、塩、溶媒和物、プロドラッグ若しくは異性体の形態で使用され得る。

30

たとえば、化合物は、薬学的に許容できる塩として提供されてもよい。

使用される場合、薬物化合物の塩は、薬理学的におよび薬学的に許容できる必要があるが、薬学的に許容できない塩は、遊離活性化合物またはその薬学的に許容できる塩の調製に都合よく使用することができ、本発明の範囲から除外されるものではない。

そのような薬理学的におよび薬学的に許容できる塩は、文献に詳細されている標準的な方法を用いて、有機または無機酸との薬物の反応により調製することができる。

【 0 0 6 8 】

本発明により有用な、化合物の薬学的に許容できる塩の例としては、酸付加塩が挙げられる。

しかしながら、薬学的に許容できない酸の塩も、たとえば、化合物の調製および精製に有用であり得る。

40

本発明による好適な酸付加塩としては、有機および無機酸が挙げられる。

好ましい塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ピルビン酸、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、オキサロ酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、およびイセチオン酸から形成されるものを含む。

他の有用な酸付加塩は、プロピオン酸、グリコール酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、サリチル酸等を含む。

薬学的に許容できる塩の特定の例としては、硫酸塩、ピロ亜硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリ

50

ン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カブロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン - 1, 4 - 二酸塩、ヘキシン - 1, 6 - 二酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩 (methoxybenzoates)、フタル酸塩、スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、 α -ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン - 1 - スルホン酸塩、ナフタレン - 2 - スルホン酸塩、およびマンデル酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0069】

酸付加塩は、好適な塩基を用いた処理により、遊離塩基に再変換することができる。本発明により有用な化合物またはプロドラッグ上に存在し得る酸部分の塩基性塩の調製は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリエチルアミン等の薬学的に許容できる塩基を使用して、同様の方法で調製することができる。

【0070】

本発明による化合物のエステルは、化合物中に存在し得るヒドロキシルおよび/またはカルボキシル基の官能化により調製することができる。

アミドおよびプロドラッグも当該技術分野で既知の技術を用いて調製することができる。

たとえば、アミドは、好適なアミン反応関与体を用いてエステルから調製することができる、またはアンモニア若しくは低級アルキルアミンとの反応により無水物または酸塩化物から調製することができる。

20

更に、本発明の化合物のエステルおよびアミドは、好適な有機溶媒（たとえば、テトラヒドロフラン、アセトン、メタノール、ピリジン、N, N - ジメチルホルムアミド）中に 0 ~ 60 の温度でカルボニル化剤（たとえば、ギ酸エチル、無水酢酸、塩化メトキシアセチル、塩化ベンゾイル、イソシアン酸メチル、クロロギ酸エチル、塩化メタンスルホン酸）および好適な塩基（たとえば、4 - ジメチルアミノピリジン、ピリジン、トリエチルアミン、炭酸カリウム）と反応させることにより作製することができる。

【0071】

薬学的に許容できる溶媒和物の例としては、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸またはエタノールアミンと組み合わせた本発明による化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0072】

本発明の第2の態様によれば、第1の態様の化合物、またはその薬学的に許容できる塩、溶媒和物若しくはプロドラッグと、薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。

【0073】

好適には、薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または賦形剤は、希釈剤、溶媒、pH緩衝液、結合剤、充填剤、乳化剤、錠剤崩壊剤、ポリマー、滑沢剤、油、脂肪、ワックス、コーティング、粘度調整剤、流動促進剤等の1つ以上であり得またはそれらを含み得る。

40

【0074】

本発明の化合物の塩形態は、改善された溶解度起因して特に有用であり得る。

【0075】

希釈剤は、微結晶セルロース、乳糖、マンニトール、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、カオリン、乾燥澱粉、粉糖等の1つ以上を含み得る。

結合剤は、ポビドン、澱粉、ステアリン酸、ガム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の1つ以上を含み得る。

錠剤崩壊剤は、澱粉、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、澱粉グリコール酸ナトリウム等の1つ以上を含み得る。

50

溶媒は、エタノール、メタノール、イソプロパノール、クロロホルム、アセトン、メチルエチルケトン、塩化メチレン、水等の１つ以上を含み得る。

滑沢剤は、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、ステアリルフマル酸ナトリウム、水素化植物油、ペヘン酸グリセリル（ペヘネート）等の１つ以上を含み得る。

流動促進剤は、コロイド状二酸化ケイ素、タルクまたはコーンスターチ等の１つ以上を含み得る。

緩衝液は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液および炭酸緩衝液を含み得るが、それらに限定されない。

充填剤は、ゼラチン、澱粉および合成ポリマーゲルを含む１つ以上のゲルを含み得るが、それらに限定されない。

10

コーティングは、フィルム形成剤、溶媒、可塑剤等の１つ以上を含み得る。好適なフィルム形成剤は、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポビドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリエチレングリコール、アクリレート等の１つ以上であり得る。

好適な溶媒は、水、エタノール、メタノール、イソプロパノール、クロロホルム、アセトン、メチルエチルケトン、塩化メチレン等の１つ以上であり得る。

可塑剤は、プロピレングリコール、ヒマシ油、グリセリン、ポリエチレングリコール、ポリソルベート等の１つ以上を含み得る。

【００７６】

20

本発明により有用であり得る賦形剤の非限定的な例を提供する、Handbook of Excipients 6th Edition、Eds. Rowe, Sheskey & Quinn (Pharmaceutical Press) が参照される。

【００７７】

薬学的に許容できる担体、希釈剤および／または賦形剤の選択は、少なくとも部分的に、製剤の投与モードに依存することが認識されるであろう。

単なる例として、組成物は、錠剤、カプセル剤、カプレット、散剤、注射用液体、坐薬、遅延放出製剤、浸透圧ポンプ製剤の形態、または投与に有効かつ安全な任意の他の形態であり得る。

【００７８】

30

好適には、医薬組成物は、下記に記載する哺乳動物における疾病、疾患または状態の処置または予防のためのものである。

好ましくは、医薬組成物は、哺乳動物における血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の処置または予防のためのものである。

【００７９】

本発明の第３の態様は、有効量の第１の態様の化合物、若しくはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ、または第２の態様の医薬組成物を投与することにより、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態を処置または予防するステップを含む、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の処置または予防方法に存在する。

40

【００８０】

本発明の第４の態様は、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態等の疾病、疾患または状態の処置または予防のための医薬の製造における第１の態様の化合物、またはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグの使用を提供する。

【００８１】

本明細書で一般的に使用される用語「投与している」または「投与」等は、たとえば、特定の経路またはビヒクル等によって化合物または組成物を哺乳動物に導入することを記述する。

投与の経路は、局所、非経口および経腸を含むことができ、経腸は、経口、頬側、舌下

50

、経鼻、肛門、胃腸、皮下、筋内および皮内投与経路を含むが、それらに限定されない。

【0082】

本明細書で使用される「処置（処理）している」（または「処置する」または「処置」）は、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の徴候または症状を、それらの発生開始後に回復させる治療的介入を指す。

血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態に関連した用語「回復させる」は、処置の任意の観察可能な有益な効果を指す。

処置は、対象に対して絶対的な有益である必要はない。

有益な効果は、当業者に既知の任意の標準的な方法を用いて決定することができる。

【0083】

本明細書で使用される「予防している」（または「予防する」または「予防」）は、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の症状、態様または特徴の発症前に開始されて、症状、態様または特徴を予防または軽減する一連の行動（治療の有効量の明細書に記載した化合物の1つ以上の投与等）を指す。

そのような予防は、対象に対して絶対的な有益である必要はないと理解するべきである。

「予防的」処置は、血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の症状、態様または特徴を発生する危険性を低減する目的で、血管新生および／若しくはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患若しくは状態の徴候を示さない、または初期徴候のみを示す対象に投与される処置である。

【0084】

本明細書で使用される「有効量」は、処置されている状態の症状の発生を予防する、または症状の悪化の停止をもたらす、または症状の重篤さを処置および緩和し若しくは少なくとも軽減するのに十分な、関連化合物または組成物の量の投与を指す。

有効量は、患者の年齢、性別、体重等によって、当業者が理解するように変動するであろう。適切な投与量または投与計画は、日常的な治験を介して確認され得る。

【0085】

本明細書で使用される用語「対象」または「個人」または「患者」は、治療が望ましい任意の対象、特に脊椎動物対象、更に特に哺乳動物対象を指し得る。

好適な脊椎動物としては、霊長類、鳥類、家畜動物（たとえば、羊、雌牛、馬、ロバ、豚）、研究室試験動物（たとえば、兎、マウス、ラット、モルモット、ハムスター）、伴侶動物（たとえば、猫、犬）および捕獲された野生動物（たとえば、キツネ、シカ、ディンゴ）が挙げられるが、これらに制限されない。

好ましい対象は、本明細書に記載した血管新生および／またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態の処置を必要とするヒトである。

しかしながら、前述した用語は、症状が必ず存在することを暗示するものではないことが理解されるであろう。

【0086】

本明細書で使用される用語「血管新生関連の疾病、疾患または状態」は、過剰な血管成長を含む異常な血管成長に関連した任意の疾患を示す。

血管新生の制御は、特定の疾病、疾患または状態において変更されていることが理解されるであろう。

そのような疾病の多くは、病理学的血管新生（即ち、不適当な、過剰なまたは望ましくない血管形成）を含み、病理学的血管新生は疾病状態を支持し、多くの場合、そのような疾病に関連した細胞および組織損傷に寄与する。

血管新生関連の疾病、疾患または状態（即ち、病理学的血管新生を含むもの）は、多数および様々であり得、たとえば、様々なタイプの癌、慢性炎症性疾病、および血管新生疾病を含み得る。

慢性炎症性疾病、疾患または状態の例としては、クローン病および潰瘍性大腸炎等の炎症性疾病、関節リウマチ、ループス、乾癬、アテローム性動脈硬化症および糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0087】

本明細書で一般的に使用される用語「リンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態」は、過剰なリンパ管成長を含む異常なリンパ管成長に関連した任意の疾患を示す。

リンパ脈管新生は、成長因子、サイトカインおよびケモカインの複雑なネットワークにより最終的に制御され、癌成長および転移、炎症並びに移植片拒絶を含むがこれらに限定されない多数の病理学的条件下で起こり得る（たとえば、El-Chemaly、Ann N Y Acad Sci (2008)；Patel、Seminars Ophthalmol (2009)；El-Chemaly、Lymphatic Res Biol (2009)；Pepper、Clin Cancer Res (2001) 参照）。

転移に関連して、癌細胞は、リンパ管を介してリンパ節および遠隔器官に転移し得、これは多くの場合、原発癌を越える癌細胞の伝播の最初ステップである。

10

【0088】

第3および第4の態様の一実施形態では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、眼科疾病、疾患または状態、特に血管新生を含むものでありまたはそれを含む。

これを目的として、血管新生および/またはリンパ脈管新生は、加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、未熟児の網膜症、血管新生緑内障、虹彩血管新生 (iritis rubeosis)、角膜血管新生、毛様体炎、鎌状細胞網膜症、角膜損傷中の血管応答および翼状片等の眼科疾病、疾患または状態の発生に中心的な役割を果たし得る。これらの眼科疾病、疾患または状態が進行するにつれて、眼の血管は過剰に増殖し得るだけでなく、新しい血管は弱く、漏れやすく、出血する傾向もあり得る。そのため、新たな異常な血管は、出血し、続いて対象に失明をもたらす場合がある。

20

【0089】

第3および第4の態様の一実施形態では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、癌でありまたは癌を含む。これを目的として、癌の形成および転移は、典型的には、病理学的血管新生を含む。健康な組織と同様に、癌は、栄養素および酸素を提供し、細胞老廃物を除去するために新たな血管形成を必要とする。したがって、病理学的血管新生は、癌の成長および拡大に重要である。

【0090】

本明細書で一般的に使用される用語「癌」、「腫瘍」、「悪性」および「悪性腫瘍」は、多くの場合、発癌に関連した1つ以上の遺伝子突然変異若しくは他の遺伝子変化を含む無軌道な若しくは異常な分子表現型、腫瘍マーカーの発現、腫瘍抑制因子発現若しくは活性の喪失、および/または無軌道な若しくは異常な細胞表面マーカー発現が付随する、無軌道なまたは異常な細胞増殖、分化および/または転位により特徴付けられる、疾病若しくは状態、または疾病若しくは状態に関連した細胞若しくは組織を指す。

30

【0091】

癌は、肉腫、癌腫、リンパ腫、白血病および芽細胞腫等の全ての主要な癌形態を含むがこれらに限定されない、<http://www.cancer.gov/cancertopics/alphalist>におけるNCI Cancer Indexに列挙されているもの等の任意の高悪性度のまたは潜在的に高悪性度の癌、腫瘍または他の悪性腫瘍を含むことができる。

40

これらは、

乳癌、肺腺癌を含む肺癌、

卵巣癌、頸部癌、子宮癌および前立腺癌を含む生殖器系の癌、

脳および神経系の癌、頭部および頸部癌、

結腸癌、結腸直腸癌および胃癌を含む胃腸癌、

肝癌、腎臓癌、黒色腫および皮膚癌腫等の皮膚癌、

リンパ系癌および骨髄単球性癌を含む血液細胞癌、

膵臓癌および下垂体癌等の内分泌系の癌、

骨および軟組織癌を含む筋骨格癌、

50

血管腫、血管腫および血管肉腫等の血管癌または新生物を含み得るが、それらに限定されない。

【0092】

特定の実施形態において、癌は、前立腺癌、肺癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、結腸癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、黒色腫、肝細胞腫、肝細胞癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫、血管新生物、たとえば、血管腫 (hemangioma)、血管腫 (angioma) および血管肉腫並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0093】

特定の一実施形態において、第1の態様の化合物または第2の態様の医薬組成物は、前記癌の転移を予防および/または阻害する。

【0094】

本明細書で使用される「転移」または「転移性」は、循環若しくはリンパ系を介したまたは自然の体腔を介した、悪性癌細胞または新生物の、典型的には腫瘍、癌または新生物の一次病巣から体内の遠隔部位への転位または移動、およびその後の1つ以上の新たな位置における1つ以上の二次腫瘍またはそのコロニーの発生を指す。

「転移」は、転移の結果として形成された二次腫瘍またはコロニーを指し、そして、微小転移と、局所および遠隔転移とを包含する。

【0095】

病理学的血管新生およびリンパ脈管新生は、癌転移において重要な役割を果たし得ることが認識されるであろう。

これを目的として、原発癌における血管の形成は、癌細胞を血流に進入させ、身体全体に循環させるだけでなく、一次部位から転移した癌細胞により播種された転移性癌の形成および成長を支持する。

【0096】

前述した2つの態様の更なる実施形態では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、腎疾病、疾患または状態でありまたはそれを含む。

好ましくは、腎疾病、疾患または状態は、慢性腎移植片機能不全、原発性腎線維化疾患、蛋白尿、糖尿病性腎症、腎炎症およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0097】

第3および第4の態様の1つの特定の実施形態では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、アテローム性動脈硬化症でありまたはそれを含む。

これを目的として、アテローム性動脈硬化症における病理学的変化は、少なくとも部分的に、慢性炎症および血管新生に起因し得ることを、当業者は認識するであろう。

更に、NF- κ B 依存性アテローム生成的炎症性応答と、SOX18 調節との間の関連性が示されており、SOX18 はアテローム性動脈硬化症の発生に役割を果たし得ることが示唆される (Garcia-Ramirez ら、2005)。

Sox18 は、動脈硬化巣において過剰発現していることも示されており、そして、したがって、疾病病因論の主要な構成要素であり得る (Brown ら、2014)。

【0098】

第3および第4の態様の一実施形態では、血管新生および/またはリンパ脈管新生関連の疾病、疾患または状態は、乏毛症・リンパ水腫・毛細血管拡張症症候群 (Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia Syndrome) でありまたはそれを含む。

この関連で、乏毛症・リンパ水腫・毛細血管拡張症症候群 (Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia Syndrome) は、SOX18 遺伝子における突然変異に関連することが認識されるであろう。

【0099】

第5の態様において、本発明は、対象における癌の転移の予防または阻害方法を提供し、この方法は、有効量の第1の態様の化合物、若しくはその薬学的に有効な塩、溶媒和物

10

20

30

40

50

若しくはプロドラッグ、または第2の態様の医薬組成物を対象に投与することにより、癌の転移を阻害または予防するステップを含む。

【0100】

好適には、癌は、本明細書にて以前に記載したものである。

【0101】

本発明の第6の態様は、対象におけるSOX18活性を阻害、防止または低減する方法に存在し、この方法は、有効量の第1の態様の化合物、若しくはその薬学的に有効な塩、溶媒和物若しくはプロドラッグ、または第2の態様の医薬組成物を投与することにより、対象におけるSOX18活性を阻害、防止または低減するステップを含む。

【0102】

好適には、SOX18活性は、DNA配列および/またはタンパク質に対する接触および/または結合を含む。好ましくは、タンパク質は、SOX7、RBPJ、XRCC5、SOX18、ILF3、DDX17およびそれらの任意の組み合わせからなるリストから選択される。

【0103】

上記の個々の節に参照した本発明の様々な特徴および実施形態は、変更すべきところは変更して、適宜、他の節にも適用される。

その結果として、1つの節に詳細に記載された特徴は、他の節に詳細に記載された特徴と適宜組み合わせることができる。

【0104】

以下の実験の節は、本発明の特定の化合物の特性、およびそれらの有効性をより詳細に記載する。

本発明は、本発明の化合物のある特定の実施形態およびそれらの有効性を、本発明を少しも限定することなく説明するものである。

【実施例】

【0105】

実施例1

材料および方法

化合物の調製

海産物抽出物ライブラリー

オーストラリアおよび南極に亘って収集した海産物ライブラリーから生成したn-ブタノール画分のライブラリーをスクリーニングに使用した。

活性画分を純粋な化合物に分画し、これを元の画分と同じ方法で再アッセイした。

【0106】

南オーストラリアおよび南極に亘って収集した海産物無脊椎動物および藻類の2688のサンプルのライブラリーを処理して、ハイスループットバイオアッセイに好適な抽出物ライブラリーを生成した。

EtOH抽出物をデカントし、濃縮し、そして、n-BuOHおよびH₂O相に分配した後、深い96ウェルプレートに移動し、>10倍濃度の小分子とした一方、塩を除去した。

n-BuOH画分(乾燥残留物の25mg/mL w/v)を、10-および100倍希釈(2.5および0.25mg/mL)の後にスクリーニングに使用した。

活性画分をヘキサン、CH₂Cl₂およびMeOH中で粉碎し、そして、HPLCにより純粋な化合物に分画した。

全化合物を画分として同じ方法でアッセイした。

【0107】

Sm1(6-ウンデシルサリチル酸)およびSm2(6-トリデシルサリチル酸)を、元の褐藻類サンプルである、カウロシステイス・セファロールニトス(Caulocystis cephalorhithos)(CMB-01671)の水性EtOH抽出物から精製した。

10

20

30

40

50

褐藻カウロシスティス・セファロルニトス (*Caulocystis cephalorhithos*) (CMB-01671) のサンプルの水性 EtOH 抽出物を、真空下で濃縮し (4.8 g)、そして、n-BuOH (0.80 g) および H₂O (4.0 g) 可溶性材料に分配した。

n-BuOH 可溶性分配物のアリコート (40 mg) を、HPLC 分画 (Agilent Zorbax SB C18 5 μM、250 × 9.4 mm カラム、60% の MeOH / H₂O ~ 100% の MeOH で 10 分間、次いで 100% の MeOH で 10 分間の 4 mL / 分の勾配溶出、アイソクラティック (isocratic) 組成 0.01% の TFA 修飾剤を含む) に供して、6-ウンデシルサリチル酸 (Sm1、5.9 mg、RT 12.8 分) および 6-トリデシルサリチル酸 (Sm2、11 mg、RT 13.7 分) を得た。

10

【0108】

Sm4 ~ Sm14 - フォーカスされたライブラリー

合成類似体を、EndoTherm GmbH (Germany) および Princeton BioMolecular Research (USA) から購入し、HP-LC / MS により純度に関して分析した。

【0109】

Sm15 ~ Sm44 SAR ライブラリー

SAR ライブラリーを設計して、サリチル酸骨格の親油性テールの役割および可能な置換基を研究した。

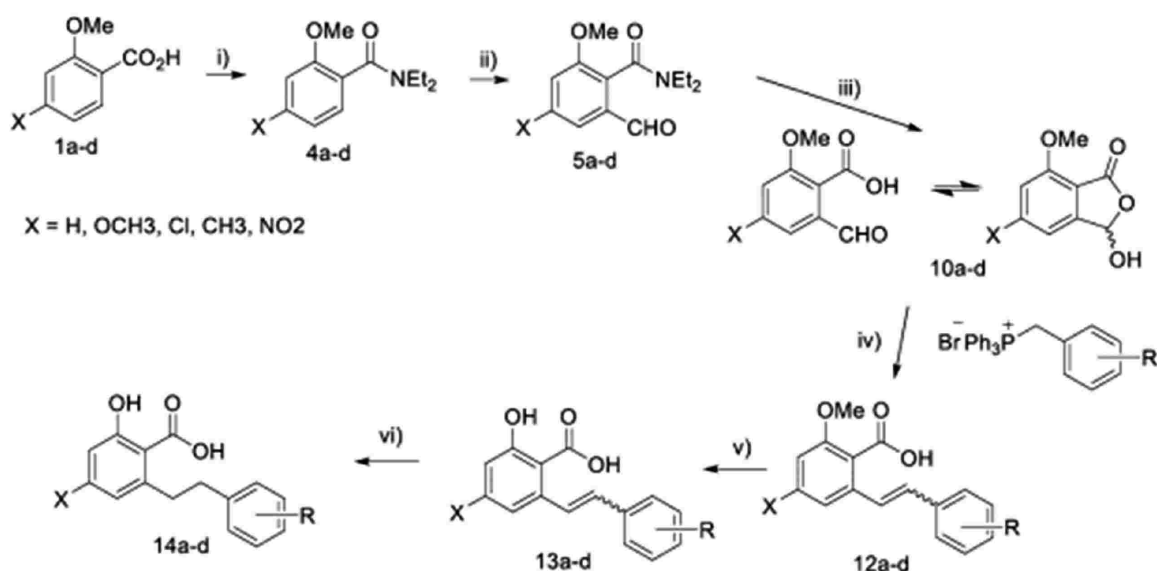
20

下記に概略した 6 ステップの合成は、置換安息香酸から開始し、ウィッティヒ (Wittig) オレフィン化反応を用いて親油性テールを導入した。

部分的に保護された中間体も SAR ライブラリーに含まれていた。

全ての化合物は、HPLC により精製された (純度 > 90%、UV / ELSD / MS)。

【化13】



30

i) SOCl₂, 還流, 3h; Et₂NH, CH₂Cl₂, 0 °C-RT, 12h; ii) s-BuLi/TMEDA, -78 °C, DMF; iii) AcOH/HCl; iv) NaH, THF, 50 °C, 2h; v) BBr₃, CH₂Cl₂; or 48% aq HBr, 還流 5 h; vi) Pd/C, H₂ 雰囲気, RT, 1h.

40

【0110】

一般的な材料および方法

試薬および無水溶媒 (THF、ジクロロメタンおよびアセトニトリル) を受け取ったまま使用した。

反応の進行を、UV 検出を有する Merck シリカゲル 60 F-254 を使用した TLC により監視した。

50

シリカゲル 60 (Merck 40 ~ 63 μm) をカラムクロマトグラフィーに使用した。

以下の染色溶液を、UV 光に加えて、蛍光 TLC プレートと共に使用した：リンモリブデン酸、アニスアルデヒド / EtOH。

無水条件を必要とする反応は、窒素下で行った。

Varian Unity 400 MHz または Bruker Avance 600 MHz 分光計上で、d4-MeOH または CDCl₃ 中で、298 K で NMR データを収集および校正した。

G1316A UV-Vis 検出器、1200 Series ELSD および 6110 四重極 ESI-MS を装着した Agilent Technologies 1200 Series 機器上で、HPLC および所定の質量スペクトルを得た。

10

高分解能質量分析法 (HRMS) は、Bruker MicroTOF 質量分析計で行った。

【0111】

N, N - ジエチルベンズアミド (4a ~ d) 1 の調製のための一般的手順

各々の置換安息香酸から置換 N, N - ジエチルベンズアミドを調製した。

酸 (5 g、32.9 mmol) を、塩化水素の放出が停止するまで、過剰の塩化チオニル (50 mL) と共に還流した。

過剰の塩化チオニルを減圧下で除去し、そして、トルエン (3 x 15 mL) と共に共蒸留した。酸塩化物を、乾燥 CH₂Cl₂ (100 mL) に溶解し、ジエチルアミン (13.6 mL、131.5 mmol) を 0 で滴加し、そして、室温で一晩攪拌した。

20

反応混合物を、CH₂Cl₂ (100 mL) で希釈し、水 (50 mL)、ブライン溶液で洗浄し、無水 MgSO₄ 上で乾燥した。

有機層を、ロータリーエバポレーター上で除去して粗化合物を得た。

この粗化合物を、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、純粋なジエチルベンズアミドを得た。

【0112】

指向された (directed) オルトメタル化反応 (5a ~ d) 2 のための一般的手順

TMEDA (0.55 mL、3.7 mmol) の乾燥 THF (10 mL) 溶液に、s-BuLi (2.6 mL、3.7 mmol、シクロヘキサン中 1.5 M) を -78 で加え、そして、15 分間攪拌した後、THF (5 mL) 中の 1 - メトキシ - N, N - ジエチルベンズアミド (0.35 g、1.7 mmol) を加えた。

30

同温で、2 時間攪拌した後、無水 DMF (0.52 mL、6.8 mmol) をゆっくり加えた。

反応混合物を、室温まで放置して温め、そして、30 分間攪拌した。

6 N の HCl 水溶液 (10 mL) を加えることにより、反応をクエンチし、そして、酢酸エチル (3 x 15 mL) で抽出した。

合わせた有機層を、ブライン (10 mL) で洗浄し、そして、MgSO₄ 上で乾燥した。

真空下で溶媒を除去した後、残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (n - ヘキサン / 酢酸エチル、1 / 2) により精製して生成物を得た。

40

【0113】

N, N - ジエチルベンズアミド (10a ~ d) の切断のための一般的手順 3

N, N - ジエチルベンズアミド (1.3 mmol) を、氷酢酸 (3 mL) に溶解し、10% HCl 水溶液 (3 mL) を加え、そして、混合物を 12 時間還流した。

室温に冷却した後、酢酸を減圧下で除去し、水で希釈し、そして、EtOAc (30 mL) で抽出した。

有機層をブラインで洗浄し、分離し、そして、無水 MgSO₄ 上で乾燥した。

溶媒を減圧下で除去して生成物を得た。

【0114】

ウィッティヒオレフィン化反応に関する一般的手順 (12a ~ d) 4

50

ウィッティヒ塩 (1 . 0 m m o l) の T H F (1 0 m L) 中の懸濁液に、 t - B u O K (2 . 0 m m o l) または N a H (2 . 0 m m o l) を、 0 で加え、そして、 3 0 分間撹拌した。

T H F に溶解したアルデヒド (0 . 8 m m o l) をゆっくり加え、そして、室温で一晩撹拌した (反応は、 N a H 、 エントリー 2 、 4 、 5 、 6 を使用して、 5 0 で行った) 。

反応を、水でクエンチし、そして、 E t O A c (3 0 m L) 中に抽出した。

有機層をブライン (2 0 m L) で洗浄し、 M g S O ₄ 上で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮して粗化合物を得た。

この粗化合物をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して純粋な生成物を得た。

【 0 1 1 5 】

脱メチル化に関する一般的手順：

方法 A (B B r ₃ を使用する) 5

化合物 (7 4 m g 、 0 . 1 9 2 m m o l) の塩化メチレン (7 0 m L) 溶液を、 - 7 8 で、 B B r ₃ (塩化メチレン中、 1 . 0 M 、 0 . 5 7 6 m L 、 0 . 5 7 6 m m o l) で処理した。

この混合物を、 - 7 8 で、 2 時間撹拌した後、そして、次いで、飽和 N H ₄ C l 水溶液 (1 0 m L) でクエンチした。

混合物を放置して、室温にし、そして、塩化メチレン (3 0 m L) で希釈した。

有機層をブライン (1 0 m L) で洗浄し、 M g S O ₄ 上で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮した。

【 0 1 1 6 】

脱メチル化に関する一般的手順：

方法 B (H B r を使用する) 6

化合物 (1 0 0 m g 、 0 . 1 9 2 m m o l) の 4 8 % H B r 水溶液 (3 . 0 m L) を、 3 時間加熱還流した。

反応の完了後、放置して室温に戻し、そして、減圧下で蒸発させて粗残留物を得た。

この粗化合物を E t O A c (3 0 m L) で抽出し、水 (2 0 m L) で洗浄した。

有機層を分離し、乾燥し (M g S O ₄) 、そして、濃縮して生成物を得た。

【 0 1 1 7 】

オレフィンの還元に関する一般的方法 (1 4 a ~ d) 。

オレフィンの 1 : 1 (E t O A c : M e O H) 溶液に、 1 0 % の P d / C (1 0 m o l %) を加え、そして、水素雰囲気下で、室温で、 2 時間撹拌した。

反応の完了後、セライトベッドで濾過した。

濾液を減圧下で除去して、生成物を得た。

【 0 1 1 8 】

タンパク質の調製

マウス S O X H M G 断片

マウス S O X 2 (グループ B) 、 S O X 1 1 (グループ C) 、 S O X 6 (グループ D) 、 S O X 9 (グループ E) 、 S O X 1 8 (グループ F) および S O X 1 5 (グループ G) の H M G ドメインを、 c D N A 鋳型 (I M A G E c D N A クローン I D : S o x 1 8 : 3 9 6 7 0 8 4 ; S o x 9 : 5 3 5 4 2 2 9 ; S o x 4 : 6 8 2 2 6 1 8) から、 p D O N R T M 2 2 1 p E N T R Y ベクターに B P クローニングし、配列決定し、 G a t e w a y (登録商標) L R T e c h n o l o g y (N g ら、 2 0 1 2) を用いて、 p E T G 2 0 A または p H i s M B P 発現プラスミドに組み入れた。

このコンストラクト (C o n s t r u c t s) を大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) B L 2 1 (D E 3) 細胞 (L u r i a - B e r t a n i 、 1 0 0 μ g / m l アンピシリン) 内に形質転換した。

【 0 1 1 9 】

完全長マウス S O X 1 8

10

20

30

40

50

N - 末端タグ化マウスHIS - GST - SOX18を、Sf9細胞内で組換え的に発現させ、GST樹脂(GE Healthcare Life Sciences、Sweden)上で精製し、そして、Tris緩衝液(50mMのTris、500mMのNaCl、10mMの還元グルタチオン、pH8.0)中で溶出した。

マウスSox18のcDNAクローンをPCR増幅し、そして、pOPIN - GSTベクターにクローニングして、N - 末端タグ化HIS - GST - SOX18を生成した。

配列を確認したコンストラクトを、フラッシュBACULTRA(flashBACULTRA)(Oxford Expression Technologies、Oxford、United Kingdom)のパキョロウイルスDNA(baculovirus DNA)と共にツマジロクサヨトウ(Spodoptera frugiperda) Sf9細胞に共トランスフェクトして、組換え的に発現されたHIS - GST - SOX18を得た。

10

Sf-900(商標)II血清フリー培地中のHigh Five細胞(BTI-TN-5B1-4)を、 1.5×10^6 細胞/mLの細胞密度で、5PFU/細胞の感染多重度(MOI)で感染させ、そして、21で144時間インキュベートした後回収した。

100mLの発現培地からの細胞ペレットを、30mLのリン酸溶解緩衝液(50mMのリン酸ナトリウム、500mMの塩化ナトリウム、1%のTriton X-100、2mMの塩化マグネシウム、1錠の完全プロテアーゼ阻害剤カクテル(cOmplete Protease Inhibitor Cocktail)、pH7.5)に再懸濁し、そして、氷上で20秒間超音波処理した。

20

細胞溶解物を、 $17,000 \times g$ 、4で、40分間遠心分離した。

上清を、DNA分解のために、Benzonase Nuclease(Merck Millipore)と共に、室温で、1時間インキュベートした後、500μLのGST樹脂(GE Healthcare Life Sciences、Sweden)と共に混合し、回転輪上で、室温で、1時間インキュベートした。

サンプルを、 $500 \times g$ で、1分間、遠心分離して、上清中の非結合タンパク質を除去した。

樹脂を、更に、50樹脂体積(RV)の洗浄緩衝液(50mMのリン酸ナトリウム、500mMのNaCl、pH7.5)で洗浄し、非結合タンパク質を上記のように遠心分離により除去した。

30

結合したタンパク質を、 3×1 RV溶離緩衝液(50mMのTris、500mMのNaCl、10mMの還元グルタチオン、pH8.0)を用いて、樹脂から溶離し、上清を、上記のように遠心分離により収集した。

【0120】

蛍光分極(FP)を用いたDNA結合競合アッセイ

DNA結合競合アッセイを、黒色384ウェルプレート内で、マウス完全長SOX18、またはSOX-HMG断片を用いて行った。

全ての実験は、蛍光標識Prox1-DNAエレメントを使用して行った。

コントロールは、フリー標識DNA(低FPミリ-分極指数、mP)、タンパク質の存在下の標識DNA(ネガティブコントロール、高mP)、並びに競合する過剰の非標識DNAの存在下の標識DNAおよびタンパク質(ポジティブコントロール、低mP)からなっていた。

40

【0121】

DNA結合競合アッセイを、25μLで、黒色384ウェルプレート内で、マウス完全長SOX18の場合には、30mMのHEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)(pH7.5、100mMのKCl、40mMのNaCl、10mMのNH₄OAc、10mMのグアニジニウム、2mMのMgCl₂、0.5mMのEDTA、0.01%のNP-40を有する)を使用し、また、SOX-HMG断片の場合には、Tris-NaCl(10mMのTris pH8.0および100mMのNaCl)を使用して行った。

50

全ての実験は、5'フルオレセインアミダイト (FAM) 標識 (Sigma Proli go または Invitrogen) を有する、40bp二本鎖Prox1-DNAエレメントを使用して行った。

最適結合レベルは、5nMの標識DNAの存在下、200nMのマウス完全長SOX18および60nMのSOX-HMG断片で得られた。

コントロールは、フリー標識DNA (低FPミリ - 分極指数、mP)、タンパク質の存在下の標識DNA (ネガティブコントロール、高mP)、並びに400倍競合過剰の非標識DNAの存在下の標識DNAおよびタンパク質 (ポジティブコントロール、低mP) からなっていた。

化合物に応じて、最終DMSO濃度は2~3.33% v/vの範囲であった。

タンパク質、DNAプローブおよび化合物を混合した後、プレートを密閉し、そして、暗所内にて、室温で、5分間、37℃で10分間、および室温で30分間、素早くかき混ぜた後、蛍光分極をTecan M1000 Pro (exc = 485nm、em = 525nm) 上で読み取った。全ての実験は、3回行った。

【0122】

細胞ベースの機能アッセイ

猿腎臓線維芽細胞様細胞 (COS-7) を、FBS、ビルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、非必須アミノ酸およびHEPESを有するDMEM (Life technologies、11995) 中で、37℃、5%のCO₂で培養した。

細胞を、96ウェルプレート内で、80%のコンフルエンスまで増殖させ、そして、X-treme GENE 9 DNAトランスフェクション試薬 (Roche、06365787001) を使用して、マウスプラスミドpGL2 Vcam 1プロモーターコンストラクト (VC1889) およびpSG5 Sox18をトランスフェクトした (Hoskingら、2004、Duongら、2014)。

4~6時間のトランスフェクション後、溶解およびルシフェラーゼアッセイ (Perkin Elmer、6016711) の前に、細胞を、0.5%のFBS培地中の化合物と共に、更に24時間インキュベートした。

【0123】

細胞フリー発現およびALPHAスクリーニング

プラスミドの調製および細胞フリー発現

全てのタンパク質を、増強GFP (GFP)、mCherryおよびcMyc (myc) タグで、遺伝子にコードし、そして、細胞フリー発現ベクターにクローニングした (Gagoskiら、2015、Siereckiら、2013)。

翻訳コンピテントのリーシュマニア・タレントラエ抽出物 (Translation competent Leishmania tarentolae extract) (LTE) を以前記載されたように調製して、タンパク質対を共発現させた (Kovtunら、2011、Mureevら、2009)。

【0124】

タンパク質を増強GFP (GFP)、mCherryおよびcMyc (myc) タグで遺伝子にコードし、そして、細胞フリーの発現Gatewayデスティネーションベクター (cell free expression Gateway destination vectors) にクローニングした：

N-末端GFPタグ化 (pCellFree_G03)、

N-末端Cherry-cMyc (pCellFree_G07) および、

C-末端Cherry-cMycタグ化 (pCellFree_G08) (Gagoskiら、2015)。

ヒトRBPJ (BC020780) およびMEF2C (BC026341) オープンリーディングフレーム (ORF) を、以前記載されたように、ヒトORFeomeコレクション、バージョン1.1および5.1、並びにヒトOrfeome collabora

10

20

30

40

50

tion OCAAコレクション (Open Biosystems) から調達し (Siereckiら、2013)、そして、ARVEC施設、UQ Diamantina Instituteにてクローニングした。

エントリークローン pDONOR223 または pENTR201 ベクターを、LR組換えにより、発現プラスミド内の ccdB 遺伝子と交換した (Life Technologies、オーストラリア)。

完全長ヒト SOX18 遺伝子を合成し、そして、ベクターへの移動は、Gateway PCR クローニングを用いて実現した。

翻訳コンピテントのリーシュマニア・タレントラエ (Leishmania tarentolae) 抽出物 (LTE) を以前記載されたように調製した (Kovtunら、2011、Mureevら、2009)。

30 nM の GFP 鑄型プラスミドおよび 60 nM の Cherry 鑄型プラスミドを LTE に加え、27 で 3 時間インキュベートすることにより、タンパク質対を共発現させた。【0125】

ALPHA Screen を以前記載されたように行った (Sierecki ら、2014、Sierecki ら、2013)。

タンパク質 - タンパク質相互作用 (IC₅₀) の邪魔 (disruption) に関するアッセイを、LTE 中でタンパク質対を発現させ、そして、緩衝液 B 中の希釈範囲の試験化合物 (0.3 ~ 300 μM) または DMSO (0.7% DMSO 最終) と共に 1 時間インキュベートすることにより行った。相互作用の百分率は、3 回の独立の実験から次のように計算した：

$$(I_{\text{cpd}} / I_{\text{DMSO}}) \times 100。$$

【0126】

cMyc 検出キットおよび Proxiplate - 384 Plus プレート (PerkinElmer) を使用して、ALPHA Screen を以前記載されたように行った (Sierecki ら、2014、Sierecki ら、2013)。

関心対象のタンパク質を共発現している LTE 溶解物を、緩衝液 A (25 mM の HEPES、50 mM の NaCl) 中で希釈した。

アッセイのために、緩衝液 B (25 mM の HEPES、50 mM の NaCl、0.001% の NP40、0.001% カゼイン) 中の 12.5 μL (0.4 μg) の抗 cMyc 被覆アクセプタービーズを各ウェル内に等分した。続いて、異なる濃度の 2 μL の希釈サンプル、および緩衝液 A 中の 2 μL のビオチン標識 GFP - Nanotrap を加えた。

プレートを、室温で、45 分間インキュベートした後、緩衝液 A 中で希釈した 2 μL (0.4 μg) のストレプトアビジン被覆ドナービーズを加え、そして、暗所内で、室温、45 分間、インキュベートした。

ALPHA Screen シグナルを、Envision Plate Reader (PerkinElmer) 上で、製造業者の推奨設定 (exc = 680 / 30 nm で 0.18 秒、37 ms 後に em = 570 / 100 nm) にしたがって、測定した。

得られた鐘形曲線は正の相互作用を示す一方、平坦な線は、タンパク質間の相互作用の欠如を反映する。

各タンパク質対の測定は、3 回繰り返した。

【0127】

結合指数は、下記にしたがって、計算された。

【数 1】

結合指数を次のように計算した：

$$BI = \left[\frac{I - I_{neg}}{I_{ref} - I_{neg}} \right] \times 100$$

【0128】

I は最大シグナルレベル（フック効果曲線の頂部）であり、I n e g は最小（バックグラウンド）シグナルレベルである。

シグナルを、最強の相互作用に関して得られた I r e f シグナルに対して正規化した。

タンパク質 - タンパク質相互作用（I C₅₀）の邪魔（d i s r u p t）に関するアッセイは、L T E 中でタンパク質対を発現させ、そして、緩衝液 B 中の希釈範囲若しくは単一濃度の試験化合物（0 . 3 ~ 3 0 0 μ M または 5 0 μ M）または D M S O（0 . 7 % D M S O 最終）と共に 1 時間インキュベートすることにより行われた。

相互作用の百分率は：

【数 2】

$$\left(\frac{I_{cpd}}{I_{DMSO}} \right)$$

10

× 1 0 0 として計算した。

3 回の独立した実験からのデータを、G r a p h P a d P r i s m バージョン 6 . 0 において、3 - パラメーター非線形回帰を用いて適合させた。

【0 1 2 9】

共免疫沈降（共 I P）。

共免疫沈降を、以前記載されたように行った（S i e r e c k i ら、2 0 1 4）。

20

手短には、S O X 1 8 - C h e r r y - c M y c を、リーシュマニア・タレントラエ（L e i s h m a n i a t a r e n t o l a e）細胞フリーのタンパク質発現システム内で、ネガティブコントロールペイトとしての G F P - R B P J、G F P - M E F 2 C または G F P コンストラクトと共に共発現させた。

N a C l を発現タンパク質（2 0 0 m M）に加え、そして、サンプルを 1 0 μ L の G F P - ナノトラップ被覆ビーズ（M B P - G F P - N a n o t r a p と結合した N H S 活性化セファロース）と共に、回転による穏やかな混合を用いて、4 で、3 0 分間、インキュベートした。

続いて、ビーズを 2 0 0 μ L の洗浄緩衝液（0 . 1 % の T r i t o n X - 1 0 0 および 2 0 0 m M の N a C l を有する P B S）で 6 回洗浄した。

30

1 5 μ L の 2 × N u P A G E L D S 負荷緩衝液中で、7 2 で、3 分間加熱することにより、タンパク質をビーズから解放し、そして、N u P a g e N o v e x 4 ~ 1 2 % ゲル（L i f e T e c h n o l o g i e s、オーストラリア）上で分離した。

C h e m i D o c M P S y s t e m（B i o - R a d、オーストラリア）を使用して、ゲルを、G F P および C h e r r y 蛍光に関して走査した。

【0 1 3 0】

臨界ミセル濃度（C M C）

ミセルへの蛍光剤、1 , 6 - ジフェニル - 1 , 3 , 5 - ヘキサトリエン（D P H）の組み入れに基づいて、臨界ミセル濃度を決定した（C h a t t o p a d h y a y および L o n d o n、1 9 8 4）。

40

小分子およびポジティブコントロール（中性洗剤 T r i t o n X 1 0 0 および陰イオン性洗剤 S D S）を低結合 9 6 ウェルプレート内で、1 0 0 0 μ M から 0 . 1 μ M ヘカスケード希釈した。

希釈は、2 0 0 m M の N a C l または F P 緩衝液中で行った。D P H は、5 μ M で、黒色 3 8 4 ウェルプレート内に補充した。

室温で 3 0 分間のインキュベーション後に、蛍光強度（e x c = 3 6 0 n m、e m = 4 3 0 n m）を測定して、C M C 推移をグラフにより概算した。

【0 1 3 1】

細胞毒性アッセイ。

アラマーブルーを使用して、細胞毒性を、以前記載されたように決定した（M c M i l

50

lianら、2002)。

COS-7細胞を、黒色壁透明底96ウェルプレート内で、10%のFBSを有するDMEM培地(Life Technologies オーストラリア)中に、ウェル当たり、7000細胞として播種した。

ATCCのHepG2およびHEK293細胞株を、黒色壁透明底384ウェル細胞培養プレート内で、1%FBSを有するDMEM中、1ウェル当たり5000細胞として播種した。

これらの細胞を、37℃、5%CO₂で24時間培養した。

段階希釈の化合物を加え、最終DMSO濃度を0.5%v/vに調整した。

細胞を更に24時間インキュベートした。1%のTriton X-100をネガティブコントロールとして使用し、そして、0.5%のDMSOをポジティブコントロールとして使用した。37℃で、2時間のインキュベーション後、5μMアラマブルーを各ウェルに加え、そして、蛍光を測定した(exc = 560 nm、em = 590 nm)。

データをPrismソフトウェアを使用して分析した。

【0132】

表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた直接DNA結合アッセイ

化合物を、HBS-EP緩衝液(10 mMのHEPES、150 mMのNaCl、3 mMのEDTA、0.005%のv/vポリソルベート20、pH 7.4)中の1%v/vのDMSOにて試験した。1%v/vのDMSOで補充した同じ緩衝液を、移動相として使用した。

DNA小溝バインダーである、DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)、DNAインターカレーターおよび小溝バインダーである、アクチノマイシンD、およびDNAインターカレーターである、臭化エチジウムを、ポジティブコントロールとして使用した。

ビオチン化(プローブ当たり1つのタグ)二本鎖DNAプローブを、Geneworksから購入した単鎖逆平行DNAプローブの標準的なアニーリングルーチン(100℃で5分間、室温で一晩、および20℃で保存)を用いて調製し、そして、製造業者の推奨にしたがって、CM5-SAストレプトアビジンチップ上に固定化した。

流れる緩衝液の流速を25 μL/分に設定し、サイクルは、化合物およびアクチノマイシンDの場合、4分間の会合、4分間の解離、その後の再生のための10秒間の、10 mMのGly-HCl、pH 2.5のパルス、および1分間の安定化からなっていた。

DAPIはいずれの再生も必要としなかったが、臭化エチジウムの場合、安定化の前に、0.5%v/vのSDSの25 μL/分で、40秒間のパルスを再生のために必要とした。

全てのサンプルおよびコントロールサイクルを、3回行った。

DMSO較正を製造業者の推奨にしたがって、行った。

各注入後、50%v/vのDMSOを用いてフローシステムの追加の洗浄を行って、キャリーオーバーを回避した。

実験は、Biacore T200(GE Healthcare、USA)上で行い、1つのフローセルを参照として保った。

【0133】

直接タンパク質結合アッセイ(熱凝集)。

差分静的光散乱研究を、Harbinger Biotech StarGazer上で、Prox1-DNAまたは推定小分子リガンドのいずれかの存在および非存在下で、マウスSOX18-HMG(109 aa)を使用して行った。

凝集温度の変化がもはや濃度に依存しない、化合物の濃度を評価するために初期実験を行った。

使用した最終濃度は、DMSOの濃度を3%までに制限する必要性に応じて、500 μM(Sm4およびSm14)~1.5 mM(Sm5)の範囲であった。

17 bp Prox1-DNAオリゴヌクレオチドを、最終濃度10 μMで使用した。

10

20

30

40

50

結合を3回行い、そして、リガンドの存在下、Tagg（凝集温度）の > 2 の増大により検出した。

Taggは、同じタンパク質バッチを用いて、1回、測定した。

反応を、3% v/vのDMSOを有するTris-NaCl緩衝液（10 mMのTris-HCl、150 mMのNaCl、pH 8）中で、最終反応容積45 μ Lで、154 μ MのMouse SOX18-HMG濃度で行った。

これらは、測定前に室温で1時間インキュベートした。タンパク質を1 / 分の速度で25 から80 に加熱した。

総強度を各サンプルに関して温度に対してプロットし、そして、非線形回帰によりボルツマン方程式に適合させた。

【0134】

インシリコドッキングおよび分子動力学

リガンド - タンパク質ドッキング

SOX18 / DNA複合体内部へのSm4のインシリコドッキングを、LeadIT / FlexX (BioSolveIT, Germany) を使用して行った。

ドッキングは、SOX18-HMG / Prox1-DNA (pdb: 4Y60) の構造から全水分子を除去し、そして、タンパク質 / 複合体全体を可能な結合部位と規定することにより行った。

Sm4の最良の20ドッキングポーズを分析し、そして、4つのクラスターに分類した。

SOX18 / DNAは従来の結合ポケットを含まないため、各ポーズクラスターを更に200 ns長MDシミュレーションにより検証した。

MDシミュレーションは、その異なる結合ポーズにおいて、完全SOX18 / DNA構造を、Sm4と使用して行った。

MDシミュレーションの分析により、ポーズの3つが不安定であり、Sm4を用いると、最初の3 ~ 14 nsのシミュレーションで、タンパク質とのその相互作用を破壊、シミュレーションの残りの間、水溶媒中に残留することが明らかとなった。

MDシミュレーションが生成したポーズの1つのみが、全200 nsのシミュレーション中にSm4の安定な結合ポーズを生成した。

同様に、Sm4、およびDNAを有さないSOX18を用いて、ドッキングおよびMDシミュレーションを行った。

しかしながら、4 - ポーズクラスターのいずれも、MDシミュレーション中に安定な結合配向を生成しなかった。

比較のために、Sm4を有さない、SOX18 / DNAおよびDNAを有さないSOX18に関してMDシミュレーションを行い、Sm4リガンドを有する構造と同様の立体構造および動的挙動を生成した。

【0135】

タンパク質 - タンパク質ドッキング

Notch1転写複合体とSOX18との間のタンパク質 - タンパク質ドッキングを、ClusProオンラインサーバーバージョン (cluspro.bu.edu) を用いて、

Notch1転写複合体およびSOX18-HMGの構造に関して、それぞれpdb: 3V79およびpdb: 4Y60を使用して行った。

DNA分子を、ClusProがそれら进行处理できないため、ドッキング前に除去し、そして、ドッキング後に再建した。

クラッシュするDNA分子を有するドッキングソリューションは拒絶された。

得られたトップドッキングポーズを出発立体構造として、50 ns長MDシミュレーションにて使用して、ドッキングポーズを最適化し、そして、多タンパク質複合体の安定性を検証した。

【0136】

MDシミュレーション

10

20

30

40

50

AMBER MDソフトウェア「pmemd」を使用して、タンパク質およびDNAにff99SB力場を使用し、潜在的な水にTIP3を使用し、そして、周期的境界条件(NTP)、長距離静電気相互作用に関して粒子メッシュエバルト(PME)法、温度カップリングに関して等方圧力カップリング(isotropic pressure coupling)およびランジュバンサーモスタット($\gamma_{ln} = 1/ps$)を適用して、任意のMDシミュレーションを行った。

2fsステップサイズを用いてシミュレーションを行い、SHAKEアルゴリズムを用いて水素に關与する結合を制約した。

Sm4を用いたMDシミュレーションの場合、AMBERパッケージのAntechamberを使用して、リガンドに関する力場パラメーターを計算した。

全てのMDシミュレーションは、構造を最小化し、そして、位置拘束をゆっくり5nsに亘って低下させることによりそれらを平衡化して行った。

各シミュレーションは、初期速度の割当てに異なる乱数を使用して3回行った。

【0137】

COX1/COX2 酵素アッセイ

Cayman Chemical Company製のCOX1およびCOX2阻害剤スクリーニングアッセイキット(Ref# 701090および701080)を使用して、COX阻害活性を測定した。

全ての化合物を、2% v/vの最終DMSO中の、単一の200 μ M濃度で、4回試験した。

化合物を、ヒツジCOX1またはヒトCOX2と共に37 で10分間ブレインキュベートした後、COX基質アラキドン酸と共に更に3分間インキュベートした。

濃塩酸を添加することにより反応を停止した。

プロスタノイド標準曲線を準備し、そして、酵素イムノアッセイを製造業者の説明の通りに行った。

DMSOコントロール、熱不活性化COX酵素を有する100%阻害コントロール、および200 μ Mメクロフェナム酸ポジティブコントロール(強力な非選択的COX1/2阻害剤)を参照のため含めた。

プロスタノイド標準値を、ロジット(B/B0)対log濃度としてプロットし、そして、GraphPad Prismバージョン6.0を使用して、直線回帰に適合させた。

標準曲線線形適合を用いて各サンプル濃度を計算した。

【0138】

SOX18 単分子追跡

図24Bは、Chenら(Cell 156、1274-1285; 2014)に概略されるような、分子軌跡の二次元追跡と、MATLABを使用する分析とを含む、実験的ワークフローを示す。

本発明者らは、不動のDNA結合部分(%、円グラフに示す)は、1つの同じDNAの位置における滞在時間に応じて、特異的および非特異的の2つのタイプがあることに注目する; 滞在時間が短時間(平均1秒未満)の場合、これは非特異的結合(即ち、ランダムDNA部位への一過性結合)と見なされ、そして、長時間(平均5~6秒を超える)の場合、これは特異的結合(即ち、転写効果を有する標的DNA部位へのより長い結合)と見なされる。

不動のDNA結合部分の滞在時間(棒グラフで示す)も、特異的および非特異的の2つのタイプがある: SOX18分子がDNAに非特異的に(平均1秒未満)または特異的に(平均5~6秒を超える)結合する、秒での時間長。

単分子追跡は、Hela細胞をSOX18-HaloTagレポーターコンストラクトでトランスフェクトした後に行われる。

この発現ベクターにより、本発明者らは、HaloTagシステムによる酵素処理後に、蛍光性となるリガンドの添加後、SOX18タンパク質の単一分子を検出することができる。

10

20

30

40

50

リアルタイムイメージングは、Z E I S S E L Y R A 超分解能顕微鏡を使用した T I R F 顕微鏡法 (H i l o) の修正バージョンを用いて行われる。

【 0 1 3 9 】

結果

S O X 1 8 - D N A 結合の阻害のための天然産物のスクリーニング

海産物抽出物ライブラリーを、蛍光分極に基づくアッセイ (F P) を用いて、D N A に対する S O X 1 8 タンパク質 (完全長ハツカネズミ) の結合の阻害剤に関してスクリーニングした。

本発明者らは、P r o x 1 遺伝子の第 1 のイントロンに見出される、コンセンサス S O X モチーフを持つ蛍光標識オリゴヌクレオチドである、S O X 1 8 直接標的を選択した (F r a n c o i s ら、2 0 0 8) (図 1 A)。

10

ライブラリーは、5 0 , 0 0 0 以上の構造を含む、2 , 0 0 0 の精製代謝物および 2 , 6 8 8 の海産物抽出物を含む。

この一次スクリーニングは、様々な門から収集した、1 6 の活性な抽出物、即ち、海綿 (1 0)、藻類 (5) および尾索類 (1) を特定した (ヒット率 0 . 6 %、一次スクリーニング Z ' 値 = 0 . 6 2) (Z h a n g ら、1 9 9 9)。

続く抽出物解析は、生物学的に活性な分子の効力および存在量に基づいて優先順位をつけられ、最も活性な抽出物は、2 つの活性化合物：6 - ウンデシルサリチル酸 (S m 1)、および 6 - トリデシルサリチル酸 (S m 2) を生成する褐藻カウロシステイス・セファロルニトス (C a u l o c y s t i s c e p h a l o r n i t h o s) に由来した (図 1 B)。

20

S m 1 および S m 2 の両方に関する用量応答スクリーニングは、高いマイクロモル範囲にて阻害効果 (I C ₅₀) をもたらした (図 1 C)。

両方の活性化合物は、大きい脂肪族基を有するサリチル酸骨格を含む。

【 0 1 4 0 】

フォーカスされたライブラリーの設計および一次スクリーニング。

次のステップにおいて、本発明者らは、類似体の小ライブラリーを設計して、サリチル酸 (ヒドロキシル安息香酸) 活性骨格を検証し、その構造 - 活性関連性プロファイル进行研究した。

図 2 A に示した選択は、類似するレゾルシノール骨格 (カルボキシル酸を更なるヒドロキシルで置き換えている) を有する化合物、並びに類似するサリチル酸またはアントラニル酸骨格 (ヒドロキシルをアミンで置き換えている) を含む多数の承認された N S A I D も含んでいた。

30

ライブラリーを購入し、F P アッセイを用いて、S O X 1 8 - D N A 結合の阻害に関してスクリーニングした。

このアッセイでは、高親和性タンパク質 - D N A 相互作用の邪魔 (d i s r u p t i o n) には、特に両親媒性および高 l o g P 分子の場合、凝集が起こり得る高いマイクロモル範囲の阻害剤濃度を必要とした (I r w i n ら、2 0 1 5)。

したがって、化合物を臨界ミセル濃度 (C M C) に関して、対抗スクリーニングして、凝集体またはミセル形成化合物を偽陽性として除外した (表 1、列 2 および 5、並びに図 2 B)。

40

【 0 1 4 1 】

C M C アッセイでは、2 0 および 3 0 μ M で C M C を示す 5 つの化合物、S m 3、S m 6、S m 7、S m 9 および S m 1 0 を除外した (表 1、列 2)。

その他は、1 0 0 0 μ M までミセル形成を示さず、そして、S O X 1 8 - D N A 結合アッセイに含めた。

S m 1 および S m 2 の C M C は、化合物の供給不足のため決定することができなかった。

S O X 1 8 - D N A 結合アッセイは、1 0 0 0 μ M 未満の I C ₅₀ 値を有する 7 つの化合物を特定し、S m 4 および S m 1 4 の 2 つは、元のヒット S m 1 および S m 2 (約 3 5 0 μ M の I C ₅₀) と比較して、改善された約 1 0 0 μ M の I C ₅₀ 値を示した (表 1、列

50

1 ; 図 2 C) 。

興味深いことに、3つのアントラニル酸類似体、メクロフェナム酸、ニフルミン酸およびフルフェナミン酸の全ても、100 ~ 400 μ M 範囲の IC_{50} 値の活性を示す (表 1、列 1 ; 図 2 C) 。

【 0 1 4 2 】

小分子の可能な結合部位を特定するために、より短い、DNA 結合を中心に置くタンパク質断片を用いて F P アッセイを繰り返した。

SOX TF の DNA 結合ドメインは、79 アミノ酸長の高移動度 (High Mobility Group) (HMG) ボックスからなる。

109 アミノ酸長の SOX 18 断片 (SOX 18 [109]) は、残基 69 - 177 (マウス SOX 18 によるナンバリング) に対応し、これは HMG ボックス (残基 78 - 149) 並びに各々 9 および 28 アミノ酸の N - および C - 末端隣接配列を含む。

SOX 18 [109] 断片を用いた F P アッセイは、完全長 SOX 18 (データは示さず) とほぼ同一の IC_{50} 値を示し、小分子は、タンパク質のこの 109 a a 部分と相互作用することが示唆された。

【 0 1 4 3 】

結合選択性

分子の観点から、SOX 18 - DNA 結合の阻害剤は、DNA 若しくはタンパク質と直接相互作用するか、またはタンパク質と DNA の界面で相互作用することにより作用し得る。

DNA への小分子の直接の結合は、他の TF に関して報告されてはいるが (Leung ら、2013)、非特異的 DNA 結合の可能性があり、これは、遺伝毒性、変異原性または発癌性をもたらす可能性がある。

そのために、本発明者らは、直接結合アッセイを開発して、活性化合物が DNA またはタンパク質と直接相互作用するか否かを決定した。

表面プラズモン共鳴ベースの方法を開発して、ストレプトアビジンチップの表面上に固定化されたビオチン化二本鎖 DNA に対する小分子の結合を分析した。

この方法は、結合速度 (k_{on})、解離速度 (k_{off}) および結合定数 (KD) を測定し、そして、2つの異なる DNA 配列 : SOX 結合部位コンセンサス DNA、およびスクランブル DNA に対する結合の測定に使用された。

インターカレーター剤である、臭化エチジウムおよびアクチノマイシン D、並びに小溝バインダーである、4', 6 - ジアミノ - 2 - フェニルインドール (DAPI) を、非選択的 DNA 結合に関するポジティブコントロールとして使用した。

全てのポジティブコントロールは、DNA 配列に無関係の KD を示し、そして、文献と一致した。

この分析は、SOX 18 阻害剤のいずれも、コンセンサスまたはスクランブル DNA に対する結合を示さないことを示した (図 3 A および 3 B) 。

【 0 1 4 4 】

阻害剤がタンパク質と直接相互作用するか否かを研究するために、本発明者らは、タンパク質変性平衡の、より高温への移動を評価することによって、得られた SOX 18 熱安定性の増大を測定した (Shrake および Ross、1992、Shrake および Ross、1990、Brandts および Lin、1990、Fukada ら、1983) 。

これを目的として、本発明者らは、タンパク質 - 阻害剤複合体凝集の読み取りとして静的光散乱を用いた (Mittal ら、2014、Senisterra ら、2006、Senisterra ら、2008、Senisterra および Finerty、2009、Senisterra ら、2012) 。

HMG のみの SOX 18 [109] 断片、および SOX モチーフで装飾した DNA プローブをポジティブコントロールとして使用して熱安定性を測定した。

Sm4、Sm5 および Sm14 を、全ての SOX 18 の潜在的な結合部位を飽和する濃

10

20

30

40

50

度、各々、S m 4 および S m 1 4 では 5 0 0 μ M、および S m 5 では 1 . 5 m M で試験した。

これらの最大リガンド結合状態においては、温度依存性タンパク質凝集はもはや結合部位占有により制限されず、そして、プラトーに到達するまで測定された。

各阻害剤は、3 を超える T a g g の増大を示し、これはタンパク質に対する阻害剤の直接的な相互作用と一致する (図 3 C)。

両方の結合試験をまとめると、結果は小分子阻害剤が DNA と直接相互作用することなく、S O X 1 8 タンパク質と相互作用することを示す。

加えて、F P アッセイおよび熱安定性アッセイのデータの組み合わせは、阻害剤 - タンパク質相互作用部位が、S O X 1 8 - H M G ボックス内またはこのボックスの直近に位置することを示唆する。

【 0 1 4 5 】

S O X DNA 結合阻害選択性

全ての S O X タンパク質の DNA 結合ドメインは高度に保存され、哺乳動物精巣 - 決定因子 S R Y の H M G ドメインと 4 6 % 配列同一性を共有するが (B o w l e s ら、2 0 0 0、G u b b a y ら、1 9 9 0)、H M G ドメインに隣接する S O X T F の残りのドメインは、低いレベルの類似性を示す。

S O X 1 8 阻害剤の選択性を研究するために、異なる S O X タンパク質からの H M G のみのタンパク質断片を、既知の S O X モチーフ、5 ' A A C A A T 3 ' を持つ、蛍光標識オリゴヌクレオチドを使用する DNA 結合 F P ベースアッセイに使用した。

異なる S O X T F は: S O X 2 (グループ B)、S O X 1 1 (グループ C)、S O X 6 (グループ D)、S O X 9 (グループ E)、S O X 1 8 (グループ F) および S O X 1 5 (グループ G) を含む。

最も活性な阻害剤 S m 4 を全ての異なる S O X T F に対して評価し、全てのケースで DNA 結合阻害を示し (I C ₅₀ は、約 2 0 0 ~ 3 0 0 μ M)、S O X 1 8 および S O X 1 5 に関して僅かな優先度を有し (I C ₅₀ は、他の 2 7 0 ~ 3 1 0 μ M に対して約 2 0 0 ~ 2 2 0 μ M)、DNA 結合における邪魔 (d i s r u p t i o n) に関しては、阻害剤は S O X T F に対して非選択的であることが示唆された (図 3 D)。

【 0 1 4 6 】

オフターゲット分析

C O X 阻害

サリチレートは、プロ炎症性プロスタグランジンのシクロオキシゲナーゼ (C O X) 依存的産生の直接または非直接的抑制を介して作用する N S A I D の重要なクラスである (P i l l i n g e r ら、1 9 9 8)。

この研究では、本発明者らは、C O X 阻害剤に構造的類似性を有する S O X 1 8 阻害剤を特定し、N S A I D および新規な S O X 1 8 阻害剤の間の任意の機能的重複を研究するために、本発明者らは、構造的に類似した N S A I D を S O X 1 8 研究に含めた。

同様に、本発明者らは、新規な S O X 1 8 阻害剤が C O X 1 / 2 酵素活性を阻害するか否かを研究した。S m 4、S m 5、S m 8、S m 1 1、S m 1 2、S m 1 3 および S m 1 4 の C O X - 1 および C O X - 2 阻害効果を、商業的な C O X - 1 / 2 E L I S A アッセイを用いて、メクロフェナム酸をポジティブコントロールとして使用して評価した。

S O X 1 8 阻害剤のいずれも、濃度 2 0 0 μ M まで C O X - 1 または C O X - 2 阻害活性を示さなかった (図 S 1 A、S 1 B)。

【 0 1 4 7 】

オフターゲットプロファイリング

本発明者らは、更に、本発明者らのリードの S m 4 の潜在的な S O X 1 8 - 非依存性効果を、広範囲の潜在的なオフターゲット効果に關与する (表 4)、G - タンパク質共役受容体 (G P C R)、イオンチャネル、膜受容体、キナーゼおよび非キナーゼ酵素、並びに核受容体を含む様々な受容体、酵素および輸送体に対する放射性リガンド結合アッセイの E u r o f i n s - C E R E P / P a n l a b s パネルを用いて、調査した。

10

20

30

40

50

一連の組換え - 酵素蛍光定量アッセイを用いて、多数の後生的修飾因子も試験した。

有意な阻害 ($> 50\%$) は $10\ \mu\text{M}$ で観察されず、 Sm4 選択性と、更なる薬物開発の可能性が示された。

【0148】

SOX18 タンパク質 - タンパク質相互作用

SOX 転写因子の高度に保存された HMG ドメインは、タンパク質 - DNA およびタンパク質 - タンパク質相互作用の両方に関与することが報告されている (Agresti および Bianchi、2003、Prokopら、2012、Huangら、2015)。

したがって、HMG ドメインに直接、またはこのドメインの直近に結合する化合物は、直接、または SOX18 タンパク質の立体構造に対するアロステリック変化のいずれかにより、SOX18 - DNA および SOX18 - タンパク質相互作用の両方を調節する可能性を有する。

10

本発明者らの小分子が、SOX18 - タンパク質相互作用を調節する可能性を研究するために、本発明者らは、内皮細胞の転写調節に関与することが既知の2つの SOX18 PPI を選択した：

MEF2C は、GST プルダウンアッセイにおいて SOX18 に結合することが報告され (Hoskingら、2001)、および、

RBPJ は、SOX18 と遺伝子的に相互作用することが報告されているが、直接結合は未だ特定されていない (Saciolttoら、2013)。

加えて、XRCC6 (ATP 依存性 DNA ヘリカーゼ II) を、ネガティブコントロールとして、非結合パートナーとして選択した。

20

【0149】

本発明者らは、タグ化タンパク質の発現に、細胞フリーの発現システムを使用して、PPI 阻害を分析し、そして、これを ALPHA Screen 技術 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) と組み合わせ、タグ化タンパク質の近似 (proximity) を測定することができるようにした (Sierackiら、2013)。

この手法によって、SOX18 とその既知のパートナー MEF2C との間の直接的なペアワイズ相互作用が確認され、そして、SOX18 と RBPJ との間の直接 PPI が明らかとなった (図 4 A、左パネル)。

30

直接的な物理的相互作用を、標準的な共免疫沈降を用いて更に検証した (図 4 A、右パネル)。

次に、本発明者らは、本発明者らの最も強力な小化合物、 Sm4 、並びにメクロフェナム酸、ニフルミン酸およびフルフェナミン酸が、SOX18 - MEF2C または SOX18 - RBPJ 相互作用を邪魔 (disrupt) する能力を研究した。 Sm4 は、 $42.3\ \mu\text{M}$ の IC_{50} で、SOX18 - RBPJ 相互作用を邪魔 (disrupt) するが、しかし、SOX18 - MEF2C 相互作用には効果を有さなかった (図 4 B、左上および右上パネル)。

逆に、フルフェナム酸は、SOX18 - MEF2C 相互作用を邪魔 (disrupt) する一方 ($29.1\ \mu\text{M}$ の IC_{50})、SOX18 - RBPJ 相互作用は僅かに邪魔 (disrupt) するのみであった ($\sim 444\ \mu\text{M}$ の IC_{50}) (図 4 B、左上および右下パネル)。

40

他の NSAID は、PPI のいずれに対しても、殆どまたは全く効果を示さなかった。

【0150】

SAR ライブラリー

SOX18 - DNA 結合および SOX18 / RBPJ の PPI のサリチル酸タイプの阻害剤の構造 - 活性関連性 (SAR) を、類似体の別個のライブラリーを用いてより詳細に研究した。

このライブラリーは、以下を含む、 Sm4 のいくつかおよび他のサリチレートの特有の特徴の有意性をクエリーするよう設計された：

50

サリチレート芳香族環の電子密度、

ヒドロキシカルボン酸モチーフの2つの酸の水素の有意性、
親油性テールを有する、飽和 - またはエチレン結合、並びに
親油性テールの構造および親油性。

本発明者らは、30の類似体、Sm15 ~ Sm44を合成し(図5)、これをHMGのみのSOX18[109]断片に対するDNA結合の阻害、およびSOX18-RBPJ相互作用の邪魔(disruption)に関してスクリーニングした(上および下パネル)。

加えて、多数のこれらの類似体(即ち、Sm4、Sm17 ~ Sm24、Sm26、Sm31、Sm34、Sm37およびSm40 ~ Sm42)も、前述したALPHA Screenアッセイを用いて、SOX18-SOX18ホモ二量体化の相互作用の邪魔(disruption)に関して試験した。

図5に示すように、Sm4、Sm17 ~ Sm23、Sm26、Sm31、Sm34、Sm37、Sm40およびSm41は、濃度5 μMで、SOX18-SOX18ホモ二量体化に関連した幾分かの阻害活性を示した。

このライブラリーを、2つの細胞株、HEK293およびHepG2に対する一般的細胞毒性に関してスクリーニングして、それらの開発可能性を評価した(表3)。

【0151】

多くの生化学的ハイスループットスクリーニングで偽陽性として作用する、雑多なフリークエントヒッター(promiscuous frequent hitters))に共通の潜在的なPAINS(パンアッセイ干渉化合物Pan Assay Interference Compounds)の化学部分を、インシリコプレディクター(predictor)「FAF-Drugs3」(<http://fafdrugs3.mti.univ-paris-diderot.fr/>)(BaelleおよびHolloway、2010、Lagorceら、2008)を使用して分析した。

合計で3つのみの化合物が、PAINS部分でフラグ(flagged)された(Sm14、Sm40およびSm44)。

Sm14は、メチレン-チアゾロンモチーフ、または反応性、-不飽和カルボニル基を含む一方、Sm40およびSm44の両方は、酸化的で不安定なカテコール基を含む(表2)。

Sm40およびSm44はFPアッセイで活性ではなかった一方、Sm14は結合アッセイを越えて追及しなかった。

加えて、新たなライブラリーを「Aggregator Advisor」データベースを使用して、潜在的なアグリゲーターに関して分析したが、いずれも既知のアグリゲーターに対する類似性を示さず、そして、全て中程度の親油性を示し、log P値は5.8未満であった(表3)。

【0152】

SOX18-DNA結合阻害に関するSAR

活性データは、SOX18-DNA結合阻害に関する幾分かの明らかなSARを示し、

ヒドロキシルまたはカルボン酸の両方またはいずれか1つの任意のエーテル化、エステル化またはアミド化による活性の低下または消失があった。

興味深いことに、ヒドロキシルによるカルボン酸の置き換えは、化合物の阻害活性を低減するにも関わらず許容される。

同様に、小電子供与基でパラ置換されたサリチル酸は、同様の活性を示し許容される；しかしながら、酸性の低下は、細胞毒性を増大させられる。

芳香族テールの場合、ナフチルをフェニル(Sm22)で置き換えると、全ての活性が完全に消失した。

この小ライブラリーから、Sm4の不飽和類似体である、Sm20のみが、Sm4と同様に、SOX18-DNA結合阻害活性および低い細胞毒性を示した(図5)。

【0153】

S O X 1 8 - R B P J タンパク質 - タンパク質結合阻害に関する S A R

類似体を最初に 5 0 μ M で試験した。

次いで、5 0 % を超える阻害を示す化合物を、より低い 5 μ M で再試験した。

同様に両方の濃度で試験したリード化合物 S m 4 を有するまたは有さない、ビヒクル溶媒の存在下、活性を、S O X 1 8 - R B P J のコントロールレベルと比較する。

図 4 B に示す I C ₅₀ プロット (右上パネル) から予想されるように、5 0 μ M の S m 4 による阻害は、ほぼ完全であり (1 1 . 9 \pm 5 . 6 % 、図 5 、下パネル) 、そして、5 μ M で僅か (m a r g i n a l) である。

5 0 μ M の高濃度では、全ての試験化合物の半分は、強い活性を示したが、S m 1 8 、S m 1 9 、S m 2 6 、S m 3 4 および S m 4 0 のみは、5 μ M で依然として高い活性を有し、S m 2 6 は中程度に活性のままであった。

10

興味深いことに、これら 5 つの強力な P P I 阻害剤のいずれも、タンパク質 - D N A 結合は阻害しなかった。

【 0 1 5 4 】

S O X 1 8 - R B P J タンパク質 - タンパク質相互作用の阻害のパターンは、S O X 1 8 - D N A 相互作用の阻害よりも明確ではない。

ビニルナフタレンを含む化合物の数個は、P P I 阻害において活性であるが ; 活性はリンカーの剛性の増大によるものか、または M i c h a e l アクセプターとしてのビニル - 芳香族基の活性によるものかは明らかではない。

このライブラリーの明確な特徴は、ジエチルアミドまたはポリヒドロキシル / メトキシ含有化合物は、5 0 μ M で P P I 阻害を示すため、遊離カルボキシレートは P P I 活性に必要なではないが、D N A 結合の阻害は示さないことである。

20

最後に、D N A および P P I の両方を阻害する S m 4 および S m 2 0 を除き、P P I および D N A 結合阻害の間には殆ど重複はない。

【 0 1 5 5 】構造研究

S O X モチーフを持つ D N A に結合したマウス S O X 1 8 - H M G ドメインの三次元構造が、X 線結晶構造解析により最近決定され (K l a u s ら、2 0 1 6) 、他の H M G ドメインと高い類似性を示している。

しかしながら、S m 4 の存在下で D N A に結合した S O X 1 8 H M G ドメインを共結晶化する試みでは、阻害剤の電子密度が検出できなかったため、阻害剤の結合ポケットを特定できなかった。

30

このことは、S m 4 のタンパク質 / D N A 邪魔 (d i s r u p t i o n) 特性に起因する可能性があった。

S m 4 の可能な結合部位を評価するために、本発明者らは、S O X 1 8 / D N A 結晶構造を使用して、インシリコドッキングおよび分子動力学計算を用いた。

S O X 1 8 - H M G ドメイン内の規定された結合ポケットの非存在下で、インシリコドッキングは、数個の可能な結合ポーズを生成し、これらを分子動力学 (M D) シミュレーションにより更に検証した。

これらのシミュレーションは、2 0 0 n s の全シミュレーション時間の間、安定なままであった 1 つの結合ポーズを特定した。

40

比較して、他の全てのポーズにおいて、阻害剤は 3 ~ 1 4 n s 後にそのタンパク質相互作用を破壊し、タンパク質接触を有さずに周囲の溶媒中に残留した。

同様に、D N A を有さない S O X 1 8 - H M G 構造を使用して、S m 4 の安定な結合ポーズは見出されなかった。

【 0 1 5 6 】

S O X 1 8 / D N A 構造における、S m 4 の安定な結合ポーズは、タンパク質と D N A との間の溶媒接近可能なポケット内に阻害剤を置き、このポケットは、そうでない場合、X 線結晶構造で水分子により占有される。

S m 4 の主な極性相互作用は、A r g 1 3 6 および L y s 1 4 7 とであり、これは、そ

50

の相互作用を $dG15$ と交換し、そして、いくつかは、 $His143$ への立体構造の変化を誘導し、その側鎖を $Sm4$ に向かって回転させる (図 6 A、B)。

しかしながら、 $Sm4$ の DNA 結合阻害モードを直接説明する、他の主な立体構造変化は観察できなかった。

【0157】

$SOX18$ の可能なタンパク質 - タンパク質相互作用部位を研究するために、本発明者らは、インシリコタンパク質 - タンパク質ドッキングを、MDシミュレーションと組み合わせて使用して、 $SOX18$ / DNA とそのタンパク質パートナー $RBPJ$ の複合体モデルを構築した。

$RBPJ$ の場合、本発明者らは、2012 に解明された、ヒト $Notch$ 転写複合体の部分の X 線結晶構造を使用した ($Choi$ ら、2012)。

この部分は、共活性化因子 $MAML1$ に結合した、アンキリン (ANK) 反復ドメイン、 $Notch$ 細胞内ドメインの $RBPJ$ - J 関連分子 (RAM) ドメイン、およびそのコンセンサス DNA に結合した転写因子 $RBPJ$ を含む。

この $Notch$ 転写複合体の構造内への $SOX18$ / DNA 構造のドッキングと、続く最適化のための MDシミュレーションとにより、図 6 C に示す複合体モデルが得られた。

このモデルは、 $RBPJ$ / $SOX18$ 複合体が HMG ドメインにより仲介され得、そして、両 DNA 分子により妨害されずにタンパク質複合体を形成できることを示す。

実際に、 $RBPJ$ および $SOX18$ からの両 DNA 鎖は、ヌクレオソームに対する DNA 配向と同様、互いにほぼ平行して配向される。

加えて、 HMG ドメインの C および N - 末端テールの両方は、溶媒に向かって配向され、 $RBPJ$ 複合体を直接妨害することなく、欠損した $SOX18$ ドメインの追加を可能にする。

【0158】

$SOX18$ と $RBPJ$ との間の相互作用は、ヘリックス 3 の C 末端部分と HMG ドメインの C 末端テール (残基 $Gln138$ 、 $Arg141$ 、 $Asp142$ および $His143$) からの残基により提供される。

それにより、このタンパク質 - タンパク質界面は、その領域の DNA 結合界面と反対である。

$RBPJ$ / $SOX18$ 複合体に対する、 $Sm4$ の推定結合部位のマッピングは、その主タンパク質 - タンパク質界面と反対の、ヘリックス - 3 および C 末端テールの $SOX18$ DNA 結合領域内に阻害剤をぴったりと位置付け、 $Sm4$ の結合が、タンパク質 - タンパク質およびタンパク質 - DNA 相互作用の両方を攪乱し得る可能性を示唆する。

【0159】

$SOX18$ 転写活性の調節

$SOX18$ 阻害剤の機能的効果を更に評価するために、本発明者らは、 $SOX18$ 転写活性の読み取りとして、インビトロでの細胞ベースのレポーターシステムを使用した。

ルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合した $Vcam-1$ プロモーター断片を含むコンストラクトおよび $SOX18$ 発現ベクターで $COS-7$ 細胞をトランスフェクトした。

$Sm4$ 、 $PP1$ 邪魔 ($disruption$) 特異性の意味で、本発明者らのリード化合物を、メクロフェナム酸、ニフルミン酸およびフルフェナミン酸と共に、この細胞ベースのアッセイで試験した。

これらの 4 つの小分子のうち、 $Sm4$ は、 $SOX18$ 転写活性の最も有効な阻害を示し、 IC_{50} 値は $5.2 \mu M$ であった (図 6 D)。

任意の濃度依存性 $SOX18$ 阻害が観察され得る前に、メクロフェナム酸およびフルフェナミン酸の細胞毒性に達した。

全ての他の試験化合物は、より低い効力を示した ($20 \mu M < IC_{50} < 50 \mu M$ 、表 1、列 3)。

【0160】

$Sm4$ が、インビトロでのその転写活性を阻害するのに必要なものと同様の濃度範囲で

10

20

30

40

50

、特定の P P I を選択的に攪乱 (p e r t u r b) するという観察事項は、この小化合物の作用モードが、タンパク質パートナー採用 (r e c r u i t m e n t) の、妨害によるものである可能性があることを示唆する。

【 0 1 6 1 】

単分子追跡 (S M T) を用いた S M 4 による S O X 1 8 標的結合の評価

本発明者らは、S M T 技術によって、クロマチン上のその標的遺伝子に対する S O X 1 8 タンパク質のサーチパターンを、単一分子の解像度 (r e s o l u t i o n) で、生細胞核においてリアルタイムで視覚化することができる。

S O X 1 8 クロマチン結合動態に対する、S M 4 の攪乱を視覚化することが可能であるという事実は、S M 4 オンターゲット関与を明白に示す。

この効果は、任意の細胞毒性を欠いた濃度で観察される。

S M 4 の効果により、S O X 1 8 はクロマチン上の特定の部位により長く滞在し、このタンパク質動態の変化は、S M 4 により損なわれた S O X 1 8 タンパク質 - タンパク質相互作用の変化の結果である可能性がある (A L P H A S c r e e n アッセイにより以前に示されたように)。

転写因子の作用様式は、遺伝子標的選択性を指示するタンパク質 - タンパク質相互作用のコードにより推進される。

このコードが変更された場合、転写因子活性は無効となる。

【 0 1 6 2 】

考察

転写因子は、D N A 結合ドメイン、多数のタンパク質パートナー、および、いくつかの場合では、内因性リガンドさえも有するタンパク質である。

T F の活性がこのタイプの相互作用に依存しているという概念は、たとえば、タンパク質 - D N A またはタンパク質 - タンパク質相互作用阻害剤のスクリーニング等の、その機能を調節する分子を発見するための異なる手段を開くものである。

T F が関与する遺伝経路に関する大量の情報が存在するが、その分子作用様式、そして、より詳細には、多数のタンパク質パートナーの採用に関しては殆ど報告されていない。

したがって、D N A 結合ドメインが T F ファミリー内で高度に保存され、そして、選択のための低い可能性を有する領域を構成していても、D N A 結合阻害剤のスクリーニングは、最近まで、T F モジュレーターを見出すための主要な選択肢を提供していた。

【 0 1 6 3 】

この研究では、本発明者らは、ハイスループット D N A 結合アッセイを用いて、化学的に多様な天然産物ライブラリーをスクリーニングし、転写因子 S O X 1 8 の D N A 結合を阻害することができる化合物を特定した。

スクリーニングは、両方ともサリチル酸コアおよび親油性テールを有する、類似した構造の 2 つの化合物を特定した。

2 つの活性化合物の周辺で設計された、フォーカスされたライブラリーは、様々な活性度を有する、より広範な類似化合物を特定し、これらの化合物が S O X 1 8 D N A 結合阻害剤のクラスターを形成することを証明した。

本発明者らは、このフォーカスされたライブラリーを用いて、阻害活性がタンパク質に対する小化合物の結合に起因し、そして、D N A 自体に対する結合には起因しないことを更に示した。

活性分子は、S O X 1 8 タンパク質と相互作用し、結合によりその熱安定性を増大させる。

加えて、S O X 1 8 完全長または H M G ボックスのみのタンパク質のいずれかを使用して、本発明者らは、化合物が D N A 結合ドメインまたはその直近と直接相互作用することを証明した。

【 0 1 6 4 】

本発明者らは、D N A 結合の邪魔 (d i s r u p t i o n) をフィルターとして使用すると、H M G - ボックスの高いレベルの配列保存に起因して、S O X 転写因子間の選択性

10

20

30

40

50

が低い化合物が得られることを以前主張した。

これと一致して、本発明者らのリード化合物、Sm4は、高濃度(200~300 μM)で使用された際、様々なSOXタンパク質からの広範なHMG-ボックスのDNA結合活性を邪魔(disrupt)することができた。

SOXタンパク質のHMGボックスは、3つのα-ヘリックスからなり、2つはDNA結合のための主な界面を提供する。

しかしながら、SOX9 HMGボックスは、タンパク質-タンパク質相互作用にも関与することが報告されており(Huangら、2015、AgrestiおよびBianchi、2003、Prokopら、2012)、第3のα-ヘリックスはパートナータンパク質のための主な界面として提案されている。

この研究では、本発明者らは、タンパク質-タンパク質相互作用(PPi)検出のインビトロ方法を適用して、TFタンパク質パートナー採用の邪魔(disruption)を研究した。

転写因子SOX18の直接タンパク質-タンパク質相互作用は、MEF2Cに関してのみ報告されている(Hoskingら、2001)が、RBPJとの遺伝子相互作用は、D114遺伝子の転写促進においてのみ示されている(Sacilottoら、2013)。

両方のタンパク質は、細胞フリー/ALPHA Screenおよび共IPアッセイにおいて、SOX18に対する直接結合を示す。

重要なことには、小分子のいくつかは、特定のPPiを異なっており、邪魔(disrupt)することである。

それにより、サリチル酸骨格を有するSm4は、SOX18/RBPJ複合体を邪魔(disrupt)することにおいて、より選択的である一方、アントラニル酸骨格を有するフルフェナミン酸は、SOX18/MEF2C複合体に関して、より選択的である。

更に、インシリコドッキングは、HMGボックスのC-末端テールに近接した、DNAおよびタンパク質の第3のヘリックスの間に割り込んだ、Sm4に関する推定結合ポケットを提供する。

この位置は、Sm4のような阻害剤が、DNA結合に影響するだけでなく、RBPJ等のタンパク質パートナーとの相互作用表面に影響するように、SOX18タンパク質の立体構造を変更することができることを示唆する。

【0165】

更に、SOX18転写活性に対する小化合物の効果の研究は、Sm4が、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と融合された際、SOX18依存性Vcam-1プロモーター活性を遮断できることを明らかにした。

フルフェナミン酸は、SOX18転写遮断にごく僅かな効果を示す。

このレポーターアッセイは、Sox18およびルシフェラーゼ発現ベクターの両方をトランスフェクトされたCOS-7細胞で行われ、したがって、潜在的なSOX18内因性パートナー採用の邪魔(disruption)の解釈が制限されている。

にもかかわらず、Sm4による、SOX18調節による転写の阻害は、小分子が細胞ベースの環境内で転写因子活性を妨害できることの明らかな指標である。

【0166】

拡張されたライブラリーの合成およびスクリーニングは、更に、SOX18/DNA結合の阻害のためのいくつかの明らかな構造-活性関連性を示した。

親油性テールおよびそのリンカーにおいて幾分かの変動が許容されるが、ヒドロキシルまたはカルボン酸基の両方は、任意のエステル、エーテルまたはアミドが活性を消失させるため、それらの水素結合供与能力を保持する必要がある。

パラ置換された電子供与基を有するカルボン酸の変化は、酸をヒドロキシル(レゾルシノール骨格)で置き換えるのと同様、殆ど影響はなく、両方ともSOX18/DNA結合を阻害するそれらの能力を保持する。

アントラニル酸骨格を有する化合物を、NSAID化合物に対するサリチル酸骨格の化

10

20

30

40

50

学的類似性の延長として選択した。

研究では、SOX18阻害剤がCOX1またはCOX2に対して阻害活性を有さないことを示したが、いくつかのNSAID化合物は、SOX18 DNA結合阻害を示す。

しかしながら、SOX18 - タンパク質結合阻害 (SOX18 - RBPJの代わりに、SOX18 - MEF2C阻害) における差異は、異なる結合または作動モードを示唆する。

【0167】

TFの転写活性を阻害する化合物の有効性は、核内のTFおよび化合物の両方の濃度に依存する。

TFの濃度は、核内でほぼミリモルレベルに達し得るが (Chenら、2014)、化合物濃度は、その細胞および核膜の両方を通した分配の能力に依存する。

10

創薬の初期段階では、化合物濃度が規定される均一アッセイにおいてIC₅₀を測定することは、より情報価値がある (即ち、SARモデルを構築するために)。

しかしながら、更なる薬物最適化のためには、予測モデル、または化合物の有効な阻害濃度 (IC₅₀) を測定する細胞ベースのアッセイのいずれかにより、核内への化合物の浸透も考慮する必要がある。

【0168】

TF阻害剤を開発する際に行う必要がある他の考慮事項は、どのPPIが化合物により優位に影響を受けるかである。

TF間の相互作用を含む、タンパク質 - タンパク質相互作用は、比較的弱い。

たとえば、p32とHDM2の間の相互作用は、低～中のマイクロモル範囲のKDを有する (Dawsonら、2003、Chenら、2013)。

20

これと比較して、抗体 - 抗原相互作用または内因性ペプチドリガンドと受容体 (たとえば、EGF - EGFR) の間の相互作用は遥かに強く、KDは、低ナノモル～高ピコモル範囲である (Mianら、1991、Laxら、1988)。

同様に、タンパク質とDNAの間の相互作用は、負に帯電したDNAと通常正に帯電したDNA結合ドメインとの間の強い静電気相互作用にほぼ起因して、低ナノモル範囲にある。

Sm4は、SOX18 / DNAおよびSOX18 / RBPJ相互作用の両方を阻害することができるが、阻害効果は、より弱いPPIに対してより高い。

【0169】

30

TF阻害剤の開発における重要な考慮事項は、特にTFが半ダースの異なるタンパク質パートナーを採用することが可能であるため、PPIを選択的に阻害する能力である (GampertおよびRoeder、2008)。

TFは本質的に無秩序であるとしても (WrightおよびDyson、2015)、これらのタンパク質は、異なるタンパク質 - タンパク質界面に関するドメインモジュール性を示す (Reichmannら、2005)。

このことは、いくつかの相互作用が、異なる下流経路を活性化する一方、構造的類似性を共有することを暗示する。

キナーゼ等の他の調節タンパク質および酵素と同様に、TFタンパク質 - タンパク質阻害の選択性プロファイルを考慮する必要がある。

40

全PPIの遮断は望ましくない可能性があるが、最大の有効性は単一のPPI阻害では達成されず、選択されたタンパク質パートナーのサブセットの採用を同時に阻害することにより達成される可能性がある。

【0170】

結論として、この研究は、SOX18阻害のための主要なファルマコフォアとしてのサリチル酸誘導体を特定し、およびSm4をリード化合物として特定した。

タンパク質 - DNA結合およびPPIアッセイの両方からの手がかりにしたがって、更なる薬物最適化を行って、選択性および効力を更に洗練させる必要がある。

【0171】

50

【表 1】

表 1. フォーカスしたライブラリーの化合物の、SOX18-DNA結合および SOX18 依存性転写活性化についての、*in vitro*での阻害能力

化 合 物	FP IC ₅₀ ± SD μM	CMC μM	細胞内での インビトロ有効性 IC ₅₀ ± SD μM COS7 (Luc)	インビトロ 細胞毒性 CC ₅₀ ± SD μM COS7	Aggregator advisor logP
天然産物					
Sm1	348 ± 1.1	-	-	-	6.8 [#]
Sm2	341 ± 1.1	-	-	-	7.8 [#]
サリチル酸類似体					
Sm3	-	30	-	-	6.1 [#]
Sm4	97.5 ± 1	>1000	5.2 ± 1.1	117 ± 29.4	4.6 [#]
Sm5	1,105 ± 1	>1000	21 ± 14	>200	3.2 [#]
Sm6	-	20	-	-	6.1 [#]
Sm7	-	20	-	-	6.3 [#]
Sm8	327 ± 1.1	>1000	約50	>200	5.5 [#]
Sm9	-	20	-	-	4.8 [#]
Sm10	-	20	-	-	6.1 [#]
レゾルシノール類似体					
Sm11	3,803 ± 1	>1000	約50	>200	2.6*
Sm12	2,880 ± 1.1	>1000	33 ± 3.7	98.6 ± 17.4	3.8*
Sm13	481 ± 1.1	>1000	約30	>200	3.2 [#]
Sm14	120 ± 1.1	>1000	25 ± 9	>200	凝集なし
NSAID類似体					
サリチル酸	-	-	-	-	凝集なし
アスピリン	-	-	-	-	凝集なし
ゲンチジン酸	-	-	-	-	凝集なし
メクロフェナム酸	163 ± 17.7	-	>>CC ₁₀	16 ± 0.3	5.6 [#]
ニフルミン酸	375 ± 84	-	50.5 ± 7.6	>200	3.4 [#]
フルフェナミン酸	220 ± 68.6	-	>CC ₁₀	65 ± 2.7	4.8 [#]

*: 既知のアグリゲーターと同様

#: 既知のアグリゲーターではない、「高い」LogP; 可能なアグリゲーター

【0172】

上記の表 1 に関して、第 1 の列において、化合物 F P I C 5 0 は、可変 H i l l 勾配曲線適合を用いて概算した。

異なる濃度範囲を、DMSO 濃度を 0 ~ 3.33 % v / v の範囲で含む、F P ベースの DNA 結合競合アッセイにて試験した (0.2 ~ 200 μM、10 ~ 500 μM、10 μM ~ 3 mM)。

実験は、3 回の独立反復で行った。

第 2 の列は、化合物 S m 1 ~ 1 4 が、生理食塩水 (200 mM の N a C l) または蛍光分極緩衝液 (30 mM の H E P E S p H 7.5、100 mM の K C l、40 mM の N a

10

20

30

40

50

C l、10 mMのNH₄OAc、10 mMのグアニジニウム、2 mMのMgCl₂、0.5 mMのEDTA、0.01%のNP-40)中でミセルの形成を開始する閾値濃度をまとめている。

第3および第4の列は、全活性化合物について、COS7線維芽細胞内での細胞ベースのルシフェラーゼSOX18依存性転写促進化の-IC₅₀-と、細胞毒性-CC₅₀-の、50%阻害濃度をまとめている。

最終列において、本発明者らは、「Aggregator Advisor」(Irwinら、2015)を使用して、物理的性質(CLogP>3)および既知のアグリゲーターの強力なライブラリー-12,600化合物に対する類似性に基づいて、アグリゲーターを予測した

*：既知のアグリゲーターに類似した化合物、

#：任意の既知のアグリゲーターに類似していないが、「高い」LogPゆえ高いリスクがある

：予測された凝集のリスクはない)。

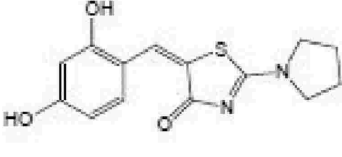
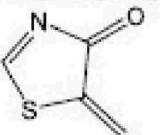
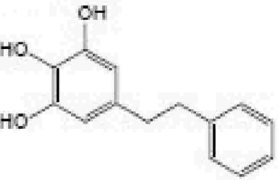
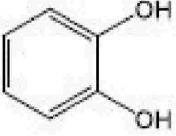
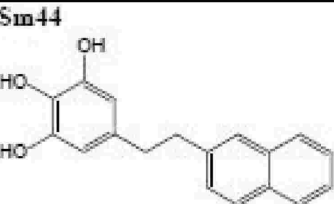
【0173】

【表2】

表2. PAINS分析

PAINS部分構造を含む化合物Sm1~Sm44の評価。

無差別(promiscuous)の結合構造の可能性がある3つの化合物をリストする。

化合物	PAINS構造	コメント
Sm14 	ene_five_het_B(90) 	メチレン-チアゾロンモチーフ:生物物理学的アッセイにおける高頻度ヒッター、これは更に酸化されて反応性代謝物となることができ、潜在的にCYP450共有結合剤である。
Sm40 	catechol_A(92) 	カテコールモチーフ:特にCYP450に対する潜在的な共有結合剤であるオルトキノンの更なる酸化のリスクに関連する。
Sm44 		

【0174】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. DNA 結合及び細胞毒性

SOX18/DNA 結合 (FP) の阻害および 2 つの哺乳類細胞株に対する細胞毒性についての、Sm15-Sm44 の実験データ。

また、予測される親油性を cLogP として示す。

化合物	FP 結合割合 (%)		細胞毒性 (CC50 μ M)		cLogP
	200 μ M	50 μ M	HEK 293	HepG2	
Sm15	120.8 \pm 4.7	102.6 \pm 7.4	>100	59.1	5.2
Sm16	108.9 \pm 4.9	99.3 \pm 6.2	>100	45.1	5.2
Sm17	117.0 \pm 10.9	100.3 \pm 6.0	62.6	38.5	4.8
Sm18	106.9 \pm 21.3	98.7 \pm 5.0	38.7	28.0	4.7
Sm19	107.6 \pm 4.5	99.2 \pm 6.8	>100	>100	5.0
Sm20	11.9 \pm 8.5	10.3 \pm 4.1	97.1	71.3	5.0
Sm21	98.1 \pm 2.1	103.4 \pm 8.8	>100	>100	3.8
Sm22	93.1 \pm 9.5	98.1 \pm 6.1	>100	>100	3.4
Sm23	106.4 \pm 1.7	102.5 \pm 9.7	36.0	20.3	5.2
Sm24	102.8 \pm 16.6	97.4 \pm 9.0	30.6	36.5	5.2
Sm25	106.8 \pm 0.4	97.3 \pm 8.2	85.8	35.8	4.8
Sm26	128.3 \pm 17.2	98.5 \pm 5.9	23.5	16.8	4.2
Sm27	92.8 \pm 21.7	97.0 \pm 6.1	>100	>100	5.0
Sm28	19.3 \pm 8.4	76.5 \pm 2.3	65.1	78.9	5.0
Sm29	2.0 \pm 7.2	73.0 \pm 1.9	64.4	71.2	4.6
Sm30	109.4 \pm 2.8	99.0 \pm 7.6	>100	>100	4.6
Sm31	91.7 \pm 2.1	97.7 \pm 5.9	92.7	>100	5.7
Sm32	10.9 \pm 5.2	3.9 \pm 6.0	37.6	24.0	5.6
Sm33	9.9 \pm 2.3	50.1 \pm 54.6	33.4	34.5	5.2
Sm34	100.9 \pm 1.5	94.2 \pm 1.9	>100	>100	5.4
Sm35	-3.7 \pm 7.9	-1.5 \pm 3.5	52.2	30.3	5.4
Sm36	-3.9 \pm 6.8	10.9 \pm 9.6	39.9	37.7	5.0
Sm37	103.5 \pm 10.4	98.2 \pm 7.4	>100	>100	4.1
Sm38	119.5 \pm 6.6	101.6 \pm 11.2	>100	>100	4.1
Sm39	116.6 \pm 8.1	101.7 \pm 9.7	>100	>100	3.6
Sm40	92.7 \pm 14.7	101.0 \pm 12.1	>100	>100	2.7
Sm41	90.2 \pm 46.1	100.3 \pm 10.0	>100	>100	5.3
Sm42	104.5 \pm 7.7	100.7 \pm 7.2	>100	>100	5.3
Sm43	113.1 \pm 3.6	105.5 \pm 9.5	>100	>100	4.7
Sm44	53.5 \pm 9.6	107.6 \pm 10.1	>100	>100	3.8

【 0 1 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表4. Sm4のオフターゲットアクティビティプロファイル
Eurofins CEREP/Panlabs (フランス、アメリカ、台湾) の
Hit Profiling screen®パッケージを使用した、10 μ Mでの、
Sm4のオフターゲットアクティビティプロファイル

アッセイ名	種	ファミリー	サブファミリー	10 μ Mでの 阻害 (%)
アデノシンA1	ヒト	GPCR	アデノシン	-8
アデノシンA2A	ヒト	GPCR	アデノシン	30
アドレナリン性 α 1A	ラット	GPCR	アドレナリン受容体	0
アドレナリン性 α 1B	ラット	GPCR	アドレナリン受容体	-1
アドレナリン性 α 2A	ヒト	GPCR	アドレナリン受容体	0
アドレナリン性 β 1	ヒト	GPCR	アドレナリン受容体	6
アドレナリン性 β 2	ヒト	GPCR	アドレナリン受容体	2
カンナビノイドCB1	ヒト	GPCR	カンナビノイド	3
ドーパミンD1	ヒト	GPCR	ドーパミン	12
ドーパミンD2S	ヒト	GPCR	ドーパミン	15
ヒスタミンH1	ヒト	GPCR	ヒスタミン	2
ムスカリン性M2	ヒト	GPCR	ムスカリン性	13
ムスカリン性M3	ヒト	GPCR	ムスカリン性	8
オピエート μ (OP3, MOP)	ヒト	GPCR	オピオイド&オピオイド様	3
プロスタノイドEP4	ヒト	GPCR	プロスタノイド	27
セロトニン5-HT2B	ヒト	GPCR	セロトニン	-2
カルシウムチャネルL型	ラット	イオンチャネル	Ca ²⁺ チャネル	-8
GABA _A 、フルニトラゼパム	ラット	イオンチャネル	GABAチャネル	-6
GABA _A 、ムシモール	ラット	イオンチャネル	GABAチャネル	6
グルタメート、NMDA	ラット	イオンチャネル	グルタメートチャネル	-5
ニコチン性アセチルコリン	ヒト	イオンチャネル	ニコチン性チャネル	3
カリウムチャネル[KATP]	ハムスター	イオンチャネル	K ⁺ チャネル	10
カリウムチャネルhERG	ヒト	イオンチャネル	K ⁺ チャネル	-14
ナトリウムチャネル、部位2	ラット	イオンチャネル	Na ⁺ チャネル	-13
ホルボールエステル	マウス	キナーゼ	AGC	15
ニコチン性アセチルコリン α 1	ヒト	ニコチン性チャネル	ニコチン性チャネル	-4
イミダゾリンI2	ラット	非キナーゼ酵素	イミダゾリン	11
ロリプラム	ラット	非キナーゼ酵素	ホスホジエステラーゼ	1
アンドロゲン(テストステロン)	ヒト	核受容体	ステロイドNR	1
エストロゲンERアルファ	ヒト	核受容体	ステロイドNR	-10
グルココルチコイド	ヒト	核受容体	ステロイドNR	12
甲状腺ホルモン	ラット	核受容体	非ステロイドNR	36
シグマ1	ヒト	他の受容体	シグマ	-6
ノルエピネフリン(NET)	ヒト	輸送体	ノルエピネフリン	34
HDAC3	ヒト	エピジェネティクス	HDACS	-4.8
HDAC4	ヒト	エピジェネティクス	HDACS	5.1
HDAC6	ヒト	エピジェネティクス	HDACS	1.1
HDAC11	ヒト	エピジェネティクス	HDACS	-29.1
サーチェイン1	ヒト	エピジェネティクス	HDACS	0.0
サーチェイン2	ヒト	エピジェネティクス	HDACS	-5.2

【 0 1 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. 合成した化合物 S m 1 5 ~ S m 4 4 の化学的特徴

化合物	分子式	化学名	HighRes MS		UV _{254nm} による HPLC純度	NMR
			計算質量	実測質量		
S m 1 5	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	(Z)-N,N-ジエチル-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)ベンズアミド	359.189	360.234 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 1 6	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	(E)-N,N-ジエチル-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)ベンズアミド	359.189	360.234 [M+H]	>95	¹ H
S m 1 7	C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	N,N-ジエチル-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)ベンズアミド	361.204	362.250 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 1 8	C ₂₃ H ₂₃ NO ₂	N,N-ジエチル-2-ヒドロキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)ベンズアミド	347.189	348.245 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 1 9	C ₂₀ H ₁₆ O ₃	(E/Z)-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	304.110	305.219 [M+H]	92 E/Z	¹ H ¹³ C
S m 2 0	C ₁₉ H ₁₄ O ₃	(E/Z)-2-ヒドロキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	290.094	289.079 [M-H]	91 E/Z	¹ H ¹³ C
S m 2 1	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	(E)-2-ヒドロキシ-6-ステリル安息香酸	240.079	239.067 [M-H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 2 2	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	2-ヒドロキシ-6-フェネチル安息香酸	242.094	241.100 [M+H]	>95	¹ H
S m 2 3	C ₂₅ H ₂₇ NO ₃	(Z)-N,N-ジエチル-2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)ベンズアミド	389.199	390.222 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 2 4	C ₂₅ H ₂₇ NO ₃	(E)-N,N-ジエチル-2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)ベンズアミド	389.199	390.222 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 2 5	C ₂₅ H ₂₉ NO ₃	N,N-ジエチル-2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)ベンズアミド	391.215	392.240 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 2 6	C ₂₃ H ₂₅ NO ₃	N,N-ジエチル-2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)ベンズアミド	363.183	364.226 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
S m 2 7	C ₂₁ H ₁₈ O ₄	(E)-2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	334.121	335.193 [M+H]	>95	¹ H
S m 2 8	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	(E/Z)-2-ヒドロキシ-4-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	320.105	319.093 [M-H]	91 E/Z	¹ H ¹³ C
S m 2 9	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	2-ヒドロキシ-4-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)安息香酸	322.121	321.120 [M-H]	90	¹ H ¹³ C
S m 3 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	2,4-ジメトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)安息香酸	336.136	337.143 [M-H]	>95	¹ H ¹³ C

10

20

30

40

50

化合物	分子式	化学名	HighRes MS		UV _{254nm} による HPLC純度	NMR
			計算質量	実測質量		
Sm31	C ₂₀ H ₁₅ ClO ₃	(E)-4-クロロ-2-メトキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	338.071	339.139 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm32	C ₁₉ H ₁₃ ClO ₃	(E)-4-クロロ-2-ヒドロキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	324.055	325.045 [M+H]	90	¹ H ¹³ C
Sm33	C ₁₉ H ₁₃ ClO ₃	4-クロロ-2-ヒドロキシ-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)安息香酸	326.071	325.062 [M-H]	85	¹ H
Sm34	C ₂₁ H ₁₈ O ₃	(E)-2-メトキシ-4-メチル-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	318.126	319.218 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm35	C ₂₀ H ₁₆ O ₃	(E)-2-ヒドロキシ-4-メチル-6-(2-(ナフタレン-2-イル)ビニル)安息香酸	304.110	305.223 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm36	C ₂₀ H ₁₈ O ₃	2-ヒドロキシ-4-メチル-6-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)安息香酸	306.126	307.235 [M-H]	90	¹ H ¹³ C
Sm37	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	(Z)-1, 2, 3-トリメトキシ-5-ステチルベンゼン	270.126	271.136 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm38	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	(E)-1, 2, 3-トリメトキシ-5-ステチルベンゼン	270.126	271.136 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm39	C ₁₇ H ₂₀ O ₃	1, 2, 3-トリメトキシ-5-フェネチルベンゼン	272.141	273.150 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm40	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	5-フェネチルベンゼン-1, 2, 3-トリオール	230.094	n.d.	>95	¹ H ¹³ C
Sm41	C ₂₁ H ₂₀ O ₃	(Z)-2-(3, 4, 5-トリメトキシステチル)ナフタレン	320.141	321.149 [M+H]	>95	¹ H
Sm42	C ₂₁ H ₂₂ O ₃	(E)-2-(2-(3, 4, 5-トリメトキシシクロヘキサ-1, 3-ジエン-1-イル)ビニル)ナフタレン	322.157	321.149 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm43	C ₂₁ H ₂₂ O ₃	2-(3, 4, 5-トリメトキシフェネチル)ナフタレン	322.157	323.164 [M+H]	>95	¹ H ¹³ C
Sm44	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	5-(2-(ナフタレン-2-イル)エチル)ベンゼン-1, 2, 3-トリオール	280.110	n.d.	>95	¹ H ¹³ C

【 0 1 7 7 】

化合物 S m 1 5 ~ S m 4 4 の化学的分析

化合物の純度を、HPLC (ESI-MS/UV/ELSD) により決定し、そして、それらの分子式を、HighRes MS (ESI microTOF-LC) により決定した。

¹Hおよび¹³C-NMR実験を用いて構造を確認した(付録A参照)。

【 0 1 7 8 】

参考文献

AGRESTI, A. & BIANCHI, M. E. 2003. HMGB protein

10

20

30

40

50

s and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 170 - 8.

BAELL, J. B. & HOLLOWAY, G. A. 2010. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem*, 53, 2719 - 40.

BASS, A. J., WATANABE, H., MERMEL, C. H., YU, S., PERNER, S., VERHAAK, R. G., KIM, S. Y., WARDWELL, L., TAMAYO, P., GAT-VIKS, I., et al. 2009. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet*, 41, 1238 - 42.

10

BOWLES, J., SCHEPERS, G. & KOOPMAN, P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227, 239 - 55.

BOYADJIEV, S. A. & JABS, E. W. 2000. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) as a knowledgebase for Human developmental disorders. *Clin Genet*, 57, 253 - 66.

20

BRANDTS, J. F. & LIN, L. N. 1990. Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 29, 6927 - 40.

CERMENATI, S., MOLERI, S., CIMBRO, S., CORTI, P., DEL GIACCO, L., AMODEO, R., DEJANA, E., KOOPMAN, P., COTELLI, F. & BELTRAME, M. 2008. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood*, 111, 2657 - 66.

30

CHATTOPADHYAY, A. & LONDON, E. 1984. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal Biochem*, 139, 408 - 12.

CHEN, J., SAWYER, N. & REGAN, L. 2013. Protein-protein interactions: General trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. *Protein Science*, 22, 510 - 515.

40

CHEN, J., ZHANG, Z., LI, L., CHEN, B. C., REVYAKIN, A., HAJJ, B., LEGANT, W., DAHAN, M., LIONNET, T., BETZIG, E., et al. 2014. Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. *Cell*, 156, 1274 - 85.

CHOI, S. H., WALES, T. E., NAM, Y., O'DONOVAN, D. J., SLIZ, P., ENGEN, J. R. & BLACKLOW, S. C. 2012. Conformational locking upon cooperative assembly of notch transcription complexes. *Structure*, 20, 340 - 9.

50

- DARNELL, J. E., JR. 2002. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 740 - 9.
- DAWSON, R., MULLER, L., DEHNER, A., KLEIN, C., KESSLER, H. & BUCHNER, J. 2003. The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol*, 332, 1131 - 41.
- DUONG, T., KOLTOWSKA, K., PICHOL-THIEVEND, C., LE GUEN, L., FONTAINE, F., SMITH, K. A., TRUONG, V., SKOCZYLAS, R., STACKER, S. A., ACHEN, M. G., et al. 2014. VEGFD regulates blood vascular development by modulating SOX18 activity. *Blood*, 123, 1102 - 12.
- FEHER, M. & SCHMIDT, J. M. 2003. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci*, 43, 218 - 27.
- FILIPPAKOPOULOS, P., QI, J., PICAUD, S., SHEN, Y., SMITH, W. B., FEDOROV, O., MORSE, E. M., KEATES, T., HICKMAN, T. T., FELLETER, I., et al. 2010. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468, 1067 - 73.
- FONTAINE, F., OVERMAN, J. & FRANCOIS, M. 2015. Pharmacological manipulation of transcription factor protein-protein interactions: opportunities and obstacles. *Cell Regen (Lond)*, 4, 2.
- FRANCOIS, M., CAPRINI, A., HOSKING, B., ORSENI GO, F., WILHELM, D., BROWNE, C., PAAVONEN, K., K ARNEZIS, T., SHAYAN, R., DOWNES, M., et al. 2008. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*, 456, 643 - 7.
- FUKADA, H., STURTEVANT, J. M. & QUIOCHO, F. A. 1983. Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 258, 13193 - 8.
- GAGOSKI, D., MUREEV, S., GILES, N., JOHNSTON, W., DAHMER-HEATH, M., SKALAMERA, D., GONDA, T. J. & ALEXANDROV, K. 2015. Gateway-compatible vectors for High-throughput protein expression in pro- and eukaryotic cell-free systems. *J Biotechnol*, 195, 1 - 7.
- GAMPER, A. M. & ROEDER, R. G. 2008. Multivalent Binding of p53 to the STAGA Complex Mediates Coactivator Recruitment after UV Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 2517 - 2527.
- GUBBAY, J., COLLIGNON, J., KOOPMAN, P., CAPEL,

- B., ECONOMOU, A., MUNSTERBERG, A., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P. & LOVELL-BADGE, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 245-50.
- HOPKINS, A. L. & GROOM, C. R. 2002. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 727-30.
- HOSKING, B. M., WANG, S. C., CHEN, S. L., PENNING, S., KOOPMAN, P. & MUSCAT, G. E. 2001. SOX18 directly interacts with MEF2C in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 493-500. 10
- HOSKING, B. M., WANG, S. C., DOWNES, M., KOOPMAN, P. & MUSCAT, G. E. 2004. The VCAM-1 gene that encodes the vascular cell adhesion molecule is a target of the Sry-related High mobility group box gene, Sox18. *J Biol Chem*, 279, 5314-22.
- HUANG, Y. H., JANKOWSKI, A., CHEAH, K. S., PRABHAKAR, S. & JAUCH, R. 2015. SOXE transcription factors form selective dimers on non-compact DNA motifs through multifaceted interactions between dimerization and High-mobility group domains. *Sci Rep*, 5, 10398. 20
- IRWIN, J. J., DUAN, D., TOROSYAN, H., DOAK, A. K., ZIEBART, K. T., STERLING, T., TUMANIAN, G. & SHOICHET, B. K. 2015. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 7076-7087. 30
- KLAUS, M., PROKOPH, N., GIRBIG, M., WANG, X., HUANG, Y. H., SRIVASTAVA, Y., HOU, L., NARASIMHAN, K., KOLATKAR, P. R., FRANCOIS, M., et al. 2016. Structure and decoy-mediated inhibition of the SOX18/Prox1-DNA interaction. *Nucleic Acids Res*, 44, 3922-35.
- KOVTUN, O., MUREEV, S., JUNG, W., KUBALA, M. H., JOHNSTON, W. & ALEXANDROV, K. 2011. Leishmania cell-free protein expression system. *Methods*, 55, 58-64. 40
- LAGORCE, D., SPERANDIO, O., GALONS, H., MITEVA, M. A. & VILLOUTREIX, B. O. 2008. FAF-Drugs2: free ADME/tox filtering tool to assist drug discovery and chemical biology projects. *BMC Bioinformatics*, 9, 396.
- LAX, I., JOHNSON, A., HOWK, R., SAP, J., BELLOT, F., WINKLER, M., ULLRICH, A., VENNSTROM, B., SCHLESSINGER, J. & GIVOL, D. 1988. Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differe 50

- ntial binding of EGF and transforming growth factor alpha. *Mol Cell Biol*, 8, 1970-8.
- LEUNG, C. - H., CHAN, D. S. - H., MA, V. P. - Y. & MA, D. - L. 2013. DNA-Binding Small Molecules as Inhibitors of Transcription Factors. *Medicinal Research Reviews*, 33, 823-846.
- LIU, L. J., LEUNG, K. H., CHAN, D. S., WANG, Y. T., MA, D. L. & LEUNG, C. H. 2014. Identification of a natural product-like STAT3 dimerization inhibitor by structure-based virtual screening. *Cell Death Dis*, 5, e1293. 10
- LOPEZ-BIGAS, N., BLENCOWE, B. J. & OUZOUNIS, C. A. 2006. Highly consistent patterns for inherited Human diseases at the molecular level. *Bioinformatics*, 22, 269-77.
- MAPP, A. K., PRICER, R. & STURLIS, S. 2015. Targeting transcription is no longer a quixotic quest. *Nat Chem Biol*, 11, 891-894.
- MCMILLIAN, M. K., LI, L., PARKER, J. B., PATEL, L., ZHONG, Z., GUNNETT, J. W., POWERS, W. J. & JOHNSON, M. D. 2002. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for Hepatic cells. *Cell Biol Toxicol*, 18, 157-73. 20
- MIAN, I. S., BRADWELL, A. R. & OLSON, A. J. 1991. Structure, function and properties of antibody binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 217, 133-151.
- MITTAL, D., YOUNG, A., STANNARD, K., YONG, M., TENG, M. W., ALLARD, B., STAGG, J. & SMYTH, M. J. 2014. Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. *Cancer Res*, 74, 3652-8. 30
- MIYOSHI, K., TAKAISHI, M., NAKAJIMA, K., IKEDA, M., KANDA, T., TARUTANI, M., IIYAMA, T., ASAO, N., DIGIOVANNI, J. & SANO, S. 2011. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol*, 131, 108-17.
- MUREEV, S., KOVTUN, O., NGUYEN, U. T. & ALEXANDROV, K. 2009. Species-independent translational leaders facilitate cell-free expression. *Nat Biotechnol*, 27, 747-52. 40
- NARASIMHAN, K., MICOINE, K., LACOTE, E., THORIMBERT, S., CHEUNG, E., HASENKNOPF, B. & JAUCH, R. 2014. Exploring the utility of organo-polyoxometalateHybrids to inhibit SOX transcription factors. *Cell Regen(Lond)*, 3, 10.
- NARASIMHAN, K., PILLAY, S., BIN AHMAD, N. R., BIKADI, Z., HAZAI, E., YAN, L., KOLATKAR, P. R., P 50

- ERVUSHIN, K. & JAUCH, R. 2011. Identification of a polyoxometalate inhibitor of the DNA binding activity of Sox2. *ACS Chem Biol*, 6, 573 - 81.
- NG, C. K., LI, N. X., CHEE, S., PRABHAKAR, S., KOLATKAR, P. R. & JAUCH, R. 2012. Deciphering the Sox-Oct partner code by quantitative cooperativity measurements. *Nucleic Acids Res*, 40, 4933 - 41.
- NIWA, H., OGAWA, K., SHIMOSATO, D. & ADACHI, K. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460, 118 - 122. 10
- PENNISI, D., GARDNER, J., CHAMBERS, D., HOSKING, B., PETERS, J., MUSCAT, G., ABBOTT, C. & KOOPMAN, P. 2000. Mutations in Sox18 underlie cardiovascular and Hair follicle defects in ragged mice. *Nat Genet*, 24, 434 - 7.
- PERISSI, V. & ROSENFELD, M. G. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 542 - 54. 20
- PILLINGER, M. H., CAPODICICI, C., ROSENTHAL, P., KHETERPAL, N., HANFT, S., PHILIPS, M. R. & WEISSMANN, G. 1998. Modes of action of aspirin-like drugs: Salicylates inhibit Erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 14540 - 14545.
- PROKOP, J. W., LEEPER, T. C., DUAN, Z. H. & MILSTED, A. 2012. Amino acid function and docking site prediction through combining disease variants, structure alignments, sequence alignments, and molecular dynamics: a study of the HMG domain. *BMC Bioinformatics*, 13 Suppl 2, S3. 30
- REICHMANN, D., RAHAT, O., ALBECK, S., MEGED, R., DYM, O. & SCHREIBER, G. 2005. The modular architecture of protein-protein binding interfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 57 - 62. 40
- SACILOTTO, N., MONTEIRO, R., FRITZSCHE, M., BECKER, P. W., SANCHEZ-DEL-CAMPO, L., LIU, K., PINHEIRO, P., RATNAYAKA, I., DAVIES, B., GODING, C. R., et al. 2013. Analysis of Dll4 regulation reveals a combinatorial role for Sox and Notch in arterial development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 11893 - 8.
- SARKAR, A. & HOCHEDLINGER, K. 2013. The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate. 50

- Cell Stem Cell, 12, 15 - 30 .
- SENISTERRA, G. , CHAU, I. & VEDADI, M. 2012 . The thermal denaturation assays in chemical biology . Assay Drug Dev Technol, 10, 128 - 36 .
- SENISTERRA, G. A. & FINERTY, P. J. , JR. 2009 . High throughput methods of assessing protein stability and aggregation . Mol Biosyst, 5, 217 - 23 .
- SENISTERRA, G. A. , MARKIN, E. , YAMAZAKI, K. , HUI, R. , VEDADI, M. & AWREY, D. E. 2006 . Screening for ligands using a generic and High - throughput light - scattering - based assay . J Biomol Screen, 11, 940 - 8 . 10
- SENISTERRA, G. A. , SOOHONG, B. , PARK, H. W. & VEDADI, M. 2008 . Application of High - throughput isothermal denaturation to assess protein stability and screen for ligands . J Biomol Screen, 13, 337 - 42 .
- SHRAKE, A. & ROSS, P. D. 1990 . Ligand - induced biphasic protein denaturation . J Biol Chem, 265, 5055 - 9 . 20
- SHRAKE, A. & ROSS, P. D. 1992 . Origins and consequences of ligand - induced multiphasic thermal protein denaturation . Biopolymers, 32, 925 - 40 .
- SIERECKI, E. , GILES, N. , POLINKOVSKY, M. , MOUSTAQIL, M. , ALEXANDROV, K. & GAMBIN, Y. 2013 . A cell - free approach to accelerate the study of protein - protein interactions in vitro . Interface Focus, 3, 20130018 . 30
- SIERECKI, E. , STEVERS, L. M. , GILES, N. , POLINKOVSKY, M. E. , MOUSTAQIL, M. , MUREEV, S. , JOHNSTON, W. A. , DAHMER - HEATH, M. , SKALAMERA, D. , GONDA, T. J. , et al. 2014 . Rapid mapping of interactions between Human SNX - BAR proteins measured in vitro by AlphaScreen and single - molecule spectroscopy . Mol Cell Proteomics, 13, 2233 - 45 .
- VAQUERIZAS, J. M. , KUMMERFELD, S. K. , TEICHMAN, S. A. & LUSCOMBE, N. M. 2009 . A census of Human transcription factors : function, expression and evolution . Nat Rev Genet, 10, 252 - 63 . 40
- VASSILEV, L. T. , VU, B. T. , GRAVES, B. , CARVAJAL, D. , PODLASKI, F. , FILIPOVIC, Z. , KONG, N. , KAMMLOTT, U. , LUKACS, C. , KLEIN, C. , et al. 2004 . In vivo activation of the p53 pathway by small - molecule antagonists of MDM2 . Science, 303, 844 - 8 .
- VOGLER, M. , DINSDALE, D. , DYER, M. J. & COHEN, G. M. 2009 . Bcl - 2 inhibitors : small molecules 50

with a big impact on cancer therapy. Cell Death Differ, 16, 360 - 7.

WRIGHT, P. E. & DYSON, H. J. 2015. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. Nat Rev Mol Cell Biol, 16, 18 - 29.

ZHANG, J. H., CHUNG, T. D. & OLDENBURG, K. R. 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. J Biomol Screen, 4, 67 - 73.

10

DRAGO, R. L. C. A. R., Thermodynamic Data for the Formation of Molecular Complexes between Phenyl Substituted Amides and Iodine. J. Am. Chem. Soc, 1963. 85 (5): p. 505 - 508

S. O. DE SILVA, J. N. R., R. J. BILLEDEAU, X. WANG, D. J. NORRIS, AND V. SNIIECKUS, Directed ortho metalation of n, n - diethyl benzamides. methodology and regiospecific synthesis of useful contiguously tri - and tetra - substituted oxygenated aromatics, phthalides and phthalic anhydrides. Tetrahedro, 1992. 48 (23): p. 4863 - 4878.

20

ZIMMERMANN, T. J., et al., Discovery of a potent and selective inhibitor for Human carbonyl reductase 1 from propionate scanning applied to the macrolide zearalenone. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. 17 (2): p. 530 - 536.

JO, G., et al., Complete NMR data of methoxylated cis - and trans - stilbenes as well as 1, 2 - diphenylethanes. Magnetic Resonance in Chemistry, 2011. 49 (6): p. 374 - 377.

30

TAUB, D., GIROTRA, N. N., HOFFSOMMER, R. D., KUO, C. H., SLATES, H. L., WEBER, S., L. WENDLER, Total synthesis of the macrolide, zearalenone. Tetrahedron, 1968. 24: p. 2443 - 2461.

SUBHASH P. KHANAPURE, R. T. R., AND EDWARD R. BIEHL, The preparation of anthraquinones and anthracyclinones via the reaction of haloarenes and cyanophthalides under aryne - forming Conditions. J. Org. Chem., 1987. 52: p. 5685 - 5690.

40

MAL, D., et al., DBU - CH₃I, a Potential Substitute for CH₂N₂ in the preparation of methyl esters and methyl aryl ethers: Studies with assorted acids. Synthetic Communications, 2008. 38 (22): p. 3937 - 3946.

【0179】

实施例2

50

転写因子SOX18の薬理学的標的化は、マウスにおける乳癌を遅延させる材料および方法実験再現性

この研究における全てのデータおよび統計分析は、別に示さない限り、少なくとも3つの独立した実験から生成した。

バックグラウンドノイズを低減し、技術的例外を検出するために、各実験に技術的反復が含まれていた。

異なる実験条件のサンプルは、無作為化の任意の特定の方法には晒されず、そして、グループは非盲検条件下で評価された。

【0180】

細胞フリーの発現のためのプラスミド調製

本明細書で使用した遺伝子にコードされたタグは、増強GFP (GFP)、mCherry (Cherry) およびcMyc (myc) である。

タンパク質を、各々、以下の細胞フリーの発現Gatewayデスティネーションベクター (Gateway destination vectors) にクローニングした：

N 末端GFPタグ化 (pCellFree_G03)、

N 末端Cherry-cMyc (pCellFree_G07) および

C 末端Cherry-cMycタグ化 (pCellFree_G08) (Gagoskiら、2015)。

ヒトSOX7 (BC071947)、SOX17、RBPJ (BC020780) およびMEF2C (BC026341) に対応するオープンリーディングフレーム (ORF) は、以前記載されたように、ヒトORFeomeコレクションバージョン1.1および5.1またはヒトOrfeome collaboration OCAAコレクション (Open Biosystems) から調達され、ARVEC施設である、UQ Diamantina Instituteにてクローニングされた。

エントリークローンpDONOR223またはpENTR201ベクターを、LR組換えにより、発現プラスミド内のccdB遺伝子と交換した (Life Technologies、オーストラリア)。

完全長ヒトSOX18遺伝子を合成し (IDT)、そして、ベクターへの移動は、Gateway PCRクローニングを使用して実現した。

【0181】

細胞フリーのタンパク質発現

翻訳コンピテントのリーシュマニア・タレントラエ (Leishmania tarentolae) 抽出物 (translation competent Leishmania tarentolae extract) (LTE) を、以前記載されたように調製した (Mureevら、2009、Kovtunら、2011)。

30 nMのGFP鑄型プラスミドおよび60 nMのCherry鑄型プラスミドをLTEに加え、そして、27℃で3時間インキュベートすることによりタンパク質対を共発現させた。

【0182】

ALPHA-Screenアッセイ

ALPHA-Screenアッセイを、cMyc検出キットおよびProxiplate-384 Plusプレート (PerkinElmer) を使用して、以前記載されたように行った (Sierreckiら、2014)。

段階希釈の各サンプルを測定した。

関心対象のタンパク質を共発現しているLTE溶解物を、緩衝液A (25 mM HEPES、50 mMのNaCl) 中で希釈した。

アッセイのために、緩衝液B (25 mMのHEPES、50 mMのNaCl、0.001%のNP40、0.001%のカゼイン) 中の12.5 μL (0.4 μg) の抗cMyc被覆アクセプタービーズを各ウェル内に等分した。

10

20

30

40

50

次いで、2 μ L の希釈サンプルおよび緩衝液 A 中の 2 μ L のビオチン標識 GFP - Nano trap を加えた。

プレートを、室温で、45 分間、インキュベートした。

その後、緩衝液 A 中で希釈した、2 μ L (0.4 μ g) のストレプトアビジン被覆ドナービーズを加え、その後、暗所内で、室温で、45 分間、インキュベートした。

Envision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) 上で、製造業者の推奨設定を用いて (励起: 680 / 30 nm で、0.18 秒間、発光: 37 ms 後に、570 / 100 nm)、ALPHA-Screen シグナルを得た。

得られた鐘形曲線は、正の相互作用を示す一方、平坦な線は、タンパク質間の相互作用の欠如を反映する。

各タンパク質対 (protein pair) の測定は、別個のプレートを使用して、最低 3 回繰り返した。

結合指数を次のように計算した:

$$BI = [(I - I_{neg}) / (I_{ref} - I_{neg})] \times 100$$

【0183】

各実験に関して、I は、最大シグナルレベル (フック効果曲線の頂部) であり、そして、I_{neg} は最小 (バックグラウンド) シグナルレベルである。

シグナルを、SOX18 とそれ自体との相互作用に関して得られた I_{ref} シグナルに対して正規化した。

【0184】

PPI の邪魔アッセイ (PPI disruption assay,) に関しては、LTE 中で発現したタンパク質対を、100 μ M の Sm4 または DMSO 単独 (0.7% の DMSO 最終) と共に 1 時間インキュベートした。

また、100 μ M の Sm4 または DMSO を緩衝液 B に加えた。

PPI の邪魔 (disruption) を次のように計算した:

$$(1 - I_{Sm4} / I_{DMSO}) \times 100。$$

【0185】

IC₅₀ 決定のために、アッセイは同一であったが、Sm4 の希釈範囲を用いた (0.3 ~ 300 μ M)。

相互作用の百分率は、次のように計算した:

$$I_{Sm4} / I_{DMSO} \times 100。$$

少なくとも 3 回の独立した実験のデータを、GraphPad Prism (RRID: SCR_007370) バージョン 6.0 において、3 - パラメーター非線形回帰を用いて適合させた。

【0186】

細胞培養およびトランスフェクション

COS-7 細胞を、ATCC から購入し (CRL-1651、RRID: CVCL_0224)、FBS、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、非必須アミノ酸および HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) を添加した、DMEM (Life technologies、11995) 中で、37、5% CO₂ で培養した。

COS-7 細胞を、4 ~ 6 時間トランスフェクトし、そして、溶解およびルシフェラーゼアッセイ (Perkin Elmer、6016711) の前に、更に 24 時間インキュベートした。

ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) を Lonza オーストラリアから購入した (CC-2519A)。

ChIP-MS、ChIP-seq および RNA-seq 分析のために、HUVEC を、7 時間トランスフェクションし、そして、更に 14 時間インキュベートした。

小分子処理中、低血清 (0.4% FBS) を含む培地中で細胞を増殖させた。

10

20

30

40

50

HUVECを、EGM-2プレートキット説明書(Lonza、CC-3162)にしたがって、補充したEGM-2培地中で、37℃、5% CO₂で培養した。

細胞を、35mm皿内で、80~90%コンフルエンスまで増殖させ、そして、X-treme gene 9 DNAトランスフェクション試薬(Roche、06365787001)を使用して、製造業者の説明書にしたがって、プラスミド、マウスpSG5 Sox18、プラスミド、pSG5 cMyc-Sox18、またはプラスミド、cMycで、トランスフェクトした。

全ての細胞株(cell lines)は、マイコプラズマ汚染に関して陰性であった。

【0187】

クロマチン免疫沈降

ChIP実験を、以前記載されたように行った(Schmidtら、2009)。

cMyc-タグ化SOX18を過剰発現しているHUVECに関して、抗cMyc(Cell Signaling、#2276、RRID:AB_2314825)を使用して免疫沈降を行った。

【0188】

ChIP-seqおよび分析

IP後、TruSeq ChIPseqキット(Illumina、IP-202-1012)を使用して、50μLの1×NEBNext High-Fidelity PCR Master Mix(New England Biolabs、M0541)中の、選択のインデックス配列を含む0.5μMの汎用リバースPCRプライマーおよびフォワードPCRプライマーを用いて、DNA増幅を行った。

PCRサイクルの数は、ChIP効率に応じて、13~18の範囲であった。

AMPureビーズ(1.8容積)を使用して、PCR産物を精製し、そして、20μLの再懸濁緩衝液(Tris酢酸10mM、pH8)中に溶出した。

ライブラリーを、Illumina配列決定プラットフォーム(KAPA Biosystems、KK4824)のための、KAPAライブラリー定量化キットを使用して定量化し、そして、50bp単一末端読み取りを、HiSeq2500上で製造業者のプロトコルにしたがって、配列決定した。

Illumina fastqファイルを、bowtieを使用して、GRCh37/UCSC hg19ゲノムアセンブリーにマッピングし、そして、MACSバージョン2.1.0を使用して入力を用いてピークを要求した。

cMycエピトープに起因する偽陽性ピーク要求を避けるために、cMycエピトープのみを有するChIP-seqを、SOX18-cMyc ChIP-seqと並行して行い、これらの実験状態において要求されたピークをSOX18-cMyc条件で要求されたピークに減算した。

Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool(GREAT、RRID:SCR_005807)を使用して、cis調節領域の機能的有意性を分析した。

ChIP-seqデータは、ArrayExpressデータベース(www.ebi.ac.uk/arrayexpress、RRID:SCR_002964)において受入番号E-MTAB-4480(SOX7)およびE-MTAB-4481(SOX18)で入手可能である。

【0189】

ChIP-MS(RIME)

ChIP-MS実験を、以前に記載したように行った(Mohammedら、2013)。

SOX18-cMycおよびネガティブコントロール(cMycのみ)の間で共通するペプチドを捨て、そして、SOX18-cMycトランスフェクト細胞中で独自に検出されたペプチドのみを分析に関して考慮した。

【0190】

10

20

30

40

50

RNA-seqおよび分析

4連のサンプルを全トランスクリプトーム配列決定のために、TruSeq stranded総RNAライブラリーprepキット(Illumina)を使用して処理した。読み取りを、STARアライナー(Dobinら、2013)を使用して、hg19参照ヒトゲノムにマッピングし、そして、独特に整列した読み取りのみを考慮した。

転写産物を、htseq-count(HTseqパッケージ)(Anders、Py1およびHuber、2015)を使用して遺伝子に割り当て、差次的発現を、DESeq2(Love、HuberおよびAnders、2014)を使用して計算した。調整された p 値 < 0.05 を有する遺伝子を有意とみなした。

【0191】

差次的発現された遺伝子を、SOX18過剰発現細胞において、Sm4処理およびDM SOコントロールの間で特定し、そして、上方調節および下方調節(DOWN)遺伝子に分離した。

それらの転写開始部位(TSS)の位置を、ENCODEコンソーシアム(RRID:SCR_006793)と、本発明者らがこの研究にて行ったSOX18およびSOX7 ChIP-seq実験とから、入手可能な転写因子結合事象の位置と相関させた。

TSSが非依存性であることを確認するため、TSSは、1 ChIP-seqピークのものに割り当てることが許された。

2倍以上の絶対倍数変化($\log_2 FC - 1$ または -1)を有する転写産物を、TSS分析の距離に含めた。TSSと結合事象の間の距離の中央値を、一組の無作為に選択された遺伝子の予想距離と比較して、中央比(median ratio)を得た。

遺伝子のコントロールセットを、HUVEC内で発現した遺伝子のプールから、それらが同様の発現レベルの分布を有するように選択した。

SOX18および分析した任意の他の転写因子による、遺伝子の潜在的な共調節によりバイアスが導入されないことを確実にするために、本発明者らは、SOX18ピークを有する遺伝子を、他の転写因子の分析から減算した。

逆分析も行い、c-JUNピークを含む遺伝子を、SOX18の分析から減算した。

RNA-seqデータは、ArrayExpressデータベース(www.ebi.ac.uk/arrayexpress)にて受入番号E-MTAB-4511で入手可能である。

【0192】

定量的RT-PCR

RNeasyミニキット(Qiagen、74106)を使用して、製造業者のプロトコルにしたがって、総RNAを抽出し、オンカラムDNA消化を含んだ。

高性能cDNA逆転写キット(Life Technologies、4368813)を使用して、1 μ gの精製RNAからcDNAを合成した。SYBRグリーン(Life Technologies、4312704)方法を用いて、少なくとも3回の生物学的反復の技術的3連において、標的cDNAの増幅および定量化を行った。

ViiA 7 Real-Time PCRシステムを使用して、反応を384ウェルプレート内で、10 μ Lで行った。

ハウスキーパー遺伝子(tg(D114in3:eGFP)の場合は-アクチン、tg(-6.5kdr1:eGFP)の場合はef1、tg(fli1a:eGFP、-6.5kdr1:mCherry)の場合はchd5、HUVECの場合はRPL13およびGAPDH)を、実験条件のセットを通したそれらの発現の安定性に基づいて選択し、またはそれらの血管発現に基づいて選択して、内皮細胞含有量に対して正規化した。プライマー効率をLinRegPCRを使用して計算し、そして、増幅データをViiA7ソフトウェアおよびQ-gene PCR分析テンプレートを使用して分析した。

【0193】

ゼブラフィッシュ水産養殖および分析

ゼブラフィッシュを、以前記載されたように維持し(Hoganら、2009)、動物

10

20

30

40

50

に關与する全手順は、University of Queensland (IMB / 030 / 16 / NHMRC / ARC / HF) の動物倫理委員会のガイドラインに適合し、または地元の倫理評価により承認され、およびUK Home Office (PPL 30 / 2783およびPPL 30 / 3324) によりライセンス化された。

tg(-6.5kdr1:eGFP)、

tg(fli1a:eGFP、-6.5kdr1:mCherry)および

tg(D114in3:GFP)は、以前に記載された(Sacilotto ら、2013、Duong ら、2014、Lawson およびWeinstein、2002)。

【0194】

デコリオネーション(Dechoriation)は、25 µg/mLまたは5 µg/mLのプロナーゼを用いる処置により、各々2時間または一晩行った。

ゼブラフィッシュ幼生に、0.01%トリカインを用いて麻酔をかけた。

代表的な幼生を、0.5%低融点アガロース中に包埋し、そして、Zeiss LSM 710 共焦点顕微鏡を用いて画像化した。

【0195】

ゼブラフィッシュインサイチューハイブリダイゼーションおよび切片分析

ゼブラフィッシュ(28および48 hpf)のホールマウントインサイチューハイブリダイゼーションを、dab(Song ら、2004)およびエフリンB2a(Durbin ら、1998)に関するプローブ鑄型を用いて、以前記載されたように行った(Thissse およびThissse、2008)。

70%グリセロールの添加前にYolk sac を除去した。

横行切片の場合、4%アガロース中に包埋された幼生全体を、Leica VT1000 S 振動ミクロトームを使用して、150 µmで切片を作製した。

画像化は、Olympus BX-51 明視野顕微鏡(ISH)、およびZeiss LSM 510 共焦点顕微鏡上で行った。

蛍光画像のために、幼生を包埋前にDAPI 染色した。

【0196】

小分子処理およびモルホリノ注射

推定小分子阻害剤、および対応するコントロール条件を用いた全ての処理は、信頼できる均質な溶液を得るために低濃度のDMSO(1% v/v)の存在下で行い、そして、10 mM DMSO ストックから調製した。

細胞培養のために、トランスフェクション後に小分子を新鮮な培地に直接加え、そして、細胞回収の時点まで、この培地中で細胞を増殖させた。

ゼブラフィッシュが關与するインビボ実験のために、培地を置き換えることにより、指定した時点にて、化合物処理を開始し、培地+化合物は、実験の期間中、毎日リフレッシュした。

必要な場合、PTU 処理(0.003%)を、小分子と並行して行って、色素形成を遮断した。

以前公表され、検証された、sox7、sox18(Herperts ら、2008)およびrbpj(Sacilotto ら、2013)に対するモルホリノオリゴマーを、tg(6.5kdr1:eGFP)およびtg(fli1a:eGFP、-6.5kdr1:mCherry)を用いて行った実験では、5 ngで、tg(D114in3:eGFP)を用いて行った実験では、0.125~0.15 pmolの準最適濃度で、単一細胞ゼブラフィッシュ接合体にマイクロ注入した。

【0197】

マウスおよびマウスモデル

BALB/c 野生型(WT)をWalter and Eliza Hall Institute for Medical Researchから購入し、そして、6~10 週齢の間に使用した。

マウス4T1.2 乳癌細胞を、5%のCO₂ インキュベーター内で、10%のFBSを

10

20

30

40

50

有する完全RPMI中で培養した。

5×10^4 の4T1.2腫瘍細胞を、前述されているようにBALB/c WTマウスの第4の乳房脂肪体中に接種した(Mittalら、2014)。

手短には、腫瘍移植から3日後、マウスに25 mg/kg体重のSm4、アスピリンまたはビヒクルPBSを、毎日、10日間、経口経管栄養した。

デジタルノギスを用いて、腫瘍サイズを2つの垂直直径の積として測定した。

7および12日目にマウスから血漿を収集し、そして、4000 Qtrap LC-MS/MSシステム質量分析計を使用してSm4濃度を分析した。

12日目に、マウスに麻酔をかけて一次腫瘍を外科的に取り除き、または一次腫瘍を切除せずにマウスに手術手順を施し、創傷を外科用クリップで閉鎖した。腫瘍を組織学的検査のためにホルマリン中に収集した。

28日目に肺を回収し、そして、ブアン固定液中で24時間固定し、そして、転移性腫瘍小結節を開顕微鏡下で計数した。

肺を回収しない実験においてマウスの生存率を監視した。

実験当たり6~14匹のマウスのグループを実験腫瘍アッセイに使用して、生物学的差異の検出の十分な能力を確実にした。

全ての実験は、QIMR Berghofer Medical Research Institute Animal Ethics Committee (P1505)により承認された。

【0198】

腫瘍中の脈管構造の定量化のために、固定組織を4%アガロース中に包埋し、Leica VT1000 S振動ミクロトーム上で、300 μmで、全体の薄片を作製した。

切片をスライドガラス上に収集し、そして、灌流血管の浸透の明視野分析のために画像化した。

続いて、抗マウスエンドムチン(cat# sc-53941、RRID: AB_2100038)、ERG(cat# ab92513、RRID: AB_2630401)、PROX1(AngioBio cat# 11-002、RRID: AB_10013720)およびポドプラニン(AngioBio cat# 11-033、AB_2631191)抗体を使用して、切片に関する免疫蛍光染色を行った。

Zeiss LSM 710共焦点顕微鏡上の10×対物レンズを使用して、z軸に沿って一連の画像を獲得することによって腫瘍切片全体を画像化した。

続いて、20×対物レンズを使用して、各腫瘍から3~4つの別個の領域に関する高解像度画像を撮影して、腫瘍内の血管密度の不均一性を説明し、バイアスを最小限とした。

同一寸法(1274.87 μm × 1274.87 μm × 89.05 μm)の未加工画像ファイルを、Imaris(Bitplane、RRID: SCR_007370)にロードし、そして、「spots」関数を使用して、ERGまたはPROX1陽性核および「表面」を計数して、エンドムチンまたはポドプラニン陽性血管の体積または面積を計算した。

各腫瘍に関して(n=6)、多数の領域からの数を平均し、データをGraphpad Prism 6にてプロットした。

【0199】

BALB/c野生型(WT)をWalter and Eliza Hall Institute for Medical Researchから購入し、6~10週齢で使用した。

マウス4T1.2乳癌細胞を、10% FBSを有する、完全RPMI中で、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

5×10^4 の4T1.2腫瘍細胞を、以前記載されたように、BALB/c WTマウスの第4の乳腺脂肪体内に接種した(Mittalら、2014)。

手短には、腫瘍移植後の3日目に、マウスに、5 mg/kg ~ 50 mg/kg体重の範囲の異なる用量のSm4、またはビヒクルPBSを毎日、10日間、経口経管栄養した。

腫瘍サイズを、デジタルノギスを用いて、2つの垂直直径の積として測定した。

12日目、マウスに麻酔をかけて、一次腫瘍を外科的に取り除き、そして、創傷を外科用クリップで閉鎖した。

腫瘍を、組織学的検査のためにホルマリン中に収集した。

マウスの生存を、実験当たり6～12匹のマウスのグループにて監視して、生物学的差異の検出の十分な能力を確実にした。

全ての実験は、QIMR Berghofer Medical Research Institute Animal Ethics Committee (P1505)により承認された。

【0200】

10

結果および考察

SOXタンパク質は、特異的相互作用パートナーを採用することにより、個々の標的遺伝子を活性化するが(SarkarおよびHochedlinger、2013)、SOXFグループ(SOX18-MEF2CおよびSOX17-OCT4)に関する2つのみのタンパク質-タンパク質相互作用が今日まで特定されている(Hoskingら、2001、Jauchら、2011)。

本発明者らは、最初に、不偏プロテオミクス技術の組み合わせを使用して、SOX18インタラクトーム(SOX18相互作用パートナーのネットワーク)をマッピングした。

質量分析と結合したクロマチン免疫沈降(ChIP-MS)は、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)内のクロマチン結合SOX18に関連したタンパク質の初回通過スクリーニングを提供し(Mohammedら、2013)、次いで、ALPHA-Screenは、インビトロで翻訳された完全長タンパク質を使用して、SOX18依存性複合体をペアワイズ相互作用に転換した(図9A)(Mureevら、2009、Kovtunら、2011、Siereckiら、2013、Siereckiら、2014、Gambinら、2014)。

20

ChIP-MS分析は、SOX18に直接または間接的に関連した分子機能の多様な遺伝子オントロジー(GO)クラスを表す、289タンパク質を明らかにした(図9Bおよび10A～C)。

直接相互作用物質を特定する本発明者らの機会を増大させるために、本発明者らは、核酸および/またはタンパク質結合であることが既知のタンパク質に焦点を当てた(図9B、紫色)。

30

このサブセットから、本発明者らは、8つの既知の転写因子、ヘリカーゼ、コリプレッサー、RNA結合およびDNA修復分子を選択した(図10A、B)。

本発明者らは、ALPHA-Screenを使用して、SOX18がそれ自体と相互作用し、そしてまた、DDX1、DDX17、ILF3、STAT1、TRIM28およびXRCC5ともペアワイズ(pairwise)相互作用を形成することを観察した(図9C、左列「+」、および図10D)。

【0201】

加えて、本発明者らは、内皮細胞機能(ESR1、NR2F2、RBPJ、SOX7、SOX17およびCTNNB1)を調節できる、6つの周知のTFの潜在的なペアワイズ相互作用(pairwise interactions)を研究し、そして、SOX18タンパク質パートナーMEF2Cのみを特定した(Hoskingら、2001)。

40

よく特徴付けられたSOX9ホモ二量体(Bernardら、2003)をポジティブコントロールとして含めてALPHA-Screenシグナルを検証した(図10D)。

SOX18は、試験した全ての内皮転写因子と相互作用することが見出され、任意の閾値を下回る結合親和性を示すSOX17およびCTNNB1は除外される可能性があった(図9C、「-」)。

【0202】

SOX18と相互作用できる多種のタンパク質を特定し、次いで本発明者らは、これらの相互作用に対する小分子化合物、Sm4(図10E)の活性試験に進んだ。

50

褐藻カウロシスティス・セファロルニトス (*Caulocystis cephalorhithos*) に見出される天然産物に由来する Sm4 を、ハイスループットスクリーニングにて、潜在的な SOX18 遮断剤に関して特定した (実施例 1 参照)。

本発明者らは、Sm4 が、検証された 12 の SOX18 相互作用のうち 6 を有意に邪魔 (disrupt) することを見出し (図 9C、右列)、IC₅₀ 値は、SOX18 - SOX18 の 3.3 μM から、SOX18 - RBPJ 二量体の 65.9 μM の範囲であった (図 9D および 10F)。

異なる SOXF メンバーに対する Sm4 の差分効果 (differential effect) を評価するために、本発明者らは、3 つの全 SOXF タンパク質と、MEF2C、RBPJ および OCT4 との間の、PPI の更なるセットを探索した (図 11)。

SOX18 と同様に、SOX7 は、その両方の相互作用が Sm4 により、少なくとも部分的に邪魔 (disrupt) される、RBPJ および SOX18 自体と相互作用することができる。

本発明者らは、更に、3 つの全 SOXF タンパク質が、OCT4 とヘテロ二量体を形成できるが、SOX17 - OCT4 相互作用のみが Sm4 の影響を受けることを見出した。

重要なことに、SOX7 および SOX17 のいずれも、ホモ二量体を形成する能力を有さず、そして、したがって、Sm4 作用モードのこの構成成分は、SOX18 - SOX18 相互作用に非常に特異的である。

更にこれを実証するように、SOX9 ホモ二量体化は、200 μM まで Sm4 により影響を受けなかった (Unperturbed) (図 9C、D および 10D)。

これらの結果は、Sm4 の選択性が、SOX18 関連 PPI のサブセットに傾くが、SOX7 または SOX17 タンパク質パートナー採用を妨害する能力を有することを示す。

Sm4 のこの特徴は、SOXF リダンダンシー機構の阻止に利点を有する可能性がある (Hosking ら、2009、Kim ら、2016)。

【0203】

SOX18 PPI 邪魔 (disruption) がどのように転写調節不全に移行するかを評価するために、本発明者らは次に、HUVEC におけるゲノムワイド RNA-seq および ChIP-seq 分析の組み合わせを行った。

SOX18 ChIP-seq ピークから特定された、最も一般的な結合モチーフは、以前報告された SOX モチーフ 5' - AACAAAT - 3' に対応し (図 13A)、そして、この ChIP-seq データセットの有効性を、更に GO term 分析と、Prox1 および Vcam1 等の既知の SOX18 標的遺伝子の特定とにより確認した (図 13B) (Francois ら、2008、Hosking ら、2004)。

本発明者らは、SOX18 過剰発現細胞における Sm4 処理と DMSO コントロールとの全体的な転写効果を比較し (図 13C ~ E)、この差次的発現遺伝子のリストを SOX18 ChIP-seq データセットに重ね合わせた。

この重ね合わせを使用して、本発明者らは、遺伝子の転写開始部位 (TSS) と TF 結合事象との間の距離を、直接転写調節の可能性の代理として計算した。

この距離がどのように Sm4 により変更されるかの分析を可能にするために、本発明者らはランダム遺伝子セットの TSS と SOX18 結合事象との間の参照距離を確立した (図 12A)。

並行して、本発明者らは、SOX7 (インハウスで生成した)、および ENCODE コンソーシアムから入手可能な 7 つの全転写レギュレーター (GATA2、c-FOS、c-JUN、CTCF、EZH2、MAX、c-MYC) に関して同じ分析を行った。

それにより、本発明者らは、SOX18 を標的とする転写と、他の内皮特異的転写因子に関する潜在的なオフターゲット効果とを区別することができた。

【0204】

累積的な SOX18 ピークから TSS への距離は、全体的に、SOX18 ピークは、無作為に分布する TSS より、Sm4 下方調節遺伝子の TSS に、3.6 倍近い (p 値 < 0.001) ことを示した (図 12B、左上)。

10

20

30

40

50

これらの結果は、S m 4 が影響を与えた遺伝子が、S O X 1 8 転写活性に対する特異的効果により調節不全にされることの間接的な指示である。

この相関は、試験した他の転写因子の7つでは観察されず（図12Bおよび13F）、S m 4 がこれらのT F 活性にオフターゲット効果を有さないことを示している。

興味深いことに、S m 4 下方調節遺伝子のT S S は、c - J U N 結合事象に、2 . 0 5 倍近かった（p 値 = 0 . 0 1 1、添付ファイル1c）。軽度にもみ有意であるが、このことは、S m 4 下方調節遺伝子のこのサブセットに対するS O X 1 8 およびc - J U N による可能な共調節を示唆し得る。

実際に、S O X 1 8 C h I P - s e q ピークにおける既知のモチーフの分析により、c - J U N 結合モチーフの過剰提示が明らかとなり（S O X 1 8 ピークの3 . 2 3 %、p 値 = 1 e - 3 0 2）、そして、A L P H A - S c r e e n 分析は更に、S O X 1 8 およびc - J U N が物理的に相互作用し得ることを確立した（図14）。

本発明者らは、試験した他のT F の発現レベルが、S m 4 処理により変更されないことを見出した。

S m 4 の存在下で、これらの転写因子に関する転写産物レベルのオフターゲット調節により、バイアスが導入されないことを示しているため、これは重要な観察事項である。

【0205】

S O X T F ファミリーメンバーに対する、S m 4 の潜在的な転写オフターゲット効果の争点に対処するために、本発明者らは、密接に関係したS O X F およびS O X E タンパク質に焦点を当てた。

S m 4 は、細胞ベースのレポーターアッセイにおいて、任意の試験濃度（50 μM）で、S O X 1 7 またはS O X 9 タンパク質のいずれの転写活性にも影響を与えなかった（図15）（Robinsonら、2014、Lefebvreら、1997）。

まとめると、これらの結果は、他の重要な内皮転写因子およびS O X タンパク質と比較して、S O X 1 8 介在転写を選択的に標的とすることの強力な証拠を提供する。

【0206】

S m 4 が、インビボで、S o x 1 8 転写活性を攪乱できるか否かを研究するために、本発明者らは、S o x 7 およびS o x 1 8 の組み合わせ活性に関する読み取りとして以前に検証されている、t g (- 6 . 5 k d r l : e G F P) 遺伝子導入ゼブラフィッシュレポーターラインを使用した（Duongら、2014）。

本発明者らは、これらの幼生を受精後（h p f）の20時間において処理し、S m 4 処置は、モルホリノオリゴヌクレオチド（MO）を使用した、組み合わせs o x 7 / 1 8 枯渇の効果と同様に、S O X 1 8 依存性e g f p 転写産物レベルを有意に低下させる（61%）ことを観察した（図16A、B）。

重要なことには、これらのゼブラフィッシュ胚は正常に発達し、そして、本発明者は毒性の証拠を見出さなかった。

【0207】

次いで、本発明者らは、d l l 4 遺伝子のイントロン3に位置する調節エレメントを持つ、第2の遺伝子導入ゼブラフィッシュレポーターラインt g (D l l 4 i n 3 : e G F P) を使用した。

このD l l 4 i n 3 エンハンサーの活性は、内因性d l l 4 発現を完全に再現するものではないが（Wytheら、2013、Sacilottoら、2013）（Wytheら、2013およびSacilottoら、2013）、S o x 7、S o x 1 8 およびN o t c h エフェクターR b p j の組み合わせ活性を研究する有用なツールを提供する。

s o x 7、s o x 1 8 およびr b p j との組み合わせ遺伝的干渉は、D l l 4 i n 3 活性化を消失させることが示されているが、単一または二重MOノックダウンは、遥かに軽度の効果を有する（Sacilottoら、2013）。

この軽度の抑圧効果は、S m 4 単独を用いた処理により再現された（図16C、D）。

加えて、準最適用量のr b p j MO注射を、S m 4 処理と組み合わせた場合、抑圧効果は有意に11 . 5 % 増大した（図16C、D）。これらのデータは、S m 4 が、D l l

10

20

30

40

50

4 i n 3 エンハンサーの S o x 7 / 1 8 および R b p j 協調活性化を妨害することを示す。インビボでのネガティブコントロールとして、本発明者らは、S o x 9 依存性 t g (c o l 2 a 1 : y f p) レポーターラインを使用し、そして、受精後の 2 ~ 6 日の間の連続 S m 4 処理は、S o x 9 の転写活性、または軟骨形成のプロセスを攪乱しないことを観察した (図 1 7)。

まとめると、これは、インビボでの選択的 S O X 1 8 阻害剤としての S m 4 に関する提案された作用機構を支持する。

【 0 2 0 8 】

更にインビボでの S o x 1 8 機能の小分子阻害を示すために、本発明者らは、次に S m 4 処置が、s o x 7 / s o x 1 8 遺伝的邪魔された (d i s r u p t e d) ゼブラフィッシュのものと同様の血管表現型を生じることができるか否かを研究した (H e r m k e n s ら、2 0 1 5)。この表現型は、動静脈特定化欠陥により特徴付けられ、動脈マーカーの発現レベルが低下している (C e r m e n a t i ら、2 0 0 8、H e r p e r s ら、2 0 0 8、P e n d e v i l l e ら、2 0 0 8)。

本発明者らは、関連発達時間中に、1 6 h p f から開始して、動脈 / 静脈レポーター t g (f l i 1 a : e G F P、- 6 . 5 k d r l : m C h e r r y) を持つゼブラフィッシュ幼生を 1 . 5 μ M S m 4 で処理した (図 1 8 A)。

これらの幼生は、背側大動脈 (D A) を犠牲にして、拡大した後主静脈 (P C V) を獲得し (図 1 6 E ~ G および 1 8 B)、動静脈シャントおよび不完全な体幹循環を有した (図 1 8 C、D)。2 4 および 4 8 h p f における血管マーカーの q R T - P C R 分析により、D M S O と比較して、S m 4 処理条件下での動脈および静脈遺伝子、特に e f n b 2 a、h e y 1 および e f n b 4 a の有意な調節不全が明らかとなった (図 1 6 H および 1 8 E)。

【 0 2 0 9 】

動静脈特定化における S o x F リダンダンシーに起因して、A / V 形成異常表現型は、一般に、S o x 7 および S o x 1 8 機能の二重喪失においてのみ観察される。S m 4 はインビトロで S o x 7 - R b p j および S o x 7 - S o x 1 8 P P I を部分的に妨害するように思われるため、本発明者らは、S o x 7 特異的表現型に注目して、この T F 活性がインビボで S m 4 により阻害されるか否かを評価した。s o x 7 遺伝的邪魔 (d i s r u p t i o n) の特徴は、背外側動脈により形成された頭部内の短い循環ループであり (M o h a m m e d ら、2 0 1 3)、顔面循環に攪乱をもたらす (H e r m k e n s ら、2 0 1 5)。

S m 4 の存在下で、本発明者らは、部分的 S o x 7 機能喪失表現型の L D A レミニセント (r e m i n i s c e n t) に対する少々の形成異常を観察した。

しかしながら、頭部内の血液循環は、S m 4 処理幼生では影響がなく、短い循環ループは完全には形成されていないことを示す。この表現型は、S o x 7 活性が小化合物の存在下でのみ部分的に影響を受けるという結論を支持する。

概して、これらの結果は、インビトロで観察されたゲノムワイド阻害効果と一致し、S m 4 がインビボで S o x 1 8 の転写活性および S o x F 仲介血管形成を選択的に妨害することを示す。

【 0 2 1 0 】

治療関連の設定における S m 4 の抗血管新生の可能性の最終的な証明として、本発明者らは次に、乳癌の前臨床モデルにおけるその有効性を評価した。

B A L B / c マウスの乳腺脂肪体内に、高転移性の 4 T 1 . 2 乳癌細胞を接種し、そして、3 日間腫瘍を生着させ、その後、2 5 m g / k g / 日の S m 4、アスピリンまたはビヒクル P B S のいずれかをを用いた処置を開始した (図 1 9 A)。

アスピリンは、S m 4 との構造的類似性によって、ネガティブコントロールとして選択された。

毎日の処置を 1 0 日間の間維持し、その後、一次腫瘍を切除し、疾病反応時間 (l a t e n c y) に対する効果を監視した (図 1 9 A)。

10

20

30

40

50

標的関与の間接的な指標として、本発明者らは、最初に、インサイチューハイブリダイゼーションにより、4 T 1 . 2 腫瘍脈管構造内の S o x 1 8 の発現を確認した（図 1 9 B）。

本発明者らは、次に、処置の過程中的 S m 4 バイオアベイラビリティの測定に進んだ。

2 つの異なる時点で、血漿中の S m 4 を一貫して検出し、平均濃度は経時的に 3 8 . 3 $\mu\text{g} / \text{mL}$ から 5 5 . 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ へ増大した（図 1 9 C）。

【 0 2 1 1 】

P B S ビヒクル - またはアスピリン処置マウスは、4 T 1 . 2 腫瘍負荷に屈し、中央反応時間は各々 3 3 および 3 4 日であった（図 1 9 D）。

一方、S m 4 処置マウスは、全体的な生存が有意に増大し、中央反応時間は 4 4 日であった（ p 値 < 0 . 0 1 ）。

図 2 0 I の S m 4 用量応答の評価に示すように、S m 4 の濃度の増大により、4 T 1 . 2 接種マウスの全体的な生存の更なる改善がもたらされた。

例として、5 0 mg / kg の S m 4 によるマウスの処置は、7 3 日間の中央反応時間をもたらし、一方、ビヒクル処置マウスでは 4 0 日間の中央反応時間がもたらされた。

【 0 2 1 2 】

更に、何がそのような効果を引き起こし得るかを研究するために、処置中に腫瘍のサイズおよび自発的肺転移の形成を監視した。

一次腫瘍のサイズは、S m 4 処置により不変であったが（図 1 9 E ）、本発明者らは、腫瘍接種後の 2 8 日目に、肺転移の平均数における 6 7 % の低下を見出した（図 1 9 F ）。

【 0 2 1 4 】

転移率と、腫瘍により誘導される血管応答との相関関係を確立するために、本発明者らは、腫瘍内および腫瘍周辺領域内の血管密度を研究した（図 1 9 G および 2 1 ）。

腫瘍全体を切開し、明視野顕微鏡法により、赤血球の存在により示されるように、血管適用範囲の全体的な低下が明らかとなった（図 1 9 G 、星形）。

更に、免疫蛍光染色を用いた内皮細胞マーカー E R G （核）およびエンドムチン（E M C N 、膜性）に関する分析により、S m 4 処理マウスの腫瘍において、内皮細胞数（4 8 % 、 p 値 < 0 . 0 5 ）および血管体積の有意な低下（5 5 % 、 p 値 < 0 . 0 1 ）が示された（図 1 9 H 、I および 2 2 ）。

リンパ特異的マーカーである、P R O X 1 およびポドプラニン（P D P N ）を使用して、本発明者らはまた腫瘍誘導リンパ脈管新生応答に対する S m 4 の効果を評価し、リンパ管に関連した腫瘍の密度、およびリンパ内皮細胞の数（7 0 % 、 p 値 < 0 . 0 0 1 ）は、処置状態において、多大に低下することを見出した（6 5 % 、 p 値 < 0 . 0 1 ）（図 2 3 ）。

この S m 4 処置に対するリンパ応答は、固形癌のリンパ伝播中の S O X 1 8 機能喪失と一致する（D u o n g ら、2 0 1 2 ）。

まとめると、このことは、S m 4 が、腫瘍誘導脈管新生およびそれに関連した転移を妨害することにより、誘導された乳癌の予後を改善したことを示す。

【 0 2 1 5 】

血管 - およびリンパ脈管新生の誘導は、固形癌の特徴であり、腫瘍転移性播種の可能化への重大な一歩である。

標的転写因子に対する従来の手法は、腫瘍細胞変換を促進することが、調整不能になった癌遺伝子を妨害することに焦点を当てていた（G o r m a l l y 、2 0 1 4 、I l l e n d u l a ら、2 0 1 5 、M o e l l e r i n g ら、2 0 0 9 、Z h a n g ら、2 0 1 2 ）。

本明細書で、本発明者らは、転移性伝播を促進し得る、宿主脈管構造からの発達転写因子の標的化に依存する新規な相補的戦略を検証する。

本発明者らの結果は、S m 4 による転写因子 S O X 1 8 の標的化が、乳癌の前臨床モデルにおける転移性伝播を妨害するための有効な分子戦略であるという概念の証明を提供する。

10

20

30

40

50

【0216】

本明細書全体を通して、目的は、本発明を任意の一実施形態または特定の特徴の収集に限定することなく、本発明の好ましい実施形態を記載することであった。

したがって、本開示を踏まえて、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な修正および変更を例示された特定の実施形態に為し得ることが当業者により認識されるであろう。

【0217】

本明細書に言及した全てのコンピュータプログラム、アルゴリズム、特許および科学文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0218】

参考文献

Anders, S., P. T. Pyl, and W. Huber. 2015. "HTSeq - a Python framework to work with High-throughput sequencing data." *Bioinformatics* 31(2): 166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.

Bernard, P., P. Tang, S. Liu, P. Dewing, V. R. Harley, and E. Vilain. 2003. "Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination." *Hum Mol Genet* 12(14): 1755-65.

Cermenati, S., S. Moleri, S. Cimbri, P. Corti, L. Del Giacco, R. Amodio, E. Dejana, P. Koopman, F. Cotelletti, and M. Beltrame. 2008. "Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development." *Blood* 111(5): 2657-66. doi: 10.1182/blood-2007-07-100412.

Corada, M., F. Orsenigo, M. F. Morini, M. E. Pitulescu, G. Bhat, D. Nyqvist, F. Breviario, V. Conti, A. Briot, M. L. Iruela-Arispe, R. H. Adams, and E. Dejana. 2013. "Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity." *Nat Commun* 4: 2609. doi: 10.1038/ncomms3609.

Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras. 2013. "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." *Bioinformatics* 29(1): 15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

Duong, T., K. Koltowska, C. Pichol-Thievent, L. Le Guen, F. Fontaine, K. A. Smith, V. Truong, R. Skoczylas, S. A. Stacker, M. G. Achen, P. Koopman, B. M. Hogan, and M. Francois. 2014. "VEGFD regulates blood vascular development by modulating SOX18 activity." *Blood* 123(7): 1102-12. doi: 10.1182/blood-2013-04-495432.

Duong, T., S. T. Proulx, P. Luciani, J. C. Leroux, M. Detmar, P. Koopman, and M. Francois. 2012. "Genetic ablation of SOX18 function suppresses tumor lymphangiogenesis and metastas

10

20

30

40

50

is of melanoma in mice." *Cancer Res* 72(12): 3105-14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4026.

Durbin, L., C. Brennan, K. Shiomi, J. Cooke, A. Barrios, S. Shanmugalingam, B. Guthrie, R. Lindberg, and N. Holder. 1998. "Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites." *Genes Dev* 12(19): 3096-109.

Eom, B.W., M.J. Jo, M.C. Kook, K.W. Ryu, I.J. Choi, B.H. Nam, Y.W. Kim, and J.H. Lee. 2012. "The lymphangiogenic factor SOX 18: a key indicator to stage gastric tumor progression." *Int J Cancer* 131(1): 41-8. doi:10.1002/ijc.26325.

Francois, M., A. Caprini, B. Hosking, F. Orsenigo, D. Wilhelm, C. Browne, K. Paavonen, T. Karnezis, R. Shayan, M. Downes, T. Davidson, D. Tutt, K.S. Cheah, S.A. Stacker, G.E. Muscat, M.G. Achen, E. Dejana, and P. Koopman. 2008. "Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice." *Nature* 456(7222): 643-7. doi:10.1038/nature07391.

Gagoski, Dejan, Sergey Mureev, Nichole Giles, Wayne Johnston, Mareike Dahmer-Heath, Dubravka Skalamera, Thomas J. Gonda, and Kirill Alexandrov. 2015. "Gateway-compatible vectors for High-throughput protein expression in pro- and eukaryotic cell-free systems." *Journal of Biotechnology* 195(0): 1-7. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.006.

Gambin, Y., N. Ariotti, K.A. McMahon, M. Bastiani, E. Sierrecki, O. Kovtun, M.E. Polinkovsky, A. Magenau, W. Jung, S. Okano, Y. Zhou, N. Leneva, S. Mureev, W. Johnston, K. Gaus, J.F. Hancock, B.M. Collins, K. Alexandrov, and R.G. Parton. 2014. "Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae." *Elife* 3:e01434. doi:10.7554/eLife.01434.

Gormally, M.V., T.S. Dexheimer, G. Marsico, D.A. Sanders, C. Lowe, D. Matak-Vinkovic, S. Michael, A. Jadhav, G. Rai, D.J. Maloney, A. Simeonov, and S. Balasubramanian. 2014. "Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition." *Nat Commun* 5:5165. doi:10.1038/ncomms6165.

Hermkens, D.M., A. van Impel, A. Urasaki, J. Bussmann, H.J. Duckers, and S. Schulte-Merker.

10

20

30

40

50

2015. "Sox7 controls arterial specification in conjunction with Hey2 and efnb2 function." *Development* 142(9):1695-704. doi:10.1242/dev.117275.

Herpers, R., E. van de Kamp, H. J. Duckers, and S. Schulte-Merker. 2008. "Redundant roles for sox7 and sox18 in arteriovenous specification in zebrafish." *Circ Res* 102(1):12-5. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.166066.

Hogan, B. M., F. L. Bos, J. Bussmann, M. Witte, N. C. Chi, H. J. Duckers, and S. Schulte-Merker. 2009. "Ccbe1 is required for embryonic lymph angiogenesis and venous sprouting." *Nat Genet* 41(4):396-8. doi:10.1038/ng.321.

Hosking, B., M. Francois, D. Wilhelm, F. Orsenigo, A. Caprini, T. Svingen, D. Tutt, T. Davidson, C. Browne, E. Dejana, and P. Koopman. 2009. "Sox7 and Sox17 are strain-specific modifiers of the lymphangiogenic defects caused by Sox18 dysfunction in mice." *Development* 136(14):2385-91. doi:10.1242/dev.034827.

Hosking, B. M., S. C. Wang, S. L. Chen, S. Penning, P. Koopman, and G. E. Muscat. 2001. "SOX18 directly interacts with MEF2C in endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 287(2):493-500. doi:10.1006/bbrc.2001.5589.

Hosking, B. M., S. C. Wang, M. Downes, P. Koopman, and G. E. Muscat. 2004. "The VCAM-1 gene that encodes the vascular cell adhesion molecule is a target of the Sry-related High mobility group box gene, Sox18." *J Biol Chem* 279(7):5314-22. doi:10.1074/jbc.M308512200.

Illendula, A., J. A. Pulikkan, H. Zong, J. Grembecka, L. Xue, S. Sen, Y. Zhou, A. Boulton, A. Kuntimaddi, Y. Gao, R. A. Rajewski, M. L. Guzman, L. H. Castilla, and J. H. Bushweller. 2015. "Chemical biology. A small-molecule inhibitor of the aberrant transcription factor CBFbeta-SMMHC delays leukemia in mice." *Science* 347(6223):779-84. doi:10.1126/science.aaa0314.

Jauch, R., I. Aksoy, A. P. Hutchins, C. K. Ng, X. F. Tian, J. Chen, P. Palasingam, P. Robson, L. W. Stanton, and P. R. Kolatkar. 2011. "Conversion of Sox17 into a pluripotency reprogramming factor by reengineering its association with Oct4 on DNA." *Stem Cells* 29(6):940-51. doi:10.1002/stem.639.

Jethon, A., B. Pula, M. Olbromski, B. Werynska, B. Muszczyńska-Bernhard, W. Witkiewicz, P. Dz

10

20

30

40

50

- iegiel, and M. Podhorska-Okolow. 2015. "Prognostic significance of SOX18 expression in non-small cell lung cancer." *Int J Oncol* 46(1):123-32. doi:10.3892/ijo.2014.2698.
- Kim, K., I. K. Kim, J. M. Yang, E. Lee, B. I. Koh, S. Song, J. Park, S. Lee, C. Choi, J. W. Kim, Y. Kubota, G. Y. Koh, and I. Kim. 2016. "SoxF Transcription Factors Are Positive Feedback Regulators of VEGF Signaling." *Circ Res* 119(7):839-52. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308483. 10
- Kovtun, O., S. Mureev, W. Jung, M. H. Kubala, W. Johnston, and K. Alexandrov. 2011. "Leishmania cell-free protein expression system." *Methods* 55(1):58-64. doi:10.1016/j.ymeth.2011.06.006.
- Lawson, N. D., and B. M. Weinstein. 2002. "In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish." *Dev Biol* 248(2):307-18.
- Lefebvre, V., W. Huang, V. R. Harley, P. N. Goodfellow, and B. de Crombrughe. 1997. "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." *Mol Cell Biol* 17(4):2336-46. 20
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biol* 15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Matsui, T., M. Kanai-Azuma, K. Hara, S. Matoba, R. Hiramatsu, H. Kawakami, M. Kurohmaru, P. Koopman, and Y. Kanai. 2006. "Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice." *J Cell Sci* 119(Pt 17):3513-26. doi:10.1242/jcs.03081. 30
- Mitchell, R. E., L. F. Huitema, R. E. Skinner, L. H. Brunt, C. Severn, S. Schulte-Merker, and C. L. Hammond. 2013. "New tools for studying osteoarthritis genetics in zebrafish." *Osteoarthritis Cartilage* 21(2):269-78. doi:10.1016/j.joca.2012.11.004. 40
- Mittal, D., A. Young, K. Stannard, M. Yong, M. W. Teng, B. Allard, J. Stagg, and M. J. Smyth. 2014. "Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor." *Cancer Res* 74(14):3652-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0957.
- Moellering, R. E., M. Cornejo, T. N. Davis, C. Del Bianco, J. C. Aster, S. C. Blacklow, A. L. Kung, D. G. Gilliland, G. L. Verdine, and J. E. Bradn 50

er. 2009. "Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex." *Nature* 462(7270):182-8. doi:10.1038/nature08543.

Mohammed, H., C.D. Santos, A.A. Serandour, H.R. Ali, G.D. Brown, A. Atkins, O.M. Rueda, K.A. Holmes, V. Theodorou, J.L. Robinson, W. Zwart, A. Saadi, C.S. Ross-Innes, S.F. Chin, S. Menon, J. Stingl, C. Palmieri, C. Caldas, and J.S. Carroll. 2013. "Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor." *Cell Rep* 3(2):342-9. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.010. 10

Mureev, S., O. Kovtun, U.T. Nguyen, and K. Alexandrov. 2009. "Species-independent translational leaders facilitate cell-free expression." *Nat Biotechnol* 27(8):747-52. doi:10.1038/nbt.1556.

Pendeville, H., M. Winandy, I. Manfroid, O. Nivelles, P. Motte, V. Pasque, B. Peers, I. Struman, J.A. Martial, and M.L. Voz. 2008. "Zebrafish Sox7 and Sox18 function together to control arterial-venous identity." *Dev Biol* 317(2):405-16. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.028. 20

Pula, B., M. Olbromski, A. Wojnar, A. Gomulkiewicz, W. Witkiewicz, M. Ugorski, P. Dziegiel, and M. Podhorska-Okolow. 2013. "Impact of SOX18 expression in cancer cells and vessels on the outcome of invasive ductal breast carcinoma." *Cell Oncol (Dordr)* 36(6):469-83. doi:10.1007/s13402-013-0151-7. 30

Robinson, A.S., S.C. Materna, R.M. Barnes, S. De Val, S.M. Xu, and B.L. Black. 2014. "An arterial-specific enhancer of the Human endothelin converting enzyme 1 (ECE1) gene is synergistically activated by Sox17, FoxC2, and Etv2." *Dev Biol* 395(2):379-89. doi:10.1016/j.ydbio.2014.08.027.

Sacilotto, N., R. Monteiro, M. Fritzsche, P.W. Becker, L. Sanchez-Del-Campo, K. Liu, P. Pinheiro, I. Ratnayaka, B. Davies, C.R. Goding, R. Patient, G. Bou-Gharios, and S. De Val. 2013. "Analysis of Dll4 regulation reveals a combinatorial role for Sox and Notch in arterial development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(29):11893-8. doi:10.1073/pnas.1300805110. 40

Sarkar, A., and K. Hochedlinger. 2013. "The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate." *Cell Stem Cell* 12(1):15-30. doi:10.1016/j.stem.2012.12.007. 50

- Schmidt, D., M.D. Wilson, C. Spyrou, G.D. Brown, J. Hadfield, and D.T. Odom. 2009. "ChIP-seq: using High-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions." *Methods* 48(3): 240-8. doi:10.1016/j.ymeth.2009.03.001.
- Sierecki, E., N. Giles, M. Polinkovsky, M. Moustaqil, K. Alexandrov, and Y. Gambin. 2013. "A cell-free approach to accelerate the study of protein-protein interactions in vitro." *Interface Focus* 3(5): 20130018. doi:10.1098/rsfs.2013.0018. 10
- Sierecki, E., L.M. Stevers, N. Giles, M.E. Polinkovsky, M. Moustaqil, S. Mureev, W.A. Johnston, M. Dahmer-Heath, D. Skalamera, T.J. Gonda, B. Gabrielli, B.M. Collins, K. Alexandrov, and Y. Gambin. 2014. "Rapid mapping of interactions between Human SNX-BAR proteins measured in vitro by AlphaScreen and single-molecule spectroscopy." *Mol Cell Proteomics* 13(9): 2233-45. doi:10.1074/mcp.M113.037275. 20
- Song, H.D., X.J. Sun, M. Deng, G.W. Zhang, Y. Zhou, X.Y. Wu, Y. Sheng, Y. Chen, Z. Ruan, C.L. Jiang, H.Y. Fan, L.I. Zou, J.P. Kanki, T.X. Liu, A.T. Look, and Z. Chen. 2004. "Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(46): 16240-5. doi:10.1073/pnas.0407241101.
- Thisse, C., and B. Thisse. 2008. "High-resolution in situ Hybridization to whole-mount zebrafish embryos." *Nat Protoc* 3(1): 59-69. doi:10.1038/nprot.2007.514. 30
- Wythe, J.D., L.T. Dang, W.P. Devine, E. Boudreau, S.T. Artap, D. He, W. Schachterle, D.Y. Stainier, P. Oettgen, B.L. Black, B.G. Bruneau, and J.E. Fish. 2013. "ETS factors regulate Vegf-dependent arterial specification." *Dev Cell* 26(1): 45-58. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.007.
- Yang, H., S. Lee, S. Lee, K. Kim, Y. Yang, J.H. Kim, R.H. Adams, J.M. Wells, S.J. Morrison, G.Y. Koh, and I. Kim. 2013. "Sox17 promotes tumor angiogenesis and destabilizes tumor vessels in mice." *J Clin Invest* 123(1): 418-31. doi:10.1172/JCI64547. 40
- Young, N., C.N. Hahn, A. Poh, C. Dong, D. Wilhelm, J. Olsson, G.E. Muscat, P. Parsons, J.R. Gamble, and P. Koopman. 2006. "Effect of disrupted SOX18 transcription factor function on tumor growth, vascularization, and endothelial development." *J Natl Cancer Inst* 98(15): 1 50

060-7. doi: 10.1093/jnci/djj299.

Zhang, X., P. Yue, B. D. Page, T. Li, W. Zhao, A. T. Namanja, D. Paladino, J. Zhao, Y. Chen, P. T. Gunning, and J. Turkson. 2012. "Orally bioavailable small-molecule inhibitor of transcription factor Stat3 regresses Human breast and lung cancer xenografts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(24): 9623-8. doi: 10.1073/pnas.1121606109.

Zhang, Y., S. Huang, W. Dong, L. Li, Y. Feng, L. Pan, Z. Han, X. Wang, G. Ren, D. Su, B. Huang, and J. Lu. 2009. "SOX7, down-regulated in colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells." *Cancer Lett* 277(1): 29-37. doi: 10.1016/j.canlet.2008.11.014.

【図面】

【図 1】

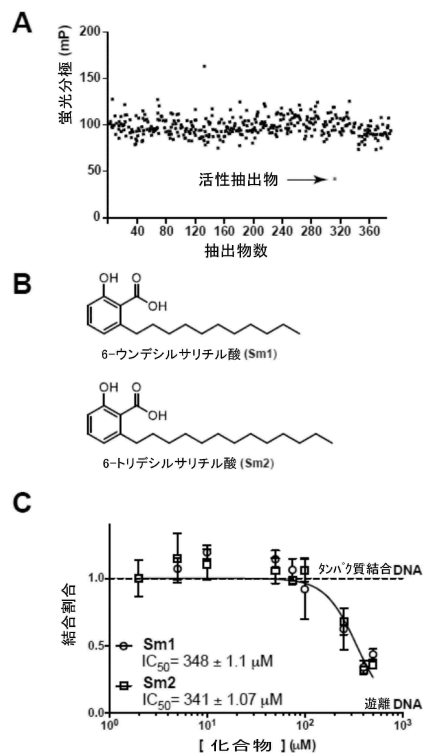


図 1

【図 2 - 1】

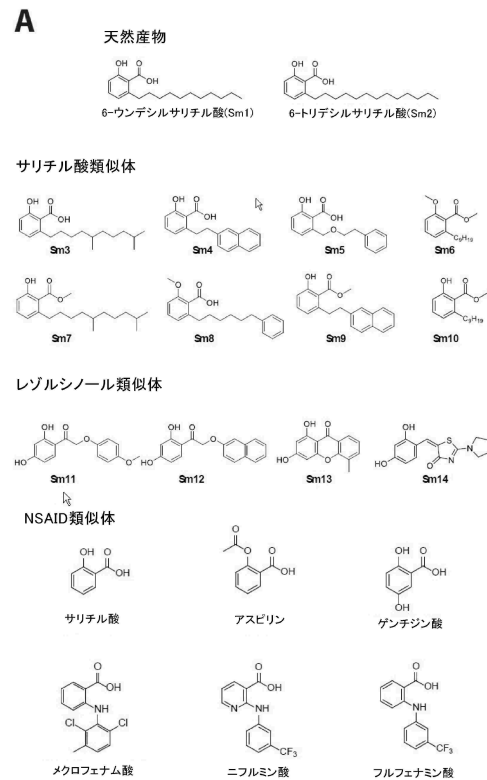


図 2

10

20

30

40

50

【図 2 - 2】

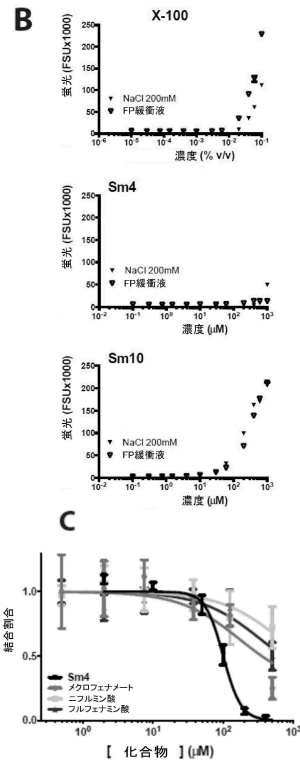


図 2 (続き)

【図 3】

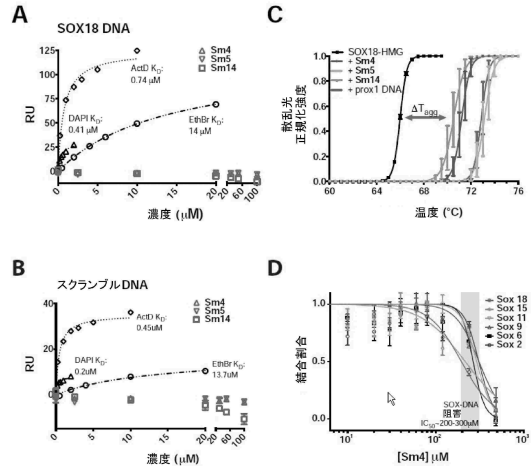


図 3

【図 4】

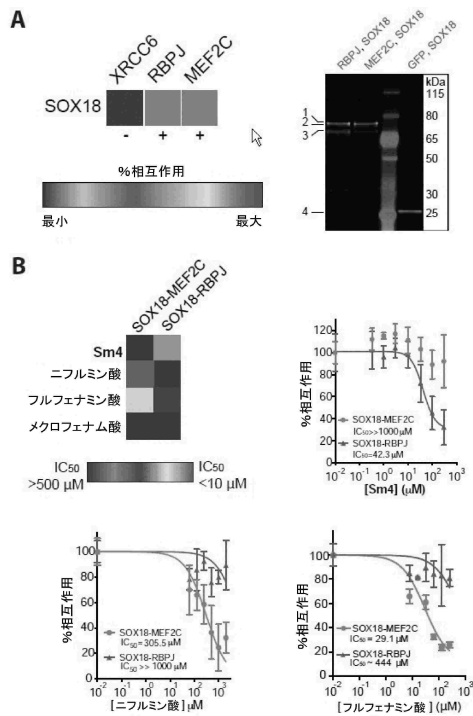


図 4

【図 5 - 1】

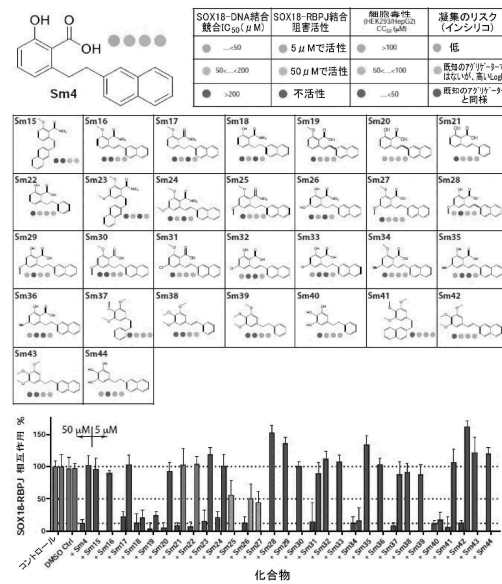


図 5

【 図 5 - 2 】

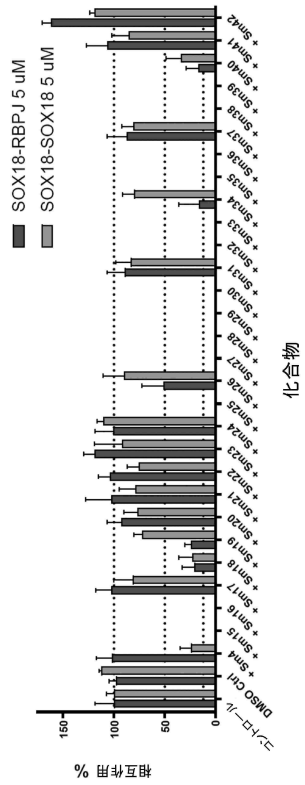


図 5 (続き)

【 図 6 】

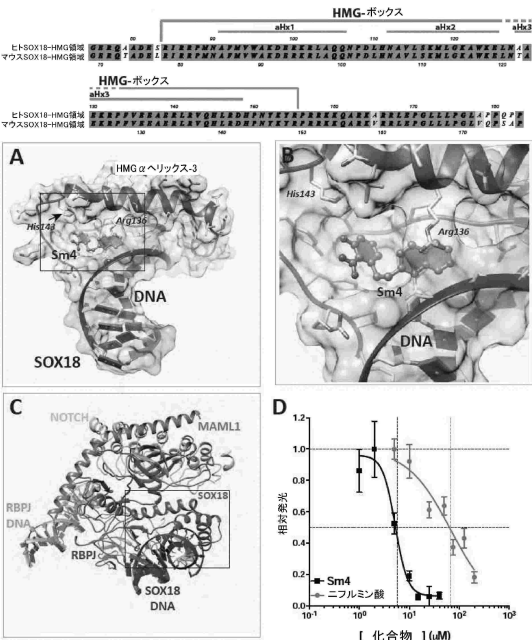


図 6

【 図 7 】

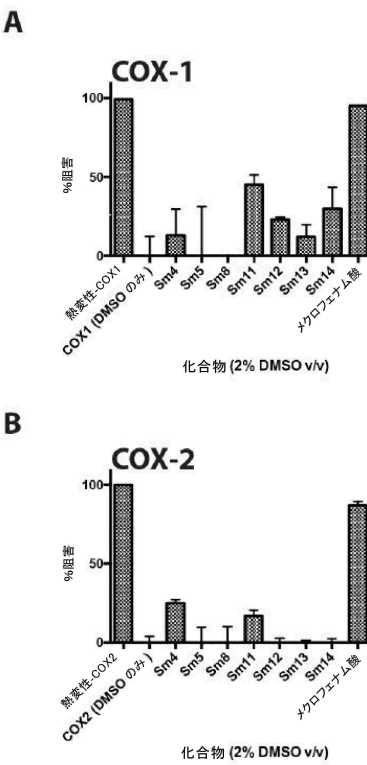


図 7

【 図 8 - 1 】

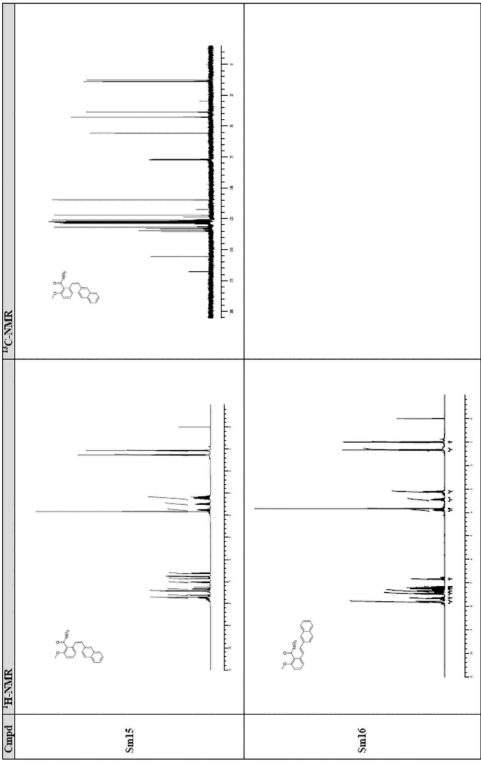


図 8

10

20

30

40

50

【 図 8 - 2 】

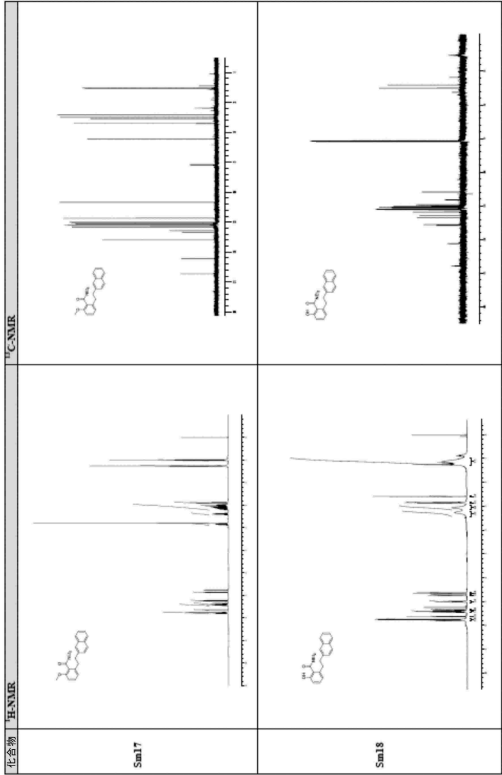


図 8 (続き)

【 図 8 - 3 】

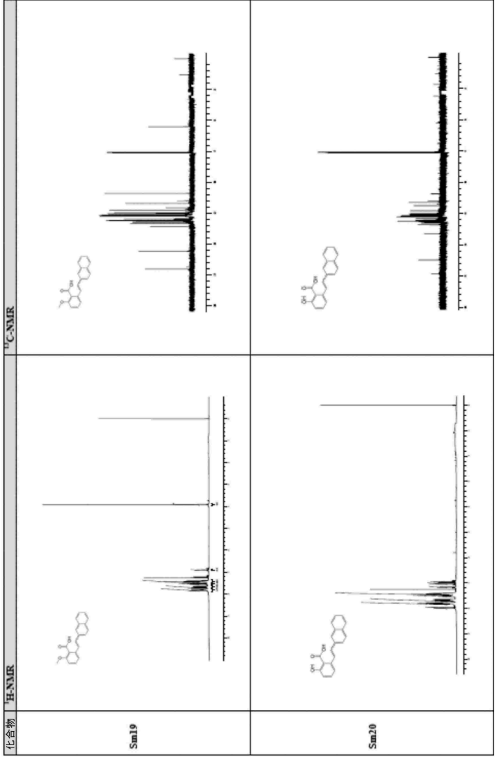


図 8 (続き)

【 図 8 - 4 】

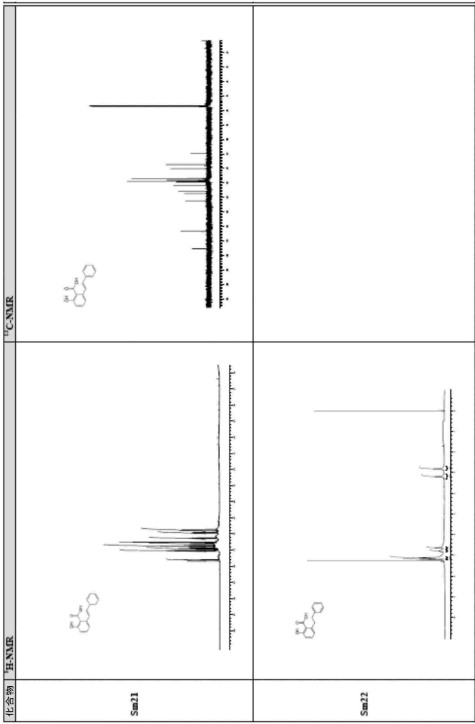


図 8 (続き)

【 図 8 - 5 】

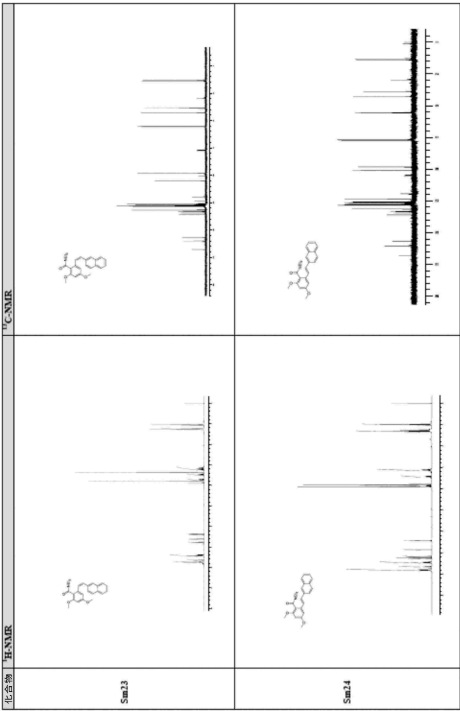


図 8 (続き)

10

20

30

40

50

【 図 8 - 6 】

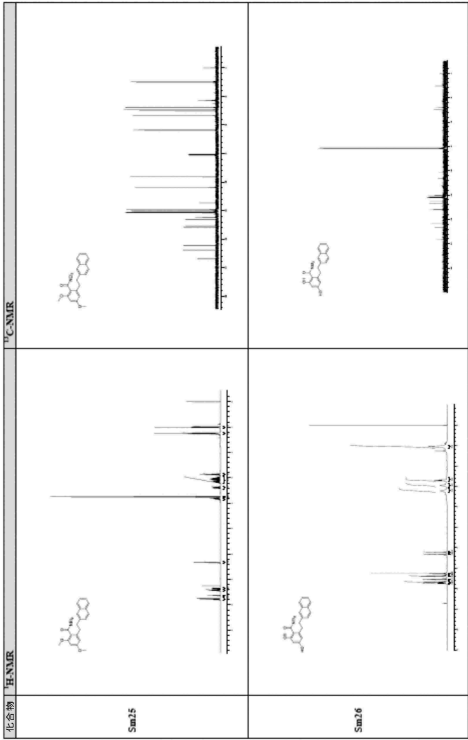


図 8 (続き)

【 図 8 - 7 】

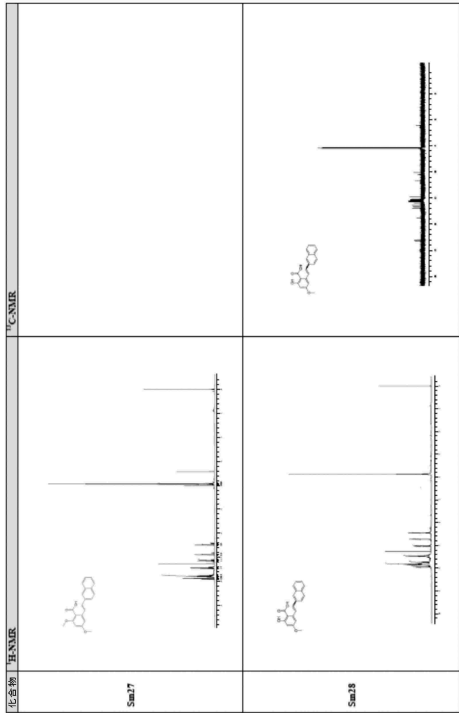


図 8 (続き)

【 図 8 - 8 】

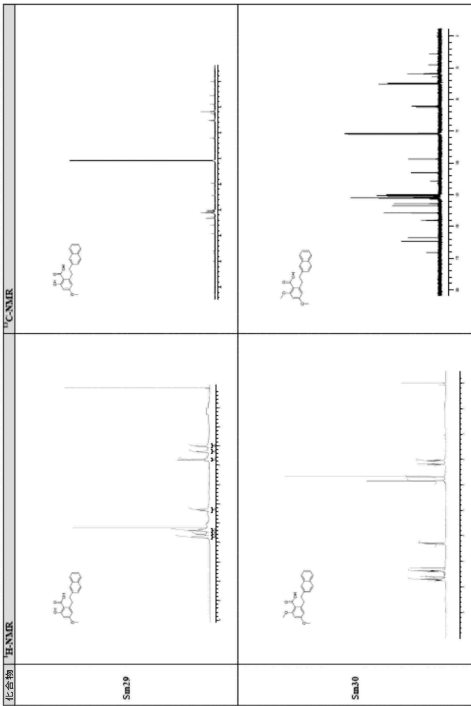


図 8 (続き)

【 図 8 - 9 】

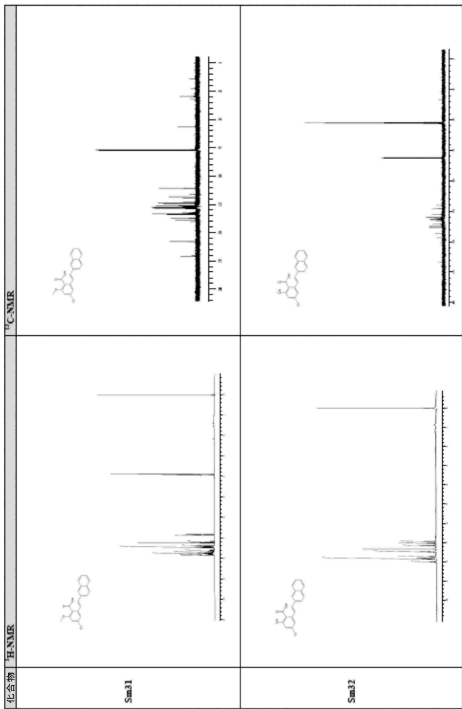


図 8 (続き)

10

20

30

40

50

【図 8 - 1 0】

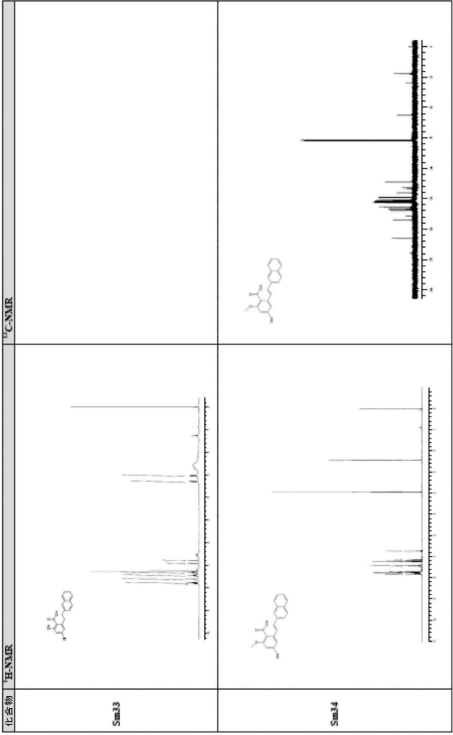


図 8 (続き)

【図 8 - 1 1】

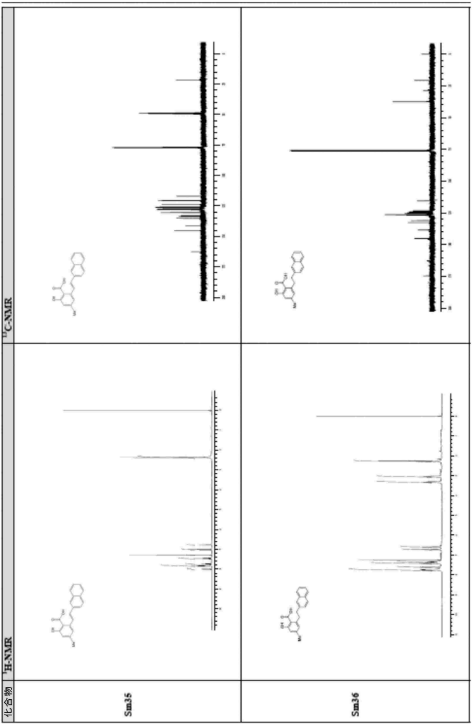


図 8 (続き)

【図 8 - 1 2】

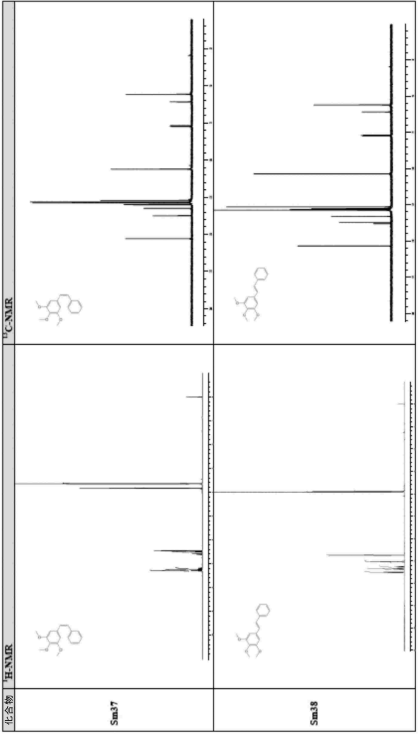


図 8 (続き)

【図 8 - 1 3】



図 8 (続き)

10

20

30

40

50

【 図 8 - 1 4 】

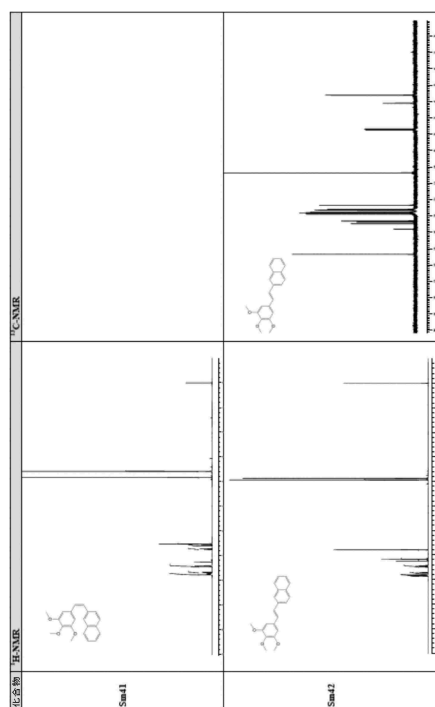


図 8 (続き)

【 図 8 - 1 5 】

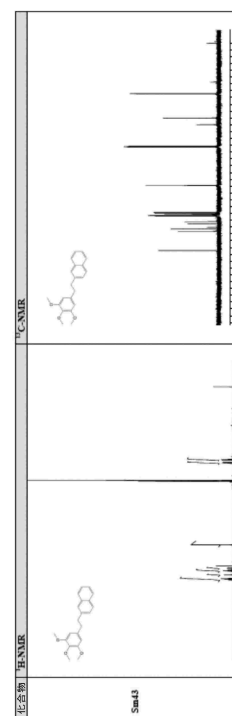


図 8 (続き)

【 図 9 】

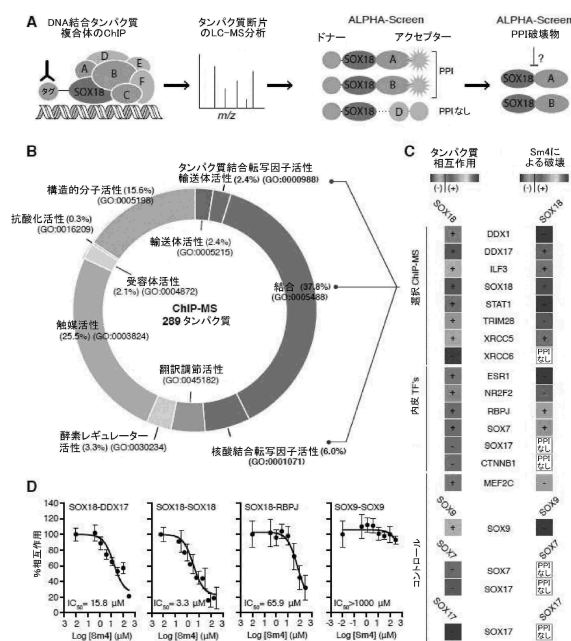


图 9

【 図 1 0 】

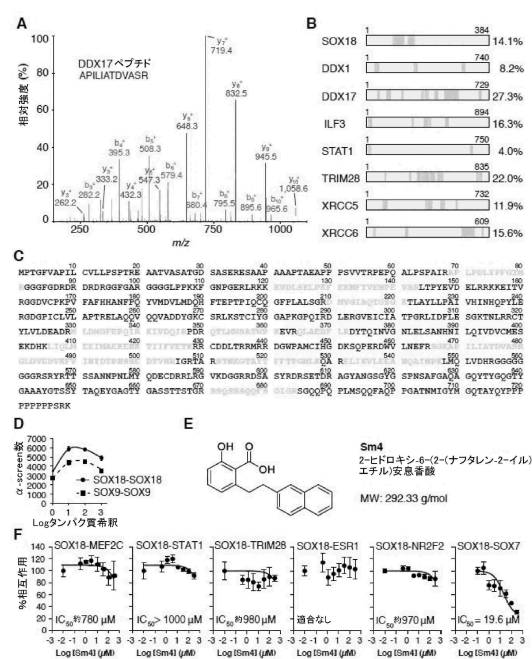


図 10

【図 1 1】

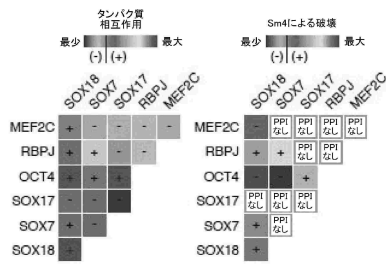


図 11

【図 1 2】

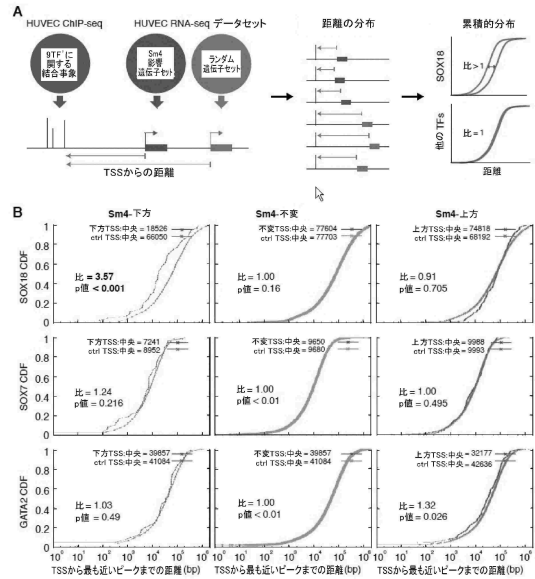


図 12

【図 1 3】

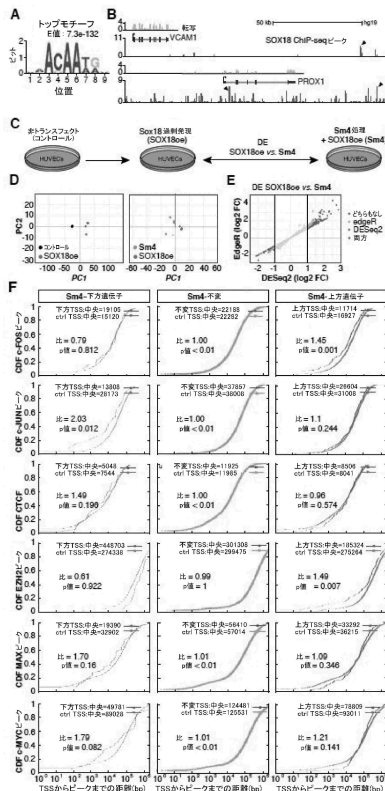


図 13

【図 1 4】

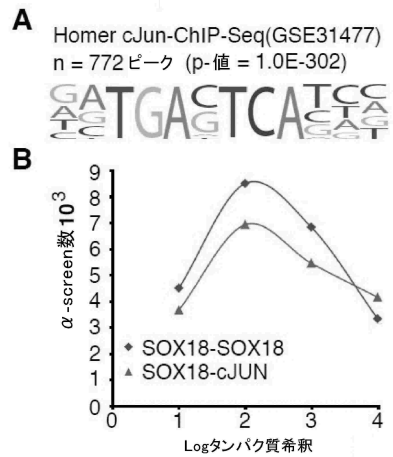


図 14

10

20

30

40

50

【图 15】

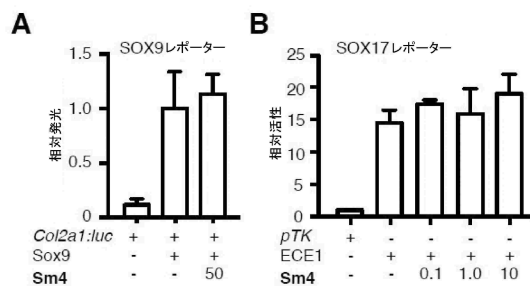


图 15

【 図 1 6 】

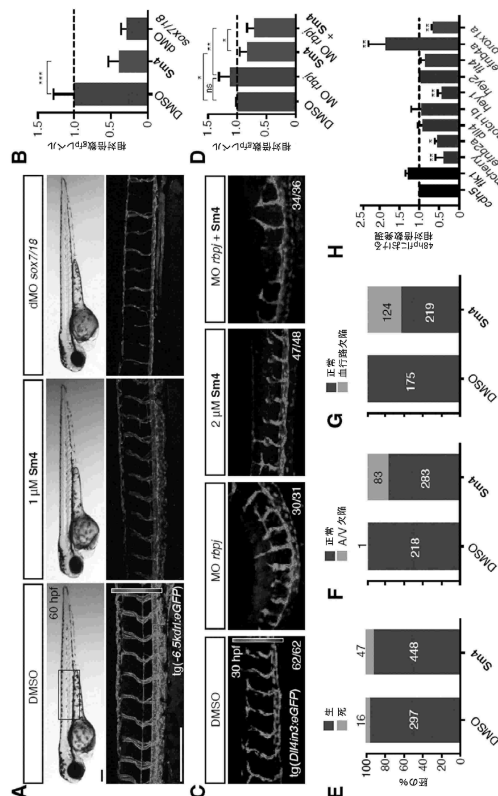


图 16

【圖 17】

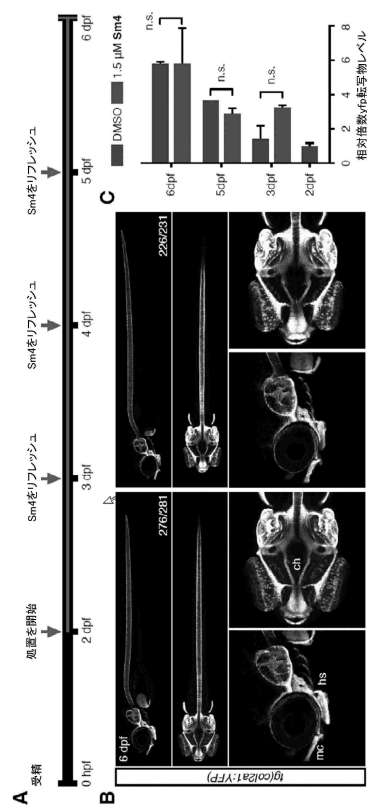


图 17

【圖 18】

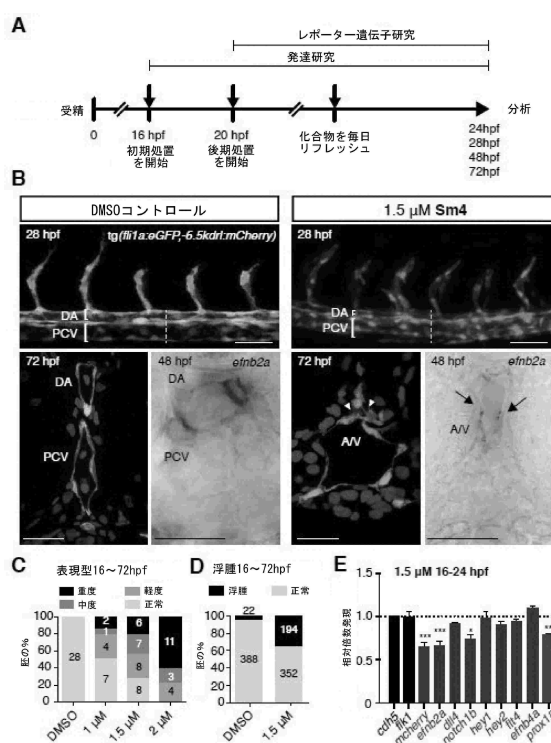


图 18

【図 19 - 1】

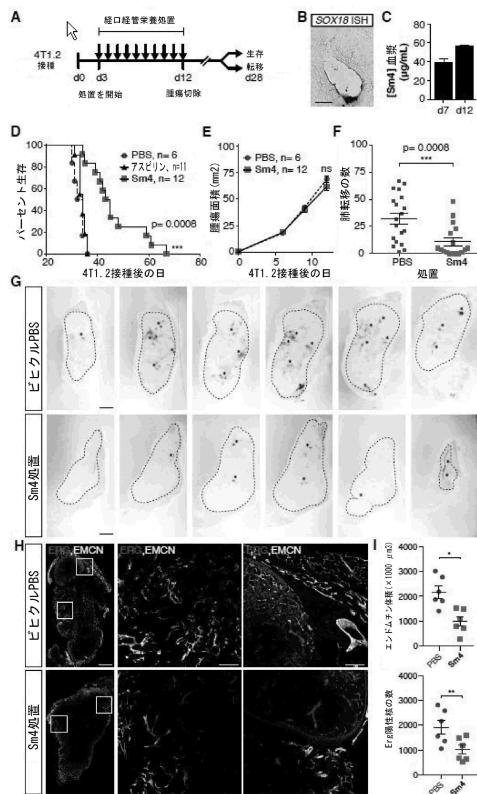


図 19

【図 21】

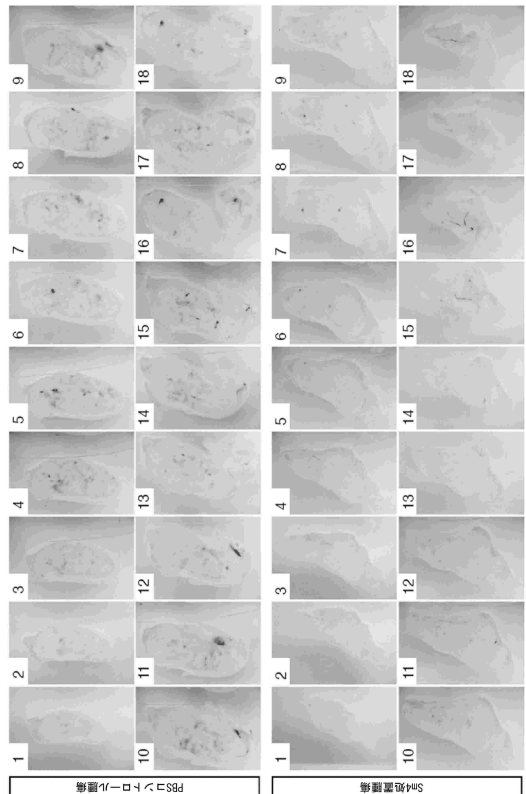


図 21

【図 22】

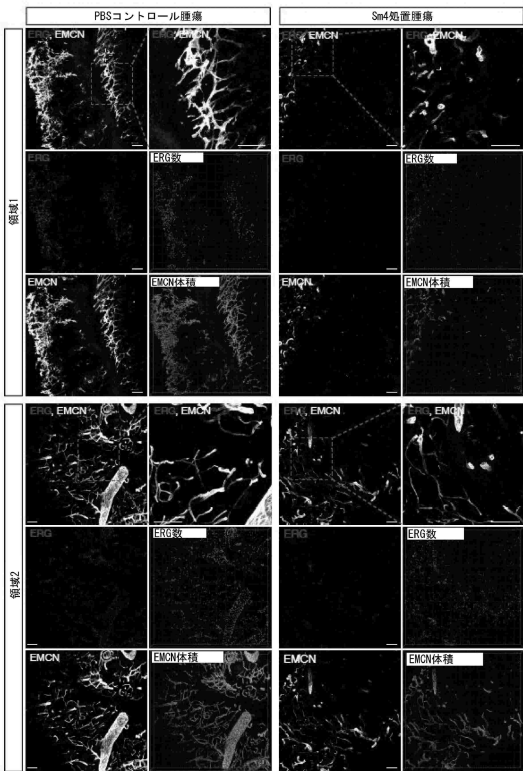


図 22

【図 23】

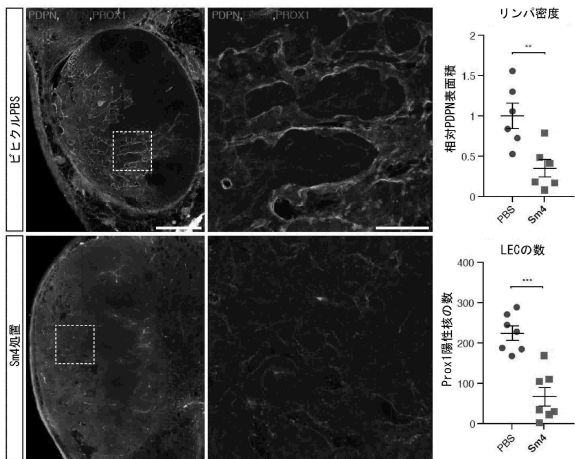


図 23

10

20

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 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
		A 6 1 P	43/00	1 1 1

オーストラリア(AU)

ー カンペルフリーストラート 2 6 1

(72)発明者

マミディアラ スレーマン クマル

インド国 テランガーナ ステート 5 0 0 0 3 7 ハイデラバード パラナガー フェイズ ザ サード
エスヴィーシーアイイー プロット ナンバー 7 9

(72)発明者

サリム アンジェラ アグスルヤルティ

オーストラリア国 クイーンズランド州 4 0 7 7 デュラック アデライン クローズ 5

(72)発明者

フォンテーヌ フランク ロジャー

オーストラリア国 クイーンズランド州 4 0 6 9 ケンモアカーロング ストリート 7

(72)発明者

クーパー マシュー アリスター

オーストラリア国 ケンブリッジ シービー 1 7 アールユーフェンドン クローズ 5

(72)発明者

カボン ロバート ジョン

オーストラリア国 クイーンズランド州 4 0 6 9 プレンヴェール リリー ピリー ロード 6 0

(72)発明者

ロバートソン アヴリル アレクシス バーバラ

オーストラリア国 クイーンズランド州 4 0 6 9 ケンモアマーランド ストリート 4 4

合議体

審判長 原田 隆興

審判官 岩下 直人

審判官 淵野 留香

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 7 4 7 5 3 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C07C

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)