

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-503687

(P2010-503687A)

(43) 公表日 平成22年2月4日(2010.2.4)

(51) Int.Cl.

**C07K 7/08** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C12Q 1/02** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

F 1

C07K 7/08 Z N A  
C07K 14/00  
C12Q 1/02  
A61K 38/46 37/54  
A61P 43/00 43/00 1 1 1

テーマコード(参考)

4 B 0 6 3  
4 C 0 8 4  
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-528336 (P2009-528336)  
(86) (22) 出願日 平成19年9月14日 (2007.9.14)  
(85) 翻訳文提出日 平成21年5月12日 (2009.5.12)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2007/020200  
(87) 國際公開番号 WO2008/100288  
(87) 國際公開日 平成20年8月21日 (2008.8.21)  
(31) 優先権主張番号 60/844,851  
(32) 優先日 平成18年9月15日 (2006.9.15)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 500114586  
ザバーナム インスティチュート  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 920  
37, ラホヤ, ノース トリー パ  
インズ ロード 10901  
(74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 英輔  
(74) 代理人 100096183  
弁理士 石井 貞次  
(74) 代理人 100118773  
弁理士 藤田 節  
(74) 代理人 100122389  
弁理士 新井 栄一  
(74) 代理人 100111741  
弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】高親和性EphB受容体結合化合物とその使用法

## (57) 【要約】

本発明は、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6を含むEphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合するペプチドに基づく化合物を提供する。特に、本発明はEphB受容体と選択的に結合する多量体ペプチドを提供する。本発明はまた、EphB受容体結合化合物および製薬上許容される担体または賦形剤を含んでなる医薬組成物を含む組成物も提供する。EphB受容体ファミリーのメンバーと選択的にまたは特異的に結合する化合物を同定する方法も提供する。

【選択図】図1

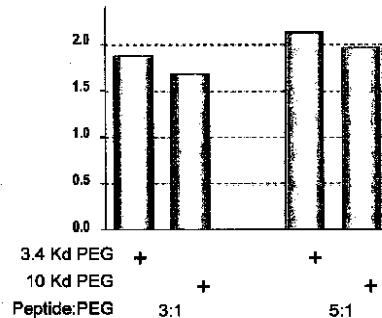


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

約100nM以下の解離定数（Kd）でEphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合する単離されたEphB受容体結合化合物であって、EphB受容体と選択的に結合する2以上のペプチドを含みかつ前記2以上のペプチドのそれぞれが5~50アミノ酸残基の長さを有する、前記単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2】**

EphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合してEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約100nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する単離されたEphB受容体結合化合物であって、EphB受容体と選択的に結合する2以上のペプチドを含みかつ前記2以上のペプチドのそれぞれが5~50アミノ酸残基の長さを有する、前記単離されたEphB受容体結合化合物。  
10

**【請求項 3】**

約100nM以下の解離定数（Kd）でEphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合する単離されたEphB受容体結合化合物であって、(i)EphB受容体と選択的に結合しつつそれが5~50アミノ酸残基の長さを有する2以上のペプチド、および(ii)異種化合物を含む単離されたコンジュゲートである、前記単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 4】**

EphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合してEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約100nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する、単離されたEphB受容体結合化合物であって、(i)EphB受容体と選択的に結合しつつそれが5~50アミノ酸残基の長さを有する2以上のペプチド、および(ii)異種化合物を含む単離されたコンジュゲートである、前記単離されたEphB受容体結合化合物。  
20

**【請求項 5】**

約100nM以下の解離定数（Kd）でEphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合する単離されたEphB受容体結合化合物であって、(i)EphB受容体と選択的に結合しつつそれが5~50アミノ酸残基の長さを有する1以上のペプチド、および(ii)ヒトIgGのFc領域またはその断片を含む単離されたコンジュゲートである、前記単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 6】**

EphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合してEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約100nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する、単離されたEphB受容体結合化合物であって、(i)EphB受容体と選択的に結合しつつそれが5~50アミノ酸残基の長さを有する1以上のペプチド、および(ii)ヒトIgGのFc領域またはその断片を含む単離されたコンジュゲートである、前記単離されたEphB受容体結合化合物。  
30

**【請求項 7】**

前記2以上のペプチドがそれぞれ配列番号1~75のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項1、2、3または4に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 8】**

前記1以上のペプチドがそれぞれ配列番号1~75のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。  
40

**【請求項 9】**

前記2以上のペプチドの少なくとも1つが配列番号39、配列番号40、または配列番号41のアミノ酸配列を有する、請求項1、2、3または4に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 10】**

前記1以上のペプチドの少なくとも1つが配列番号39、配列番号40、または配列番号41のアミノ酸配列を有する、請求項5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 11】**

前記2以上のペプチドが配列番号39、配列番号40、または配列番号41のアミノ酸配列を有する、請求項1、2、3または4に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。  
50

**【請求項 1 2】**

前記 1 以上のペプチドが配列番号39、配列番号40、または配列番号41のアミノ酸配列を有する、請求項 5 または 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 3】**

前記 2 以上のペプチドが同じものである、請求項 1 1 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 4】**

前記 1 以上のペプチドが同じものである、請求項 1 2 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 5】**

解離定数 ( $K_d$ ) がほぼ0.5nM～ほぼ20nMである、請求項 1 、 3 または 5 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 6】**

解離定数 ( $K_d$ ) がほぼ60nM～ほぼ90nMである、請求項 1 、 3 または 5 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 7】**

EphB受容体がマウスEphB受容体である、請求項 1 5 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 8】**

EphB受容体がヒトEphB受容体である、請求項 1 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 1 9】**

解離定数 ( $K_d$ ) がELISAまたは蛍光偏光アッセイにより測定される、請求項 1 5 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 0】**

解離定数 ( $K_d$ ) が等温滴定カロリメトリーにより測定される、請求項 1 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 1】**

$IC_{50}$  がほぼ1nM～ほぼ25nMである、請求項 2 、 4 または 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 2】**

$IC_{50}$  がほぼ10nM～ほぼ50nMである、請求項 2 、 4 または 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 3】**

$IC_{50}$  がほぼ50nM～ほぼ100nMである、請求項 2 、 4 または 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 4】**

EphB受容体がマウスEphB受容体でありかつエフリン-Bリガンドがマウスエフリン-Bリガンドである、請求項 2 1 、 2 2 または 2 3 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 5】**

$IC_{50}$  がELISAにより測定される、請求項 2 1 、 2 2 または 2 3 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 6】**

EphB受容体と選択的に結合する 2 つのペプチドを含む二量体である、請求項 1 または 2 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 7】**

前記 2 以上のペプチドの少なくとも1つが前記 2 以上のペプチドの他のものと異なる、請求項 1 または 2 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

**【請求項 2 8】**

前記 2 以上のペプチドの少なくとも1つがEphB受容体とエフリン-Bリガンドとの結合を

10

20

30

40

50

ほぼ1nM～ほぼ100nMのIC<sub>50</sub>で阻害する、請求項2または4に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項29】

前記1以上のEphB受容体結合ペプチドの少なくとも1つがEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合をほぼ1nM～ほぼ100nMのIC<sub>50</sub>で阻害する、請求項6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項30】

EphB受容体がマウスEphB受容体でありかつエフリン-Bリガンドがマウスエフリン-Bリガンドである、請求項28または29に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項31】

IC<sub>50</sub>がELISAにより測定される、請求項28または29に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

10

【請求項32】

前記2以上のペプチドの少なくとも1つがEphB受容体とほぼ1nM～ほぼ80nMの解離定数で選択的に結合する、請求項1または3に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項33】

前記1以上のペプチドの少なくとも1つがEphB受容体とほぼ1nM～ほぼ80nMの解離定数で選択的に結合する、請求項5に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項34】

EphB受容体がマウスEphB受容体である、請求項32または33に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

20

【請求項35】

EphB受容体がヒトEphB受容体である、請求項32または33に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項36】

解離定数(Kd)がELISAまたは蛍光偏光アッセイにより測定される、請求項32または33に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項37】

解離定数(Kd)が等温滴定カロリメトリーにより測定される、請求項32または33に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

30

【請求項38】

EphB受容体がEphB1、EphB2、EphB3、Eph4、EphB5、またはEphB6である、請求項1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項39】

EphB受容体と選択的に結合する2つのペプチドを、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて連結することにより作製した二量体である、請求項1または2に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項40】

前記2つのペプチドをPEGと連結する効率が少なくとも40%、50%、60%または70%である、請求項39に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

40

【請求項41】

PEGが3.4kDa、10kDaまたは40kDaの分子量を有する、請求項40に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項42】

さらに前記1以上のEphB受容体結合ペプチドと前記Fc領域またはその断片の間にリンカーを含む、請求項5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項43】

リンカーがアミノ酸配列Gly Ser Gly Ser Lys(配列番号76)をもつペプチドリンカーである、請求項42に記載の単離されたEphB受容体結合化合物。

【請求項44】

50

請求項 1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物を含む組成物。

【請求項 4 5】

さらに製薬上許容される担体を含む、請求項 4 6 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

さらに化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を含む、請求項 4 6 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

それを必要とする被験体に請求項 1、2、3、4、5または6の単離されたEphB受容体結合化合物の予防上または治療上有効な量を投与することを含む、EphB受容体関連疾患を予防、治療または管理する方法。10

【請求項 4 8】

EphB受容体関連疾患が新生物疾患、血管疾患、または神経障害である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

EphB受容体関連疾患が癌である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

被験体がヒトである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

さらに第2の療法を含む、請求項 4 7 または 4 9 に記載の方法。20

【請求項 5 2】

前記第2の療法が化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

それを必要とする被験体に請求項 1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物の治療上有効な量を投与し、続けて前記癌の腫瘍を被験体から除去することを含む、癌を治療する方法。

【請求項 5 4】

EphB受容体発現細胞の数を減ずる方法であって、前記細胞を請求項 1、2、3、4、5または6の単離されたEphB受容体結合化合物と接触させることを含む前記方法。30

【請求項 5 5】

癌の再発を予防または治療する方法であって、それを必要とする被験体に請求項 1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物の有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項 5 6】

腫瘍のサイズを低下させる方法であって、前記腫瘍を請求項 1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物の有効量と接触させることを含む前記方法。

【請求項 5 7】

EphB受容体発現細胞の増殖を抑制する方法であって、EphB受容体発現細胞を請求項 1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物の有効量と接触させることを含む前記方法。40

【請求項 5 8】

腫瘍の増殖を防止する方法であって、前記腫瘍を請求項 1、2、3、4、5または6に記載の単離されたEphB受容体結合化合物の有効量と接触させることを含む前記方法。

【請求項 5 9】

請求項 1、2、3、4、5または6に記載の、アゴニストである単離されたEphB受容体結合化合物のin vitroでの効力を確認する方法であって、

- 患者から得た癌細胞を前記単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップ；および

b. 前記癌細胞の増殖、EphB受容体トランスリン酸化、EphB受容体クラスター形成、EphB受

10

20

30

40

50

容体インターナリゼーション、またはEphB受容体分解に与える、前記単離されたEphB受容体結合化合物の効果をアッセイするステップ；

を含み、ここで、もし

- i. 対照と比較して、前記癌細胞の増殖の低下または阻害があれば；
- ii. 対照と比較して、EphB受容体トランスリン酸化の増加があれば；
- iii. 対照と比較して、EphB受容体クラスター形成の増加があれば；
- iv. 対照と比較して、EphB受容体インターナリゼーションの増加があれば；または
- v. 対照と比較して、EphB受容体分解の増加があれば

前記単離されたEphB受容体結合化合物は有効であると決定する前記方法。

**【請求項 6 0】**

請求項 1、2、3、4、5 または 6 に記載の、アンタゴニストである単離されたEphB受容体結合化合物の *in vitro*での効力を確認する方法であって、

- a. 患者から得た癌細胞を前記単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップ；および

b. 前記癌細胞の増殖、EphB受容体トランスリン酸化、EphB受容体クラスター形成、EphB受容体インターナリゼーション、またはEphB受容体分解に与える、前記単離されたEphB受容体結合化合物の影響をアッセイするステップ；

を含み、ここで、もし

- i. 対照と比較して、前記癌細胞の増殖の低下があるかまたは変化がなければ；
- ii. 対照と比較して、EphB受容体トランスリン酸化の減少または阻害があれば；
- iii. 対照と比較して、EphB受容体クラスター形成の減少または阻害があれば；
- iv. 対照と比較して、EphB受容体インターナリゼーションの減少または阻害があれば；または

v. 対照と比較して、EphB受容体分解の減少または阻害があれば

前記単離されたEphB受容体結合化合物は有効であると決定する前記方法。

**【請求項 6 1】**

被験体におけるEphB受容体の異常発現を検出する方法であって、

- a. 被験体の細胞を、請求項 1、2、3、4、5 または 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップ；および

b. 単離されたEphB受容体結合化合物の前記被験体の細胞との結合を検出するステップ；  
を含み、ここで、もし、単離されたEphB受容体結合化合物の前記被験体の細胞との結合が、単離されたEphB受容体結合化合物の、EphB受容体の発現が正常な対照細胞との結合より高いかまたは低ければ、EphB受容体の異常な発現が検出される前記方法。

**【請求項 6 2】**

前記接触が被験体中での接触である、請求項 6 1 に記載の方法。

**【請求項 6 3】**

対照細胞が健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体由来である、請求項 6 1 に記載の方法。

**【請求項 6 4】**

被験体におけるサンプルの異常発現を検出する方法であって、

- a. 被験体のサンプルを、請求項 1、2、3、4、5 または 6 に記載の単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップ；および

b. 単離されたEphB受容体結合化合物の前記被験体のサンプルとの結合を検出するステップ；

を含み、ここで、もし、単離されたEphB受容体結合化合物の前記被験体のサンプルとの結合が、単離されたEphB受容体結合化合物の、EphB受容体の発現が正常な対照サンプルとの結合より高いかまたは低ければ、EphB受容体の異常な発現が検出される前記方法。

**【請求項 6 5】**

対照サンプルが健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体由来である、請求項 6 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 6 6】**

前記方法が前記被験体のEphB受容体関連障害を診断することを目的とする、請求項 6 1 または 6 4 に記載の方法。

**【請求項 6 7】**

被験体がヒトである、請求項 6 1、6 3、6 4 または 6 5 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関係出願**

本出願は、参照により本明細書にその全てが組み入れられる米国予備特許出願第60/844 ,851号（2006年9月15日出願）の優先権を主張する。 10

**【0 0 0 2】****政府の関与**

本発明は、米国国立衛生研究所（National Institutes of Health）による認可番号CA1 16099、CA82713およびHD25938、ならびに米国国防総省（Department of Defense）による認可番号DAMD17-01-1-0168のもとで、政府支援を受けて行われたものである。米国政府は本発明にある特定の権利を有しうる。

**【0 0 0 3】****1. 発明の分野**

本発明は、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6 を含むEphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合する、ペプチドに基づく化合物を提供する。特に、本発明はEphB受容体と選択的に結合する多量体ペプチドを提供する。本発明はまた、前記EphB受容体結合化合物と製薬上許容される担体または賦形剤とを含むものである医薬組成物を含む組成物も提供する。EphB受容体ファミリーのメンバーと選択的にまたは特異的に結合する化合物を同定する方法も提供する。 20

**【背景技術】****【0 0 0 4】****2. 発明の背景**

Eph受容体は受容体型チロシンキナーゼの大ファミリーであって、エフリンと呼ばれるリガンドのファミリーと結合することにより、発生中のならびに成熟した組織における多数の生物学的プロセスを調節する（Murai & Pasquale, 2003, J Cell Sci 116:2823-2832）。現在、14種のEph受容体（EphA1～A8およびEphB1～B6）および8種のエフリンリガンド（エフリンA1～A5およびエフリン-B1～B3）が哺乳動物で同定されている（例えば、the Eph Nomenclature Committeeによる“Unified Nomenclature For Eph Family Receptors And Their Ligands, The Ephrins”（Cell 90:403-404, 1997に複製あり）；およびZhou et al., 1998, Pharmacol. Ther. 77:151-181を参照）。エフリンリガンドはEphAとEphBクラスの受容体に分類することができる。エフリン-AリガンドはEphA受容体と結合し、例外としてエフリン-A5は高濃度ではEphB2と結合しうる（Himanen et al, 2004, Nat Neurosci 7:501-509）。エフリン-BリガンドはEphB受容体ならびにEphA4と結合する（Gale et al., 1996, Neuron 17:9-19; Kullander & Klein, 2002, Nat Rev Mol Cell Biol 3:475-486）。しかし、同じクラスに属するEph受容体とエフリンの間の相互作用は極めて乱交雜である（Murai & Pasquale, 2003, J Cell Sci 116:2823-2832; Kullander & Klein, 2002, Nat Rev Mol Cell Biol 3:475-486; Flanagan & Vanderhaeghen, 1998, Annu Rev Neurosci 21:309-345）。一般的に、Eph受容体とそのリガンドとの結合は、受容体クラスター形成、トランスリン酸化、および下流シグナル伝達を誘発する。EphA2などのある特定のEph受容体については、アゴニストにより引き起こされるチロシンリン酸化は受容体自己リン酸化、受容体およびアゴニストの内部化ならびに次いで受容体分解に介在する（Zantek, N.D. et al. 1999 Cell Growth Differ 10:629-638; Carles-Kinch, K. et al. 2002 Cancer Res 62:2840-2847; Van der Geer, P. et al. 1994 Annu Rev Cell Biol 10:251-337）。 40 50

**【 0 0 0 5 】**

Eph受容体は様々な健康な組織において差別的に発現され (Hafner et al., 2004, Clinical Chem 50:490-499)、疼痛処理 (Battaglia et al., 2003, Nat Neurosci 6:339-340)、血小板凝集、胚形成 (Holder & Klein, 1999, Devel. 126:2033-2044)、神経発生、細胞遊走および接着 (Prevost et al., 2005, PNAS USA 102:9820-9825) などの正常な機能の様々な態様に関係があるとされている。さらにこれらの受容体は、幹細胞の自己更新-対-細胞死決定のバランスおよび分化にある役割を果たすと報じられている (Conover et al., 2000, Nat Neurosci 3:1091-1097 ; Aoki et al., 2004, J Biol Chem 279:32643-32650 ; Moore et al., 2004, Dev Cell 6:55-67)。Eph受容体はまた、様々な病理学プロセスに関係があるとされており、それには、腫瘍進行 (Dodelet & Pasquale, 2000, Oncogene 19:5614-5619 ; Nakamoto & Bergemann, 2002, Microsc Res Tech 59:58-67 ; Walker-Daniels et al., 2003, Am J Pathol 162:1037-1042 ; Hu et al., 2005, Cancer Res 65:2542-2546 ; Hafner et al., 2004, Clin Chem 50:490-499)、血管形成の病理形態 (Adams & Klein, 2000, Trends Cardiovasc Medicine 10:183-188 ; Brantley-Sieders & Chen, 2004, Angiogenesis 7:17-28 ; Noren et al., 2004, PNAS USA 101:5583-5588 ; Cheng et al., 2002, Cytokine & Growth Factor Rev. 13:75-85)、組織損傷後の慢性疼痛 (Battaglia et al., 2003, Nat Neurosci 6:339-340)、脊椎損傷後の神経再生の阻害 (Goldshmit et al., 2004, J Neurosci 24:10064-10073)、およびヒト先天性形成異常 (Twigg et al., 2004, PNAS USA 101:8652-8657 ; Wieland et al., 2004, Am J Hum Genet 74:1209-1215) が含まれる。

10

20

**【 0 0 0 6 】**

特定のEph受容体は癌を含む様々な疾患プロセスに関係があるとされている。例えば、EphA2は、発現すると非トランスフォーム乳房上皮細胞に悪性トランスフォーメーションおよび腫瘍化潜在能を与えるのに十分強力な腫瘍性タンパク質であって、前立腺癌および乳癌などの数多くの攻撃性癌細胞においてアップレギュレートされることが示されている (Walker-Daniels, 1999, Prostate 41:275-280 ; Zelinski et al., 2001, Cancer Res. 61:2301-2306 ; Carles-Kinch et al., 2002, Cancer Res. 62:2840-2847)。成人の肝臓、肺、腎臓、腸、胎盤、筋肉および心臓組織において高レベルで転写されるEphB受容体ファミリー、EphB4 (Zhou et al., 1998, Pharmacol. Ther. 77:151-181) については、大腸癌 (Stephenson et al., 2001, BMC Mol. Biol. 2:15)、乳癌 (Wu et al., 2004, Pathology Oncology Res. 10:26-33) ならびに前立腺癌 (Lee et al., 2005, BMC Cancer 5:119) でアップレギュレートされることが示されている。さらに、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4およびEphB6は、いくつかの小細胞肺癌系において高レベルで発現されることが示されている (Tang et al., 1999, Clin. Cancer Res. 5:455-460)。従って、Eph受容体は癌治療の有用な標的でありうる。

30

**【発明の概要】****【 0 0 0 7 】****3. 本発明の概要**

本発明は、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6を含むEphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合する化合物を提供する。具体的な実施形態において、本発明は、EphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合してエフリン-Bリガンド（例えば、エフリン-B1、エフリン-B2およびエフリン-B3）とEphB受容体との結合を競合するおよび/または前記結合を阻害する多量体ペプチドであって、2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む前記多量体ペプチドを提供する。さらに具体的な実施形態において、本発明は配列番号1～75により同定される、または下記の表1に開示した2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む多量体ペプチドを提供する。多量体ペプチドは2以上の同じものであるEphB受容体結合ペプチドを含んでもよく、または少なくとも1以上の異なるEphB受容体結合ペプチド（配列番号1～75により同定される、または下記の表1に開示した）を含んでもよい。ある具体的な実施形態において、多量体ペプチドは少なくとも2つの、配列番号39のアミノ酸配列を有するEphB受容体結合ペプチド（例えば、二量体であ

40

50

る)を含む。他の具体的な実施形態において、多量体ペプチドは少なくとも2つの、配列番号41のアミノ酸配列を有するEphB受容体結合ペプチド(例えば、二量体である)を含む。

#### 【0008】

他の実施形態においては、本発明は1以上のEphB受容体結合ペプチド(好ましくは、2以上の)と異種化合物を含むコンジュゲートであって、エフリン-Bリガンド(例えば、エフリン-B1、エフリン-B2およびエフリン-B3)とEphB受容体との結合を競合するおよび/または前記結合を阻害する前記コンジュゲートを提供する。具体的な実施形態において、本発明は、配列番号1~75により同定される、または下記の表1に開示した1以上の(ある具体的な一実施形態においては、2以上の)EphB受容体結合ペプチドと異種化合物を含むコンジュゲートであって、前記コンジュゲートがエフリン-Bリガンド(例えば、エフリン-B1、エフリン-B2およびエフリン-B3)とEphB受容体との結合を競合するおよび/または前記結合を阻害する前記コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、異種化合物は、ポリエチレングリコール(PEG)、IgG免疫グロブリン(例えば、ヒトIgG1免疫グロブリン)のFc領域またはその断片(例えば、CH2またはCH3ドメイン)、または他の治療または診断薬である。コンジュゲートは2以上の同じものであるEphB受容体結合ペプチドを含んでもよく、または、少なくとも1つのペプチドが他のペプチド(例えば、配列番号1~75により同定される、または下記の表1に開示したEphB受容体結合ペプチド)と異なる少なくとも2以上の異なるEphB受容体結合ペプチドを含んでもよい。ある具体的な実施形態において、コンジュゲートは融合タンパク質である。ある具体的な実施形態において、異種化合物は治療薬、診断薬、細胞傷害薬またはマーカーでない。他の具体的な実施形態において、異種化合物を含むコンジュゲートはEphB受容体結合ペプチドのペプチドPEG化、グリコシル化、アセチル化、ホルミル化、アミド化、リン酸化または他の類似した化学的修飾により作製されるものでない。他の具体的な実施形態において、異種化合物はビオチンでない。

#### 【0009】

ある具体的な実施形態において、コンジュゲートは、配列番号1~75により同定されるまたは下記の表1に開示した1以上のEphB受容体結合ペプチドおよびヒトIgG1免疫グロブリンのFc領域またはその断片(例えば、CH2またはCH3ドメイン)を含む。他の具体的な実施形態において、コンジュゲートは、配列番号39のアミノ酸配列およびヒトIgG1免疫グロブリンのFc領域またはその断片(例えば、CH2またはCH3ドメイン)を有するEphB受容体結合ペプチドを含む。他の具体的な実施形態において、コンジュゲートは配列番号41のアミノ酸配列およびヒトIgG1免疫グロブリンのFc領域またはその断片(例えば、CH2またはCH3ドメイン)を有するEphB受容体結合ペプチドを含む。ある特定の実施形態において、1以上のEphB受容体結合ペプチドは、当技術分野で公知のコンジュゲート合成用の技法を用いて、すなわち、組換え体/遺伝子工学を用いて、または化学的方法により、異種化合物と連結されている。かかる方法の例は下記第5.1節に開示されている。EphB結合コンジュゲートを作製するために用いられる様々な化学およびペプチドリンクーも下記第5.1節に開示されている。

#### 【0010】

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物はアゴニスト作用を有する(例えば、Eph受容体クラスター形成、トランスリン酸化、下流シグナル伝達、EphB受容体インターナリゼーションおよび/または分解を誘発する)。

#### 【0011】

他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はアンタゴニスト作用を有する(例えば、EphB受容体クラスター形成、トランスリン酸化、下流シグナル伝達、EphB受容体インターナリゼーションおよび/または分解を阻害する)。

#### 【0012】

本発明はさらに、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を同定するおよび作製する方法を提供する。EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を同定

10

20

30

40

50

する方法としては、限定されるものでないが、ハイスループットスクリーニングアッセイなどが挙げられる。EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を作製または生産する方法としては、限定されるものでないが、組換え/遺伝子工学的方法および/または化学合成が挙げられる。かかる方法のさらに詳細な説明は、下記第5.1節を参照されたい。

### 【0013】

具体的な実施形態において、本発明はさらに、EphB受容体結合ペプチド（例えば、表1に掲げられたもの）またはEphB受容体結合化合物の配列がアミノ酸残基欠失、付加および/または置換の導入により改変されている、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物の誘導体を提供する。具体的な実施形態において、前記誘導体はより安定であり（例えば、タンパク質分解に対してより耐性がある）かつ1以上のEphB受容体に対して増加した結合親和性を有する。EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の誘導体を作製または生産する方法は当業者に公知でありかつ下記第5.1節で考察される。

10

### 【0014】

ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と、少なくとも $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の $k_{on}$ 速度で選択的に結合する。

20

### 【0015】

他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と、 $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-1}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-3}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-4}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-5}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-6}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-7}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-8}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-9}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-10}\text{s}^{-1}$ 以下、または $10^{-10}\text{s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度で選択的に結合する。

20

### 【0016】

他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は選択的にEphB受容体と、少なくとも $10^{11}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{13}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{14}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{15}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{15}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{16}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{16}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{17}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{17}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{18}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{18}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{19}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{19}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{20}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{20}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{21}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{21}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{22}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{22}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{23}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{23}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{24}\text{nM}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^{24}\text{nM}^{-1}$ の $K_a$  ( $k_{on}/k_{off}$ ) で結合する。

30

### 【0017】

さらに他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は選択的にEphB受容体と、 $5 \times 10^7\text{nM}$ 以下、 $10^7\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^6\text{nM}$ 以下、 $10^6\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^5\text{nM}$ 以下、 $10^5\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^4\text{nM}$ 以下、 $10^4\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^3\text{nM}$ 以下、 $10^3\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^2\text{nM}$ 以下、 $100\text{nM}$ 以下、 $90\text{nM}$ 以下、 $80\text{nM}$ 以下、 $70\text{nM}$ 以下、 $60\text{nM}$ 以下、 $50\text{nM}$ 以下、 $10\text{nM}$ 以下、 $5\text{nM}$ 以下、 $3.8\text{nM}$ 以下、 $1\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-1}\text{nM}$ 以下、 $10^{-1}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-2}\text{nM}$ 以下、 $10^{-2}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-3}\text{nM}$ 以下、 $10^{-3}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-4}\text{nM}$ 以下、 $10^{-4}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-5}\text{nM}$ 以下、 $10^{-5}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-6}\text{nM}$ 以下、または $10^{-6}\text{nM}$ 以下の $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) で結合する。

40

### 【0018】

一実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と結合しつつ当技術分野で周知のまたは本明細書に記載の方法、例えば、ELISAにより測定すると、 $5 \times 10^7\text{nM}$ 未満、 $10^7\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^6\text{nM}$ 未満、 $10^6\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^5\text{nM}$ 未満、 $10^5\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^4\text{nM}$ 未満、 $10^4\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^3\text{nM}$ 未満、 $10^3\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^2\text{nM}$ 未満、 $100\text{nM}$ 未満、 $90\text{nM}$ 未満、 $80\text{nM}$ 未満、 $70\text{nM}$ 未満、 $60\text{nM}$ 未満、 $50\text{nM}$ 未満、 $40\text{nM}$ 未満、 $30\text{nM}$ 未満、 $20\text{nM}$ 、 $12\text{nM}$ 未満、 $5\text{nM}$ 未満、 $1\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^{-1}\text{nM}$ 未満、 $10^{-1}\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^{-2}\text{nM}$ 未満、 $10^{-2}\text{nM}$ 未満、 $5 \times 10^{-3}\text{nM}$ 未満

50

、 $10^{-3}$ nM未満、 $5 \times 10^{-4}$ nM、または $10^{-4}$ nM未満のIC<sub>50</sub>値を有する。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB4と結合しあつ当技術分野で周知のまたは本明細書に記載の方法、例えば、ELISAにより測定すると、ほぼ1nM～ほぼ10nM、ほぼ10nM～ほぼ10<sup>2</sup>nM、ほぼ10<sup>2</sup>nM～ほぼ10<sup>3</sup>nM、ほぼ10<sup>3</sup>nM～ほぼ10<sup>4</sup>nM、ほぼ10<sup>4</sup>nM～ほぼ10<sup>5</sup>nM、ほぼ10<sup>5</sup>nM～ほぼ10<sup>6</sup>nM、またはほぼ10<sup>6</sup>nM～ほぼ10<sup>7</sup>nMの近似的なIC<sub>50</sub>値を有する。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB4と結合しあつほぼ0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150nMのIC<sub>50</sub>値を有する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB4と結合しあつほぼ12nMまたはほぼ16nMのIC<sub>50</sub>値を有する。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物はマウスEphB4と結合する。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はヒトEphB4と結合する。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB4と選択的に結合し、かつEphB4受容体のエフリンB2リガンドとの結合をほぼ69nM、ほぼ70nM、ほぼ75nM、またはほぼ80nMのIC<sub>50</sub>値にて阻害する。

10

## 【0019】

本発明はさらに、限定されるものでないが、新生物疾患、癌、血管疾患（例えば、黄斑変性症）、神経疾患、血管形成の病理形態、組織損傷後の慢性疼痛、脊椎損傷後の神経再生の阻害、およびヒト先天性形成異常を含む、EphB受容体関連疾患を予防、治療および／または管理するように設計した組成物ならびに予防および治療レジメンを提供する。具体的な実施形態において、EphB受容体関連疾患は、例えば、癌のような、EphB受容体ファミリーの1以上のメンバーを過剰発現する細胞を含む。本明細書に提示した方法を用いて予防、治療および／または管理する癌としては、上皮または内皮細胞起源の癌が挙げられる。かかる癌の例としては、限定されるものでないが、中皮腫、卵巣癌、膀胱癌、頭部および頸部の扁平上皮癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、小細胞肺癌および神経起源の癌が挙げられる。

20

## 【0020】

ある具体的な実施形態において、組成物は1以上のEphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）および製薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる組成物はさらに、追加の療法、例えば、化学療法、ホルモン療法および／または生物学的療法、免疫療法を含むものであり、放射線療法および／または手術と一緒に投与することができる。従って、EphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチド および／または コンジュゲート）を、1以上の本明細書に記載のさらなる療法の治療上または予防上有効な量と一緒に投与することができる。1以上の追加の療法は、EphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチド および／または コンジュゲート）の投与と同時に、その投与前にまたはその投与後に投与することができる。

30

## 【0021】

これらの方法と組成物は未治療の患者に有用であるだけでなく、限定されるものでないが、化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法、および／または手術を含むEphB受容体関連疾患に対する現行の標準的および実験的療法に部分的または完全に不応性である患者の治療にも有用である。従って、いくつかの実施形態において、本発明は、EphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）の投与を含まない療法に不応性または非応答性であるかまたはありうることが示されているEphB受容体関連疾患を、治療、予防および／または管理するための治療および予防の方法を提供する。ある具体的な実施形態においては、1以上のEphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）を非EphB受容体結合化合物に基づく療法に不応性または非応答性の患者に投与し、その患者を非不応性または応答性にする。次いで患者が今まで不応または非応答であった療法を投与して治療効果をもたらすことができる。

40

## 【0022】

本発明は、それを必要とする被験体に有効量の単離されたEphB受容体結合化合物を投与

50

するステップを含む、EphB受容体関連疾患を予防、治療または管理する方法を提供する。具体的な実施形態において、本発明は、それを必要とする被験体に、その被験体から腫瘍を除去した後に治療的に有効量の単離されたEphB受容体結合化合物を投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。他の実施形態においては、本発明は、それを必要とする被験体に予防的にまたは治療的に有効な量の単離されたEphB受容体結合化合物を投与するステップを含む、癌の再発を予防または治療する方法を提供する。特別な実施形態において、本発明は、EphB受容体発現細胞（例えば、EphB受容体を異常に発現する細胞）の数を低下させる方法およびEphB受容体発現細胞（例えば、EphB受容体を異常に発現する細胞）の増殖を抑制する方法であって、前記細胞を有効量の単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップを含む前記方法を提供する。本発明はまた、腫瘍のサイズを低下させる方法および腫瘍の成長を防止する方法であって、腫瘍を有効量の単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップを含む前記方法も提供する。

#### 【0023】

本発明はさらに、EphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）を用いて被験体のEphB関連疾患を診断、予後判定、またはモニターする方法であって、EphB受容体関連疾患について、EphB受容体結合化合物に基づくかまたは非EphB受容体結合化合物に基づくか二者択一の治療の効力を評価する前記方法を提供する。例えば、限定されるものでないが、EphB2またはEphB4発現の増加は、ますます浸潤性および転移性の癌に関連しうる。従って、ある特別な治療によるEphB2またはEphB4発現の低下は、その治療がEphB2またはEphB4に関連する癌の浸潤および／または転移潜在能を低下させることを示す。特別なEphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）の効力を測定するための他の決定要因または終点としては、細胞増殖、EphB受容体トランスリン酸化、EphB受容体クラスター形成およびEphB受容体分解が挙げられる。癌の関係では、アゴニスト性のEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチドまたはそのコンジュゲート）が有効であるかどうかを試験するためには、EphB受容体結合化合物を患者からの細胞、例えば、癌細胞と接触させ、次いでアッセイを実施して、癌細胞の増殖、EphB受容体クラスター形成、トランスリン酸化、インターナリゼーションおよび／または分解などの様々な終点に与えるEphB受容体結合化合物の効果を測定する。ある具体的な実施形態において、もし(1)対照と比較して癌細胞増殖の減少または阻害がある；(2)対照と比較してEphB受容体トランスリン酸化の増加がある；(3)対照と比較して、EphB受容体クラスター形成の増加がある；(4)対照と比較して、EphB受容体インターナリゼーションの増加がある；(5)対照と比較して、EphB受容体分解の増加がある；(6)対照と比較して、アポトーシスの増加がある；または(7)対照と比較して、細胞遊走/浸潤の減少または阻害がある；のであれば、アゴニスト性のEphB受容体結合化合物は有効であると決定される。他の具体的な実施形態において、もし(1)対照と比較して癌細胞増殖の減少または阻害がある；(2)対照と比較してEphB受容体トランスリン酸化の減少がある；(3)対照と比較して、EphB受容体クラスター形成の減少がある；(4)対照と比較して、EphB受容体インターナリゼーションの減少がある；または(5)対照と比較して、EphB受容体分解の減少がある；のであれば、アンタゴニスト性のEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）は有効であると決定される。かかる終点を測定する方法は当業者に公知であり、かつ下記第5.3節でさらに記載される。

#### 【0024】

本明細書に提示したのは、EphB受容体結合化合物を利用するEphB受容体関連疾患の検出および診断の方法である。特別な実施形態において、本明細書に提示した検出および診断の方法は、原発腫瘍部位の遠位の組織および体液、例えば、全血、痰、尿、血清、細針吸引液（すなわち、バイオプシー）を用いて、転移をイメージングおよび限局化する方法、および診断および予後判定の方法（ならびに、原発腫瘍の組織および体液を用いる方法）を提供する。他の実施形態において、本明細書に提示した診断方法は、*in vivo*で転移をイメージングおよび限局化する方法および診断および予後判定する方法を提供する。かかる実施形態においては、原発転移性腫瘍を、EphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に

10

20

30

40

50

記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）を用いて検出する。EphB受容体結合化合物はまた、凍結したまたは固定した細胞または組織アッセイの免疫組織化学分析に用いることもできる。

#### 【0025】

本発明はさらに、EphB受容体結合化合物を単独でまたは他の治療または診断試薬と組合させて含むキットを提供する。

#### 【0026】

##### 3.1 定義

本明細書に使用する用語「約」および「ほぼ」が数値または数字の範囲を修飾するのに使用される場合、その値または範囲からの合理的な偏差、典型的には、その値の10%上および10%下の値または範囲は、記載の値または範囲の意図する意味内に含まれることを意味する。

10

#### 【0027】

本明細書に使用する用語「薬剤」は、所望の生物学的効果を有する分子を意味する。薬剤は予防薬、治療薬または診断薬であってもよい。薬剤としては、限定されるものでないが、ペプチド（かかるペプチドの二量体および多量体を含む）、ポリペプチド、転写後改変されたタンパク質を含むタンパク質、コンジュゲート、抗体、などを含む、タンパク質性分子；無機または有機化合物を含む、小分子（1000ダルトン未満）；限定されるものでないが、2本鎖または1本鎖DNA、または2本鎖または1本鎖RNA（例えば、アンチセンス、RNAi、など）、イントロン配列、三重らせん核酸分子およびアプタマーを含む核酸分子；またはワクチンが挙げられるがこれらに限られるものではない。薬剤はいずれかの公知の生物由来（限定されるものでないが、動物、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルスを含む）または合成分子のライブラリー由来であってもよい。

20

#### 【0028】

本明細書に使用する「アゴニスト」または「アゴニスト性の」は、受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的に結合し、EphB受容体のシグナル伝達を誘発する（例えば、EphB受容体クラスター形成、トランスリン酸化および／または下流シグナル伝達経路の活性化を生起する）薬剤（例えば、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物）を意味する。

30

#### 【0029】

本明細書に使用する「アンタゴニスト」または「アンタゴニスト性の」は、受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的に結合し、EphB受容体のシグナル伝達を阻害するかまたは低下させる（例えば、EphB受容体クラスター形成、トランスリン酸化および／または下流シグナル伝達経路の活性化を阻害するかまたは低下させる）薬剤を意味する。

#### 【0030】

本明細書において、受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するペプチド、および特に、下記の表1に開示されたペプチドの関係で使用する用語「類似体」は、第2のペプチドと類似したまたは同一の機能を所持するが、必ずしも第2のペプチドと類似したまたは同一のアミノ酸配列または構造を含むものでないペプチドを意味する。類似のアミノ酸配列を有するペプチドは、少なくとも次の1つを満たす第1のペプチドを意味する：(a) 第2のペプチドのアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する第1のペプチド；

40

(b) 第2のペプチドの100以下のアミノ酸残基、90以下のアミノ酸残基、80以下のアミノ酸残基、70以下のアミノ酸残基、60以下のアミノ酸残基、50以下のアミノ酸残基、40以下のアミノ酸残基、30以下のアミノ酸残基、20以下のアミノ酸残基、12以下のアミノ酸残基、10以下のアミノ酸残基、8以下のアミノ酸残基、最小限で4または5アミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配

50

列がコードする第1のペプチド；(c)第2のペプチドをコードするヌクレオチド配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列がコードする第1のペプチド。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドの類似体はペプチドミメチックである。

#### 【0031】

第2のペプチドと類似の構造をもつペプチドは、類似の二次、三次または四次のペプチドの構造を有するペプチドを意味する。ペプチドの構造は、限定されるものでないが、X線結晶学、核磁気共鳴、および結晶学的電子顕微鏡を含む、当業者に公知の方法により決定することができる。10

#### 【0032】

2つのアミノ酸配列のまたは2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するためには、配列を、最適な比較のためにアラインメントする（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列と最適なアラインメントとなるように、第1のアミノ酸または核酸配列にギャップを導入することができる）。次いで対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められていると、その分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、同一性パーセント = 同一の重複位置の数 / 位置の全数 × 100%）。一実施形態において、2つの配列は同じ長さである。20

#### 【0033】

2つの配列間の同一性パーセントの決定はまた、数学アルゴリズムを用いて実施することもできる。2つの配列を比較するために利用される、限定されるものでない数学アルゴリズムの例は、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268、およびその改訂版であるKarlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403) に組込まれている。BLAST又ヌクレオチド検索をNBLASTヌクレオチドプログラムパラメーターセット、例えばスコア=100、ワード長=12を用いて実施して、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラムパラメーターセット、例えばスコア=50、ワード長=3を用いて実施して、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較の目的でギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載のギャップ付きBLASTを利用することができる。あるいはPSI-BLASTを用いて繰り返し検索を行い、分子間の遠隔関係性を検出することができる（同著）。BLAST、ギャップ付きBLAST、および PSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを利用できる（例えば、NCBIウェブサイトを参照）。配列を比較するために利用される数学アルゴリズムの他の限定されるものでない例はMyers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムを、GCC配列アラインメント・ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組込む。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120加重残基表、ギャップ長さペナルティ12、およびギャップペナルティ4を利用できる。3040

#### 【0034】

2つの配列間の同一性パーセントは前記の技法と類似した技法を用いてギャップを認めるかまたは認めないで決定することができる。同一性パーセントの計算において、典型的には正確な一致（マッチ）だけを数える。

#### 【0035】

受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的に結合するペプチド以外の有機もしくは無機分子の関係で、本明細書に使用する用語「類似体」は、第1の有機もしくは無機分子と類似したまたは同一の機50

能を有しかつ第1の有機もしくは無機分子と構造的に類似してた第2の有機もしくは無機分子を意味する。

【0036】

本明細書に使用する用語「癌」は、細胞の異常な無制御な成長から生じる新生物または腫瘍を意味する。限定するものでない例としては、下記の第5.2.2.1節に記載したこれらの癌が挙げられる。用語「癌」は前悪性および悪性両方の癌細胞に関わる疾患を包含する。いくつかの実施形態において、癌は被験体の他の部分へ拡がってない細胞の限局性過増殖、すなわち、良性腫瘍を意味する。他の実施形態において、「癌」は、遠位部位に転移する潜在能を有し、非癌細胞と異なる表現型形質、例えば、軟寒天などの三次元基質中のコロニー形成または三次元基底膜もしくはMATRIGEL(登録商標)などの細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワークもしくはウェブ様マトリックスの形成を示す細胞に関わる疾患を意味する。非癌細胞は、軟寒天中でコロニーを形成せず、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中で分離した中空の球様構造を形成しうる。用語「癌細胞」は、前悪性癌細胞および悪性癌細胞の両方を包含することを意味する。10

【0037】

EphB受容体結合化合物の関係で本明細書に使用する用語「コンジュゲート」は、EphB受容体ファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合する薬剤であって、2以上のEphB受容体結合ペプチド（例えば、下記の表1に開示されたもの）、または1以上のEphB受容体結合ペプチドと異種化合物とを含む前記薬剤を意味する。従って、コンジュゲートの関係での用語「異種化合物」は、それがコンジュゲートしているEphB受容体結合ペプチドとアミノ酸配列および/または構造が異なる任意の化合物を意味する。コンジュゲートの成分は、非共有結合または共有結合（例えば、ペプチド結合を介してアミノ酸配列を結合することにより）を用いて直接融合していてもよいし、および/または1以上のリンカーを用いて結合していてもよい。コンジュゲートを調製するために好適なリンカーとしては、2以上の成分を一緒に結合してEphB受容体結合化合物を得ることができる、ペプチド、アルキル基、化学的に置換されたアルキル基、ポリマー、またはいずれかの他の共有結合もしくは非共有結合した化学物質が挙げられる。ポリマーリンカーには、ポリエチレンギリコール（PEG）を含む、当技術分野で公知のいずれかのポリマーが含まれる。当技術分野で公知のおよび/または本明細書に記載の化学合成法を利用して、PEGを1以上のEphB受容体結合ペプチド（ならびにその類似体または誘導体）とカップリングすることにより、コンジュゲートを調製し、それによりEphB受容体結合化合物を提供することができる。ある具体的な実施形態において、コンジュゲートは、ペプチド結合を介して一緒に連結された2つのタンパク質性分子を含む、EphB受容体ファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5、またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合する融合タンパク質である。20

【0038】

EphB受容体ファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5、またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するペプチドの関係で、本明細書に使用する用語「誘導体」は、アミノ酸残基欠失、付加および/または置換の導入により改変されたアミノ酸配列を含むペプチドを意味する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドの関係での誘導体は、第2のEphB受容体結合化合物のアミノ酸配列と、1~8、1~6、1~4、1~3、1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸欠失を除いて同一のアミノ酸配列から構成されるEphB受容体結合化合物を意味する。他の実施形態において、用語「誘導体」は、EphB受容体結合ペプチドの関係で、第2のEphB受容体結合化合物のアミノ酸配列と、1~5、1~4、1~3、1、2、3、4、5個のアミノ酸残基置換を除いて同一のアミノ酸配列から構成されるEphB受容体結合化合物を意味する。他の実施形態においては、用語「誘導体」は、EphB受容体結合ペプチドの関係で、第2のEphB受容体結合化合物のアミノ酸配列と、EphB受容体結合化合物のアミノまたはカルボキシ末端における1~12、1~10、1~8、1~6、1~4、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のアミノ酸残基の付加を除いて同一のアミノ酸配列から構成されるEphB受容体結合化合物を意味する。さら< span style="float: right;">30

に他の実施形態においては、用語「誘導体」は、EphB受容体結合ペプチドの関係で、第2のEphB受容体結合化合物のアミノ酸配列と、1~8、1~6、1~4、1~3、1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸残基欠失および置換、アミノ酸残基欠失および付加、アミノ酸残基置換および付加、またはアミノ酸残基欠失、置換および付加の組合せを除いて、同一のアミノ酸配列から構成されるEphB受容体結合化合物を意味する。

#### 【0039】

EphB受容体結合ペプチドの誘導体はまた、限定されるものでないが、化学修飾により、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む当業者に公知の技法を用いて、作製することもできる。さらに、EphB受容体結合ペプチドの誘導体は1以上の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

10

#### 【0040】

受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するペプチドの誘導体は、それが由来するEphB受容体結合ペプチドと同一の機能を保持する。一実施形態において、EphB受容体結合化合物の誘導体はエフリン-Bリガンドと類似したまたは同一の機能を保持する。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチド誘導体は、それが由来するEphB受容体結合ペプチドと比較すると、改善された活性を有する。例えば、EphB受容体結合ペプチド誘導体は、それが由来するEphB受容体結合ペプチドよりもEphB受容体ともっと強く結合できるおよび/またはタンパク質分解にもっと耐性がある。

20

#### 【0041】

本明細書に使用する「検出可能な標識」または「イメージング剤」は、ある化合物と共有結合すると、その化合物の検出を可能にする物質を意味し、前記検出には、例えば、限定されるものでないが、Eph受容体結合剤（例えば、Eph受容体結合化合物）と選択的にまたは特異的に結合する薬剤を投与した患者におけるin vivoでの検出が含まれる。好適な検出可能な標識は当技術分野で公知であり、それらとしては、例えば、ビオチン、アルカリホスファターゼ、放射性同位体、蛍光標識（例えば、フルオレセイン）などが挙げられる。利用する特別な検出可能な標識は重要でなく、使用する標識の量ならびに使用する標識の量でのその標識の毒性を比較して選択する。かかる要因に関連する標識の選択は当業者内で周知である。

30

#### 【0042】

検出可能な標識とペプチドまたはペプチドミメチックとの共有結合は、当技術分野で周知の慣用の方法により行う。例えば、<sup>125</sup>I放射性同位体を検出可能な標識として使用する場合、<sup>125</sup>Iのペプチド、ペプチドミメチックまたはそれらの多量体との共有結合は、アミノ酸チロシンをペプチドまたはペプチドミメチック中に組み込み、次いでそのペプチドをヨウ素化することにより行うことができる（例えば、Werner, et al. 1994 Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, pp. 137-140を参照）。もしチロシンがペプチドまたはペプチドミメチック中に存在しなければ、チロシンのペプチドまたはペプチドミメチックのアミノまたはカルボキシ末端への組み込みを周知の化学により行うことができる。同様に、<sup>32</sup>Pをペプチドまたはペプチドミメチック中にリン酸塩部分として、ペプチドまたはペプチドミメチック上のヒドロキシリル基を介して組み込むことができる。

40

#### 【0043】

用語「疾患」および「障害」は互換的に使用することができ、症状、特に、病理症状、そしてさらに特にEphB関連疾患を意味する。

#### 【0044】

予防および/または治療の有用性の関係で、本明細書に使用する用語「有効量」は、被験体において有益な予防または治療効果を有する療法（例えば、予防薬または治療薬）の量を意味する。ある具体的な実施形態において、有効量は次の1つ、2つ、3つ以上の効果をもたらすのに十分な療法の量である：(1) 疾患またはその症候の重篤度を軽減するおよび/または改善する；(2) 疾患またはその症候の期間を短縮する；(3) 疾患の進行

50

を防止する；(4)前記疾患の後退を生じる；(5)疾患またはその症候の再発、進展、または発症を防止する；(6)疾患の症候群数を低下させる；(7)入院期間を短縮する；(8)再発を減ずる；(9)異なる細胞、組織、および／または器官への疾患の伝播を減ずる；(10)死亡率を低下させる；(11)生存率を増加する；(12)腫瘍サイズを減少する；(13)EphB受容体を発現する細胞（例えば、EphB受容体を異常に発現する細胞）の増殖を阻害または低減する；(14)EphB受容体を発現する細胞（EphB受容体を異常に発現する細胞）の数を低下させる；および／または(15)他の療法（例えば、予防薬または治療薬）の予防または治療効果を増強するまたは改善する。EphB受容体結合化合物の有効量の限定されるものでない例を下記の第5.4.3節に与える。

## 【0045】

10

本明細書に使用する用語「内因性リガンド」または「天然リガンド」は、特別な受容体と*in vivo*で通常結合する分子を意味する。例えば、限定するものではないが、A型エフリンリガンド（例えば、エフリンA1、エフリンA2、エフリンA3、エフリンA4およびエフリンA5）のいずれかは、A型Eph受容体（例えば、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7およびEphA8）のいずれかと結合しうる；そして、B型エフリンリガンド（例えば、エフリン-B1、エフリン-B2およびエフリン-B3）のいずれかはB型Eph受容体（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6）のいずれかと結合しうる。また、例であって、限定でないが、EphA4は、本明細書に記載の通り、A型とB型の両方のエフリンリガンドと結合しうる。

## 【0046】

20

本明細書に使用する用語「Eph受容体」または「Eph受容体チロシンキナーゼ」は、当業者により同定および認識されたまたはされうる任意のEph受容体を意味する（例えば、Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90:403-404を参照）。EphB受容体には、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6が含まれる。ある具体的な実施形態において、EphB受容体は任意の種由来である。ある具体的な実施形態において、EphB受容体はヒトである。Eph受容体のヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列は、文献または公共データベース中に見出すことができる（例えば、GenBank）か、または該ヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列は当業者に公知のクローニングおよび配列決定技法を用いて決定することができる。Eph受容体のアミノ酸配列に対するGenBank受託番号の限定されるものでない例としては、P54762（ヒトEphB1）；NP\_059145（ヒトEphB2）；NP\_004434（ヒトEphB3）；A54092（ヒトEphB4）；およびNP\_004436（ヒトEphB6）が挙げられる。

30

## 【0047】

40

本明細書に使用する用語「エフリン」または「エフリンリガンド」は、当業者により同定および認識されたまたはされうる任意のエフリンリガンドを意味する（例えば、Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90:403-404を参照）。本明細書に使用する「エフリン-B」は、エフリン-Bリガンドサブクラスのメンバーである任意のエフリンを含む。本発明のエフリンには、限定されるものでないが、エフリン-B1、エフリン-B2およびエフリン-B3が含まれる。ある具体的な実施形態において、エフリンは任意の種由来である。ある具体的な実施形態において、エフリンはヒトである。エフリンのヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列は、文献または公共データベースに見出すことができ（例えば、GenBank）、または該ヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列は当業者に公知のクローニングおよび配列決定技法を用いて決定することができる。エフリン-Bリガンドのアミノ酸配列に対するGenBank受託番号の限定されるものでない例としては、S46993（ヒトエフリンB1）；2108400B（ヒトエフリンB2）；およびNP\_501955（エフリンB3）が挙げられる。

## 【0048】

50

本明細書に使用する用語「EphB受容体結合ペプチド」は、受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するペプチドを意味し、それらの類似体および誘導体を含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは最小で4または5個のアミノ酸残基および最大で50

個のアミノ酸残基を含む。EphB受容体結合ペプチドの例を下記の表1に開示する。

#### 【0049】

本明細書に使用する用語「EphB受容体結合化合物」は受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するEphB受容体結合ペプチドを含む分子を意味する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するコンジュゲートである。一実施形態において、該コンジュゲートはEphB受容体結合ペプチドを含む。ある具体的な実施形態において、該コンジュゲートは2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む。

10

#### 【0050】

本明細書に使用する用語「EphB受容体関連疾患」は、1以上のEphB受容体に関わる任意の疾患または病理過程を意味する。典型的には、前記EphB受容体関連疾患に關係する1以上のEphB受容体は異常に発現される、例えば、不適当に発現される、過剰発現される、または過少に発現される。具体的な実施形態において、EphB受容体の異常発現/活性は、当技術分野で周知のアッセイ、例えば、ウェスタンプロット、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ELISA、および転写標的レポートアッセイ(transcriptional target report assay)を用いて決定される。かかる疾患關係において、前記EphB受容体関連疾患に關係する1以上のEphB受容体はまた、異常な受容体活性、例えば、過剰活性または不足活性を有しうる。EphB受容体関連疾患の、限定されるものでない例としては、新生物疾患、癌、神経疾患、および血管疾患（例えば、黄斑変性症）が挙げられる。EphB受容体関連疾患のさらなる限定されるものでない例については、下記の第5.2節を参照されたい。

20

#### 【0051】

EphB受容体結合ペプチド、EphB受容体結合化合物、または免疫グロブリン分子のFc領域のアミノ酸配列の関係で、本明細書に使用する用語「断片」は、それぞれ、EphB受容体結合ペプチド、EphB受容体結合化合物、または免疫グロブリン分子Fc領域のアミノ酸配列の、少なくとも4隣接アミノ酸残基、少なくとも5隣接アミノ酸残基、少なくとも8隣接アミノ酸残基、少なくとも10隣接アミノ酸残基、少なくとも20隣接アミノ酸残基、少なくとも30隣接アミノ酸残基、少なくとも40隣接アミノ酸残基、少なくとも50隣接アミノ酸残基、少なくとも60隣接アミノ酸残基、少なくとも70隣接アミノ酸残基、少なくとも隣接80アミノ酸残基、少なくとも90隣接アミノ酸残基、少なくとも100隣接アミノ酸残基、少なくとも125隣接アミノ酸残基、少なくとも150隣接アミノ酸残基、少なくとも175隣接アミノ酸残基、少なくとも200隣接アミノ酸残基、または少なくとも250隣接アミノ酸残基のアミノ酸配列を含む分子を意味する。

30

#### 【0052】

本明細書に使用する用語「融合タンパク質」は、ペプチド結合を介して一緒に連結された2つのタンパク質性分子を有するコンジュゲートを意味する。具体的な実施形態において、融合タンパク質は、2以上のEphB受容体結合ペプチドを含むポリペプチドまたはタンパク質；またはペプチド結合を介して一緒に連結された1以上のEphB受容体結合ペプチドと異種ペプチドを含むポリペプチドまたはタンパク質を意味する。ある具体的な実施形態において、融合タンパク質は、それらが同じN末端～C末端配置において、隣接してEphB受容体またはエフリン-Bリガンドアミノ酸配列で見出されるように配置された2以上のEphB受容体結合ペプチドを含まない。ある具体的な実施形態において、融合タンパク質は、ペプチド結合を介してヒトIgG<sub>1</sub>免疫グロブリンまたはその断片のFc部分に連結された、本明細書に記載した1以上のEphB受容体結合ペプチド（例えば、配列番号1～75により同定されるまたは下記の表1に開示されたもの）を含む。融合タンパク質の限定されるものでない例およびそれを作製する方法は、下記の第5.1節でさらに考察される。

40

#### 【0053】

本明細書に使用する用語「組合わせて」は、1以上の療法を用いることを意味する。用語「組合わせて」の使用は、その療法を被験体に投与する順序を制限しない。被験体に

50

第1の療法を、第2の療法の投与前に（例えば、1分間、5分間、15分間、30分間、45分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間前に）、第2の療法投与と同時に、または第2の療法投与後に（例えば、1分間、5分間、15分間、30分間、45分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後に）投与することができる。任意の追加の療法を、任意の順序で、他の追加の療法と共に投与することができる。ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合化合物を1以上の療法（例えば、現在、疾患を予防し、治療し、管理するために投与している非EphB受容体結合化合物、例えば、鎮痛薬、麻酔薬、抗生物質、癌治療薬、および免疫調節薬）と組合わせて投与することができる。

10

## 【0054】

タンパク質性薬剤または核酸以外の有機もしくは無機分子（小分子であってもまたは大分子であっても）の関係で、本明細書に使用する用語「単離された」は、実質的に異なる有機もしくは無機分子を含まないことを意味する。好ましくは、有機もしくは無機分子は、第2の異なる有機もしくは無機分子を60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%含まない。ある具体的な実施形態において、有機および／または無機分子は単離されている。

10

## 【0055】

タンパク質性薬剤（例えば、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、または抗体）の関係で、本明細書に使用する用語「単離された」は、それが由来する細胞もしくは組織源からの細胞材料または汚染タンパク質を実質的に含まない、または、化学的に合成された場合は、化学前駆体または他の化学品を実質的に含まないタンパク質性薬剤を意味する。言語「細胞材料を実質的に含まない」は、それから単離されたかまたは遺伝子組換えで生産された細胞の細胞成分から分離されているタンパク質性薬剤の調製物を含む。従って、細胞材料を実質的に含まないタンパク質性薬剤は、約30%、20%、10%、または5%（乾重量で）未満の異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド（「汚染タンパク質」とも呼ばれる）を有するタンパク質性薬剤の調製物を含む。タンパク質性薬剤を遺伝子組換えで生産する場合、好ましくは、培地を実質的に含まない、すなわち、培地はタンパク質性薬剤調製物の体積の約20%、10%、または5%未満である。タンパク質を化学的に合成する場合、好ましくは、化学前駆体または他の化学品を実質的に含まない、すなわち、タンパク質性薬剤の合成に関わる化学前駆体または他の化学品から分離されている。従って、タンパク質性薬剤のかかる調製物は、約30%、20%、10%、5%（乾重量で）未満の目的のタンパク質性薬剤以外の化学前駆体または化合物を有する。ある具体的な実施形態において、本明細書に開示されたタンパク質性薬剤は単離されている。他の具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物は単離されている。

20

## 【0056】

核酸分子の関係で、本明細書に使用する用語「単離された」は、核酸分子の天然源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を意味する。さらに、遺伝子組換え技法により生産された場合、cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、好ましくは、実質的に他の細胞材料または培養培地を含まない、または化学的に合成された場合、化学前駆体または他の化学品を実質的に含まない。ある特定の実施形態において、「単離された」核酸分子は、異種細胞で遺伝子組換えで発現された核酸分子である。ある具体的な実施形態において、核酸分子は単離されている。他の具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物をコードする核酸分子は単離されている。

30

## 【0057】

本明細書に使用する用語「低い耐性（low tolerance）」は、患者が療法からの副作用を受けて、患者に利益がないおよび／またはその有害な影響の故に療法を継続したくないおよび／または副作用からの害がその療法の利益を上回る状態を意味する。

40

## 【0058】

療法の被験体への投与の関係で、本明細書に使用する用語「管理する」または「管理」

50

は、被験体が療法から得る、疾患の治癒をもたらすものでない有利な効果を意味する。ある特定の実施形態において、疾患を管理する1以上の療法を被験体に投与して、疾患の進行または悪化を防止する（すなわち、疾患の進行を遅らせる）。

#### 【0059】

本明細書に記載した、ペプチドの「ミメチック」または「ペプチドミメチック」は、受容体のEphBファミリーのメンバー（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と選択的にまたは特異的に結合するペプチドであって、ペプチドの機能的活性に必要なペプチドの化学構造がペプチドのコンフォメーションを模倣する他の化学構造を用いて置き換えられたペプチドを意味する。ペプチドミメチックの例としては、さらに以下に記載する、ペプチド骨格が1以上のベンゾジアゼピン分子により置換されたペプチド化合物（例えば、James et al., 1993, Science 260:1937-1942を参照）、全てのL-アミノ酸が対応するD-アミノ酸により置換されたペプチドおよび「レトロ-インベルソ（retro-inverso）」ペプチド（例えば、Sistoによる米国特許第4,522,752号を参照）が挙げられる。

#### 【0060】

本明細書に使用する用語「新生物」は、無調節な様式で増殖しかつ遠位部位に転移する潜在能を有し、非新生物細胞のそれと異なる表現型形質、例えば、軟寒天などの三次元基質中のコロニー形成または三次元基底膜もしくはMATRIGEL（登録商標）などの細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワークもしくはウエブ様マトリックスの形成を示す細胞に関わる疾患を意味する。非新生物細胞は、軟寒天中でコロニーを形成せず、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中で分離した球様構造を形成する。新生物細胞は、様々な機構を介してであるが、その発生中に特徴のある一式の機能を獲得する。かかる特性としては、アポトーシスの回避、増殖シグナルの自己充足、抗増殖シグナルに対する非感受性、組織浸潤／転移、無限の複製潜在能、および血管形成の持続が挙げられる。従って、「非新生物」は、症状、疾患、または障害が転移する可能性を有しない細胞に関わらないことを意味する。

#### 【0061】

本明細書で表現「非応答性／不応性」は、1以上の現在利用可能な療法（例えば、癌治療薬などの化学療法、放射線療法、手術、ホルモン療法および／または生物学的療法／免疫療法、特に特定の癌に対する標準的な治療レジメン）を受けたかまたは受けたことのある患者であって、その療法が当該患者を治療するのに臨床的に十分でなく追加の有効な治療を必要とする患者、例えばその療法に対して非感受性のままである患者を記載するに使用される。この表現はまた、治療に応答するがなお副作用に悩む、再発する、抵抗性を生じるなどの患者も記載しうる。様々な実施形態において、「非応答性／不応性」は、癌細胞の少なくともある有意な部分が死滅しないかまたはそれらの細胞分裂が停止しないことを意味する。特定の細胞が「非応答性／不応性」かどうかの決定は、かかる細胞に対する治療の効力をアッセイする当技術分野で公知のいずれかの方法により、かかる関係で当技術分野で許容される「不応性」の意味を用いて、in vivoまたはin vitroで行うことができる。様々な実施形態において、細胞数が療法中に有意に低下しなかったかまたは増加した場合、細胞は「非応答性／不応性」である。

#### 【0062】

本明細書で使用される表現「製薬上許容される」は、動物、さらに特にヒトにおける使用について、連邦または州政府の規制機関により認可されているかまたは米国薬局方、欧州薬局方、または他の一般的に認識された薬局方に掲載されていることを意味する。

#### 【0063】

本明細書に使用する「製薬上許容される塩」は、医薬品工業で一般的に使用される無毒のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及びアンモニウム塩を意味し、これらには当業者に周知の方法で調製されるナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩、アンモニウム塩及びプロタミン亜鉛塩が含まれる。この用語にはまた、本発明の化合物を好適な有機酸又は無機酸と反応させることによって一般的に製造される、無毒の酸付加塩が含まれる。代表的な塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫

10

20

30

40

50

酸塩、硫酸水素塩、酢酸塩、シュウ酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、ホウ酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシレート、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナプシレートなどが挙げられる。

#### 【0064】

本明細書に使用する「製薬上または治療上許容される担体」は、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げることなく、被験体に無毒である担体媒体を意味する。

#### 【0065】

本明細書に使用する用語「増強する」は、その通常のまたは承認された用量における治療薬の効力の改善を意味する。

#### 【0066】

被験体に対する療法の投与の関係で、本明細書に使用する用語「予防する」および「予防」は、療法（予防薬または治療薬）の投与または療法の併用（例えば、予防薬または治療薬の組合せ）の投与によってもたらされる疾患またはその1以上の症候群の再発、発症および／または発達の予防または阻害を意味する。いくつかの実施形態において、かかる用語は、次の項の1以上を意味する：（1）緩解の長さの増加；（2）疾患の再発率の減少；および（3）疾患の再発までの時間の増加。

10

#### 【0067】

本明細書に使用する用語「予防薬」は、疾患の予防で使用することができる任意の薬剤を意味する。ある特定の実施形態において、用語「予防薬」はEphB受容体結合化合物を意味する。ある特定の実施形態において、用語「予防薬」は、化学療法薬、放射線療法、ホルモン療法、および／または生物学的療法（例えば、免疫療法）を意味する。他の実施形態においては、予防薬を他の予防薬および／または治療薬と組合せて投与してもよい。

20

#### 【0068】

本明細書に使用する「予防上有効な量」は、EphB受容体関連疾患の再発、発症および／または発達の予防または阻害をもたらすのに十分な療法の量を意味する。予防上有効な量は、限定されるものでないが、かかる障害の素因を有する患者、例えば、遺伝的に素因を有するかまたは前にかかる障害を患った患者を含む、患者または被験体におけるEphB受容体関連疾患の再発、発症および／または発達を予防するのに十分な予防薬の量を意味しうる。一実施形態において、予防上有効な量は、EphB受容体関連疾患の予防において予防の利益を提供する予防薬の量である。他の実施形態において、予防薬に関する予防上有効な量は、予防薬単独の、または1以上の他の治療薬（例えば、本疾患または障害を治療するために投与した非EphB受容体結合化合物、鎮痛薬、麻酔薬、抗生物質、免疫調節薬）と組合せての量である。EphB受容体結合化合物の量の関係で使用されるこの用語は、全体の予防を改良するかまたは他の予防薬との相乗作用の予防効果を増強する量を包含しうる。

30

#### 【0069】

本明細書に使用する「プロトコル」は、投薬レジメン、薬剤投与の時間頻度および期間、または疾患の予防、治療もしくは管理の方法を意味する。

#### 【0070】

本明細書に使用する用語「不応性」は、特定の療法に対して応答しない疾患を意味する。ある特定の実施形態において疾患が療法に対して不応性であることは、前記疾患に関連する症候群の少なくともいくつかの有意な部分がその療法により排除または軽減されないことを意味する。疾患が不応性であるかどうかの決定は、in vivoまたはin vitroのいずれかにおいて、疾患を予防、治療または管理する療法の有効性をアッセイするためのいずれかの当技術分野で公知の方法により行うことができる。

40

#### 【0071】

本明細書に使用する表現「副作用」は、療法の欲しないおよび有害な効果を包含する。有害な効果は常に欲しないが、欲しない効果は必ずしも有害ではない。療法から受ける有害な効果は害があるかまたは不快であるかまたはリスクがありうる。化学療法からの副作用としては、限定されるものでないが、初期および後期に生じる下痢および膨満などの胃腸毒性、悪心、嘔吐、摂食障害、白血球減少、貧血、好中球減少、無力症、腹部痙攣、発

50

熱、疼痛、体重減少、脱水症、脱毛症、呼吸困難、不眠症、眩暈、粘膜炎、口内乾燥、および腎不全、ならびに便秘、神経および筋肉への影響、腎臓および膀胱への一時的または永久的な損傷、インフルエンザ様症状、体液貯留、および一時的または永久的な不妊症が挙げられる。放射線療法による副作用には、限定されるものでないが、疲労、口内乾燥、および食欲減少がある。生物学的療法／免疫療法による副作用としては、限定されるものでないが、投与部位の発疹または腫張、発熱、悪寒および疲労などのインフルエンザ様症状、消化管問題およびアレルギー反応が挙げられる。ホルモン療法による副作用には、限定されるものでないが、恶心、不妊問題、うつ病、食欲減少、眼の問題、頭痛、および体重変動が挙げられる。患者が典型的に経験するさらなる望ましくない作用は多く、当技術分野で公知である。それらの多くはPhysicians' Desk Reference(第61版、2007)に記載されている。

10

#### 【0072】

EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の関係で、本明細書に使用する用語「選択的に結合する」および類似の用語は、1または数種のEphB受容体ファミリーメンバーに対して、他のEphB受容体ファミリーメンバーおよび他の抗原に対する結合親和性より実質的に大きい結合親和性を有するペプチド、誘導体、類似体またはコンジュゲートを意味する。選択的結合親和性の関係で使用する「実質的に大きい」は、1または数種のEphB受容体ファミリーメンバーと結合したペプチド、誘導体、類似体または多量体の量で、他のEph受容体ファミリーメンバーおよび他の抗原とよりも、イムノアッセイ(例えば、ELISA)またはプラズモン表面共鳴により測定して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍または少なくとも100倍の増加を意味する。

20

#### 【0073】

EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の関係で、本明細書に使用する用語「特異的に結合する」および類似の用語は、イムノアッセイ(例えば、ELISA)またはプラズモン表面共鳴により測定して、受容体のEphBファミリーの1メンバー(例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6)と特異的に結合しかつ他のEphB受容体またはAクラスのEph受容体と結合しないペプチド、誘導体、類似体またはコンジュゲートを意味する。

30

#### 【0074】

本明細書に使用する用語「被験体」および「患者」は互換的に使用される。本明細書に使用する被験体は、好ましくは、哺乳動物、例えば、非靈長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および靈長類(例えば、サルおよびヒト)、最も好ましくはヒトである。一実施形態において、被験体はEphB受容体関連疾患を患う哺乳動物、好ましくはヒトである。他の実施形態において、被験体はEphB受容体関連疾患を患う農場動物(例えば、ウマ、ブタ、またはウシ)、愛玩動物(例えば、モルモット、イヌまたはネコ)、または実験動物(例えば、動物モデル)である。他の実施形態において、被験体は、EphB受容体関連疾患を発生するリスクのある哺乳動物、好ましくはヒトである。ある具体的な実施形態においては、EphB受容体関連疾患について被験体または患者を診断する。

40

#### 【0075】

本明細書に使用する用語「相乗的」は、いずれかの2以上の単独療法(例えば、1以上の予防薬または治療薬)の相加効果より有効である療法(例えば、予防薬または治療薬)の組合せを意味する。療法の組合せ(例えば、予防薬または治療薬の組合せ)の相乗効果は、EphB受容体関連疾患を患う被験体への1以上の療法(例えば、1以上の予防薬または治療薬)の投与使用量の低下および/または前記療法の投与頻度の低下を可能にする。療法(例えば、予防薬または治療薬)の投与量の低下および/または療法の投与頻度の低下が可能であると、EphB受容体関連疾患の予防または治療における前記療法の効果を低下させることなく、被験体への前記療法の投与に関連する毒性を低下する。さらに相乗効果は、EphB受容体関連疾患の予防または治療における療法(例えば、予防薬または治療

50

薬)の効果の改善をもたらすことができる。最後に、療法(例えば、予防薬または治療薬)の組合せの相乗効果は、いずれかの単独療法に関連する有害なまたは欲しない副作用を回避または軽減することができる。

#### 【0076】

本明細書に使用する用語「治療薬」は、その疾患またはその症候の治療および/または管理に利用できる任意の薬剤を意味する。ある特定の実施形態において、用語「治療薬」は、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物を意味する。ある特定の他の実施形態において、用語「治療薬」は、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物でない薬剤を意味する。特別な実施形態において、治療薬は、疾患またはその1以上の症候群を治療および/または管理するために有用であることが公知であるか、または使用されたか、または現在使用されている薬剤である。

10

#### 【0077】

本明細書に使用する「治療上有効な量」は、被験体における疾患の進行、拡大および/または期間の低減または抑制、疾患の重篤度の軽減または改善、1以上の疾患の症候の改善および/または療法の投与からもたらされる疾患の1以上の症候の期間の短縮のために十分な療法の量を意味する。一実施形態において、療法の治療上有効な量は、疾患またはかかる疾患に関連する症候を排除、改変、または制御するために十分である。他の実施形態において、治療上有効な量は、障害の発症または重篤度を遅延または最小化するために十分な療法の量である。ある具体的な実施形態において、治療上有効な量は、障害の治療および/または管理において治療の利益を提供するための療法の量である。他の具体的な実施形態において、療法についての治療上有効な量は、障害の治療および/または管理において治療の利益を提供するための、療法単独の量または他の療法と組合せての量を意味する。EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の量との関係で使用するこの用語は、全体の療法を改善し、欲しない効果を低減または回避し、または他の療法の治療効果を増強するかまたは他の療法と相乗作用するための量を包含しうる。

20

#### 【0078】

本明細書に使用する用語「療法」は、障害の予防、治療および/または管理に利用できる任意のプロトコル、方法および/または薬剤を意味する。ある特定の実施形態において、用語「療法」は、生物学的療法、支持療法、および/または、障害もしくはその1以上の症候群の治療、管理および/または予防に有用な、医療従事者などの当業者に公知の他の療法を意味する。

30

#### 【0079】

療法の被験体への投与の関係で、本明細書に使用する用語「治療する」および「治療」は、疾患の進行、拡大および/または期間の低下または阻害、疾患の重篤度の低下または改善、1以上の疾患の症候の改善および/または1以上の療法の投与からもたらされる疾患の1以上の症候の期間の低下を意味する。具体的な実施形態において、癌の関係でかかる用語は、1、2、3以上の療法の投与後に得られる、1、2、または3以上の次の結果：(1)腫瘍または新生物の増殖の低下；(2)腫瘍の形成の低下；(3)原発性、限局性および/または転移性癌の根絶、除去、または制御；(4)転移伝播の低下；(5)死亡率の低下；(6)生存率の増加；(7)寿命の延長；(8)緩解の患者数の増加；(9)入院率の減少；(10)入院期間の減少；および(11)10%超、または8%超、または6%超、または4%超増加しないようにする；好ましくは腫瘍サイズは2%超増加しないようにする、腫瘍サイズの維持を意味する。

40

#### 【0080】

濃度、量、細胞数、パーセントおよびその他の数値を本明細書では範囲のフォーマットで提示する。かかる範囲フォーマットはまた、単に便宜と簡潔のために使用し、範囲の限界で明示した数値を含むだけでなく、個々の数値または範囲内に含まれる小範囲の全てを、あたかも各数値と各小範囲を明示したごとく含むと柔軟に解釈しなければならない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0081】

50

【図1】TNYL-Rawペプチド(配列番号39)が活性化PEGと反応してPEG連結多量体ペプチドを形成しうることを示すグラフである。グラフは、PEGサイズ(3.4kDaまたは10kDa)と最初のペプチド:PEG出発材料比(3:1または5:1)とを変化した4つの異なる実験におけるPEGリンカー1分子当たりのペプチドの平均数を示す。グラフは、各サンプル中にPEG1リンカー当たりほぼ2ペプチドが存在することを示し、PEG連結ペプチド二量体が形成されたという結論を支持する。

【図2】抗PEG抗体をコートしたウエル上に捕捉されたPEG連結TNYL-Raw-ビオチン二量体が、EphB4アルカリホスファターゼ(AP)と結合することを示すグラフである。データは、TNYL-Raw-ビオチンペプチドを3.4kDaまたは10kDaのPEGとコンジュゲートすることにより形成したペプチド二量体の光学密度(OD405)分析に関わる実験から得たものである。カップリング反応を、最初のPEG:ペプチド出発材料比(グラフの各PEGペプチドコンジュゲートの後のカッコ内に示した)を変えることにより繰り返した。

【図3】図3A~3DはTNYL-Rawペプチドの安定性データを示し、それぞれPC3細胞による細胞培地(図3Aおよび図3B)、PC3細胞の非存在での細胞順化培地(図3C)、およびPC3細胞無してかつプロテアーゼインヒビターの混合物有りの細胞順化培地(図3D)における安定性データである。図5Bでは、細胞培地を、TNYL-Rawペプチドを加える直前に新鮮な培地によって置き換えた。図3Aでは、TNYL-Rawペプチドを加える前に新鮮な培地によって置き換えなかった。

【図4】図4は、TNYL-Raw-ビオチンペプチドが首尾よく二官能性または単官能性PEGと共有結合でカップリングしたことを示すグラフである。PEG化ペプチドは抗PEG抗体をコートしたウエル上に捕獲し、ストレプトアビシン-HRPを用いて検出した。データはOD405での光学密度分析に関わる実験から得た。二官能性PEGと結合したペプチドからのシグナルは、ペプチド単独によるバックグラウンドシグナル(破線で示した)および単官能性PEGとカップリングしたペプチドからのシグナルより強かった。

【図5】図5A~5EはTNYL-RawFc融合タンパク質の機能的特徴を評価する実験からのデータである。TNYL-RawFc融合タンパク質は、N末端に分泌用のシグナルペプチド、次いでTNYL-Rawペプチド(下線)、次いでGSGSKリンカー(配列番号76)およびFcドメイン(図5A)を含む。HEK293細胞から精製したTNYL-RawFc融合タンパク質を、ELISAプレートを用いて、EphB4と結合する能力を試験した。TNYL-RawFc融合タンパク質をタンパク質A-ELISAプレート上に固定し、アルカリホスファターゼ(AP)とコンジュゲートしたEphB4を用いて検出した(図5B)。TNYL-RawFc融合タンパク質のEphB4-APに対する結合親和性(図5C)を、エフリン-B2Fc融合タンパク質の結合親和性(図5D)と比較した。TNYL-RawFc融合タンパク質のMDA-MB-231細胞を刺激する能力を次によって試験した: 2μg/ml TNYL-RawFcタンパク質、または1μg/mlエフリンB2Fcタンパク質(ポジティブ対照)、またはヒトFcドメイン(ネガティブ対照)を20分間インキュベートし、次いで細胞溶菌液をEphB4免疫沈降で処理し、そして抗ホスホチロシン抗体(PTyr)を用いてイムノプロット(図5E)する。抗EphB4抗体によるイムノプロットによる再プロービングを対照として行った。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0082】

#### 5. 本発明の詳細な説明

Eph受容体チロシンキナーゼは多くの病理学的組織で発現され、それ故に有望な薬物標的候補として登場した。しかし、单一のEph受容体と選択的に結合しかつこの大きい受容体ファミリーの他メンバーと結合しない分子で、利用できるものは少ししかない。一実施形態において、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物は、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5、およびEphB6を含むEphBクラスの色々な受容体と選択的に結合する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物は、Eph受容体との高親和性相互作用に介在する領域であるエフリン-BリガンドのG-Hループに見出されるアミノ酸モチーフを含有する。エフリン結合部位を標的化することは、高親和性多量体ペプチドがその結合するEphB受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用しうることと一致する。

10

20

30

40

50

**【 0 0 8 3 】**

EphB受容体、そして特に、EphB2およびEphB4（前掲の第2節を参照）は広範な様々な癌において過剰発現され、従ってこれらの受容体と結合する化合物はイメージングおよび薬物標的化の応用に有用でありうる。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体アゴニストとして作用しうるので、細胞増殖および／または転移を低下させる癌療法向けに有用である。乳癌細胞に発現されるEphB4と腫瘍脈管構造中に発現されるエフリンB2との間の相互作用が報じられており、その場合、膜貫通エフリン-B2リガンドの細胞質ドメインは血管形成を刺激することにより腫瘍成長を促進する（Noren et al., 2004, PNAS USA 101 : 5583-5588）。また他の具体的な実施形態においては、EphB受容体結合化合物がEphB受容体アンタゴニストとして作用して、血管内皮組織に発現されるEphB受容体の活性化を阻害し、血管形成を阻害しつつ腫瘍成長を阻害しうる。

10

**【 0 0 8 4 】**

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物はEph受容体関連疾患の療法として利用される。かかる疾患の限定されるものでない例としては、新生物疾患、癌、神経疾患、および血管疾患（例えば、黄斑変性症）が挙げられる。いくつかの実施形態において、Eph受容体関連疾患はEphB受容体関連疾患である。EphB受容体関連疾患には、EphB受容体の正常より高い発現に関連する疾患が含まれる。ある具体的な実施形態において、EphB受容体の正常より高い発現は、当技術分野で周知のアッセイ、例えば、免疫蛍光、ELISA、フローサイトメトリー、およびウェスタンプロットを介して測定して、対照（例えば、健康な被験体から得た血清、細胞、および組織サンプル）のEphB受容体の正常な発現より、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%少なくとも90%、または少なくとも100%高い。他の具体的な実施形態において、EphB受容体の正常より高い発現は、当技術分野で周知のアッセイ、例えば、免疫蛍光、ELISA、フローサイトメトリー、およびウェスタンプロットを介して測定して、対照（例えば、健康な被験体から得た血清、細胞、および組織サンプル）のEphB受容体の正常な発現より、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍少なくとも9倍、または少なくとも10倍高い。従って、一具体的な実施形態において、EphB受容体を標的化するEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物は、かかるEphB受容体関連疾患に対する治療効能を有しうる。EphB受容体関連疾患の例としては、新生物疾患、癌、神経疾患（例えば、脊椎損傷）、および血管疾患（例えば、黄斑変性症）が挙げられる。

20

30

40

**【 0 0 8 5 】**

本発明は、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6を含むEphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合するペプチド（すなわち、EphB受容体結合ペプチド）および化合物（すなわち、EphB受容体結合化合物）を提供する。一実施形態において、単離されたEphB受容体結合ペプチドは配列番号41のアミノ酸配列を有する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物は、EphB受容体に対するエフリン-Bリガンド（例えば、エフリン-B1、エフリン-B2およびエフリン-B3）の結合と競合するおよび／または結合を阻害する。

40

**【 0 0 8 6 】**

本明細書に提示されるのは、2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む単離された多量体ペプチドであって、EphB受容体ファミリーのメンバーと約100nM以下、約71nM以下、または約20nM以下の解離定数（Kd）で選択的に結合してEph受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を阻害する前記多量体ペプチドである。他の実施形態において、前記多量体ペプチドはEphB受容体ファミリーのメンバーと約15nM以下；約10nM以下、または約5nM以下の解離定数（Kd）で選択的に結合する。一実施形態において、単離された多量体ペプチドはEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約100nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する。いくつかの実施形態において、単離された多量体ペプチドはEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約20nM以下または15nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する。ある具体的な実施形態において、単離され

50

た多量体ペプチドは二量体である。いくつかの実施形態において、二量体は2つのEphB受容体結合ペプチドをポリエチレングリコール(PEG)によって連結することにより作られる。他の実施形態においては、単離された多量体ペプチドは2以上の同じEphB受容体結合ペプチドを含む。特別な実施形態において、単離された多量体ペプチドは2以上のEphB受容体結合ペプチドを含み、ここで、少なくとも1つのEphB受容体結合ペプチドは他のEphB受容体結合ペプチドと異なる。ある特定の実施形態において、EphB受容体はEphB1、EphB2、EphB3、Eph4、EphB5、またはEphB6である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは配列番号1～75の任意のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、単離された多量体ペプチドはアゴニストである。他の実施形態において、単離された多量体ペプチドはアンタゴニストである。具体的な実施形態において、約100nM以下の解離定数(Kd)でEphB受容体ファミリーのEphB受容体と選択的に結合するEphB受容体結合化合物は、(i) EphB受容体と選択的に結合する2以上のペプチドであってそれぞれ5～50アミノ酸残基の長さを有する2以上のペプチドと(ii) 異種化合物とを含む単離されたコンジュゲートである。

10

#### 【0087】

ある特定の実施形態において、EphB受容体ファミリーのメンバーと特異的に結合する単離された多量体ペプチドは、2以上のEphB受容体結合ペプチドを含み、そして多量体ペプチドはEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約100nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する。ある具体的な実施形態において、単離された多量体ペプチドは二量体である。他の具体的な実施形態において、二量体は、2つのEphB受容体結合ペプチドをポリエチレングリコール(PEG)を用いて連結することにより作られる。他の実施形態において、単離された多量体ペプチドは、2以上の同じEphB受容体結合ペプチドを含む。特別な実施形態において、単離された多量体ペプチドは、2以上のEphB受容体結合ペプチドを含み、ここで、少なくとも1つのEphB受容体結合ペプチドが他のEphB受容体結合ペプチドと異なる。ある特定の実施形態において、EphB受容体はEphB1、EphB2、EphB3、Eph4、EphB5、またはEphB6である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは配列番号1～75である。

20

#### 【0088】

本明細書に提示されるのは、EphB受容体結合ペプチドと異種化合物を含む単離されたコンジュゲートであって、EphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を阻害して、選択的にEphB受容体と約100nM以下、約71nM以下、または約20nM以下の解離定数(Kd)で結合する前記単離されたコンジュゲートである。いくつかの実施形態において、単離されたコンジュゲートは約15nM以下、10nM以下、または5nM以下の解離定数(Kd)を有する。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドと異種化合物を含む単離されたコンジュゲートは、EphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約100nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する。他の実施形態において、単離されたコンジュゲートはEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約50nM以下、40nM以下、30nM以下、20nM以下、または15nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する。ある具体的な実施形態において、異種化合物はIgGのFc領域またはその断片(例えば、CH<sub>2</sub>またはCH<sub>3</sub>ドメイン)である。ある特定の実施形態において、異種化合物はポリエチレングリコール(PEG)である。いくつかの実施形態において、単離されたコンジュゲートは融合タンパク質である。ある特定の実施形態において、EphB受容体はEphB1、EphB2、EphB3、Eph4、EphB5、またはEphB6である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは配列番号1～75である。

30

#### 【0089】

本明細書に提示されるのは、配列番号39のアミノ酸配列を有する少なくとも2つのEphB受容体結合ペプチドを含む単離された多量体ペプチドである。いくつかの実施形態において、単離された多量体ペプチドは配列番号40のアミノ酸配列を有する少なくとも2つのEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、単離された多量体ペプチドは配列番号41のアミノ酸配列を有する少なくとも2つのEphB受容体結合ペプチドを含む。ある具体的な実施形態において、単離された多量体ペプチドは二量体である。他の実施形態において、多量体ペプチドは約15nM以下、10nM以下、または5nM以下の解離定数(Kd)を有す

40

50

る。他の実施形態において、単離された多量体ペプチドはEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を約75nM以下、約50nM以下、約25nM以下、約15nM以下、約10nM以下、または約5nM以下のIC<sub>50</sub>で阻害する。

#### 【0090】

本発明はまた、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物および製薬上許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物を含む組成物も提供する。ペプチドおよび化合物はEphB受容体関連疾患を予防、治療および/または管理するために有用である。ペプチドおよび化合物はまた、EphB受容体関連疾患の診断および/またはモニタリングに、ならびに、選択的にまたは特異的にEphB受容体ファミリーのメンバーと結合する化合物を同定する方法にも有用である。

10

#### 【0091】

一実施形態において、組成物は製薬上許容される担体または賦形剤と多量体ペプチドとを含むものであり、ここで、前記多量体ペプチドは2以上のEphB受容体結合ペプチドを含み、かつEphB受容体ファミリーのメンバーとほぼ100nM以下、ほぼ71nM以下、ほぼ40nM以下、またはほぼ20nM以下の解離定数(Kd)で選択的に結合してEphB受容体の結合を阻害する。ある具体的な実施形態において、組成物はさらに、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を含む。

20

#### 【0092】

他の実施形態において、組成物は製薬上許容される担体または賦形剤と、EphB受容体とほぼ100nM以下、ほぼ71nM以下、ほぼ40nM以下、またはほぼ20nM以下の解離定数(Kd)で選択的に結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を阻害する単離されたコンジュゲートとを含むものであり、ここで前記コンジュゲートは、EphB受容体結合ペプチドと異種化合物とを含む。いくつかの実施形態において、組成物は製薬上許容される担体または賦形剤と、EphB受容体と15nM以下、10nM以下、5nM以下、または1nM以下の解離定数(Kd)で選択的に結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を阻害する単離されたコンジュゲートとを含むものであり、ここで前記コンジュゲートは、EphB受容体結合ペプチドと異種化合物とを含む。ある具体的な実施形態において、組成物はさらに、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を含む。

30

#### 【0093】

他の実施形態において、本発明は、配列番号41を有するEphB受容体結合ペプチドと製薬上許容される担体または賦形剤とを含むものである医薬組成物を含む組成物を提供する。ある具体的な実施形態において、組成物はさらに、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を含む。

30

#### 【0094】

本発明は、EphB受容体関連疾患を予防、治療または管理する方法であって、それを必要とする被験体に、EphB受容体ファミリーのメンバーとほぼ100nM以下、ほぼ71nM以下、ほぼ40nM以下、またはほぼ20nM以下の解離定数(Kd)で選択的に結合してEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を阻害する多量体ペプチドの予防上または治療上有効な量を投与することを含み、ここで、多量体ペプチドは2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む前記方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記方法は、それを必要とする被験体に、EphB受容体ファミリーのメンバーとほぼ15nM以下、10nM以下、または5nM以下の解離定数(Kd)で選択的に結合してEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合を阻害する多量体ペプチドの予防上または治療上有効な量を投与することを含み、ここで、多量体ペプチドは2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む前記方法を提供する。特別な実施形態において、EphB受容体関連疾患は新生物疾患、血管疾患、または神経障害である。他の実施形態において、EphB受容体関連疾患は癌、例えば、中皮腫、卵巣癌、膀胱癌、頭頸部の扁平上皮癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、小細胞肺癌、および神経起源の癌である。具体的な実施形態において、癌を予防、治療または管理する方法はさらに、被験体に化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を投与することを含む。一実施形態において、被験体はヒトである。

40

50

**【 0 0 9 5 】**

ある特定の実施形態において、EphB受容体関連疾患を予防、治療または管理する方法は、EphB受容体と20nM以下の解離定数で選択的に結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を阻害する、単離されたコンジュゲートの予防上または治療上有効な量を、それを必要とする被験体に投与することを含み、ここで前記コンジュゲートはEphB受容体結合ペプチドと異種化合物を含むものである。いくつかの実施形態において、前記方法は、EphB受容体と15nM以下、10nM以下、または5nM以下の解離定数で選択的に結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を阻害する、単離されたコンジュゲートの予防上または治療上有効な量を、それを必要とする被験体に投与することを含み、ここで前記コンジュゲートはEphB受容体結合ペプチドと異種化合物を含むものである。特別な実施形態において、EphB受容体関連疾患は癌、新生物疾患、血管疾患、または神経障害である。他の実施形態において、EphB受容体関連疾患は癌、例えば、中皮腫、卵巣癌、膀胱癌、頭頸部の扁平上皮癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、小細胞肺癌、および神経起源の癌である。具体的な実施形態において、癌を予防、治療または管理する方法はさらに、被験体に化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を投与することを含む。一実施形態において、被験体はヒトである。

**【 0 0 9 6 】**

ある特定の実施形態において、EphB受容体関連疾患を予防、治療または管理する方法は、アゴニストであるEphB受容体結合ペプチドの予防上または治療上有効な量を、それを必要とする被験体に投与することを含む。特別な実施形態において、EphB受容体関連疾患は新生物疾患、血管疾患、または神経障害である。他の実施形態において、EphB受容体関連疾患は癌、例えば、中皮腫、卵巣癌、膀胱癌、頭頸部の扁平上皮癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、小細胞肺癌、および神経起源の癌である。具体的な実施形態において、癌を予防、治療または管理する方法はさらに、被験体に化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を投与することを含む。一実施形態において、被験体はヒトである。

**【 0 0 9 7 】**

本発明は、被験体から腫瘍を除去した後に、それを必要とする被験体に、単離されたEphB受容体結合化合物の治療上有効な量を投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。他の実施形態において、本発明は、単離されたEphB受容体結合化合物の治療上有効な量を投与することを含む、癌の再発を予防または治療する方法を提供する。特別な実施形態において、本発明は、EphB受容体発現細胞（例えば、EphB受容体を異常に発現する細胞）の数を低下させる方法およびEphB受容体発現細胞（例えば、EphB受容体を異常に発現する細胞）の増殖を抑制する方法であって、細胞を単離されたEphB受容体結合化合物の有効量と接触させることを含む前記方法を提供する。本発明はまた、腫瘍のサイズを減少する方法および腫瘍の増殖を防止する方法であって、腫瘍を単離されたEphB受容体結合化合物の有効量と接触させることを含む前記方法も提供する。

**【 0 0 9 8 】**

他の実施形態において、本発明はまた、被験体におけるEphB受容体の異常な発現を検出する方法であって、(a)被験体のサンプルまたは細胞を、検出可能な薬剤を含む単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップ；および(b)単離されたEphB受容体結合化合物と被験体のサンプルまたは細胞との結合を検出するステップ[ここで、もし単離されたEphB受容体結合化合物と前記被験体のサンプルとの結合が単離されたEphB受容体結合化合物と対照サンプルまたはEphB受容体の正常な発現を有する細胞との結合より高いかまたは低いのであれば、EphB受容体の異常な発現が検出される]を含む、前記方法も提供する。具体的な実施形態においては、被験体のEphB受容体発現のレベルを測定し、健康な被験体（例えば、EphB受容体発現の正常なレベル）もしくはEphB受容体関連疾患が検出されない被験体のEphB受容体発現のレベルと、または健康な被験体もしくはEphB受容体関連疾患が検出されない被験体に対して予め測定した参照範囲と比較する。他の実施形態において、被験体のEphB受容体の異常な発現を検出する方法は、被験体のサンプルにおけるまたは

10

20

30

40

50

被験体におけるEphB受容体発現のレベルを測定するステップ、およびサンプルにおけるまたは被験体におけるEphB受容体発現のレベルを、健康な被験体（例えば、EphB受容体発現の正常なレベル）もしくはEphB受容体関連疾患が検出されない被験体のレベルと、またはEphB受容体を異常に発現するもしくはEphB受容体関連疾患有する被験体に対して予め測定した参照範囲と比較するステップ[ここで、もし予め測定した参照範囲と比較して、サンプルまたは被験体において同等以上のEphB受容体発現のレベルが存在すれば、EphB受容体の異常な発現が検出される]を含む。ある特定の実施形態において、EphB受容体の異常な発現を検出する方法は、EphB受容体関連疾患の診断を目的とする。他の実施形態において、EphB受容体の異常な発現を検出する方法は、EphB受容体関連疾患の進行のモニタリングを目的とするかまたは療法の有効性のモニタリングを目的とする。

10

## 【0099】

5.1 EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物

本発明は、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5、およびEphB6を含むEphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合するペプチドおよび化合物を提供する。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体のエフリン-Bリガンドとの結合と競合しおよび/またはこれを阻害する。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは長さが4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17アミノ酸残基である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは長さが10未満、15未満、20未満、25未満、30未満、35未満、40未満、45未満または50未満のアミノ酸残基で、最小が4または5アミノ酸残基である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはモチーフ  $\text{xx}$  [ここで $\text{x}$ は非保存アミノ酸であり、 $\text{xx}$ は芳香族アミノ酸である(Aasland et al., 2002, FEBS Lett 513:141-144)]であって、このモチーフはある特定のエフリンリガンドのG-Hループにも見出される。

20

## 【0100】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは受容体のEphBクラスのメンバー、例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6に対して高い結合親和性を有する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは特異的な結合速度定数( $k_{on}$ 値)、解離速度定数( $k_{off}$ 値)、親和性定数( $K_a$ 値)、解離定数( $K_d$ 値)および/または $IC_{50}$ 値を有する。

30

## 【0101】

ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体と少なくとも $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の $k_{on}$ 速度で選択的に結合する。

30

## 【0102】

他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体と $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ 以下、または $10^{-10} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度で選択的に結合する。

40

## 【0103】

他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体と少なくとも $10^{11} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{15} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{15} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{16} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{16} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{17} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{17} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{18} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{18} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{19} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{19} \text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{20} \text{nM}^{-1}$ 、少

50

くとも  $5 \times 10^{20}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $10^{21}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $5 \times 10^{21}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $10^{22}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $5 \times 10^{22}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $10^{23}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $5 \times 10^{23}$ nM<sup>-1</sup>、少なくとも  $10^{24}$ nM<sup>-1</sup>、または少なくとも  $5 \times 10^{24}$ nM<sup>-1</sup>のK<sub>a</sub>(k<sub>on</sub>/k<sub>off</sub>)で選択的に結合する。

#### 【0104】

他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体と  $5 \times 10^7$ nM以下、 $10^7$ nM以下、 $5 \times 10^6$ nM以下、 $10^6$ nM以下、 $5 \times 10^5$ nM以下、 $10^5$ nM以下、 $5 \times 10^4$ nM以下、 $10^4$ nM以下、 $5 \times 10^3$ nM以下、 $10^3$ nM以下、 $5 \times 10^2$ nM以下、100nM以下、90nM以下、80nM以下、70nM以下、60nM以下、50nM以下、20nM以下、15nM以下、10nM以下、5nM以下、3.8nM以下、2nM以下、1.5nM以下、1nM以下、 $5 \times 10^{-1}$ nM以下、 $10^{-1}$ nM以下、 $5 \times 10^{-2}$ nM以下、 $10^{-2}$ nM以下、 $5 \times 10^{-3}$ nM以下、 $10^{-3}$ nM以下、 $5 \times 10^{-4}$ nM以下、 $10^{-4}$ nM以下、 $5 \times 10^{-5}$ nM以下、 $10^{-5}$ nM以下、 $5 \times 10^{-6}$ nM以下、または $10^{-6}$ nM以下のK<sub>d</sub>(k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>)で選択的に結合する。<sup>10</sup> 具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体とほぼ1nM～ほぼ10nM、またはほぼ1nM～ほぼ20nM、またはほぼ1nM～ほぼ30nM、またはほぼ1nM～ほぼ40nM、またはほぼ1nM～ほぼ50nM、またはほぼ1nM～ほぼ60nM、またはほぼ1nM～ほぼ70nM、またはほぼ1nM～ほぼ80nM、またはほぼ1nM～ほぼ90nM、またはほぼ1nM～ほぼ100nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ1nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ10nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ20nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ30nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ40nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ50nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ60nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ70nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ80nM、またはほぼ0.5nM～ほぼ90nM、またはほぼ50nM～ほぼ80nM、またはほぼ60nM～ほぼ90nM、またはほぼ50nM～ほぼ100nM、またはほぼ0.6nM～ほぼ1.1nM、またはほぼ0.7nM～ほぼ1.2nM、またはほぼ0.5～ほぼ5nMのK<sub>d</sub>(k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>)で選択的に結合する。他の具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体と約71nM、約70nM、約5nM、約3.5nM、約1.2nM、約1.1nM、約1nM、約0.9nM、または約0.8nMのK<sub>d</sub>(k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>)で選択的に結合する。<sup>20</sup> 具体的な実施形態においては、K<sub>d</sub>(k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>)値は、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー( ITC )、BIAcore、または蛍光偏光アッセイにより決定される。特別な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはマウスEphB受容体(またはEphB受容体の外部ドメイン)と、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー( ITC )、BIAcore、または蛍光偏光アッセイにより決定した或るK<sub>d</sub>の値で選択的に結合する。<sup>30</sup> 特別な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはヒトEphB受容体(またはEphB受容体の外部ドメイン)と、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー( ITC )、BIAcore、または蛍光偏光アッセイにより決定した或るK<sub>d</sub>の値で選択的に結合する。具体的な実施形態において、マウスEphB受容体に対するEphB受容体結合ペプチドのK<sub>d</sub>値は、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー( ITC )、BIAcore、または蛍光偏光アッセイを用いて測定される。ある特定の実施形態において、ヒトEphB受容体のEphB受容体結合ペプチドに対するK<sub>d</sub>値は、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー( ITC )、BIAcore、または蛍光偏光アッセイを用いて測定される。

#### 【0105】

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB受容体と選択的に結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を、当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、 $5 \times 10^7$ nM未満、 $10^7$ nM未満、 $5 \times 10^6$ nM未満、 $10^6$ nM未満、 $5 \times 10^5$ nM未満、 $10^5$ nM未満、 $5 \times 10^4$ nM未満、 $10^4$ nM未満、 $5 \times 10^3$ nM未満、 $10^3$ nM未満、 $5 \times 10^2$ nM未満、100nM未満、90nM未満、80nM未満、70nM、69nM未満、60nM未満、50nM未満、40nM未満、30nM未満、25nM未満、20nM未満、15nM未満、12nM未満、10nM未満、5nM未満、1nM未満、 $5 \times 10^{-1}$ nM、 $10^{-1}$ nM未満、 $5 \times 10^{-2}$ nM未満、 $10^{-2}$ nM未満、 $5 \times 10^{-3}$ nM未満、 $10^{-3}$ nM未満、 $5 \times 10^{-4}$ nM、または $10^{-4}$ nMのIC<sub>50</sub>値で阻害する。<sup>40</sup> 他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB4と結合して、当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、ほぼ1nM～ほぼ10nM、ほぼ1nM～ほぼ15nM、ほぼ1nM～ほぼ20nM、ほぼ1nM～ほぼ25nM、ほぼ1nM～ほぼ30nM、ほぼ1nM～ほぼ40nM、ほぼ1nM～ほぼ50nM、ほぼ10nM～ほぼ10<sup>2</sup>nM、ほぼ10<sup>2</sup>nM～ほぼ10<sup>3</sup>nM、または $10^{-1}$ nM～ $10^{-3}$ nMのIC<sub>50</sub>値で阻害する。

M～ほぼ $10^3$ nM、ほぼ $10^3$ nM～ほぼ $10^4$ nM、ほぼ $10^4$ nM～ほぼ $10^5$ nM、ほぼ $10^5$ nM～ほぼ $10^6$ nM、またはほぼ $10^6$ nM～ほぼ $10^7$ nMの近似的なIC<sub>50</sub>値を有する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはEphB4と結合して、当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、ほぼ5nM～ほぼ10nM、ほぼ5nM～ほぼ15nM、ほぼ10nM～ほぼ15nM、ほぼ10nM～ほぼ20nM、ほぼ10nM～ほぼ30nM、ほぼ10nM～ほぼ40nM、ほぼ10nM～ほぼ50nM、ほぼ1nM～ほぼ100nM、ほぼ10nM～ほぼ100nM、ほぼ20nM～ほぼ100nM、ほぼ30nM～ほぼ100nM、ほぼ40nM～ほぼ100nM、ほぼ50nM～ほぼ100nM、ほぼ15nM～ほぼ25nM、またはほぼ15nM～ほぼ20nMの近似的なIC<sub>50</sub>値を有する。具体的な実施形態において、IC<sub>50</sub>値はマウスエフリンBリガンドのマウスEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。特別な実施形態において、IC<sub>50</sub>はマウスエフリンBリガンドのヒトEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。いくつかの実施形態において、IC<sub>50</sub>値はヒトエフリンBリガンドのマウスEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。他の実施形態において、IC<sub>50</sub>値はヒトエフリンBリガンドのヒトEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。具体的な実施形態において、IC<sub>50</sub>値はマウスエフリンBリガンドのマウスEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。具体的な実施形態において、IC<sub>50</sub>値は、例えば、ELISAにより、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ90%、ほぼ95%、ほぼ99%の純度を有するEphB受容体結合ペプチドの調製物を用いて測定される。特別な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは選択的にEphB受容体と結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合をアッセイで、例えば、ELISAにより測定したIC<sub>50</sub>値で阻害し、ここで、アッセイに用いる可溶性エフリンBリガンドまたはEphB受容体の前記濃度はほぼ0.001 μM、0.005 μM、0.01 μM、0.05 μM、0.1 μM、0.5 μM、1 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、200 μM、300 μM、400 μM、500 μM、600 μM、700 μM、800 μM、900 μM、1000 μM、または5000 μMである。

#### 【0106】

限定されるものでないEphB受容体結合ペプチドの例を表1に掲げる。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは、TNYLFSPNGPIARAW（「TNYL～RAW」配列番号39）である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはNYLFSPNGPIARAW（「NYL～RAW」配列番号40）である。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは、YLFSNPGPIARAW（「YL～RAW」配列番号41）である。

#### 【0107】

本発明は、特異的にEphB受容体ファミリーのメンバーと結合する化合物（すなわち、EphB受容体結合化合物）を提供する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合と競合するおよび／またはそれを阻害する。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物はアゴニストである。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はアンタゴニストである。

#### 【0108】

上記EphB受容体結合ペプチドは、本明細書に記載の通りコンジュゲート（例えば、融合または連結）して、例えば、改善された能力、活性、選択性、結合親和性および／または改善された半減期などの改善された特性を有するEphB受容体結合化合物を提供することができる。

#### 【0109】

具体的な実施形態において、上記EphB受容体結合化合物は、単量体であるおよびコンジュゲートまたは他の方法で修飾されてないEphB受容体結合ペプチドより大きい活性を有する（例えば、表1に記載のペプチド）。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のEphB受容体結合化合物は、EphB受容体結合ペプチドの約0.1～約0.01倍の活性を有する。他の実施形態において、本明細書に記載のEphB受容体結合化合物は、EphB受容体結合ペプチドの約0.1～1倍の活性を有する。例えば、ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、EphB受容体結合ペプチド（例えば、表1のもの）より改善された結合速度定

10

20

30

40

50

数 ( $k_{on}$  値)、解離速度定数 ( $k_{off}$  値)、親和性定数 ( $K_a$  値)、解離定数 ( $K_d$  値) を有する。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は単量体ペプチド（例えば、表 1 に記載の）と比較して改善された  $IC_{50}$  値を有する。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、細胞生存および / または増殖を測定する当技術分野で公知の標準アッセイを用いて分析すると、EphB受容体結合ペプチド（例えば、表 1 のもの）より *in vitro* で癌細胞のより大きい死（例えばより大きい死亡率）を引き起こす；例えば、細胞増殖は  $^3H$ -チミジン結合、フローサイトメトリーを測定することにより、直接細胞計数により、プロトオノコジーン（例えば、*fos*、*myc*）または細胞サイクルマーカーなどの公知の遺伝子の転写活性の変化を検出することによりアッセイすることができる；細胞生存率はトリパンブルー染色により評価することができる。これらの実施形態による癌細胞死の関係での用語「より大きい」（例えば、より大きい死亡率）は、癌細胞を EphB受容体結合ペプチドまたは EphB受容体結合化合物と接触させることにより引き起こされる細胞死のパーセントを意味し、これは癌細胞を対照ペプチドまたは化合物と接触させた場合と比較し、当技術分野で周知のアッセイおよび / または本明細書に記載のアッセイを用いて決定したものである。従って、EphB受容体結合ペプチドまたは EphB受容体結合化合物は、当技術分野で周知のアッセイおよび / または本明細書に記載のアッセイ、例えば、 $^3H$ -チミジン結合アッセイ、細胞計数アッセイ、トリパンブルー染色による細胞生存率アッセイにより決定して、対照ペプチドまたは化合物と比較して、癌細胞の少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 99% より大きい死（例えば、大きい細胞死亡率）を引き起こすことができる。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドまたは EphB受容体結合化合物は、当技術分野で周知のアッセイおよび / または本明細書に記載のアッセイ、例えば、腫瘍の物理的試験、イメージング分析（例えば、MRI、CT-スキャン、X線）により測定して、対照ペプチドまたは化合物と比較して、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 99% より大きい腫瘍のサイズの低下を引き起こすことができる。  
10  
20  
30

#### 【0110】

具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、EphB受容体結合ペプチドの活性の少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 99% を有する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、当技術分野で周知のおよび / または本明細書に記載のアッセイ、例えば、EphB受容体と結合する親和性、チロシンリン酸化、および細胞増殖を測定するアッセイにより測定して、EphB受容体結合ペプチドの活性の量より少なくとも 1 倍、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 2.5 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 3.5 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 1,000 倍、または少なくとも 10,000 倍高い活性の量を有する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物または EphB受容体結合ペプチドは、EphB受容体結合ペプチドの活性の 10% 未満、20% 未満、25% 未満、30% 未満、35% 未満、40% 未満、45% 未満、50% 未満、55% 未満、60% 未満、65% 未満、70% 未満、75% 未満、80% 未満、85% 未満、90% 未満、または 95% 未満を有する。  
40

#### 【0111】

ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は EphB受容体と少なくとも  $10^5$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^5$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも  $10^6$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも  $5 \times 10^6$  M $^{-1}$ s $^{-1}$

10

20

30

40

50

、少なくとも $10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の $k_{off}$ 速度で選択的に結合する。

#### 【0112】

他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と、 $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-1}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-3}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-4}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-5}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-6}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-7}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-8}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 以下、 $10^{-9}\text{s}^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-10}\text{s}^{-1}$ 以下、または $10^{-10}\text{s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度で選択的に結合する。

#### 【0113】

他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と少なくとも $10^{11}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{13}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{14}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{15}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{15}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{16}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{16}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{17}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{17}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{18}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{18}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{19}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{19}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{20}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{20}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{21}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{21}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{22}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{22}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{23}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{23}\text{nM}^{-1}$ 、少なくとも $10^{24}\text{nM}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^{24}\text{nM}^{-1}$ の $K_a$ ( $k_{on}/k_{off}$ )で選択的に結合する。

#### 【0114】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と $5 \times 10^7\text{nM}$ 以下、 $10^7\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^6\text{nM}$ 以下、 $10^6\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^5\text{nM}$ 以下、 $10^5\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^4\text{nM}$ 以下、 $10^4\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^3\text{nM}$ 以下、 $10^3\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^2\text{nM}$ 以下、 $100\text{nM}$ 以下、 $90\text{nM}$ 以下、 $80\text{nM}$ 以下、 $70\text{nM}$ 以下、 $60\text{nM}$ 以下、 $50\text{nM}$ 以下、 $20\text{nM}$ 以下、 $15\text{nM}$ 以下、 $10\text{nM}$ 以下、 $5\text{nM}$ 以下、 $3.8\text{nM}$ 以下、 $2\text{nM}$ 以下、 $1.5\text{nM}$ 以下、 $1\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-1}\text{nM}$ 以下、 $10^{-1}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-2}\text{nM}$ 以下、 $10^{-2}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-3}\text{nM}$ 以下、 $10^{-3}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-4}\text{nM}$ 以下、 $10^{-4}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-5}\text{nM}$ 以下、 $10^{-5}\text{nM}$ 以下、 $5 \times 10^{-6}\text{nM}$ 以下、または $10^{-6}\text{nM}$ 以下の $K_d$ ( $k_{off}/k_{on}$ )で選択的に結合する。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体とほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $10\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $20\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $30\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $40\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $50\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $60\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $70\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $80\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $90\text{nM}$ 、またはほぼ $1\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $0.1\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $0.1\text{nM}$ ～ほぼ $50\text{nM}$ 、またはほぼ $0.1\text{nM}$ ～ほぼ $25\text{nM}$ 、またはほぼ $0.1\text{nM}$ ～ほぼ $10\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $10\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $20\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $25\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $30\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $40\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $50\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $60\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $70\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $80\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $90\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $5\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5\text{nM}$ ～ほぼ $1\text{nM}$ 、またはほぼ $10\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $20\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $30\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $40\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $50\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $60\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $70\text{nM}$ ～ほぼ $100\text{nM}$ 、またはほぼ $50\text{nM}$ ～ほぼ $90\text{nM}$ 、またはほぼ $60\text{nM}$ ～ほぼ $90\text{nM}$ の $K_d$ ( $k_{off}/k_{on}$ )で選択的に結合する。

特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体とほぼ $0.6\text{nM}$ ～ほぼ $1.1\text{nM}$ 、またはほぼ $0.7\text{nM}$ ～ほぼ $1.2\text{nM}$ 、またはほぼ $0.5$ ～ほぼ $5\text{nM}$ の $K_d$ ( $k_{off}/k_{on}$ )で選択的に結合する。他の具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と、当技術分野で公知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー、または蛍光偏光アッセイを用いて決定して、約 $100\text{nM}$ 、約 $70\text{nM}$ 、約 $60\text{nM}$ 、約 $50\text{nM}$ 、約 $40\text{nM}$ 、約 $30\text{nM}$ 、約 $20\text{nM}$ 、約 $16\text{nM}$ 、約 $15\text{nM}$ 、約 $14\text{nM}$ 、約 $10\text{nM}$ 、約 $5\text{nM}$ 、約 $3.5\text{nM}$ 、約 $1.2\text{nM}$ 、約 $1.1\text{nM}$ 、約 $1\text{nM}$ 、約 $0.9\text{nM}$ 、約 $0.8\text{nM}$ 、約 $0.7\text{nM}$ 、または約 $0.6\text{nM}$ の $K_d$ ( $k_{off}/k_{on}$ )で選択的に結合する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、マウスEphB受容体と、当技術分野で公知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー、または蛍光偏光アッセイを用いて決定して、約 $100\text{nM}$ 、約 $70\text{nM}$ 、約 $60\text{nM}$ 、約 $50\text{nM}$ 、約 $40\text{nM}$ 、約 $30\text{nM}$ 、約 $20\text{nM}$ 、約 $16\text{nM}$ 、約 $15\text{nM}$ 、約 $14\text{nM}$ 、約 $10\text{nM}$ 、約 $5\text{nM}$ 、

10

20

30

40

50

約3.5nM、約1.2nM、約1.1nM、約1nM、約0.9nM、約0.8nM、約0.7nM、または約0.6nMの $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ )で選択的に結合する。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物はヒトEphB受容体と、当技術分野で公知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー、または蛍光偏光アッセイを用いて決定して、約100nM、約70nM、約60nM、約50nM、約40nM、約30nM、約20nM、約16nM、約15nM、約14nM、約10nM、約5nM、約3.5nM、約1.2nM、約1.1nM、約1nM、約0.9nM、約0.8nM、約0.7nM、または約0.6nMの $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ )で選択的に結合する。特別な実施形態において、EphB受容体結合ペプチドはマウスEphB受容体（またはEphB受容体の外部ドメイン）と当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー（ITC）、BIAcore、または蛍光偏光アッセイにより決定した $K_d$ 値で選択的に結合する。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物はヒトEphB受容体（またはEphB受容体の外部ドメイン）と当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー（ITC）、BIAcore、または蛍光偏光アッセイにより決定した $K_d$ 値で選択的に結合する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物のマウスEphB受容体に対する親和性の $K_d$ 値は当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー（ITC）、BIAcore、または蛍光偏光アッセイを用いて測定される。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物のヒトEphB受容体に対する親和性の $K_d$ 値は当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー（ITC）、BIAcore、または蛍光偏光アッセイを用いて測定される。具体的な実施形態において、 $K_d$ 値はアッセイ、例えば、ELISA、等温滴定カロリメトリー（ITC）、BIAcore、または蛍光偏光アッセイにより、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ99%の純度を有するEphB受容体結合化合物の調製物を用いて測定される。

【 0 1 1 5 】

一実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB受容体と選択的に結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、 $5 \times 10^7$ nM未満、 $10^7$ nM未満、 $5 \times 10^6$ nM未満、 $10^6$ nM未満、 $5 \times 10^5$ nM未満、 $10^5$ nM未満、 $5 \times 10^4$ nM未満、 $10^4$ nM未満、 $5 \times 10^3$ nM未満、 $10^3$ nM未満、 $5 \times 10^2$ nM未満、 $100$ nM未満、 $90$ nM未満、 $80$ nM未満、 $70$ nM、 $69$ nM未満、 $60$ nM未満、 $50$ nM未満、 $40$ nM未満、 $30$ nM未満、 $20$ nM未満、 $15$ nM未満、 $12$ nM未満、 $10$ nM未満、 $5$ nM未満、 $2$ nM未満、 $1.5$ nM未満、 $1$ nM未満、 $5 \times 10^{-1}$ nM未満、 $10^{-1}$ nM未満、 $5 \times 10^{-2}$ nM未満、 $10^{-2}$ nM未満、 $5 \times 10^{-3}$ nM未満、 $10^{-3}$ nM未満、 $5 \times 10^{-4}$ nM未満、または $10^{-4}$ nM未満のIC<sub>50</sub>値で阻害する。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB4と選択的に結合してEphB4受容体のエフリンBリガンドとの結合を、当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、ほぼ $1$ nM～ほぼ $10$ nM、ほぼ $1$ M～ほぼ $15$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $20$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $25$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $30$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $40$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $50$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $60$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $70$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $80$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $90$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $100$ nM、ほぼ $1$ nM～ほぼ $10$ nM、ほぼ $10$ nM～ほぼ $40$ nM、ほぼ $10$ nM～ほぼ $50$ nM、ほぼ $60$ nM～ほぼ $100$ nM、ほぼ $40$ nM～ほぼ $100$ nM、ほぼ $50$ nM～ほぼ $100$ nM、ほぼ $60$ nM～ほぼ $100$ nM、ほぼ $10$ nM～ほぼ $10^2$ nM、ほぼ $10^2$ nM～ほぼ $10^3$ nM、ほぼ $10^3$ nM～ほぼ $10^4$ nM、ほぼ $10^4$ nM～ほぼ $10^5$ nM、ほぼ $10^5$ nM～ほぼ $10^6$ nM、またはほぼ $10^6$ nM～ほぼ $10^7$ nMのIC<sub>50</sub>値で阻害する。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB4と結合して当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、ほぼ $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $11$ 、 $12$ 、 $13$ 、 $14$ 、 $15$ 、 $16$ 、 $17$ 、 $18$ 、 $19$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $40$ 、 $50$ 、 $60$ 、 $70$ 、 $80$ 、 $90$ 、 $100$ 、 $110$ 、 $120$ 、 $130$ 、 $140$ または $150$ nMのIC<sub>50</sub>値を有する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB4と結合して当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、ほぼ $12$ nM、またはほぼ $14$ nM、またはほぼ $16$ nMのIC<sub>50</sub>値を有する。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物はEphB4と結合して当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにより測定して、ほぼ $18$ nM、ほぼ $14$ nM、ほぼ $10$ nM、ほぼ $9$ nM、またはほぼ $7$ nMのIC<sub>50</sub>値を有する。具体的な実施形態において、IC<sub>50</sub>値はマウスエ

10 フリンBリガンドのマウスEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。特別な実施形態において、IC<sub>50</sub>はマウスエフリンBリガンドのヒトEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。いくつかの実施形態において、IC<sub>50</sub>値はヒトエフリンBリガンドのマウスEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。他の実施形態において、IC<sub>50</sub>値はヒトエフリンBリガンドのヒトEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。具体的な実施形態において、IC<sub>50</sub>値はマウスエフリンBリガンドのマウスEphB受容体との結合を阻害するEphB受容体結合ペプチドについて決定される。具体的な実施形態においては、IC<sub>50</sub>値は、例えば、ELISAにより、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ99%の純度を有するEphB受容体結合化合物の調製物を用いて測定される。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物は選択的にEphB受容体と結合してEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を、アッセイで、例えば、ELISAにより測定したIC<sub>50</sub>値で阻害し、ここでアッセイに用いる可溶性エフリンBリガンドまたはEphB受容体の前記濃度はほぼ0.001 μM、0.005 μM、0.01 μM、0.05 μM、0.1 μM、0.5 μM、1 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、200 μM、300 μM、400 μM、500 μM、600 μM、700 μM、800 μM、900 μM、1000 μM、または5000 μMである。

#### 【0116】

20 下記の表1は、EphB受容体結合化合物を作製するために利用できるある特定のペプチド（例えば、とりわけ、ペプチド二量体、ペプチド多量体、Fc-融合ペプチドおよびPEG-コンジュゲートペプチド）を開示する。EphB受容体結合化合物を作製するために利用できる他のEphB受容体結合ペプチドとしては、限定されるものでないが、長さが少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10または少なくとも11アミノ酸残基である上記の表1に掲げたペプチドの断片が挙げられる。ある具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物を作製するために利用する他のEphB受容体結合ペプチドとしては、限定されるものでないが、長さが4~5、4~6、4~7、4~8、4~9、4~10、5~10、6~10、4~15、5~15、6~15、4~20、5~20、5~30、5~40、5~50、6~20、4~25、5~25、または6~25アミノ酸残基である上記の表1に掲げたペプチドの断片が挙げられる。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物を作製するために利用できる他のEphB受容体結合ペプチドは、ほぼ4~ほぼ10アミノ酸残基、ほぼ4~ほぼ15アミノ酸残基、ほぼ4~ほぼ20アミノ酸残基、ほぼ4~ほぼ25アミノ酸残基、ほぼ4~ほぼ30アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ10アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ15アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ20アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ25アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ30アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ40アミノ酸残基、ほぼ5~ほぼ50アミノ酸残基、またはほぼ10~ほぼ40アミノ酸残基の長さを有する。さらに他のEphB受容体結合化合物を作製するために利用できる他のEphB受容体結合ペプチドとしては、限定されるものでないが、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、または少なくとも6アミノ酸置換、挿入および/または欠失を有する、上記の表1に掲げたペプチドの断片が挙げられる。可能な置換のなかに含まれるのは、アミノ酸配列が類似の化学的または構造的特徴を有するおよび/またはペプチドの生物学的機能を有意に変えることのない異なるアミノ酸により1以上のアミノ酸を置き換えることにより改変された保存的置換である。

#### 【0117】

40 当業者に公知の標準技法を用いて、突然変異をEphB受容体結合ペプチドをコードする又クレオチド配列に導入してもよく、突然変異には、例えば、部位-部位特異的突然変異およびアミノ酸置換をもたらすPCR介在性突然変異が含まれる。ある特定の実施形態において、誘導体は、元來の分子と比較して25未満のアミノ酸置換、20未満のアミノ酸置換、15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4アミノ酸置換、3アミノ酸置換、2未満のアミノ酸置換を含む。ある具体的な実施形態において、誘導体は1以上の予測非必須アミノ酸残基で行われる保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸置換」はアミノ酸残基が、類似の電荷をもつ側鎖を有するアミノ酸残基により置き換

えられている置換である。類似の電荷をもつ側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷の極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、-分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）をもつアミノ酸が挙げられる。あるいは、飽和突然変異などにより、突然変異をコード配列の全てまたは一部分に沿って無作為に導入し、得られる突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングして活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異後に、コードされたEphB受容体結合ペプチドを発現ベクター中に挿入して発現し（例えば、異種宿主細胞において）、そしてタンパク質の活性を測定することができる。

10

## 【0118】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物はコンジュゲートを含む。特別な実施形態において、コンジュゲートはFc融合タンパク質である。具体的な実施形態において、コンジュゲートはIgG<sub>1</sub>のFc領域またはその断片（例えば、CH<sub>2</sub>またはCH<sub>3</sub>ドメイン）を含むFc融合タンパク質である。他の具体的な実施形態において、Fc領域はIgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、またはIgG<sub>4</sub>のFc領域である。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はPEG-コンジュゲートEphB受容体結合ペプチドを含む。

20

## 【0119】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、PEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は1つのPEGポリマーとコンジュゲートした1つのEphB受容体結合ペプチドを含まない。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はビオチンとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は治療薬とコンジュゲートしないEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はイメージング剤とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。いくつかの他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は検出可能な薬剤とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。さらに他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は診断薬とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。

30

## 【0120】

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は多量体ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のEphB受容体結合ペプチドを含んでなる多量体ペプチドを含む。多量体ペプチドを作りあげるEphB受容体結合ペプチドは1、2以上の表1のペプチドでありうる。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、ホモマーである、すなわち、それぞれが同じアミノ酸配列を含む2以上のペプチドを含有する多量体ペプチドを含む。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、ヘテロマーである、すなわち、異なるアミノ酸配列を有する2以上のペプチドを含有する多量体ペプチドを含む。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、ホモ二量体である、すなわち、同じアミノ酸配列の2つのペプチドを含有する多量体ペプチドを含むものである。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、ヘテロ二量体、すなわち、異なるアミノ酸配列の2つのペプチドを含有する多量体ペプチドを含むものである。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、アミノ酸配列TNYLFSPNGPIARAW、（「TNYL-RW」、配列番号39）のホモ二量体のPEG連結ペプチド、例えば、(TNYL-RW)<sub>2</sub>-PEGを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、アミノ酸配列NYLFSPNGPIARAW、（「NYL-RW」、配列番号40）のホモ二量体のPEG連結ペプチド、例えば、(NYL-RW)<sub>2</sub>-PEGを含む。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は、アミノ酸配列YLFSNGPIARAW、（「YL-RW」、配列番号41）のホモ二量

40

50

体のPEG連結ペプチド、例えば、(YL-RAW)<sub>2</sub>-PEGを含む。

【表1】

表1. EphB受容体結合ペプチド

ペニング 受容体	クローン <sup>a</sup>	配列番号	ペプチド配列 <sup>b</sup>	EphB受容体特異性(%結合) <sup>c</sup>				ペプチド C <sub>50</sub> <sup>d</sup>
				B1	B2	B3	B4	
EphB1	1 <sup>4</sup>	1	EWLSPNIALPSVR	100	2	1	1	~10 μM <sup>e</sup>
	2 <sup>3</sup>	2	TILSQLPKSTWL	100	0	1	0	nd
	16 <sup>3,4</sup>	3	AHTFPYPHPKPH	100	4	8	1	~150 μM
	1 <sup>3</sup>	4	SHKFPGPPSWMS	88	100	10	9	nd
	1 <sup>3</sup>	5	THWKFQPWALVT	86	100	5	0	nd
	1 <sup>3,2</sup>	6	THWCHILLNCAAL	100	89	85	20	~15 μM <sup>f</sup>
EphB2	1 <sup>3,2</sup>	7	WHRYPDPRMLPT	54	100	31	13	nd
	5 <sup>3,2,4</sup>	8	WHWTIEPFAITS	99	100	22	20	nd
	1 <sup>2</sup>	9	DHWYYTTPWQPIE	100	81	5	5	>100 μM
	2 <sup>2,3,2</sup>	10	DHWRLLPFSLSS	53	100	4	1	nd
	1 <sup>2</sup>	11	IHWPVAVAPSYLD	97	100	4	4	>100 μM
	1 <sup>2</sup>	12	SHWPVLLPAHWWQ	98	100	9	6	nd
	5 <sup>2,3,2,4</sup>	13	DHWRVSPYSLLY	100	97	1	0	nd
	1 <sup>4</sup>	14	SHWPISPYSLLS	39	100	9	4	>100 μM
	1 <sup>2</sup>	15	NHWPTIQPYAPI	18	100	22	22	nd
	1 <sup>4</sup>	16	DHWPLLPYALAH	4	100	7	0	nd
	1 <sup>2</sup>	17	WPPPHWPRSLDYA	0	100	0	0	nd
	3 <sup>2</sup>	18	SNEWIQPRLPQH	1	100	7	1	~15 μM <sup>c</sup>

ペニンギ 受容体	クローネ <sup>a</sup>	配列番号	ペプチド配列 <sup>b</sup>	EphB受容体特異性(%結合) <sup>c</sup>				ペプチドIC <sub>50</sub> <sup>d</sup>
				B1	B2	B3	B4	
EphB4	1 <sup>3,2</sup>	19	<u>EWYMKFPPEHYF</u>	22	23	100	30	>600 μM
	7 <sup>3 (1st)</sup>	20	<u>DALNDWLFRPW</u>	0	0	100	16	>100 μM
	4 <sup>3,1,3,2,4</sup>	21	<u>DHNHNLYNPWRL</u>	9	8	9	100	~200 μM
	1 <sup>2</sup>	22	<u>TYFDQAWSIRA</u>	10	21	18	100	>50 μM <sup>f</sup>
	1 <sup>3,2</sup>	23	<u>EFFTWWRPTYYGI</u>	16	12	29	100	nd
	5 <sup>2,3,1,4</sup>	24	<u>TNYLFSPNGPIA</u>	5	3	3	100	~50 μM <sup>e</sup>
	1 <sup>4</sup>	25	<u>FSPQGPAAARNFA</u>	13	8	11	100	nd
	1 <sup>2</sup>	26	<u>LPHGPVAAAWDA</u>	2	15	2	100	>600 μM
	1 <sup>3,2</sup>	27	<u>NPVIGPQRRAWT</u>	1	0	4	100	nd
	1 <sup>3,1</sup>	28	<u>SHVGPIMRAWAP</u>	22	6	2	100	nd
Ephrin-B1	1 <sup>3,1</sup>	29	<u>GPVHRAWEPTSH</u>	4	6	16	100	7
	1 <sup>3,1</sup>	30	<u>GPVERAWRPDLI</u>	1	2	1	100	nd
	2 <sup>3,2,4</sup>	31	<u>GPVSKAWQETET</u>	13	13	14	100	3
	1 <sup>3,1</sup>	32	<u>GPVADAWLVYPR</u>	10	5	4	100	nd
	2 <sup>3</sup>	33	<u>WGIPRAAQVMWT</u>	16	17	20	100	6
	1 <sup>3 (1st)</sup>	34	<u>IPWTQHMANSPM</u>	nd	nd	nd	100	nd
	1 <sup>3 (1st)</sup>	35	<u>SGHQLLJNKMPN</u>	nd	nd	nd	100	nd
		36	<u>KFOQEFSPPNMYMGLFKKHHHDY</u>					
		37	<u>KFOQEFSPPNLWGLEFQQNKDY</u>					
		38	<u>KFOQEFSPPNLWGHEFRSHHDY</u>					
Ephrin-B2	EphB4	39	<u>TNYLFSPNGPIARAW</u>					See below
	EphB4	40	<u>NYLFSPNGPIARAW</u>					See below
	EphB4	41	<u>YLFSPPNGPIARAW</u>					See below
	EphB4	42	<u>LFSPNGPIARAW</u>					See below
	EphB4	43	<u>DALNDWLFRPW</u>					See below
	EphB4	44	<u>IPWTQHMAMSPM</u>					
	EphB4	45	<u>SVSVGGMKPSPRP</u>					

受容体 アミニング	クローナ <sup>a</sup>	配列番号	ペプチド配列 <sup>b</sup>	EphB受容体特異性(%結合) <sup>c</sup>				ペプチドIC <sub>50</sub> <sup>d</sup>
				B1	B2	B3	B4	
EphB4	EphB4	46	SGHQLLNKMPN GPVADAWLVYPR					
EphB4	EphB4	47	NPVIGPIQRRAWT					
EphB4	EphB4	48	DHNHDLYNPWRL					
EphB4	EphB4	49	TNYLFSPNGPIA					
EphB4	EphB4	50	LPHGPVAAAWDA					
EphB4	EphB4	51	TYFDFQAWSIRA					
EphB4	EphB4	52	EWYMKFPPEHYF					
EphB4	EphB4	53	GPVHRAWEPTSH					
EphB4	EphB4	54	SHVGPIRMRAWAP					
EphB4	EphB4	55	WGIPRAAQVMWT					
EphB4	EphB4	56	GPVSKAQWQETET					
EphB4	EphB4	57	EFFTWRPTYYGI					
EphB4	EphB4	58	GPVERAWRPDLI					
EphB4	EphB4	59	DHNHNLYNPWRL					
EphB4	EphB4	60	FSPQGPAAARNFA					
EphB4	EphB4	61	SHWPISPYSSLSS					
EphB2	EphB2	62	DHWRSVPYSLLY					
EphB2	EphB2	63	SNEWIQPRLPQH					
EphB2	EphB2	64	DHWRLPFSLSS					
EphB2	EphB2	65	SHWPVLPPFAHWQ					
EphB2	EphB2	66	IHWPVAPYSYLD					
EphB2	EphB2	67	WHRYPDPRMLPT					
EphB2	EphB2	68	WHTWTLPEFAITS					
EphB2	EphB2	69	THWCCHLLNCAAL					
EphB2	EphB2	70	DHWYVYTTPWQPIE					
EphB2	EphB2	71	NHWPTQPYAIP					
EphB2	EphB2	72	WPPHWRPSLDYA					
EphB2	EphB2	73	DHWPLLPYALAH					
EphB2	EphB2	74						

ペニシング 受容体	クローン <sup>a</sup>	配列番号	ペプチド配列 <sup>b</sup>	EphB受容体特異性(%結合) <sup>c</sup>				ペプチドIC <sub>50</sub> <sup>d</sup>
				B1	B2	B3	B4	
EphB2	75	RNKRRJRMQLPMI					B6	

<sup>a</sup>ペニシングのランダムを上付き添字で示した。1stはEphB4上の第1ペニシングである。

<sup>b</sup>アラインメントは目視による、またヒトのエフリンのG-Hループに下線を引いた。

<sup>c</sup>>25の値を太字で示した。

<sup>d</sup>エフリン-B2 AP結合を50%だけ阻害するためには必要なペプチドの濃度、濃度の前に「>」と記したIC<sub>50</sub>値は、エフリン-B2 AP結合を50%阻害するために必要な濃度、またはエフリン-B2 AP結合を50%阻害しなかった試験での最高濃度のどちらかを示す。

ビオチン化と非ビオチン化ペプチドが同じ結果を与えた。

溶解度により制限された。

この値はビオチン化ペプチドについて得たが、非ビオチン化ペプチドのIC<sub>50</sub>は150 μMである。  
nd、非検出。

【 0 1 2 1 】

### 5.1.1 EphB受容体結合ペプチドの調製

本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドは、当技術分野の標準的方法により、例えば、固相合成および組換えDNA/遺伝子工学技法により調製することができる。限定されるものでない固相合成の例としては、独占的固相合成、部分的固相合成、断片縮合、および古

典型的溶液合成が挙げられる。例えば、本明細書に参照により組み入れられる、Merrifield, 1963 J Am Chem Soc 85:2149を参照されたい。EphB受容体結合ペプチドを組換え／遺伝子工学技法により作製するために、EphB受容体結合ペプチドをコードする核酸を様々な発現ベクター中に挿入し、それを異種宿主細胞中に導入して組換え発現することができる。組換えDNA技法の標準プロトコルについては、例えば、それぞれ本明細書に参照により組み入れられるSambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, New York 2001)、ならびに米国特許公開第US 2004/0091486 A1号（例えば、パラグラフ番号136-148を参考）とその引用文献を参照されたい。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物またはEphB受容体結合ペプチドの調製物の純度は、当技術分野で周知のおよび／または本明細書に記載のアッセイを用いて、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ99%である。

10

## 【0122】

5.1.1.1 固相合成

合成を固相で、典型的には -アミノを保護したアミノ酸を用いてペプチドのC末端から開始する。好適な出発材料は、例えば、所要の -アミノ酸をクロロメチル化樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、またはベンズヒドリルアミン樹脂に付着させることによって調製することができる。かかるクロロメチル化樹脂の1つは商品名BIO-BEADS SX-1の下で、BioRad Laboratories, Richmond, CAにより販売されているし、またヒドロキシメチル樹脂の調製物はBodonszky, et al. 1966 Chem Ind (London) 38:1597に記載されている。ベンズヒドリルアミン (BHA) 樹脂はPietta and Marshall, 1970 Chem Commun 650に記載されているし、またBeckman Instruments, Inc., Palo Alto, CAから塩酸塩の形態で市販されている。

20

## 【0123】

従って、前記化合物は -アミノを保護したアミノ酸を、クロロメチル化樹脂と、例えば、炭酸水素セシウム触媒の助けて、Gisin, 1973 Helv Chim Acta 56 : 1467に記載の方法により、カップリングすることによって調製することができる。最初のカップリングの後、有機溶媒中のトリフルオロ酢酸 (TFA) または塩酸 (HCl) 溶液を含む選択した試薬により室温で -アミノ保護基を取り除く。

30

## 【0124】

-アミノ保護基がペプチドの段階的合成の技術分野で有用なことは公知である。それらには、アシリル型保護基（例えば、ホルミル、トリフルオロアセチル、アセチル）、芳香族ウレタン型保護基（例えばベンジルオキシカルボニル (Cbz) および置換されたCbz）、脂肪族ウレタン保護基（例えば、t-ブチルオキシカルボニル (Boc)、イソプロピルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル）およびアルキル型保護基（例えば、ベンジル、トリフェニルメチル）が挙げられる。BocおよびFmocが好ましい保護基である。側鎖保護基はカップリング中、無傷で残り、アミノ-末端保護基の脱保護の間にまたはカップリングの間に分割されることはない。側鎖保護基は、最終ペプチドの合成完了時に、標的ペプチドを改変しない反応条件下で除去可能でなければならない。

40

## 【0125】

Tyrに対する側鎖保護基にはテトラヒドロピラニル、tert-ブチル、トリチル、ベンジル、Cbz、Z--Br--Cbz、および2,5-ジクロロベンジルが含まれる。Aspに対する側鎖保護基にはベンジル、2,6-ジクロロベンジル、メチル、エチル、およびシクロヘキシルが含まれる。ThrおよびSerに対する側鎖保護基にはアセチル、ベンゾイル、トリチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル、およびCbzが含まれる。ThrおよびSerに対する側鎖保護基はベンジルである。Argに対する側鎖保護基にはニトロ、トシリル (Tos)、Cbz、アダマンチルオキシカルボニルメチルスルホニル (Mts)、またはBocが含まれる。Lysに対する側鎖保護基にはCbz、2-クロロベンジルオキシカルボニル (2Cl-Cbz)、2-プロモベンジルオキシカルボニル (2-BrCbz)、Tos、またはBocが含まれる。

50

## 【0126】

-アミノ保護基の除去後、残りの保護したアミノ酸を所望の順序で段階的にカップリングする。一般にそれぞれの保護したアミノ酸の過剰量を、溶液、例えば、塩化メチレン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、ジメチルホルムアミド(DMF)混合液中のジシクロヘキシリカルボジイミド(DCC)などの適当なカルボキシリ基活性化剤と共に用いる。

#### 【0127】

これらの手順はまた、20種の天然の遺伝的にコードされるアミノ酸以外のアミノ酸を任意の化合物の1、2箇所以上で置換したペプチドを合成するために利用することもできる。例えば、ナフチルアラニンをトリプトファンと置換して合成を容易にすることができる。本発明のペプチド中に置換することができる他の合成アミノ酸としては、L-ヒドロキシプロピル、L-3,4-ジヒドロキシ-フェニルアラニル、L-d-ヒドロキシリシルおよびD-d-メチルアラニルなどのd-アミノ酸、L- -メチルアラニル、アミノ酸、およびイソキノリルが挙げられる。Dアミノ酸および非天然の合成アミノ酸も本発明のペプチド中に組込むことができる(例えば、Roberts, et al. 1983 Unusual Amino/Acids in Peptide Synthesis 5:341-449を参照)

所望のアミノ酸配列が完成すると、樹脂からペプチドを切断するだけでなく残る全ての側鎖保護基も切断するトリフルオロ酢酸もしくはフッ化水素(HF)などの試薬を用いる処理により、所望のペプチドを樹脂支持体からデカップリングする。クロロメチル化樹脂を使用する場合、フッ化水素処理は遊離ペプチド酸を生じる。ベンズヒドリルアミン樹脂を使用する場合、フッ化水素処理は直接、遊離ペプチドアミドを生じる。あるいは、クロロメチル化樹脂を使用する場合、ペプチド樹脂の処理により側鎖が保護されたペプチドをデカップリングするのに、アンモニアを用いて所望の側鎖の保護されたアミドを得るか、またはアルキルアミンを用いて側鎖の保護されたアルキルアミドもしくはジアルキルアミドを得ることができる。次いで通常の方式でフッ化水素を用いる処理により側鎖保護を除去して遊離したアミド、アルキルアミド、またはジアルキルアミドを得る。

#### 【0128】

これらの固相ペプチド合成の手順は当技術分野で周知であって、さらに、J.M. Stewart and J.D. Young, 1984 Solid Phase Peptide Syntheses 2nd Ed., Pierce Chemical Companyに記載されている。

#### 【0129】

米国特許出願第07/492,462号(1990年3月7日出願)；同第07/624,120号(1990年12月6日出願)；および同第07/805,727号(1991年12月6日出願)に記載の「コードされた合成ライブラリー」または「非常に大規模な固定されたポリマー合成」システムを用いて、かかる活性をもつ最小サイズのペプチドを決定できるだけでなく、好ましいモチーフ(またはその最少サイズのモチーフ)と1、2以上の残基だけ異なるペプチドのグループを形成するペプチドを全て作ることもできる。次いで、このペプチドのコレクションを、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6を含むEph受容体ファミリーのメンバーと結合する能力についてスクリーニングすることができる。この固定されたポリマー合成システムまたは他のペプチド合成法はまた、EphB受容体結合ペプチドの末端切断類似体および欠失類似体ならびに末端切断体と欠失類似体の混合物を合成するにも利用できる。

#### 【0130】

##### 5.1.1.2 ペプチド改変

様々な技法を用いてEphB受容体結合ペプチドを改変し、未改変ペプチドと同じ所望の生物学的活性をもつが、溶解度、安定性、および/または加水分解とタンパク質分解に対する感受性についてさらに好ましい活性をもつ他のEphB受容体結合ペプチド(例えば、類似体または誘導体)を調製することができる。例えば、Morgan, et al. 1989 Ann Rep Med Chem 24:243-252を参照されたい。次に、ペプチドのアミノ酸残基のN末端アミノ基にて、C末端カルボキシリ基にて、他の反応部位(例えば、側鎖)にて、および/またはペプチドのアミド連鎖の1以上を非アミド連鎖に変えることによって改変したEphB受容体結合ペプチドを調製する方法を記載する。2以上のかかる改変(例えば、C末端カルボキシリ基

10

20

30

40

50

における改変とペプチドの2つのアミノ酸間に-CH<sub>2</sub>-カルバマート連鎖の封入)を1つのEphB受容体結合ペプチドで結合しうることは理解されている。

### 【0131】

#### (A) N末端改変

EphB受容体結合ペプチドは、典型的には遊離酸として合成されるが、容易にアミドまたはエステルとして調製することができる。また、ペプチドのアミノおよび/またはカルボキシ末端を改変してEphB受容体結合ペプチドを作ることもできる。アミノ末端改変としては、メチル化(すなわち、-NHCH<sub>3</sub>または-NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、アセチル化、ベンジルオキシカルボニル基の付加、またはRCOO-(ここで、Rはナフチル、アクリジニル、ステロイジル、および類似の基からなる群より選択される)により定義されたカルボン酸官能基を含有する、任意のブロック基によるアミノ末端のブロックが挙げられる。カルボキシ末端改変としては、カルボキサミド基による遊離酸の置き換えまたは構造を束縛するためのカルボキシ末端における環状ラクタムの形成が挙げられる。

10

### 【0132】

アミノ末端改変は前記の通りであり、アルキル化、アセチル化、カルボベンゾイル基の付加、スクシンイミド基の形成などを含む(例えば、Murray, et al. 1995 Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 5th ed., Vol. 1, Manfred E. Wolff, ed., John Wiley and Sons, Inc.を参照)。具体的には、N末端アミノ基を次のように反応させることができる:

20

(a)酸ハロゲン化物[例えば、RC(O)Cl]または対称無水物との反応により、式RC(O)NH-(式中、Rは先の定義の通りである)のアミド基を形成するケース。典型的には反応を、ほぼ等モルまたは過剰量(例えば、約5当量)の酸ハロゲン化物とペプチドとを、好ましくは過剰の(例えば、約10当量)の三級アミン、例えば、ジイソプロピルエチルアミンを含有する不活性希釈剤(例えば、ジクロロメタン)中で接触させ、反応中に生成する酸を除去することにより実施することができる。反応条件は、特に問題がなければ慣用の通りである(例えば、室温で30分間)。上記の酸ハロゲン化物との反応後に末端アミノをアルキル化すると、低級アルキルN-置換が行われて式RC(O)NR-のN-アルキルアミド基を得る;

30

(b)コハク酸無水物との反応によりスクシンイミド基を形成するケース。先に記載の通り、コハク酸無水物のほぼ等モル量または過剰量(例えば、約5当量)を使って、アミノ基を、好適な不活性の溶媒(例えば、ジクロロメタン)中のジイソプロピルエチルアミンなどの三級アミンの過剰量(例えば、10当量)の使用を含む当技術分野で周知の方法により、スクシンイミドに変換することができる。例えば、本明細書に参照によりその全てが組み入れられる、Wollenberg, et al., U.S. Pat. No. 4,612,132を参照されたい。コハク酸基を、例えば、汎用の方法で調製したC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキルまたは-SR置換基を用いて置換し、置換したスクシンイミドをペプチドのN末端に得ることは理解されている。かかるアルキル置換基は、低級オレフィン(C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>)の無水マレイン酸との反応により、Wollenbergら(前掲)が記載した方法に従って調製し、また-SR置換基はRSH(Rは先に定義した通りである)の無水マレイン酸との反応により調製する;

30

(c)ベンジルオキシカルボニル-NH-または置換したベンジルオキシカルボニル-NH-基を、好ましくは、反応中に生成する酸を除去する三級アミンを含有する好適な不活性希釈剤(例えば、ジクロロメタン)中で、CBZ-Cl(すなわち、ベンジルオキシカルボニル塩化物)または置換したCBZ-Clのほぼ等モル量または過剰量との反応により生成するケース;

40

(d)好適な不活性希釈剤(ジクロロメタン)中のR-S(O)<sub>2</sub>Cl(Rは先に定義した通りである)の等モル量または過剰量(例えば、5当量)との反応によりスルホアミド基を生成して末端アミンをスルホアミドに変換するケース。好ましくは、不活性希釈剤は、反応中に生成する酸を除去するために、ジイソプロピルエチルアミンなどの過剰の三級アミン(例えば、10当量)を含有する。反応条件は、特に問題がなければ慣用の通りである(例えば、室温で30分間);

(e)好適な不活性希釈剤(例えば、ジクロロメタン)中のR-OC(O)ClまたはR-OC(O)OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-NO<sub>2</sub>の等モル量または過剰量(例えば、5当量)との反応によりカルバマート基を形成し

50

て、末端アミンをカルバマート（Rは先に定義した通りである）に変換するケース。好ましくは、不活性希釈剤は、反応中に生成する酸を除去するために、三級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンの過剰量（例えば、約10当量）を含有する。反応条件は、特に問題がなければ慣用の通りである（例えば、室温で30分間）。；および

(f) 好適な不活性希釈剤（例えば、ジクロロメタン）中のR-N=C=Oの等モル量または過剰量（例えば、5当量）との反応により尿素基を形成して、末端アミンを尿素（すなわち、RNH-C(O)NH-）基（Rは先に定義した通りである）に変換するケース。好ましくは、不活性希釈剤はジイソプロピルエチルアミンなどの過剰の三級アミン（例えば、10当量）を含有する。反応条件は、特に問題がなければ慣用の通りである（例えば、室温で30分間）。

#### 【0133】

10

##### (B) C末端改変

C末端カルボキシル基がエステル（すなわち、-C(O)OR、ここでRは先に定義した通りである）により置換されたEphB受容体結合ペプチドの調製には、ペプチド酸を調製するために用いた樹脂を利用し、側鎖を保護したペプチドを塩基および適当なアルコール、例えばメタノールを用いて切断する。次いで、通常の方式でフッ化水素を用いる処理により側鎖保護基を除去して、所望のエステルを得る。

#### 【0134】

20

C末端カルボキシル基がアミド-C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>により置換されたEphB受容体結合ペプチドの調製には、ベンズヒドリルアミン樹脂をペプチド合成用の固体支持体として用いる。合成が完了すると、フッ化水素処理により支持体からペプチドを遊離して、直接、遊離ペプチドアミド（すなわち、C末端が-C(O)NH<sub>2</sub>である）を得る。あるいは、ペプチド合成中のクロロメチル化樹脂の使用と側鎖を保護したペプチドを支持体から切断するアンモニアとの反応とを組合わせると遊離ペプチドアミドを得て、そしてアルキルアミンまたはジアルキルアミンとの反応により側鎖を保護したアルキルアミドまたはジアルキルアミド（すなわち、C末端が-C(O)NRR<sup>1</sup>である、ここでRおよびR<sup>1</sup>は先に定義した通りである）を得る。次いで側鎖保護を通常の方式で、フッ化水素処理により除去して、遊離アミド、アルキルアミド、またはジアルキルアミドを得る。

#### 【0135】

30

他の代わりの実施形態においては、C末端カルボキシル基またはC末端エステルを、カルボキシル基またはエステルの-OHまたはエステル（-OR）とそれぞれN末端基との内部置換により環化するように誘導して、環状ペプチドを形成させることができる。例えば、合成および切断してペプチド酸を得た後に、遊離酸を、適当なカルボキシル基活性化剤、溶液中の、例えば、塩化メチレン（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>）、ジメチルホルムアミド（DMF）混合物中の、例えば、ジシクロヘキシリカルボジイミド（DCC）により活性化工ステルに変換する。次いで環状ペプチドを、N末端アミンをもつ活性化工ステルの内部置換により形成させる。重合とは対照的に、内部環化は非常に希薄な溶液を用いることにより促進できる。かかる方法は当技術分野で周知である。

#### 【0136】

40

また、ペプチドを環化するか、または脱アミノ（desamino）または脱カルボキシル（decarboxy）残基をペプチドの末端に組み込んで、末端アミノまたはカルボキシル基が存在しないようにして、プロテアーゼに対する感受性を低下させるかまたはペプチドのコンフォメーションを制限することもできる。本発明の化合物のC末端官能基としては、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキル（低級アルキル）アミド、低級アルコキシ、ヒドロキシ、およびカルボキシ、およびそれらの低級エステル誘導体、ならびに、それらの製薬上許容される塩が挙げられる。

#### 【0137】

50

##### (C) 骨格改変

本発明のEphB受容体結合ペプチドを作るために利用できる方法は、本明細書に参照により組み入れられるHruby, et al. 1990 Biochem J 268(2):249-262に記載されている。EphB受容体結合ペプチドはまた、類似の生物学的活性をもつ非ペプチド化合物の構造モデル

としての役割も果たす。当業者は、EphB受容体結合ペプチドを改変して、未改変のEphB受容体結合ペプチドと同じかまたは類似した所望の生物学的活性をもつが、溶解度、安定性ならびに加水分解およびタンパク質分解に対する感受性の点でリード化合物よりさらに好ましい活性をもつ他のEphB受容体結合ペプチドを作製するために、様々な技法を利用しうることを認識している。本明細書に参照により組み入れられるMorgan, et al. 1989 Ann Rep Med Chem 24:243-252を参照されたい。これらの技法には、ペプチド骨格をホスホネート、アミド化物、カルバマート、スルホアミド、二級アミン類、およびN-メチルアミノ酸から成る骨格によって置き換える技法が含まれる。

## 【0138】

1以上のペプチジル連鎖[-C(O)NH-]が、-CH<sub>2</sub>-カルバマート連鎖、ホスホネート連鎖、-CH<sub>2</sub>-スルホアミド連鎖、尿素連鎖、二級アミン(-CH<sub>2</sub>NH-)連鎖、アルキル化ペプチジル連鎖[-C(O)NR<sup>6</sup>- (R<sup>6</sup>が低級アルキルである)]のような連鎖、または他の、例えば、限定されるものでないが、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH=CH- (cisおよびtrans)、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-、および-CH<sub>2</sub>SO-のような連鎖により置き換えられているEphB受容体結合ペプチドは、当技術分野で公知の方法によって、例えば、慣用のペプチド合成中に、好適に保護したアミノ酸類似体を合成中の適当な点でアミノ酸試薬と置換する方法によって調製される。

## 【0139】

好適な試薬としては、例えば、アミノ酸のカルボキシル基が、上記連鎖の1つを形成するのに好適な部分と置き換えられているアミノ酸類似体が挙げられる。例えば、もしペプチド中の-C(O)NR-連鎖をCH<sub>2</sub>-カルバマート連鎖(-CH<sub>2</sub>OC(O)NR-)と置き換えることを望むのであれば、好適な保護されたアミノ酸のカルボキシル(-COOH)基を最初に-CH<sub>2</sub>OH基に還元し、次いでこの基を慣用の方法によってOC(O)Cl官能基またはパラ-ニトロカルボナート-OC(O)O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-P-NO<sub>2</sub>官能基へ変換する。かかる官能基と、固体支持体上に見出される部分的に作られたペプチドのN末端上のいずれかの遊離アミンまたはアルキル化アミンとの反応は-CH<sub>2</sub>OC(O)NR-連鎖の形成に導く。かかる-CH<sub>2</sub>-カルバマート連鎖の形成の詳細の説明については、Cho, et al. 1993 Science 261:1303-1305を参照されたい。

## 【0140】

同様に、ペプチド中のアミド連鎖のホスホネート連鎖との置き換えは、本明細書に参照によりその全てが組み入れられる米国特許出願第07/943,805号、第08/081,577号、および第08/119,700に記載の方法で達成することができる。

## 【0141】

ペプチド中のアミド連鎖の-CH<sub>2</sub>-スルホアミド連鎖との置き換えは、好適に保護されたアミノ酸のカルボキシル(-COOH)基を-CH<sub>2</sub>OH基およびヒドロキシル基に還元し、次いで慣用の方法によりトリル基などの好適な脱離基に変換することができる。トリレート誘導体の、例えば、チオ酢酸との反応と続いての加水分解および酸化的塩素化は、他の方法で、好適に保護されたアミノ酸のカルボキシル基と置き換わる-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>Cl官能基を提供する。この好適に保護したアミノ酸誘導体のペプチド合成における使用は、ペプチド中のアミド連鎖と置き換わってそれにより類似体、誘導体またはペプチドミメチックを提供する-CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>NR-連鎖の封入を提供する。アミノ酸のカルボキシル基の-CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>Cl基への変換についてのさらに完全な説明は、例えば、本明細書に参照により組み入れられるWeinstein, B., 1983 Chemistry & Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins Vol. 7, pp. 267-357, Marcel Dekker, Inc., New Yorkを参照されたい。

## 【0142】

ペプチド中のアミド連鎖の尿素連鎖との置き換えは、本明細書に参照によりその全てが組み入れられる米国特許出願第08/147,805号に記載の方法で達成することができる。

## 【0143】

-CH<sub>2</sub>NH-連鎖がペプチド中のアミド連鎖と置き換わる二級アミン連鎖は、例えば、アミド連鎖のカルボニル結合が慣用の方法によりCH<sub>2</sub>基に還元されている好適に保護したジペプチド類似体を使うことにより調製することができる。例えば、ジグリシンの場合、アミドのアミンへの還元は、脱保護後にH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>COOHを生じ、次いでこれをN-保護した

10

20

30

40

50

形態で次のカップリング反応を利用する。ジペプチド中のアミド連鎖のカルボニル基の還元による、かかる類似体の調製は、当技術分野では周知である（例えば、M.W. Remington 1994 Meth Mol Bio 35:241-247を参照）。

#### 【0144】

好適に保護したアミノ酸類似体は、対応するアミノ酸と同じ方式で、慣用のペプチド合成に用いる。例えば、典型的には、保護したアミノ酸類似体の約3当量をこの反応に用いる。塩化メチレンまたはDMFなどの不活性の有機希釈剤を用いて、酸が反応副産物として生じる場合、反応溶媒は反応中に生成する酸を除去するために、典型的には過剰量の三級アミンを含有する。1つの特に好ましい三級アミンはジイソプロピルエチルアミンであって、典型的にはこれを約10倍過剰で使用する。この反応は非ペプチジル連鎖を有するアミノ酸類似体の類似体、誘導体またはペプチドミメチック中への組込みをもたらす。かかる置換を所望によって繰り返し、ペプチド中のアミド結合をゼロから全てまで非アミド結合によって置換することができる。

10

#### 【0145】

ペプチドを環化するかまたはペプチドの末端に脱アミノ(desamino)または脱カルボキシル(descarboxy)残基を組み込んで、末端アミノ基または末端カルボキシル基が存在しないようにして、プロテアーゼに対する感受性を低下させるかまたはペプチドの立体配座を制限することもできる。化合物のC末端官能基には、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ(低級アルキル)、低級アルコキシ、ヒドロキシ、およびカルボキシ、ならびにそれらの低級エステル誘導体、ならびにそれらの製薬上許容される塩が含まれる。

20

#### 【0146】

##### (D) ジスルフィド結合の形成

EphB受容体結合ペプチドは、システインのチオール基間に分子内ジスルフィド結合をもつ環化型で存在してもよい。本発明の他の実施形態には、硫黄の1つがCH<sub>2</sub>基または他の硫黄の等価体(isostere)により置き換えられたジスルフィド誘導体の類似体が含まれる。これらの類似体は、当技術分野で公知の方法を用いて分子内または分子間置換を介して作ることができる。

20

#### 【0147】

あるいは、ペプチドのアミノ-末端を置換した酢酸(ここで置換基は-ハロ酢酸、例えば、-クロロ酢酸、-ブロモ酢酸、または-ヨード酢酸などの脱離基である)を用いてキャップすることができる。本発明の化合物を、脱離基のシステインの硫黄またはホモシステイン残基による置換を介して、環化または二量化することができる。例えば、それぞれ本明細書に参照により組み入れられる、Andreu, et al. 1994 Meth Mol Bio 35(7):91-169; Barker, et al. 1992 J Med Chem 35:2040-2048; およびOr, et al. 1991 J Org Chem 56:3146-3149を参照されたい。

30

#### 【0148】

##### (E) さらなる化学修飾

ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドを化学修飾して他のEphB受容体結合化合物を作製することができる。化学修飾は本明細書に記載の他の変更に加えて実施してもよい。ある特定の実施形態において、化学修飾はペプチドへの官能基の付加をもたらす。化学修飾は、限定されるものでないが、ペプチドのN末端、C末端、および/または反応性側鎖を含む任意の点で実施することができる。

40

#### 【0149】

20種の遺伝的にコードされるアミノ酸(またはDアミノ酸)の天然の側鎖を他の側鎖と、例えば、アルキル、低級アルキル、環状4-、5-、6-、~7-員のアルキル、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ(低級アルキル)、低級アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシおよびその低級エステル誘導体などの基と、および4-、5-、6-、~7-員のヘテロ環などの基と置き換えることができる。特に、プロリン残基の環サイズを5員から4、6、または7員に変えるプロリン類似体を使うことができる。環状基は飽和または不飽和であってもよく、もし不飽和であれば、芳香族または非芳香族であってもよい。ヘテロ環基は、好ましくは

50

1個以上の窒素、酸素、および／または硫黄ヘテロ原子を含有する。かかる基の例としては、フラザニル、フリル、イミダゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、モルホリニル（例えば、モルホリノ）、オキサゾリル、ピペラジニル（例えば、1-ピペラジニル）、ピペリジル（例えば、1-ピペリジル、ピペリジノ）、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル（例えば、1-ピロリジニル）、ピロリニル、ピロリル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、チオモルホリニル（例えば、チオモルホリノ）、およびトリアゾリルが挙げられる。これらのヘテロ環基は置換されていてもまたは無置換であってもよい。基が置換されている場合、その置換基はアルキル、アルコキシ、ハロゲン、酸素、または置換されたもしくは無置換のフェニルであってもよい。

10

### 【0150】

ある特定の実施形態においては、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドを修飾し、化学官能基を付加する。ある特定の実施形態においては、ペプチドを化学的に修飾し、アセチル化反応を用いて1以上のアセチル基を加える。他の実施形態においては、ペプチドを化学的に修飾し、アルキル化反応を用いて1以上のアルキル基、例えば、メチルまたはエチル基を加える（例えば、メチル基のリシンおよび／またはアルギニン残基への付加など）。他の実施形態においては、ペプチドを化学的に修飾し、1以上のビオチン付属物を加える。他の実施形態においては、ペプチドを化学的に修飾し、リン酸化反応を用いて1以上のリン酸基を加える（例えば、リン酸基のセリン、チロシン、トレオニンおよび／またはヒスチジン残基への付加など）（例えば、W. Bannwarth, et al. 1996 Biorganic and Medicinal Chemistry Letters 6:2141-2146を参照）。他の実施形態においては、ペプチドを化学的に修飾し、1以上の硫酸基を加える（例えば、硫酸基のチロシン残基への付加など）。他の実施形態においては、ペプチドを化学的に修飾し、グリコシル化反応を用いて1以上の糖を加える（例えば、グリコシル基のアスパラギン、ヒドロキシリシン、セリンおよび／またはトレオニン残基への付加など）。EphB受容体結合ペプチドを化学的に修飾するのに使うことができる他の方法は、Hruby, et al. 1990 Biochem J 268:249-262に記載されている。

20

### 【0151】

#### 5.1.2 EphB受容体結合化合物の調製

ある特定の実施形態においては、前記EphB受容体結合ペプチドと、1以上のペプチド（例えば、前記の表1に記載したペプチド）、類似体、誘導体、ペプチドミメチック、抗体断片（例えば、Fc抗体断片）、異種化合物、マーカー配列および／または治療薬とをコンジュゲートして（例えば、融合または連結して）、例えば、改善された選択性、効力、結合親和性および／または改善された半減期などの改善された特性を有するEphB受容体結合化合物を提供することができる。

30

### 【0152】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は1以上の親水性ポリマーと共有結合したEphB受容体結合ペプチドを含まない。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物はPEGと共有結合したEphB受容体結合ペプチドを含まない。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は無分枝のPEGと共有結合したEphB受容体結合ペプチドを含まない。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は分枝鎖PEGと共有結合したEphB受容体結合ペプチドを含まない。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は5,000ダルトン～約20,000ダルトンの範囲の分子量を有するPEGと共有結合したEphB受容体結合ペプチドを含まない。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は1つのPEGと共有結合した1つのEphB受容体結合ペプチドを含まない。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物は実質的に、1つのPEGと共有結合した1つのEphB受容体結合ペプチドから成るものでない。

40

### 【0153】

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物はセルロースまたはセルロース誘導体と共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。具体的な実施形

50

態において、EphB受容体結合化合物はデキストランまたはデキストラン誘導体と共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物はビオチンと共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。

#### 【 0 1 5 4 】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物はポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニルアルコール、またはポリビニルピロリドンと共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は治療薬と共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は検出可能な薬剤と共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は診断薬と共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。

#### 【 0 1 5 5 】

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物はペプチドまたは化学リンカーと共有結合でカップリングしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、N末端修飾をもつEphB受容体結合ペプチドを含まない。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は、C末端修飾をもつEphB受容体結合ペプチドを含まない。

#### 【 0 1 5 6 】

##### 5.1.2.1 ペプチドコンジュゲーション

本発明は、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、または12以上のEphB受容体結合ペプチドを含む多量体EphB受容体結合化合物（ホモ多量体およびヘテロ多量体を含む）を包含する。EphB受容体結合化合物は、ペプチドを本明細書に記載の方法によりコンジュゲートすることにより調製することができる。EphB受容体結合化合物は、2つのペプチドがコンジュゲートした二量体、または3つ以上のペプチドがコンジュゲートしたさらなる多量体のコンジュゲートとして存在しうる。EphB受容体結合化合物は、同じアミノ酸配列をもつ1以上のペプチド（ホモ多量体化合物）を含んでもおよび／または異なるアミノ酸配列をもつペプチド（ヘテロ多量体化合物）を含有してもよい。ある特定の実施形態において、一緒にコンジュゲートしたペプチドのEphB受容体結合化合物内の数は、12未満、11未満、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、または3未満のペプチドである。具体的な実施形態においては、2ペプチド、3ペプチド、4ペプチド、5ペプチド、6ペプチド、7ペプチド、8ペプチド、9ペプチド、10ペプチド、11ペプチドまたは12ペプチドが一緒にコンジュゲートして1つのEphB受容体結合化合物を形成する。

#### 【 0 1 5 7 】

ある特定の実施形態においては、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または少なくとも40のアミノ酸残基を含む1以上のEphB受容体結合ペプチドをコンジュゲートして、EphB受容体結合化合物を形成させる。他の実施形態においては、11未満、21未満、31未満、41未満、または50未満のアミノ酸残基を含む1以上のEphB受容体結合ペプチドをコンジュゲートして、EphB受容体結合化合物を形成させる。ある特定の実施形態においては、ほぼ4～ほぼ10、ほぼ5～ほぼ10、ほぼ6～ほぼ10、ほぼ4～ほぼ15、ほぼ5～ほぼ15、ほぼ6～ほぼ15、ほぼ4～ほぼ12、ほぼ5～ほぼ12、ほぼ6～ほぼ12、ほぼ10～ほぼ15、ほぼ10～ほぼ20、ほぼ10～ほぼ30、ほぼ10～ほぼ40、ほぼ10～ほぼ50、ほぼ15～ほぼ25、ほぼ20～ほぼ30、ほぼ25～ほぼ35、ほぼ30～ほぼ40、ほぼ30～ほぼ50、またはほぼ40～ほぼ50アミノ酸残基を含む1以上のEphB受容体結合ペプチドをコンジュゲートしてEphB受容体結合化合物を形成させる。ある具体的な実施形態においては、10、12、または15アミノ酸残基を含む1以上のEphB受容体結合ペプチドをコンジュゲートしてEphB受容体結合化合物を形成させる。一実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1に掲げた配列番号1～75の

10

20

30

40

50

ペプチドの2以上をコンジュゲートすることから得られる。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1に掲げた配列番号1~75のペプチドに基づく構造をもつ2以上のペプチド類似体または誘導体をコンジュゲートすることから得られる。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1に掲げた配列番号1~75のペプチドを、類似体、誘導体または異種ペプチドと一緒に1つのEphB受容体結合化合物にコンジュゲートすることから得られる。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、同じアミノ酸配列の2以上のEphB受容体結合ペプチドと一緒に1つのホモ多量体EphB受容体結合化合物にコンジュゲートすることから得られる。

#### 【0158】

具体的な実施形態は、表1の配列番号1~75からなる群より選択される配列をもつ2つのペプチドのコンジュゲーションから得られるペプチド二量体であるEphB受容体結合化合物を提供する。一実施形態は、表1の配列番号39に対応するアミノ酸配列TNYLFSPNGPIARAW ("TNYL-Raw")の2つのペプチドのコンジュゲーション(本明細書に記載した、融合または化学連鎖を含む)から得られるペプチド二量体を提供する。他の実施形態において、本発明は、表1の配列番号40に対応するアミノ酸配列NYLFSPNGPIARAW ("NYL-Raw")の2つのペプチドのコンジュゲーション(本明細書に記載した、融合または化学連鎖を含む)から得られるペプチド二量体を提供する。他の実施形態において、本発明は、表1の配列番号41に対応するアミノ酸配列YLFSNGPIARAW ("YL-Raw")の2つのペプチドのコンジュゲーション(本明細書に記載した、融合または化学連鎖を含む)から得られるペプチド二量体を提供する。他の実施形態において、本発明は、表1の配列番号1~75のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列の2つのペプチドのコンジュゲーション(本明細書に記載した、融合または化学連鎖を含む)から得られるペプチド二量体を提供する。他の実施形態は、本発明は、表1の配列番号1~75のアミノ酸配列から選択される2つの異なるアミノ酸配列の2つのペプチドのコンジュゲーション(本明細書に記載した、融合または化学連鎖を含む)から得られるペプチド二量体を提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載したペプチド二量体は、非二量体のまたは単量体のペプチドより高い親和性でEphB受容体(例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6)と結合する。ある具体的な実施形態において、本明細書に記載したペプチド二量体は、非二量体のまたは単量体のペプチドより高い親和性でEphB4受容体と結合する。

#### 【0159】

他の実施形態においては、EphB受容体結合化合物を、その類似体および/または誘導体を含む3つ以上のペプチドまたは修飾したペプチドの、多量体EphB受容体結合化合物中へのコンジュゲーション(融合および/または化学的連鎖を含む)により形成させる。ある特定の実施形態において、多量体EphB受容体結合化合物は、表1の配列番号1~75のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列の1以上のペプチドを含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の多量体EphB受容体結合化合物は、非多量体または単量体ペプチドより高い親和性で、EphB受容体(例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6)と結合する。ある具体的な実施形態において、本明細書に記載の多量体EphB受容体結合化合物は、非多量体または単量体ペプチドより高い親和性で、EphB4受容体と結合する。

#### 【0160】

二量体およびさらなる多量体のEphB受容体結合化合物は、2以上の成分を直接(例えば、ペプチド結合を介して)融合することによりおよび/または2以上の成分を下記の化学リンカーを用いて化学的に連結することによりコンジュゲートすることができる。ある特定の実施形態においては、以下に詳しく記載した通り、ポリエチレンギリコール(PEG)またはその化学誘導体を用いて、ペプチドを二量体EphB受容体結合化合物中にコンジュゲートする。具体的な実施形態において、TNYL-Raw、NYL-RawおよびYL-Raw(それぞれ表1に示した配列番号39、40、および41)からなる群より選択される2つのアミノ酸配列を、二官能性のPEGまたはPEGの化学誘導体を用いて二量体EphB受容体結合化合物としてコンジュゲートする。具体的な実施形態において、一緒に連結する2つのペプチドは同一のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を有する。ある具体的な実施形態において、PEGで連結した二量体のEphB受容体結合化合物は、同じ配列の非二量化ペプチドより高い親和性でEphB受容体（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）と結合する。特別な実施形態において、EphB受容体はマウスEphB受容体である。ある特定の実施形態において、EphB受容体はヒトEphB受容体である。

#### 【0161】

特別な実施形態において、2以上のEphB受容体結合ペプチドの、PEGまたはその化学誘導体とコンジュゲートしてEphB受容体結合化合物を形成するコンジュゲーション効率は、当技術分野で周知のアッセイにより測定して（例えば、ELISAまたは分光計によりコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分と分離し、画分の定量を行うことができる）、ほぼ10%、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ85%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ100%である。当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、アフィニティクロマトグラフィおよびHPLCを実施して、コンジュゲートしたおよびコンジュゲートしていないペプチドおよびPEGの画分を分離することができる。10

#### 【0162】

ある特定の実施形態において、多量体EphB受容体結合化合物はアゴニストである。他の実施形態において、多量体EphB受容体結合化合物はアンタゴニストである。

#### 【0163】

##### 5.1.2.2 リンカー

前記多量体EphB受容体結合化合物を作り上げるEphB受容体結合ペプチドは、非共有結合または共有結合（例えばペプチド結合）を用いて、一緒に直接コンジュゲート（すなわち、融合）してもよい。他の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドは、1以上の化学リンカー、ジスルフィド結合、IgGのFc領域またはその断片（例えば、CH<sub>2</sub>またはCH<sub>3</sub>ドメイン）および／または2以上のアミノ酸を接続できる他の化学部分を用いて一緒にコンジュゲートする。20

#### 【0164】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドを接続するリンカーは、コンフォメーションの柔軟性を示す。他の実施形態においては、ペプチドを接続するリンカーの長さを最適化してEphB受容体（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6）に対する結合親和性を最大化する。30

#### 【0165】

いくつかの実施形態においては、ペプチドリンカーを用いてEphB受容体結合ペプチドを接続し、多量体EphB受容体結合化合物を作り上げる。ある特定の実施形態においては、ペプチドリンカーは、大部分がグリシンおよびアラニンなどの立体障害のないアミノ酸で作り上げる。ある特定のペプチドリンカーとしては、アラニンおよびグリシンを含むポリグリシン、ポリアラニン、およびペプチドが挙げられる。一実施形態において、ペプチドリンカーは長さが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20アミノ酸残基である。他の実施形態において、ペプチドリンカーは、長さがほぼ1～ほぼ5、ほぼ5～ほぼ10、ほぼ2～ほぼ6、またはほぼ3～ほぼ7アミノ酸残基である。一実施形態において、EphB受容体結合化合物はリンカーを含まない。40

#### 【0166】

他の実施形態において、アミノ酸（例えば、システイン）のチオール基の間の分子間ジスルフィド結合は、ホモマーおよびヘテロマー化合物を含む二量体またはさらなる多量体のEphB受容体結合化合物を生じうる。1以上のシステイン残基をホモシステインにより置換することができる。ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合化合物を提供する目的で、ジスルフィド結合形成に加わることができる1以上のチオールを含有するアミノ酸、例えば、システインを特に含むように、ペプチドを改変することができる。ある具体的な実施形態においては、ホモマーおよびヘテロマー化合物を含む二量体またはさらなる多量体のEphB受容体結合化合物は、ジスルフィド結合を用いて作製しない。50

## 【0167】

他の実施形態においては、非ペプチドリンカーを用いてEphB受容体結合ペプチドを接続し、EphB受容体結合化合物を作製する。いくつかの実施形態においては、共有結合したアルキル基を含むリンカーを用いてEphB受容体結合化合物を形成させる。アルキルリンカーは、例えば、 $-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}_n-\text{C(O)-}$ （ここでnは整数のメチレン単位数である）の型をとることができる。アルキルリンカーは直鎖または分枝鎖であってもよくおよび／または飽和または不飽和であってもよい。他の実施形態としては、限定されるものでないが、アルキル、アシル、ハロゲン、ニトリル、アミノ、フェニル、エーテルなどを含む1以上の化学官能基により置換されたアルキルリンカーの使用が挙げられる。

他の実施形態においては、非ペプチドポリマーを用いてEphB受容体結合ペプチドを接続して多量体化合物を作製する。ある特定の実施形態において、非ペプチドポリマーは親水性ポリマーである。多量体化合物でリンカーとして使うことができるポリマーとしては、ポリアルキルエーテルの多官能性バージョン、例えば、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体、などが挙げられる。ある特定の実施形態において、かかる親水性ポリマーは約500～約100,000ダルトン、約2,000～約40,000ダルトン、または約3,000～約20,000ダルトンの範囲の平均分子量を有する。他の実施形態において、かかる親水性ポリマーは約3,000ダルトン、4,000ダルトン、5,000ダルトン、10,000ダルトンおよび20,000ダルトンの平均分子量を有する。

10

20

30

40

50

## 【0168】

EphB受容体結合化合物を、かかるポリマーにより誘導体化するかまたはかかるポリマーとカップリングすることは、Zalipsky, S. 1995 *Bioconjugate Chem* 6:150-165 ; Monfardini, C, et al. 1995 *Bioconjugate Chem* 6:62-69 ; 米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号；第4,179,337号、またはWO 95/34326（これらは全て、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる）に記載の方法を含む当技術分野で公知のいずれかの方法を用いて可能である。

## 【0169】

ある特定の実施形態においては、ペプチドを、官能基で修飾されたPEGを含む多官能性ポリエチレングリコール（PEG）と一緒に連結する。PEGはその分子量により分類され、典型的には約500ダルトン～約40,000ダルトンの範囲にある。ある特定の実施形態において、使用するPEGは5,000ダルトン～約20,000ダルトンの範囲の分子量を有する。本発明でリンカーとして使用するPEGは分枝鎖または非分枝鎖のどちらかであってよく、二官能性または多官能性であってもよい（例えば、Monfardini, C. et al. 1995 *Bioconjugate Chem* 6:62-69を参照）。二官能性PEGを含むPEGは、Nektar Therapeutics AL, Co. (Huntsville, Ala.)、Sigma Chemical Co. およびその他の会社から市販されている。かかる二官能性または多官能性PEGとしては、限定されるものでないが：アミン類とのコンジュゲーション用に好適なPEG、例えば、ポリエチレングリコール-ビス-(スクシンイミジル- -メチルブタノアート) (SMB-PEG-SMB) およびポリエチレングリコール-ビス-(カルボキシメチル-3-ヒドロキシブタノアート-N-ヒドロキシル-スクシンイミジルエステル) (NHS-HBA-CM-PEG-CM-HBA-NHS)；ペプチドのN末端とのコンジュゲーション用に好適なPEG、例えば、ポリエチレングリコール-ビス-ブチルアルデヒド (ButyralD-PEG-ButyralD)；チオールとのコンジュゲーション用に好適なPEG、例えば、ポリエチレングリコール-ビス-マレイミド (MAL-PEG-MAL)、モノメトキシポリエチレングリコール-二分枝型-マレイミド (mPEG2-MAL2)、分枝鎖-モノメトキシポリエチレングリコール-ビス-二分枝型-マレイミド (mPEG2-MAL2) およびポリエチレングリコール-ビス-ortho-ピリジニルジスルフィド (OPSS-PEG-OPSS)；ならびに、2つの異なるポリペプチド間のコンジュゲート形成用に好適なPEG、例えば、9-フルオレニルメトキシカルボニル-ポリエチレングリコール-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (Fmoc-PEG-NHS)、tert-ブチルオキシカルボニル-ポリエチレングリコール-N-ヒドロキシ-スクシンイミジルエステル (Boc-PEG-NHS)、および一般構

造X-PEG-Y(ここで、XとYは2つの異なるPEG活性化官能基を表す)を有するPEGの他のヘテロ二官能性誘導体が挙げられる。かかるリンカーは、例えば、Nektar Therapeutics AL, Co. (Huntsville, Ala.)から市販されている。

#### 【0170】

限定されるものでない例示の実施形態において、リンカーとして使われる親水性ポリマーは、各末端に反応性官能基、例えば、ハロゲン化シアヌル(例えば、塩化シアヌル、臭化シアヌルまたはフッ化シアヌル)、無水物試薬(例えば、無水ジプロモコハク酸などの無水ジハロコハク酸)、アシリアルジド、p-ジアゾニウムベンジルエーテル、3-(p-ジアゾニウムフェノキシ)-2-ヒドロキシプロピルエーテル)、イミド誘導体(例えば、スクシニミジルプロピオネートまたはN-ヒドロキシスクシンイミド)、チオール誘導体などを有する二官能性のPEGである。活性化ポリマーを次いでEphB受容体結合ペプチドと、本明細書に記載の方法を用いてまたは当技術分野で公知の通常のPEG化条件を用いて反応させて(例えば、アミンPEG化については、アミド結合をタンパク質とペプチドの間に形成させることができる)、PEGで連結した多量体EphB受容体結合化合物を作製する。あるいは、EphB受容体結合ペプチドの1つの官能基を活性化してポリマーと反応させるか、または2つの基を公知のカップリング法を用いて協奏カップリング反応で接続することができる。EphB受容体結合ペプチドをPEGにより、無数の公知のかつ当業者が利用する他の反応スキームを用いて、誘導体化できることは容易に理解されよう。

10

#### 【0171】

ある特定の実施形態においては、ペプチドを連結して本発明の二量体または多量体EphB受容体結合化合物を形成する化学リンカーを、その長さが有利な結合親和性を与えるように選択する。リンカー長さを最適化して有利な結合親和性を与える方法は当技術分野で公知であり、例えば、Kramer and Karpen, Nature (1998) 395:710-713に詳細に記載されている。特別な実施形態において、2以上のEphB受容体結合ペプチドの、化学リンカーとコンジュゲートしてEphB受容体結合化合物を形成するコンジュゲーション効率は、当技術分野で周知のアッセイにより測定して、ほぼ10%、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ85%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ100%である(例えば、ELISAまたは分光計によりコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分を分離し、画分の定量を行うことができる)。当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、アフィニティクロマトグラフィおよびHPLCを実施してコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分を分離することができる。

20

30

#### 【0172】

本明細書に記載の具体的な実施形態は、表1に掲げた配列番号1~75の2つのペプチドのコンジュゲーションから、本明細書に記載した化学リンカーにより接続して得られるEphB受容体結合化合物を提供する。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1の配列番号39に対応するアミノ酸配列TNYLFPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ3.4kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られる。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1の配列番号39に対応するアミノ酸配列TNYLFPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ10kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られる。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1の配列番号39に対応するアミノ酸配列TNYLFPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ40kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られる。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1の配列番号40に対応するアミノ酸配列NYLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ3.4kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られる。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、表1の配列番号40に対応するアミノ酸配列NYLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ10kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られる。特別な実施形態において、本発明は、表1の配列番号40に対応するアミノ酸配列NYLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ40kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られるEphB受容体結合化合物を提供する。具体的な実施形態において、本発明は、表1の配列番号40に対応するアミノ酸配列NYLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ40kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られるEphB受容体結合化合物を提供する。ある特定の実施形態において、本発明は、表

40

50

1の配列番号41に対応するアミノ酸配列YLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ3.4kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られるEphB受容体結合化合物を提供する。他の実施形態において、本発明は、表1の配列番号41に対応するアミノ酸配列YLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ10kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られるEphB受容体結合化合物を提供する。特別な実施形態において、本発明は、表1の配列番号41に対応するアミノ酸配列YLFSPNGPIARAWの2つのペプチドのコンジュゲーションから、ほぼ40kDaのPEGポリマーにより一緒に連結して得られるEphB受容体結合化合物を提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載のEphB受容体結合化合物ペプチド二量体は、二量体してないまたは単量体のペプチドより高い親和性でEphB4と結合する。

10

## 【0173】

## 5.1.2.3 抗体フラグメントとのコンジュゲーション

ある特定の実施形態において、本発明は、EphB受容体結合ペプチドを抗体断片（ある特定の実施形態においては、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸の抗体断片を用いる）とコンジュゲートして（例えば、融合または化学的に連結して）作製した多量体化合物またはEphB受容体結合化合物を含むEphB受容体結合化合物を提供する。これらの成分を直接融合によりコンジュゲートすることができるし、またはリンカーアミノ酸配列もしくは例えば、本明細書に記載の親水性ポリマーなどの他のリンカーを介してコンジュゲートすることができる。ペプチドを特定の細胞表面受容体に特異的な抗体断片とコンジュゲート（例えば、融合または化学的連結）することにより、抗体断片を利用してin vitroまたはin vivoのどちらかで、ペプチドを特定の細胞型に標的化することができる。抗体断片とコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドはまた、ペプチドの半減期を改変するか、またはペプチドの分解プロファイルを改変するのに利用することもできる。抗体断片とコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドはまた、当技術分野で公知の方法を使ってin vitroイムノアッセイおよび精製法に利用することもできる。例えば、参照によりその全てが組み入れられる、国際公開特許WO 93/21232；EP 439,095；Naramura et al, 1994, Immunol. Lett. 39 : 91-99；米国特許第5,474,981号；Gilliesら、1992, PNAS 89:1428-1432；およびFell et al, 1991, J. Immunol. 146 : 2446-2452を参照されたい。一実施形態において、EphB受容体結合化合物は、全抗体とコンジュゲートした1以上のEphB受容体結合ペプチドを含む。ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合化合物、全抗体とコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。特別な実施形態において、抗体断片とコンジュゲートした2以上のEphB受容体結合ペプチドの、EphB受容体結合化合物を形成するコンジュゲーション効率は、当技術分野で周知のアッセイにより測定して（例えば、ELISAまたは分光計によりコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分を分離し、画分の定量を行うことができる）、ほぼ10%、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ85%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ100%である。

20

## 【0174】

具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、IgG免疫グロブリンの生来のFc領域またはその断片（例えば、CH2またはCH3ドメイン）とコンジュゲートした（例えば、融合または化学的に連結した）EphB受容体結合ペプチドを含む。生来のFc領域は、全抗体の消化から得られる、単量体または多量体の形の、非抗原結合断片を含む分子または配列である。生来のFcの元来の免疫グロブリン源は、ある特定の実施形態において、ヒト起源であり、いずれの免疫グロブリンであってもよい。ある特定の実施形態においては、IgG1とIgG2を用いる。生来のFc領域は単量体のポリペプチドから成り、これは共有結合（例えば、ジスルフィド結合）および非共有結合の会合により二量体または多量体型に連結されていてもよい。生来のFc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、IgE）またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgA2）に応じて1~4の範囲にある。生来のFc領域の一例は、IgGのパパイン消化から得

30

40

50

られるジスルフィド結合二量体である (Ellison et al (1982), Nucleic Acids Res., 10: 4071-9を参照)。本明細書に使用する用語「生来のFc」は、単量体、二量体および多量体型に対する一般的呼称である。Fc変異体は、生来のFcから改変されているが、それでもなおサルベージ受容体、FcRnに対する結合部位を有する分子または配列である。国際特許出願WO 97/34631およびWO 96/32478はFc変異体の例、ならびにサルベージ受容体との相互作用を記載していて、本明細書に参照により組み入れられる。従って、Fc変異体は非ヒト生来のFc由来である分子または配列を含みうる。さらに、生来のFcは、本発明の融合分子にとって不必要的構造的特性または生物学的活性を与えるので、除去しうる部位を含む。従って、Fc変異体は、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択した宿主細胞との不適合性、(3)宿主細胞における発現時のN末端均一性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体との結合、または(7)抗体依存性細胞傷害性(ADCC)に影響を与えるかまたは関わる、1以上の生来のFc部位または残基を欠如する分子または配列を含みうる。Fc断片および/またはFc変異体を、EphB受容体結合ペプチドと1以上のN末端、C末端、または1以上のアミノ酸残基の側鎖においてコンジュゲート(例えば、直接融合または化学リンカーを介して接続)することができる。ある特定の実施形態において、生来のFc断片またはFc変異体のペプチドへの付加は有利な特性を導入する。ある特定の実施形態において、Fc変異体の生来のFc領域の付加は半減期を増加しおよび/またはペプチド分解プロファイルを改善する。特別な実施形態において、生来のFc領域またはFc変異体の付加は、当技術分野で公知のまたは本明細書に記載のアッセイにより測定して、EphB受容体結合ペプチドの半減期を、ほぼ0.5倍、ほぼ1倍、ほぼ1.5倍、ほぼ2倍、ほぼ2.5倍、ほぼ3倍、ほぼ3.5倍、ほぼ4倍、ほぼ4.5倍、ほぼ5倍、ほぼ5.5倍、ほぼ6倍、ほぼ6.5倍、ほぼ7倍、ほぼ8倍、ほぼ9倍、ほぼ10倍、ほぼ15倍、ほぼ20倍、ほぼ30倍、ほぼ40倍、ほぼ50倍、ほぼ60倍、ほぼ70倍、ほぼ80倍、ほぼ90倍、ほぼ100倍、ほぼ500倍またはほぼ1000倍だけ増加する。  
10  
20

#### 【0175】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、Fc断片またはFc変異体を含む抗体断片とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含有する。具体的な実施形態において、Fc領域またはFc変異体とコンジュゲートした1以上のEphB受容体結合ペプチドを含むEphB受容体結合化合物は、さらに、アミノ酸配列:Gly Ser Gly Ser Lys(配列番号76)を有するペプチドリンカーを含む。一実施形態において、EphB受容体結合化合物は、Fc領域またはFc変異体とコンジュゲートした1以上のEphB受容体結合ペプチドを含み、ここで、このEphB受容体結合化合物はアゴニストである。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、Fc領域またはFc変異体とコンジュゲートした1以上のEphB受容体結合ペプチドを含み、ここで、このEphB受容体結合化合物はアンタゴニストである。特別な実施形態において、Fc領域またはFc変異体とコンジュゲートした2以上のEphB受容体結合ペプチドの、EphB受容体結合化合物を形成するコンジュゲーション効率は、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイにより測定して(例えば、ELISAまたは分光計によりコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分を分離し、画分の定量を行うことができる)、ほぼ10%、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ85%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ100%である。当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、アフィニティクロマトグラフィおよびHPLCを実施して、コンジュゲートしたおよびコンジュゲートしていないペプチドとPEGの画分を分離することができる。当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、アフィニティクロマトグラフィおよびHPLCを実施して、コンジュゲートしていない画分とコンジュゲートした画分を分離することができる。  
30  
40  
50

#### 【0176】

##### 5.1.2.4 ポリマーとのコンジュゲーション

ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチド(例えば、表1に掲げたペプチド)を、共有結合または非共有結合で1以上の異種化合物、例えば、親水性ポリマーとカップリングすることができる。EphB受容体結合ペプチドを親水性ポリマーを用いて誘導

体化する場合、その溶解度および循環半減期を増加することができ、その生物学的分布パターンを改善することができ、またその免疫原性をマスキングして、それにより生物学的分解から保護することができる。有利なことに、以上の事を、その結合活性の僅かな低下しか伴わず（もしあっても）に達成できる。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は親水性ポリマーとコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。特別な実施形態において、異種化合物とコンジュゲートした2以上のEphB受容体結合ペプチドの、EphB受容体結合化合物を形成するコンジュゲーション効率は、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイにより測定して（例えば、ELISAまたは分光計によりコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分を分離し、画分の定量を行うことができる）、ほぼ10%、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ85%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ100%である。当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、アフィニティクロマトグラフィおよびHPLCを実施して、コンジュゲートしていない画分とコンジュゲートした画分を分離することができる。

10

## 【0177】

使用するのに好適な非タンパク質性ポリマーとしては、限定されるものでないが、ポリエチレン glycol およびポリプロピレン glycol で例示されるポリアルキルエーテル、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体などが挙げられる。ある特定の実施形態において、かかる親水性ポリマーは約500～約100,000ダルトン、約2,000～約40,000ダルトン、または約5,000～約20,000ダルトンの範囲の平均分子量を有する。他の実施形態において、かかる親水性ポリマーは約5,000ダルトン、10,000ダルトンおよび20,000ダルトンの平均分子量を有する。

20

## 【0178】

EphB受容体結合ペプチドは、Zalipsky, S. 1995 Bioconjugate Chem 6:150-165 ; Monfardini, C, et al. 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69 ; 米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号；第4,179,337号、またはWO 95/34326（これらの全ては参考によりその全てが本明細書に組み入れられる）に記載の方法のいずれかを用いて、かかるポリマーと誘導体化またはカップリングすることができる。

30

## 【0179】

ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドをポリエチレン glycol (PEG)（官能基が修飾されたPEGを含む）により誘導体化する。PEGは、2つの末端ヒドロキシル基をもつ直鎖、水溶性のエチレンオキシドのポリマーである。PEGは、その分子量により分類され、典型的には約500ダルトン～約40,000ダルトンの範囲にある。ある特定の実施形態において、使用するPEGは5,000ダルトン～約20,000ダルトンの範囲の分子量を有する。本発明のphB受容体結合ペプチドとカップリングするPEGは分枝鎖または非分枝鎖のどちらであってもよい（例えば、Monfardini, C. et al. 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69を参照）。PEG（官能基が修飾されたPEGを含む）は、Nektar Therapeutics AL, Co. (Huntsville, Ala.)、Sigma Chemical Co. およびその他の会社から市販されている。かかるPEGとしては、限定されるものでないが、モノメトキシポリエチレン glycol (MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレン glycol-コハク酸エステル (MePEG-S)、モノメトキシポリエチレン glycol-N-ヒドロキシ-スクシンイミド (MePEG-NHS) モノメトキシポリエチレン glycol-スクシンイミジルコハク酸エステル (MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレン glycol-アミン (MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレン glycol-トレシレート (MePEG-TRES)、モノメトキシポリエチレン glycol-イミダゾリル-カルボニル (MePEG-IM)、モノメトキシポリエチレン glycol-スクシンイミジル-メチルブタノアート (MePEG-SMG)、モノメトキシポリエチレン glycol-スクシンイミジルプロピオン酸エステル (MePEG-SPA)、モノメトキシポリエチレン glycol-カルボキシメチル-3-ヒドロキシブタノアート-N-ヒドロキシ-スクシンイミド (MePEG-CM-HBA-NHS)、モノメトキシポリエチレン glycol-アセトアルデヒド、モノメトキシポリエチレ

40

50

ングリコール-プロピオンアルデヒド、モノメトキシポリエチレングリコール-ブチルアルデヒド(MePEG-ButyralD)、モノメトキシポリエチレングリコール-ortho-ピリジルチオエステル(MePEG-OPTE)、モノメトキシポリエチレングリコール-マレイミド(MePEG-MAL)、モノメトキシポリエチレングリコール-ortho-ピリジニルジスルフィド(MePEG-OPSS)、およびモノメトキシポリエチレングリコール-チオール(MePEG-SH)が挙げられる。

#### 【0180】

概要を述べると、一実施形態においては、使用する親水性ポリマー、例えばPEGの一末端を、好ましくは、メトキシまたはエトキシ基などの非反応性基によりキャップする。その後、ポリマーの他の末端を、好適な活性化剤、例えばハロゲン化シアヌル(例えば、塩化シアヌル、臭化シアヌルまたはフッ化シアヌル)、無水物試薬(例えば、無水ジブロモコハク酸などの無水ジハロコハク酸)、アシリルアジド、p-ジアゾニウムベンジルエーテル、3-(p-ジアゾニウムフェノキシ)-2-ヒドロキシプロピルエーテル)、イミド誘導体、チオール誘導体などとの反応により活性化する。活性化したポリマーを次いで、本明細書に記載したまたは当技術分野で公知のEphB受容体結合ペプチドと反応させてポリマー誘導体化EphB受容体結合化合物を作製する。あるいは、EphB受容体結合ペプチドの官能基を、ポリマーと反応させるために活性化することができるし、または2つの基を公知のカップリング法を用いて協奏カップリング反応で接続することができる。EphB受容体結合ペプチドをPEGにより、多数の公知のかつ当業者が利用する他の反応スキームを用いて、誘導体化できることは容易に理解されよう。

#### 【0181】

この実施形態に用いるのに好適なペプチドは、一般に、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチド、例えば、表1に掲げた配列番号1~75のペプチドを含む。本発明に用いるのに好適な親水性ポリマーとしては、限定されるものでないが、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールにより例示されるポリアルキルエーテル、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体などが挙げられる。ある特定の実施形態において、かかる親水性ポリマーは約500~約100,000ダルトン、約2,000~約40,000ダルトン、または約5,000~約20,000ダルトンの平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、かかる親水性ポリマーは約5,000ダルトン、10,000ダルトンまたは20,000ダルトンの平均分子量を有する。

#### 【0182】

いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は1以上の親水性ポリマーとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、PEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、非分枝鎖PEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、分枝鎖PEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、5,000ダルトン~約20,000ダルトンの範囲の分子量を有するPEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、3.4kDaまたは10kDaの分子量を有するPEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は、PEGとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、PEGとコンジュゲートしていない2以上のEphB受容体結合ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、セルロースまたはセルロース誘導体とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、EphB受容体結合化合物は、デキストランまたはデキストラン誘導体とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、ポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニルアルコール、およびポリビニルピロリドンからなる群より選択される1以上のポリマーとコンジュゲートしていない

10

20

30

40

50

EphB受容体結合ペプチドを含む。

【0183】

5.1.2.5 マーカー配列とのコンジュゲーション

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドをマーカー配列、例えば、精製を容易にする他のペプチドとコンジュゲートすることにより形成することができる。具体的な実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけpQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）で提供されるタグのようなヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、その多くは市販されている。Gentz et al, 1989, PNAS 86: 821に記載の通り、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは融合タンパク質の精製に好都合である。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定されるものでないが、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する赤血球凝集素「HA」タグ（Wilson et al., 1984, Cell 37: 767）、および「flag」タグが挙げられる。  
10

【0184】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、1以上のマーカー配列とコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、1以上の「HA」タグとコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、1以上の「flag」タグとコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、1以上のヘキサ-ヒスチジンとコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドを含まない。  
20

【0185】

他の実施形態において、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドは診断薬または検出可能な薬剤とコンジュゲートしている。かかるコンジュゲートは、癌の発達または進行をモニターまたは予後判定するために、特定の療法の効能を測定するなどの臨床試験手順の一部として有用でありうる。さらにかかるコンジュゲートは、EphB受容体を過剰発現する細胞に関連する前癌症状の発達または進行をモニターまたは予後判定するために有用である。

【0186】

かかる診断および検出はEphB受容体結合ペプチドを検出可能な物質とカップリングすることにより実施することができ、かかる検出可能な物質としては、限定されるものでないが、様々な酵素、例えば、限定されるものでないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ；補欠分子族、例えば、限定されるものでないがストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチン；蛍光材料、例えば、限定されるものでないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリン；発光性材料、例えば、限定されるものでないが、ルミノール；生物発光性の材料、例えば、限定されるものでないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン；放射性物質、例えば、限定されるものでないが、ビスマス（<sup>213</sup>Bi）、炭素（<sup>14</sup>C）、クロム（<sup>51</sup>Cr）、コバルト（<sup>57</sup>Co）、フッ素（<sup>18</sup>F）、ガドリニウム（<sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd）、ガリウム（<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga）、ゲルマニウム（<sup>68</sup>Ge）、ホルミウム（<sup>166</sup>Ho）、インジウム（<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In）、ヨウ素（<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I）、ランタン（<sup>140</sup>La）、ルテチウム（<sup>177</sup>Lu）、マンガン（<sup>54</sup>Mn）、モリブデン（<sup>99</sup>Mo）、パラジウム（<sup>103</sup>Pd）、リン（<sup>32</sup>P）、プラセオジム（<sup>142</sup>Pr）、プロメチウム（<sup>149</sup>Pm）、レニウム（<sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re）、ロジウム（<sup>105</sup>Rh）、ルテニウム（<sup>97</sup>Ru）、サマリウム（<sup>153</sup>Sm）、スカンジウム（<sup>47</sup>Sc）、セレン（<sup>75</sup>Se）、ストロンチウム（<sup>85</sup>Sr）、硫黄（<sup>35</sup>S）、テクネチウム（<sup>99</sup>Tc）、タリウム（<sup>201</sup>Tl）、スズ（<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn）、トリチウム（<sup>3</sup>H）、キセノン（<sup>133</sup>Xe）、イッテルビウム（<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb）、イットリウム（<sup>90</sup>Y）、亜鉛（<sup>65</sup>Zn）；様々なポジトロン放出断層撮影を用いるポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。  
30  
40  
50

## 【0187】

一実施形態においてEphB受容体結合化合物は、1以上のEphB受容体結合ペプチドが検出可能な薬剤またはマーカー配列とコンジュゲートしているEphB受容体結合多量体ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、検出可能な薬剤またはマーカー配列とコンジュゲートしたFc領域とコンジュゲートしている1以上のEphB受容体結合ペプチドを含む。ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合化合物を利用してEphB受容体関連疾患または障害を検出または診断することができる。

## 【0188】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、マーカー配列とまたは診断薬とまたは検出可能な薬剤とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含有する。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、ビオチンとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、<sup>125</sup>IとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、蛍光材料、例えば、限定されるものでないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される化合物とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は、生物発光物質、例えば、限定されるものでないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンとコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。具体的な実施形態において、EphB受容体結合化合物は、放射性物質とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含む。

10

20

30

40

## 【0189】

5.1.2.6 治療薬とのコンジュゲーション

ある特定の実施形態において、本発明は、治療薬とコンジュゲート（例えば、融合または化学的に連結して）してEphB受容体結合化合物を形成するEphB受容体結合ペプチドを提供する。1以上のペプチドを、治療薬部分、例えば、細胞分裂停止薬または細胞殺傷薬などの細胞毒、治療薬または放射性金属イオン、例えば、-エミッターとコンジュゲートすることができる。細胞毒または細胞傷害薬には細胞に有害な任意の薬剤が含まれる。例としては、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エミチン、マイトイシン、エトボシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパノロール、ピューロマイシン、エピルビシンおよびシクロホスファミド、ならびにそれらの類似体または同族体が挙げられる。治療薬としては、限定されるものでないが、抗代謝物（例えば、メトレキセート、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロランブシリル、メルファラン、カルムスチン（BCNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイシンC、およびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧名ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生素質（例えば、ダクチノマイシン（旧名アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン）が挙げられる。

## 【0190】

さらにペプチドを、治療薬または所与の生物学的応答を改変する薬物部分とコンジュゲート（例えば、融合または化学的に連結した）することができる。治療薬または薬物部分

50

は古典的な化学治療薬に限定されると解釈してはならない。例えば、薬物部分は所望の生物学的活性を保持するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。かかるタンパク質としては、例えば、毒素、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、コレラ毒、またはジフテリア毒素；タンパク質、例えば、腫瘍壞死因子、-インターフェロン、-インターフェロン、神経成長因子、血小板由来の成長因子、組織プラスミノーゲンアクチベーター、アポトーシス剤、例えば、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、AIMI（国際特許公開WO 97/33899を参照）、AIM II（国際特許公開WO97/34911を参照）、Fasリガンド（Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6: 1567）、およびVEGI（国際特許公開WO 99/23105を参照）<sup>10</sup>、血栓薬または抗血管形成薬、例えば、アンギオスタチンまたはエンドスタチン；または、生物学的応答改変因子、例えば、リンホカイン[例えば、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)]、または成長因子[例えば、成長ホルモン(GH)]が挙げられる。

#### 【0191】

さらに、ペプチドを治療薬部分、例えば、放射性物質または放射性金属イオンとコンジュゲートするために有用な大環状キレーターとコンジュゲートすることができる（上記、放射性物質の例を参照）。ある特定の実施形態において、大環状キレーターは、ペプチドとリンカー分子を介して結合することができる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸(DOTA)である。かかるリンカー分子は当技術分野で公知であって、それぞれ参照によりその全てが組み入れられるDenardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; およびZimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50に記載されている。特別な実施形態において、2以上のEphB受容体結合ペプチドが治療薬とコンジュゲートしてEphB受容体結合化合物を形成するコンジュゲーション効率は、当技術分野で周知のアッセイにより測定して（例えば、ELISAまたは分光計によりコンジュゲートした画分とコンジュゲートしていない画分を分離し、画分の定量を行うことができる）、ほぼ10%、ほぼ20%、ほぼ30%、ほぼ40%、ほぼ50%、ほぼ60%、ほぼ70%、ほぼ80%、ほぼ85%、ほぼ90%、ほぼ95%、またはほぼ100%である。当技術分野で周知のまたは本明細書に記載のアッセイ、例えば、アフィニティクロマトグラフィおよびHPLCを実施してコンジュゲートしていない画分とコンジュゲートした画分を分離することができる。<sup>20</sup>

#### 【0192】

ある特定の実施形態において、EphB受容体結合化合物は治療薬または薬物部分とコンジュゲートしていないEphB受容体結合ペプチドを含有する。他の実施形態において、EphB受容体結合化合物は治療薬または薬物部分とコンジュゲートしていないコンジュゲートである。特別な実施形態において、EphB受容体結合化合物が含む多量体ペプチドは、治療薬、例えば、化学治療薬、ホルモン、ビタミン、酵素、毒素、ステロイド、アポトーシス誘導薬、アルキル化剤、抗代謝物、天然産物およびそれらの誘導体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、神経エフェクター（例えば、神経伝達物質または神経伝達物質アンタゴニスト）、オピオイド、抗炎症薬、利尿薬、バソプレッシンアゴニストまたはアンタゴニスト、アンジオテンシン、レンニン、抗細菌薬、抗ウイルス薬、抗血液凝固薬、抗血栓溶解薬、および抗血小板薬とコンジュゲートしていない。<sup>30</sup>

#### 【0193】

治療薬部分をペプチドとコンジュゲートする技法は周知である。前記部分をペプチドと、任意の当技術分野で公知の方法によりコンジュゲートすることができ、それらの方法としては、限定されるものでないが、アルデヒド/Schiff連鎖、スルフヒドリル連鎖、酸-不安定な連鎖、cis-アコニチル連鎖、ヒドラゾン連鎖、酵素分解性連鎖が挙げられる（一般的には、Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216を参照）。治療薬部分をペプチドとコンジュゲートするさらなる技法は周知であり、例えば、Arnon et al., 「癌療法において薬物を免疫標的化するためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」in Monoclonal Antibodies And

10

20

30

40

50

Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985) ; Hellstrom et al., 「薬物送達用の抗体 (Antibodies For Drug Delivery)」 in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, 「癌療法における細胞傷害薬の抗体担体：総括 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985) ; 「放射標識抗体の癌療法における治療利用の分析、結果、および将来予想 (Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」 in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) ; ならびにThorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58を参照されたい。抗体をポリペプチド部分と融合またはコンジュゲートする方法は当技術分野で公知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053、5,447,851号、および第5,112,946；EP 307,434；EP 367,166；国際特許公開WO 96/04388およびWO 91/06570；Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88 : 10535-10539；Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154 : 5590-5600；および Vil et al., 1992, PNAS 89 : 11337- 11341を参照されたい。ペプチドの治療薬部分との融合は直接であることを必ずしも必要とせず、リンカー配列を介して行ってもよい。かかるリンカー分子は当技術分野で公知であり、前記の第5.1.3.2節、および、それぞれ本明細書に参照によりその全てが組み入れられるDenardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4 : 2483-90；Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10 : 553；Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26 : 943-50；Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53 : 171-20に記載されている。

10

20

30

40

## 【0194】

5.1.3 ハイスループットスクリーニング

ハイスループットスクリーニングを利用して、例えば、EphB-エフリンB複合体の形成を破壊および／または阻止するEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を含む分子について、化学ライブラリーをスクリーニングすることができる。かかる分子を同定するアッセイのタイプの1つは、固定された、エフリンと複合したEph受容体外部ドメイン（アルカリホスファターゼ融合タンパク質）を利用する。結合したアルカリホスファターゼ活性を低下させる能力から、EphB-エフリン相互作用のインヒビター分子（例えば、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物）を同定しうる。標準ハイスループットスクリーニング法は当業者に公知であり、また参考により本明細書にその全てが組み入れられる米国特許公開第US2006/0177452号にも記載されている。こうして同定される分子の結合親和性と生物学的活性を評価するさらなるアッセイは当技術分野の標準的方法により行うことができ、それには下記第5.3節に記載の方法が含まれる。

## 【0195】

5.2 予防／治療法

本明細書に記載（前記第5.1節を参照）のEph受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物をヒトを含む動物に投与して、in vivoでEph受容体をモジュレートすることができる。例えば、本明細書に開示したある特定のペプチドを用いて、限定されるものでないが、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6を含むEph受容体ファミリーのメンバーを選択的に活性化または阻害することができる。従って、本発明は、EphB受容体関連疾患を治療及び予防する方法であって、アゴニストまたはアンタゴニストであるEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物をin vivoでEphB受容体を活性化または阻害するのに十分な量だけ投与するステップを含む前記方法を包含する。従って、本発明は、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を用いて、限定されるものでないが、癌、新生物疾患、血管疾患（例えば、黄斑変性症）および神経学的な障害を含むEphB受容体関連疾患を治療および／または管理する方法を提供する。

## 【0196】

癌の関係で、例えば、本発明は、特異的にEphB受容体ファミリーのメンバー、特にEphB

50

1またはEphB4と結合してアゴニストとして作用するEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を提供する。EphB受容体アゴニストはEphB受容体と結合し、受容体クラスター形成、トランスリン酸化、下流シグナル伝達、EphB受容体インターナリゼーションおよび／または受容体分解を刺激して、細胞増殖および転移を阻害することにより腫瘍進行を阻害する。さらに、同じ患者からの同じ組織型または細胞の正常な非癌細胞と比較して、特にEphB受容体が癌細胞に過剰発現されている場合、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を用いて、細胞傷害薬を癌組織または細胞に送達することができる。それ故に、EphB受容体結合ペプチドを化学療法薬、毒素、またはプロアポトーシス性ペプチドとカップリングさせて、腫瘍成長を低下させ、臨床関節炎を抑制し、または前立腺組織を破壊することができる (Arap, W. et al. 1998 Science 279:377-380 ; Olson, T.A. et al 1997 Int J Cancer 73:865-870 ; Ellerby, H.M. et al. 1999 Nat Med 5:1032-1038 ; Arap, W. et al. 2002 PNAS USA 99:1527-1531 ; Gerlag, D.M. et al. 2001 Arthritis Research 3:357-361)。毒性またはプロアポトーシス性物質を細胞を細胞内に送達して、選択的に細胞を殺滅することもできる (Ellerby, H.M. et al. 1999 Nat Med 5:1032-1038)。具体的な実施形態において、本発明は治療薬部分とコンジュゲート、連結および／または融合しているEphB受容体結合ペプチドであって、EphB受容体を発現する細胞を殺滅／排除／モジュレートしてかかる細胞の異常増殖により特徴付けられるEphB関連疾患を予防し、治療しおよび／または管理するために利用できる前記EphB受容体結合ペプチドを提供する。

10

20

30

40

50

#### 【0197】

ある具体的な実施形態において、本明細書および特に第5.1節に記載のEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物はアンタゴニストである。ある具体的な実施形態において、アンタゴニストは、天然リガンド（例えば、エフリン-Bリガンド）のEphB受容体ファミリーメンバーとの結合と競合しておよび／または前記結合を阻害して、EphB受容体クラスター形成および／またはトランスリン酸化および下流シグナル伝達経路の活性化を防止、阻害または低下するEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物である。EphB受容体アンタゴニストは、下流シグナル伝達経路を活性化するために必要であるエフリン依存性Eph受容体クラスター形成およびトランスリン酸化を防止することにより機能しうる (Murai & Pasquale, 2003, J. Cell Sci. 116 : 2823-2832)。ある具体的な実施形態において、アンタゴニストは、前記第5.1節に記載のFc融合タンパク質であるEphB受容体結合化合物である。他の実施形態において、アンタゴニストは、ペプチドの一断片であるEphB受容体結合化合物である。他の実施形態において、アンタゴニストはPEG化されているEphB受容体結合化合物である。

#### 【0198】

従って、ある特定の実施形態において、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB結合化合物を用いて、癌などの異常な血管形成、および非新生生物症状、例えば、肝硬変、線維症（例えば、肝臓、腎臓、肺、心臓、網膜および他の内臓の線維症）、喘息、虚血、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、血管再狭窄、黄斑変性症、慢性関節リウマチ、骨関節炎、乳児性血管腫、尋常性いぼ、カポジ肉腫、神経線維腫症、劣性栄養障害性表皮水泡症、強直性脊椎炎、全身性狼瘡、ライター症候、シェーグレン症候、子宮内膜症、子癪前症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、乾癬性関節症および乾癬に関わる疾患を治療および／または管理することができる。

#### 【0199】

一実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEph受容体結合化合物を、癌の治療および／または管理に有用である1以上の他の療法と組み合わせて投与することができる。ある特定の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドまたはEph受容体結合化合物を、動物、例えば、哺乳動物、好ましくはヒトに、癌の治療用に有用な1以上の他の療法と同時に投与する。他の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEph受容体結合化合物を、動物、例えば、哺乳動物、好ましくはヒトに、血管疾患（例えば、黄斑変性症）の治療用に有用な1以上の他の療法と同時

に投与する。さらに他の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEph受容体結合化合物を、動物、例えば、哺乳動物、好ましくはヒトに、神経障害の治療に有用な1以上の他の療法と同時に投与する。用語「同時に」は、療法、例えば、予防薬または治療薬の正確に同じ時間の投与に限定されるものでなく、むしろ、EphB受容体結合ペプチドまたはEph受容体結合化合物および他の薬剤を、被験体に続けてある時間間隔内に投与し、前記抗体が他の薬剤と一緒に作用して、もしそれらを他の方法で投与した場合よりも増加した利益を提供できることを意味する。例えば、それぞれの療法、例えば、予防薬または治療薬と同じ時間に、またはいずれかの順序で続けて異なる時点に投与することができる；しかし、もし同じ時間に投与しないのであれば、十分近い時間に投与して所望の治療または予防効果を与えるようにしなければならない。それぞれの治療薬を別々に適当な剤形で任意の好適な経路により投与することができる。他の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEph受容体結合化合物を手術の前に、同時に、または後に投与する。特別な実施形態において、手術は完全に限局性腫瘍を除去するかまたは大きい腫瘍のサイズを小さくする。手術はまた、予防対策としてまたは疼痛を緩和するために行うことができる。ある特定の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドまたはEph受容体結合化合物を、手術による腫瘍の除去後に、動物、例えば、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。他の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドまたはEph受容体結合化合物を、腫瘍を放射線療法および/または化学療法によって限局的に治療した後に、動物、例えば、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。いくつかの実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドまたはEph受容体結合化合物を、手術による腫瘍の除去後にアジュvant療法と組合せて、動物、例えば、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。

10

20

30

#### 【0200】

様々な実施形態においては、療法、例えば、予防薬または治療薬を、1時間未満離れて、約1時間離れて、約1時間～約2時間離れて、約2時間～約3時間離れて、約3時間～約4時間離れて、約4時間～約5時間離れて、約5時間～約6時間離れて、約6時間～約7時間離れて、約7時間～約8時間離れて、約8時間～約9時間離れて、約9時間～約10時間離れて、約10時間～約11時間離れて、約11時間～約12時間離れて、24時間以下離れてまたは48時間以下離れて投与する。具体的な実施形態においては、2以上の成分を同じ患者來訪中に投与する。

#### 【0201】

本明細書で提供する投与量および投与頻度は、用語、治療上有効なおよび予防上有効なものに包含される。投与量および投与頻度はさらに、典型的には、特定の療法、例えば、投与する治療薬または予防薬、癌の重症度と型、投与の経路、ならびに患者の年齢、体重、応答、および過去の医療歴に応じたそれぞれの患者に特異的な要因によって変わりうる。当業者は、かかる要因を考慮することにより、および、例えば、文献に報じられかつthe Physicians' Desk Reference (61<sup>st</sup> ed., 2007) に推奨される投与量に従うことにより好適なレジメンを選択することができる。

#### 5.2.1 患者集団

本発明は、被験体のEphB受容体関連疾患、またはその症候を予防、治療および/または管理する方法であって、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物、特に前記第5.1節に記載のものを投与することを含む前記方法を包含する。被験体は、好ましくは哺乳動物、例えば、非靈長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）または靈長類（例えば、カニクイザルなどのサル、またはヒト）である。ある好ましい実施形態において、被験体はヒトである。

40

50

#### 【0202】

本発明の方法は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の、EphB受容体関連疾患を患う患者かまたは患うと予想される患者（例えば、遺伝的素因をもつ患者または先に患った患者）への投与を含む。ある特定の実施形態においては、被験体をEphB受容体関連疾患について診断する。限定されるものでないEphB受容体関連疾

患の例としては、癌、および血管疾患（例えば、黄斑変性症）、および神経障害が挙げられる。かかる患者は、EphB受容体関連疾患について、先に治療されていてもよく、または現在、例えば、非EphB受容体結合療法により治療されている。本発明によれば、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を、限定されるものでないが、療法の第1、第2、第3および第4ラインを含むいずれかの療法のラインとして用いることができる。さらに、本発明によれば、非EphB受容体結合療法のいずれかの有害な影響または不耐性（intolerance）が起こる前に、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を用いることができる。本発明は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を投与してEphB受容体関連疾患（例えば、癌）の発症または再発を予防することを包含する。

10

#### 【0203】

一実施形態において、本発明はまた、現行の療法（例えば、治療薬または予防薬）の代替法としてEphB受容体関連疾患を治療または管理する方法も提供する。ある具体的な実施形態においては、現行の療法が患者にとってあまりにも毒性（すなわち、容認できないまたは耐えられない副作用）のあることを示したかまたは示しうる。他の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物が現行の療法と比較して副作用を軽減する。他の実施形態においては、患者が現行の療法に対して不応性または非応答性であることを示した。ある特定の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を、それを必要とする患者に、EphB受容体関連疾患を治療する他の療法の代わりに投与することができる。

20

#### 【0204】

本発明はまた、非EphB受容体結合ペプチドおよび／または非EphB受容体結合化合物療法に不応性であるかまたは不応性になった患者に、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を投与して、EphB受容体関連疾患またはその症候群を治療または改善する方法も包含する。EphB受容体関連疾患またはその症候群が不応性であるかどうかの判定は、EphB受容体関連疾患の罹患細胞、例えば上皮および／または内皮細胞について、または非EphB受容体結合ペプチドおよび／または非EphB受容体結合化合物療法に不応性であるか不応性になった患者について、療法の有効性をアッセイするための任意の当技術分野で公知の方法により、in vivoまたはin vitroのいずれかで行うことができる。

30

#### 【0205】

様々な実施形態において、癌細胞が有意に減少しなかったかまたは増加した場合、癌は不応性である。本発明はまた、特に、前記第5.1節に記載の1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を投与して癌の素因を有する患者における癌の再発、発症または発達を防止する方法も包含する。

#### 【0206】

特別な実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび／もしくはEphB受容体結合化合物、またはEphB発現および／もしくは活性を低下させる他の治療薬を投与して、癌細胞のある特定のホルモン、放射線および化学治療薬に対する耐性または感受性の低下を逆転しそれにより癌細胞を1以上のこれらの薬剤に対して再鋭敏化し、次いで、これらを投与して（または投与を継続して）、転移の予防を含めて、癌を治療または管理する。他の実施形態において、本発明は、それを必要とする患者の転移を治療する方法であって、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物、特に、第5.1節に記載のものを投与することを含む、前記方法を提供する。

40

#### 【0207】

代わりの実施形態において本発明は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／もしくはEphB受容体結合化合物を任意の他の治療と組合させて、他の治療法に不応性であることが示されてもうこれらの治療法を受けてない患者に投与する方法を提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法により治療する患者は、既に化学療法、放射線療法、ホルモン療法、または生物学的療法/免疫療法を用いて処理されたことのある患者

50

である。これらの患者のなかには、不応性の患者および現存の癌療法による治療にも関らず癌を患う患者が存在する。

#### 【0208】

具体的な実施形態において、現存治療は化学療法である。特別な実施形態において、現存治療としては、限定されるものでないが、メトトレキセート、タキソール、メルカプトプリン、チオグアニン、ヒドロキシウレア、シタラビン、シクロホスファミド、イホスファミド、ニトロソウレア、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、ダカルバジン、プロカルビジン、エトボシド、カンプトテシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ブリカマイシン、ミトキサントロン、アスピラギナーゼ、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルピン、パクリタキセル、ドセタキセルなどを含む化学治療薬の投与が挙げられる。これらの患者のなかには、放射線療法、ホルモン療法および／または生物学的療法／免疫療法を用いて治療される患者が存在する。これらの患者のなかにはまた、癌の治療のために手術を受けた患者も存在する。

10

#### 【0209】

あるいは、本発明はまた、放射線療法を受けているかまたは受けたことのある患者を治療する方法も包含する。これらの中には、化学療法、ホルモン療法および／または生物学的療法／免疫療法により治療されているかまたは先に治療された患者が存在する。これら患者の中にはまた、癌を治療する手術を受けた患者も存在する。

20

#### 【0210】

他の実施形態において、本発明は、ホルモン療法および／または生物学的療法／免疫療法を受けているかまたは受けた患者を治療する方法を包含する。これらの中には、化学療法および／または放射線療法により治療されているかまたは治療された患者が存在する。また、これらの患者の中には、癌を治療する手術を受けた患者も存在する。

20

#### 【0211】

さらに、本発明はまた、治療している被験体にとってその治療の毒性が強すぎることを示したかまたは示しうる場合、すなわち、許容できないまたは耐えられない副作用をもたらす場合、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および／または生物学的療法／免疫療法に代わる方法として癌を治療する方法も提供する。本明細書に記載の方法で治療している被験体は、場合によっては、許容できないまたは耐えられないことが判明した治療に応じて、手術、化学療法、放射線療法、ホルモン療法または生物学的療法などの他の癌治療で治療していくてもよい。

30

#### 【0212】

他の実施形態において、本発明は、かかる治療に不応性であることが示された被験体に、癌を治療するための任意の他の癌療法を行わず1以上のEph受容体結合ペプチドおよび／またはEph受容体結合化合物を投与する方法を提供する。具体的な実施形態において、他の癌療法に不応性の患者に、かかる癌療法を行わぬず、1以上のEph受容体結合化合物を投与する。

#### 【0213】

40

#### 5.2.2 EphB受容体関連疾患

本発明は、被験体のEphB受容体関連疾患を治療および／または管理する方法であって、1以上のEph受容体結合ペプチドおよび／またはEph受容体結合化合物を単独でまたは1以上の他の療法（例えば、治療薬または予防薬）と組合させて投与することを含む前記方法を包含する。限定されるものでないEphB受容体関連疾患の例としては、癌、および血管疾患（例えば、黄斑変性症）および神経障害（例えば、脊椎損傷）が挙げられる。限定されるものでない異常な血管形成に関わる疾患も、本発明の方法により考えていて、それらとしては、肝硬変、線維症（例えば、肝臓、腎臓、肺、心臓、網膜および他の内臓の線維症）、喘息、虚血、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、血管再狭窄、黄斑変性症、慢性関節リウマチ、骨関節炎、乳児性血管腫、尋常性いぼ、カポジ肉腫、神経線維種症、劣性栄養障害性表皮水泡症、強直性脊椎炎、全身性狼瘡、ライター症候、

50

シェーグレン症候、子宮内膜症、子癟前症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、乾癬性の関節症および乾癬が挙げられる。一実施形態において、EphB受容体関連疾患はEphB4受容体関連疾患である。

#### 【0214】

##### 5.2.2.1 癌

本発明の方法および組成物により治療、予防または管理および／または改善することができる癌および関連疾患としては、限定されるものでないが、上皮または内皮細胞由來の癌が挙げられる。かかる癌の限定されるものでない例としては、中皮腫、卵巣癌、膀胱癌、頭頸部の扁平上皮癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、小細胞肺癌および神経起源の癌が挙げられる。ある具体的な実施形態において、治療および／または管理する癌はEphB受容体ファミリーの1以上のメンバーを過剰発現する。

10

#### 【0215】

かかる癌の他の限定されるものでない例としては、次が挙げられる：

急性白血病、急性リンパ性白血病、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病などの急性骨髄性白血病、ならびに骨髄異形成症候群などの白血病；限定されるものでないが、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ性白血病、毛様細胞白血病などの慢性白血病；真性赤血球増加症；限定されるものでないが、ホジキン病、非ホジキン病などのリンパ腫；限定されるものでないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌型骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫などの多発性骨髄腫；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；意義不定モノクローナル免疫グロブリン血症；良性モノクローナル免疫グロブリン血症；H鎖病；限定されるものでないが、骨肉腫(bone sarcoma、osteosarcoma)、軟骨肉腫、ユーディング肉腫、悪性巨細胞腫瘍、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜性骨肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫(angiosarcoma、hemangi osarcoma)、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫などの骨および結合組織肉腫；限定されるものでないが、神経膠腫、星状膠細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠腫、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髓芽腫、髓膜腫、松果体腫、松果体芽腫、原発性脳リンパ腫などの脳腫瘍；限定されるものでないが、腺癌、小葉(小細胞)癌、腺管内癌、乳腺髓様癌、乳腺粘液癌、乳腺管状癌、乳頭癌、パジェット病および炎症性乳癌などの乳癌；限定されるものでないが、クロム親和性細胞腫および副腎皮質癌などの副腎癌；限定されるものでないが、乳頭状または濾胞性甲状腺癌、髓様甲状腺癌および未分化型甲状腺癌などの甲状腺癌；限定されるものでないが、膵島細胞腺腫、ガストリン産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ビポーマ、ソマトスタチン産生腫瘍およびカルチノイドまたは膵島細胞腫などの膵癌；限定されるものでないが、クッシング病、プロラクチン産生腫瘍、末端肥大症および尿崩症などの下垂体癌；限定されるものでないが、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫などの眼球黒色腫および網膜芽細胞腫などの眼癌；扁平上皮癌、腺癌および黒色腫などの腔癌；扁平上皮癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫およびパジェット病などの外陰癌；限定されるものでないが、扁平上皮癌および腺癌などの子宮頸癌；限定されるものでないが、子宮内膜癌および子宮肉腫などの子宮癌；限定されるものでないが、卵巣上皮癌、境界性腫瘍、胚細胞腫瘍および間質腫瘍などの卵巣癌；限定されるものでないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様囊胞癌、粘表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、疣贅癌および燕麦細胞(小細胞)癌などの食道癌；限定されるものでないが、腺癌、腫瘍形成型(ポリープ状)、潰瘍形成型、表在拡大型、びまん性拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、癌肉腫などの胃癌；大腸癌；直腸癌；限定されるものでないが、肝細胞癌および肝芽腫などの肝臓癌；腺癌などの胆嚢癌；限定されるものでないが、乳頭状、結節型およびびまん性などの胆管癌；非小細胞肺癌、扁平上皮癌(類表皮癌)、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌などの肺癌；限定されるものでないが、胚腫瘍、精上皮腫、未分化型、古典的(典型的)、精母細胞性、非精上皮腫、胎児性癌、奇形腫瘍、絨毛癌(卵黄囊腫瘍)などの精巣癌；限定されるものでないが、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫などの前立腺癌；陰茎癌；限定されるものではないが、扁平上皮癌などの口腔癌；基底癌；限定されるものでないが、腺癌、粘

20

30

40

50

表皮癌および腺様囊胞癌などの唾液腺癌；限定されるものでないが、扁平上皮癌および疣状癌などの咽頭癌；限定されるものでないが、基底細胞癌、扁平上皮癌および黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節型黒色腫、黒子悪性黒色腫、末端黒子型黒色腫などの皮膚癌；限定されるものでないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌(腎盤および／または尿管)などの腎癌；ウィルムス腫瘍；限定されるものでないが、移行上皮癌、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫などの膀胱癌。さらに癌には、混合肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽腫、上皮癌、囊胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌が含まれる（かかる疾患の総説は、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B.Lippincott Co., Philadelphia、およびMurphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of Americaを参照されたい）。 10

#### 【0216】

従って、本発明の方法および組成物はさらに（限定されるものでないが）次を含む様々な癌または他の異常増殖性疾患の治療、予防および／または管理に有用である：膀胱、乳房、大腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、胃、頸部、甲状腺および皮膚の癌を含む癌；扁平上皮癌を含む癌；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫を含むリンパ系の造血腫瘍；急性および慢性骨髓性白血病ならびに前骨髓性血病を含む骨髄系統の造血腫瘍；線維肉腫および横紋筋肉腫を含む間葉起源の腫瘍；黒色腫、精上皮腫、奇形癌、神経芽細胞腫および神経膠腫を含む他の腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、および神経鞘腫を含む中枢および末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫、および骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；ならびに黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞状癌および奇形癌を含む他の腫瘍。アポトーシスの異常によって引き起こされた癌も本明細書に記載の方法および組成物によって治療しうることを意図している。かかる癌としては、限定されるものでないが、濾胞状リンパ腫、p53変異をもつ癌、乳房、前立腺および卵巣のホルモン依存腫瘍、ならびに家族性腺腫性ポリボージスなどの前癌性病変、ならびに骨髄異形成症候群も挙げられる。具体的な実施形態においては、悪性または異常増殖性変化(化生および異形成など)、あるいは、皮膚、肺、大腸、乳房、前立腺、膀胱、腎臓、脾臓、卵巣、または子宫における過剰増殖性障害を治療または予防する。他の具体的な実施形態においては、肉腫、黒色腫、または白血病を治療、予防、および／または管理する。 20

#### 【0217】

いくつかの実施形態において、癌は特徴として、異常なEphB受容体発現を提示する。具体的な実施形態において、癌は悪性であって、EphB受容体、好ましくはEphB1またはEphB4を過剰発現する。一実施形態においては、サンプル（例えば、癌細胞または癌組織）中のEphB受容体の異常発現を、ネガティブ対照（例えば、非癌細胞、正常組織サンプル）と比較して当技術分野で周知のおよび／または本明細書に記載のアッセイを介して検出する。かかるアッセイの、限定されるものでない例としては、免疫組織化学、ELISA、免疫蛍光、ウェスタンプロット、およびフローサイトメトリーが挙げられる。ある具体的な実施形態において、EphB受容体を過剰発現する癌のEphB受容体発現レベルは、当技術分野で周知のおよび／または本明細書に記載のアッセイを用いて検出して、ネガティブ対照（例えば、正常または非癌細胞または正常または非癌組織サンプル）のEphB受容体発現レベルよりも少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%高い。 30

#### 【0218】

##### 5.2.3 他の予防薬／治療薬

いくつかの実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の投与を、限定されるものでないが、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および／または生物学的療法／免疫療法などの1以上の療法の投与と組合わせる。 40

10

20

30

40

50

予防薬 / 治療薬としては、限定されるものでないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質（翻訳後に改変されるタンパク質を含む）、抗体、細胞内発現抗体、アブタマーなどを含むタンパク質性分子；または小分子（1000ダルトン未満）、無機もしくは有機化合物；または、限定されるものでないが、2本鎖もしくは1本鎖DNA、または2本鎖もしくは1本鎖RNA、RNAi、ならびに三重らさん核酸分子を含む核酸分子が挙げられる。予防薬 / 治療薬は、いずれの公知の生物（限定されるものでないが、動物、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルスを含む）由来または合成分子のライブラリー由来であってよい。本発明の方法に使用される他の予防薬および治療薬の限定されるものでない例は、それぞれ参照により本明細書にその全てが組み入れられる米国特許公開第US 2004/0091486 A1号および第US 2004/0028685 A1号、および第US 2006/0121042 A1号を参照されたい。

10

## 【0219】

ある具体的な実施形態において、本明細書に記載の方法はEphB受容体結合ペプチドおよび / またはEphB受容体結合化合物の投与とキナーゼのインヒビターである1以上の予防薬 / 治療薬の投与との組合せを包含するものであって、前記キナーゼのインヒビターは、例えば、限定されるものでないが、ABL、ACK、AFK、AKT（例えば、AKT-1、AKT-2、およびAKT-3）、ALK、AMP-PK、ATM、Aurora1、Aurora2、bARK1、bArk2、BLK、BMX、BTK、CAK、C aMキナーゼ、CDC2、CDK、CK、COT、CTD、DNA-PK、EGF-R、ErbB-1、ErbB-2、ErbB-3、ErbB-4、ERK（例えば、ERK1、ERK2、ERK3、ERK4、ERK5、ERK6、ERK7）、ERT-PK、FAK、FGR（例えば、FGF1R、FGF2R）、FLT（例えば、FLT-1、FLT-2、FLT-3、FLT-4）、FRK、FYN、GSK（例えば、GSK1、GSK2、GSK3-、GSK3-、GSK4、GSK5）、G-タンパク質共役受容体キナーゼ（GRK）、HCK、HER2、HKII、JAK（例えば、JAK1、JAK2、JAK3、JAK4）、JNK（例えば、JNK1、JNK2、JNK3）、KDR、KIT、IGF-1受容体、IKK-1、IKK-2、INSR（インスリン受容体）、IRAK1、IRAK2、IRK、ITK、LCK、LOK、LYN、MAPK、MAPKAPK-1、MAPKAPK-2、MEK、MET、MFPK、MHCK、MLCK、MLK3、NEU、NIK、PDGF受容体、PDGF受容体、PHK、PI-3キナーゼ、PKA、PKB、PKC、PKG、PRK1、PYK2、p38キナーゼ、p135tyk2、p34cdc2、p42cdc2、p42mapk、p44mpk、RAF、RET、RIP、RIP-2、RK、RON、RSキナーゼ、SRC、SYK、S6K、TAK1、TEC、TIE1、TIE2、TRKA、TXK、TYK2、UL13、VEGFR1、VEGFR2、YES、YRK、ZAP-70、およびこれらのキナーゼの全てのサブタイプ（例えば、Hardie and Hanks (1995) *The Protein Kinase Facts Book, I and II*, Academic Press, San Diego, Calif. を参照）である。具体的な実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび / またはEphB受容体結合化合物を、Eph受容体キナーゼ（例えば、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5およびEphB6）のインヒビターである1以上の予防薬 / 治療薬の投与と組合せて投与する。ある具体的な実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび / またはEphB受容体結合化合物を、EphB受容体、好ましくはEphB1、EphB2、およびEphB4のインヒビターである1以上の予防薬 / 治療薬の投与と組合せて投与する。

20

## 【0220】

他の実施形態において、本発明は、EphB受容体結合ペプチドおよび / またはEphB受容体結合化合物の投与と血管形成インヒビターである1以上の予防薬 / 治療薬の投与とを組み合わせて包含する方法であって、前記血管形成インヒビターは、例えば、限定されるものでないが、アンギオスタチン（プラスミノゲン断片）；抗血管形成アンチトロンピンIII；アンギオザイム（Angiozyme）；ABT-627；Bay 12-9566；ベネフィン；ベバシズマブ；BMS-275291；軟骨由来インヒビター（CDI）；CAI；CD59補体断片；CEP-7055；Col 3；コンプレタスタチンA-4；エンドスタチン（コラーゲンXVIII断片）；フィプロネクチン断片；Gro-；ハロフジノン；ヘパリナーゼ；ヘパリン六糖類断片；HMV833；ヒト緜毛性ゴナドトロピン（hCG）；IM-862；インターフェロン / / ；インターフェロンで誘発されるタンパク質（IP-10）；インターロイキン12；クリングル5（プラスミノゲン断片）；マリマstatt；メタロプロテイナーゼインヒビター（TIMP）；2-メトキシエストラジオール；MMI 270（CGS 27023A）；MoAb IMC-1C11；ネオバスタット；NM-3；パンゼム；PI-88；胎盤リボヌクレアーゼインヒビター；プラスミノゲン活性化剤インヒビター；血小板因子-4（PF4）；プリノマstatt；プロラクチン16k<sub>d</sub>断片；プロリフェリン系タンパク質

30

40

50

(PRP) ; PTK 787 / ZK 222594 ; レチノイド ; ソリマstatt (Solimastat) ; スクアラミン ; SS 3304 ; SU 5416 ; SU 6668 ; SU 11248 ; テトラヒドロコルチゾール-S ; テトラチオモリブデン酸塩 ; サリドマイド ; トロンボスポンジン-1 (TSP-1) ; TNP-470 ; 形質転換成長因子-<sub>1</sub> (TGF-<sub>1</sub>) ; バスキュロスタチン (Vasculostatin) ; バソスタチン (Vasostatin) (カルレチクリン断片) ; ZD6126 ; ZD6474 ; ファルネシル・トランスフェラーゼイシンヒビター (FTI) ; およびビスフォスフォネートなどである前記方法を提供する。

## 【0221】

他の具体的な実施形態において、本発明は、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の投与と抗癌薬である1以上の予防薬／治療薬の投与とを組み合わせて包含する方法であって、抗癌薬は、例えば、限定されるものでないが、アシビシン(ascobicin)、アクラルビシン、塩酸アコダゾール(acodazole)、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アムボマイシン(ambomycin)、酢酸アメタントロン(ametantrone)、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アンスラマイシン、アスパラギナーゼ、アスペルリン(asperlin)、アザシチジン(azacitidine)、アゼテパ(azetepa)、アゾトマイシン(azotomycin)、バチマstatt、ベンゾデパ(benzodepa)、ビカルタミド、塩酸ビサントレン、ビスナフィドジメシレート(bisnafide dimesylate)、ビゼレシン、硫酸ブレオマイシン、ブレキナール・ナトリウム、プロピリミン、ブルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド(caracemide)、カーベタイマー、カルボプラチン、カルムスチン、塩酸カルビシン(carubicin)、カルゼレシン(carzelesin)、セデフィンゴル(cedefingol)、クロラムブシリ、シロレマイシン(cirolemycin)、シスプラチン、クラドリビン、クリスナトールメシレート、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルビシン、デカルバジン(デカルバジン)、デシタビン(decitabine)、デキソマプラチン(dexormaplatin)、デザグアニン(dezaguanine)、デザグアニンメシレート、ジアジコン、ドセタキセル、ドキソルビシン、塩酸ドキシリビシン、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオニ酸ドロモスタンロン、デュアゾマイシン(duazomycin)、エダトレキセート(edatrexate)、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン(elsamitrucin)、エンロプラチン(enloplatin)、エンプロメート(enpromate)、エピプロピジン(epipropidine)、塩酸エピルビシン、エルブゾロール(erbulazole)、塩酸エソルビシン(esorubicin)、エストラムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、エタニダゾール、エトポシド、リン酸エトポシド、エトプリン(etoprine)、塩酸ファドロゾール、ファザラビン(fazarabine)、フェンレチニド(fenretinide)、フルクスウリジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、フルロシタビン(flurocitabine)、ホスキドン(fosquidone)、ホストリエシン・ナトリウム、ゲムシタビン、塩酸ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、塩酸イダルビシン、イホスファミド、イルモホシン、インターロイキン2(組換えインターロイキン2、またはrIL2を含む)、インターフェロン-2a、インターフェロン-2b、インターフェロン-n1、インターフェロン-n3、インターフェロン-1a、インターフェロン-1b、イプロプラチン、塩酸イリノテカン、酢酸ランレオチド、レトロゾール、酢酸リュープロライド、塩酸リアロゾール、ロメトレキソール・ナトリウム(lometrexol sodium)、ロムスチン、塩酸ロソキサントロン(losoxantrone hydrochloride)、マソプロコール(masoprocol)、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサレート・ナトリウム、メトプリン、メツレデパ(meturedepa)、ミチンドミド(mitindomide)、マイタルシン(mitocarcin)、マイクロミン(mitocromin)、マイトギリン(mitogillin)、マイタルシン(mitomalcin)、マイトイシン、マイトスパー(mitosper)、ミトタン(mitotane)、塩酸ミトキサンtron、ミコフェノール酸、ニトロソ尿素、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルマプラチン(ormaplatin)、オキシスラン(oxisuran)、パクリタキセル、ペガスパルガーゼ(pegaspargase)、ペリオマイシン(peliomycin)、ペントムスチン(pentamustine)、硫酸ペプロマイシン、ペルホスファミド(perfosfamide)、ピボブロマン、ピボスルファン(piposulfan)、塩酸ピロキサンtron(piroxantrone)、プリカマイシン、プロメスタン(plomestane)、ポルフィマー・ナト

リウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン(prednimustine)、塩酸プロカルバジン、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、ピラゾフリン(pyrazofurin)、リボプリン(riboprine)、ログレチミド(rogletimide)、サфинゴル(safingol)、塩酸サ芬ゴル(safingol)、セムスチン、シムトラゼン(simtrazene)、スバルフォセート・ナトリウム、スバルソマイシン、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン(spiromustine)、スピロプラチン(spiroplatin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌール(sulofenur)、タリソマイシン、テコガラン・ナトリウム、テガフル、塩酸テロキサンtron(teloxantrone)、テモポルフィン、テニボシド、テロキシロン(teroxirone)、テストラクトン、チアミブリーン(thiamiprime)、チオグアニン、チオテバ、チアゾフリン(tiazofurin)、チラパザミン、クエン酸トレミフェン、酢酸トレストロン(trestolone)、リン酸トリシリビン(triciridine)、トリメトレキセート、グルクロン酸トリメトレキセート、トリプトレリン、塩酸チュブロゾール(tubulozole)、ウラシル・マスター、ウレデパ(uredepa)、バブレオチド(vapreotide)、ベルテポルフィン、硫酸ビンプラスチン、硫酸ビンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ビネピジン(vinepidine)、硫酸ビングリシネット(vinglycinate)、硫酸ビンロイロシン(vinleurosine)、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンロシジン(vinrosidine)、硫酸ビンゾリジン(vinzolidine)、ボロゾール(vorozole)、ゼニプラチン(zeniplatin)、ジノスタチン、塩酸ゾルビシンである前記方法を提供する。他の抗癌薬としては、限定されるものでないが、20-epi-1,25ジヒドロキシビタミンD3、5-エチニルウラシル、アビラテロン(abiraterone)、アクラルビシン、アシルフルベン、アデシペノール(adecyphenol)、アドゼレシン、アルデスロイキン、ALL-TKアンタゴニスト、アルトレタミン、アンバムスチン(ambamustine)、アミドクス(amidox)、アミフォスチン、アミノレブリン酸、アムルビシン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホライド、血管形成インヒビター、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリクス(antarelix)、抗背側化形態形成タンパク質1、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、アンチネオプラスチック、アフィジコリングリシネット、アポトーシス遺伝子調節剤、アポトーシス調節剤、アプリン酸、ara-CDP-DL-PTBA、アルギニンデアミナーゼ、アスラクリン(asulacrine)、アタメスタン、アトリムスチン、アキシナスタチン(axinastatin)1、アキシナスタチン2、アキシナスタチン3、アザセトロン、アザトキシン、アザチロシン、バッカチンIII誘導体、バラノール(balanol)、バチマstatt、BCR/ABLアンタゴニスト、ベンゾクロリン、ベンゾイルスタウロスボリン、-ラクタム誘導体、-アレチン(a-lethine)、-クラミシンB、ベツリン酸、bFGFインヒビター、ビカルタミド、ビサントレン、ビスマジリジニルスペルミン、ビスマファイド(bisnafide)、ビストラテン(bistratene)A、ビゼレシン、ブレフレート(breflate)、ブロピリミン、ブドチタン(budotitane)、ブチオニン・スルホキシイミン、カルシポトリオール、カルフォスチンC、カンプトセシン誘導体、カナリア痘IL-2、カベシタビン、カルボキサミド-アミノ-トリアゾール、カルボキシアミドトリアゾール、CaRest M3、CARN 700、軟骨由来インヒビター、カルゼレシン(carzelesin)、カゼイン・キナーゼインヒビター(ICOS)、カスタノスペルミン、セクロピンB、セトロレリクス、クロロキノキサリン・スルホニアミド、シカブロスト、cis-ボルフィリン、クラドリビン、クロミフェン類似体、クロトリマゾール、コリスマイシンA、コリスマイシンB、コンブレタスタチンA4、コンブレタスタチン類似体、コナゲニン、クラムベスシジン(crambescidin)816、クリスナトール(crisnatol)、クリプロファイシン(cryptophycin)8、クリプロファイシンA誘導体、クラシン(curacin)A、シクロペンタ-アントラキノン、シクロプラタム、シペマイシン(cypemycin)、シタラビンオクホスフェート、細胞溶解因子、サイトスタチン(cytostatin)、ダクリキシマブ(dacliximab)、デシタビン(decitabine)、デヒドロジデムニンB、デスロレリン、デキサメタゾン、デキシホスファミド、デクスラゾキサン、デクスペラパミル、ジアジコン、ジデムニンB、ジドクス(diodox)、ジエチルノルスペルミン、ジヒドロ-5-アザシチジン、ジヒドロタキソール、ジオキサマイシン(dioxamycin)、ジフェニル・スピロムスチン(diphenyl spiromustine)、ドセタキセル、ドコサノール、ドラセトロン、ドキシフルリジン、ドロロキシフェン、ドロナビノール、デュオカルマイシンSA、エブセレン、エコムスチン(ecomustine)、エデルホ

10

20

30

40

50

シン(edelfosine)、エドレコロマブ、エフロルニチン、エレメン、エミテフル、エピルビシン、エプリステリド、エストラムスチン類似体、エストロゲン・アゴニスト、エストロゲン・アンタゴニスト、エタニダゾール、リン酸エトポシド、エキセメスタン、ファドロゾール、ファザラビン(fazarabine)、フェンレチナイド、フィルグラスチム、フィナステライド、フラボピリドール、フレゼラスチム(flezelastine)、フルアステロン、フルダラビン、塩酸フルオロダウノルニシン(fluorodaunorunicin)、フォルフェニメクス(forfenimex)、フォルメスタン、フォストリエシン、フォテムスチム、ガドリニウム・テキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタビン、ガニレリックス、グラチナーゼ・インヒビター、ゲムシタビン、グルタチオン・インヒビター、ヘプルスファム(hepsulfam)、ヘレグリン、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ヒペリシン、イバンドロン酸、イダルビシン、イドキシフェン、イドラマントン(idramantone)、イルモホシン(ilmofosine)、イロマstatt(ilmastat)、イミダゾアクリドン、イミキモド、免疫刺激ペプチド、インスリン様成長因子-1受容体インヒビター、インターフェロン・アゴニスト、インターフェロン、インターロイキン、イオベングアン(iobenguane)、ヨードドキソルビシン(iododoxorubicin)、イポメアノール(ipomeanol)、イロプラクト(iroplact)、イルソグラジン、イソベンガゾール(isobengazole)、イソホモハリコンドリン(isohomohalicondrin)B、イタセトロン、ジャスプラキノライド、カハラリド(kahalalide)F、ラメラリン-Nトリアセテート、ランレオチド、レイナマイシン、レノグラスチム、硫酸レンチナン、レプトルスタチン(lepstatin)、レトロゾール、白血病阻害因子、白血球インターフェロン、ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン、ロイプロレリン、レバミゾール、リアロゾール、直鎖ポリアミン類似体、親油性二糖類ペプチド、親油性白金化合物、リッソクリナミド(lissoclinamide)7、ロバプラチン(lobaplatin)、ロンブリシン、ロメトレキソール(lometrexol)、ロニダミン、ロソキサントロン(Iosoxantrone)、ロバスタチン、ロキソリビン(loxoridine)、ルルトテカン(lurtotecan)、ルテチウム・テキサフィリン、リソフィリン(lysofiline)、溶解ペプチド、メイタンシン、マンノスタチンA、マリマstatt(マリマstatt)、マソプロコール(masoprolol)、マスピン(maspin)、マトリリシンインヒビター、マトリックス・メタロプロテイナーゼインヒビター、メノガリル、メルバロン(merbarone)、メテレリン(metrelin)、メチオニナーゼ(methioninase)、メトクロプラミド、MIFインヒビター、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミスマッチ二重鎖RNA、ミトグアゾン、ミトラクトール(mitolactol)、マイトイマイシン類似体、ミトナファイド(mitonafide)、マイトキシン(mitotoxin)線維芽細胞成長因子-サポリン、ミトキサントロン、モファロテン、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロphin、モノホスホリル脂質A+マイコバクテリア細胞壁sk、モピダモール(mopidamol)、多剤耐性遺伝子インヒビター、多発腫瘍抑制剤1系治療薬、マスター抗癌薬、マイカペルオキシド(mycaperoxide)B、マイコバクテリウム細胞壁抽出物、ミリアポロン(myriaporone)、N-アセチルジナリン、N-置換ベンズアミド、ナファレリン、ナグレスチップ(nagrestip)、ナロキソン+ペンタゾシン、ナパビン(napavine)、ナフェルビン、ナルトグラスチム、ネダプラチン、ネモルビシン(nemorubicin)、ネリドロン酸(neridronic acid)、中性エンドペプチダーゼ、ニルタミド、ナイサマイシン(nisamycin)、一酸化窒素調整剤、ニトロキシド抗酸化剤、ニトルリン(nitrullyn)、O6-ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン(okicenone)、オリゴヌクレオチド、オナプリストン、オンダンセトロン、オラシン、経口サイトカイン誘発剤、オルマプラチン(ormaplatin)、オサテロン、オキサリプラチン、オキザウノマイシン、パクリタキセル、パクリタキセル類似体、パクリタキセル誘導体、パラウアミン(palaumine)、パルミトイルリゾキシン、パミドロン酸、パナキシトリオール、パノミフェン、パラバクチン(parabactin)、パゼリプチム(pazelliptine)、ペガスパルガーゼ(pegaspargase)、ペルデシン、ポリ硫酸ペントサンナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール(pentrozole)、パーフルブロン、パーホスファミド、ペリリルアルコール、フェナジノマイシン、酢酸フェニル、ホスファターゼインヒビター、ビシバニル、塩酸ピロカルピン、ピラルビシン、ピリトレキシム(piritrexim)、プラセチン(placetin)A、プラセチンB、プラスミノゲン活性化剤インヒビター、白金錯体、白金化合物、白金トリアミン錯体、

10

20

30

40

50

ポルフィマー・ナトリウム、ポルフィロマイシン、ブレドニゾン、プロピルビス-アクリドン、プロスタグランジンJ2、プロテアソームインヒビター、タンパク質A系免疫調節剤、タンパク質キナーゼCインヒビター、微細藻類、タンパク質チロシン・ホスファターゼインヒビター、プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター、ブルプリン、ピラゾロアクリジン、ピリドキシリ化ヘモグロビン・ポリオキシエチレン接合体、rafアンタゴニスト、ラルチトレキセド、ラモセトロン、rasファルネシル・タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、rasインヒビター、ras-GAPインヒビター、脱メチル化レティリプチン(*retelliptine demethylated*)、レニウムRe 186エチドロネート、リゾキシン、リボザイム、RIIレチニアミド、ログレチミド(*rogletimide*)、ロヒツカイン(*rohitukine*)、ロムルチド、ロキニメクス(*roquinimex*)、ルビギノン(*rubiginone*)B1、ルボキシル(*ruboxyl*)、サフインゴル(*safingol*)、サントピン(*saintopin*)、SarCNU、サルコフィトールA、サルグラモスチム、Sdi 1ミメチック、セムスチン、老化由来インヒビター1、センス・オリゴスクレオチド、シグナル伝達インヒビター、シグナル伝達調整剤、一本鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン、ソブゾキサン、ナトリウムボロカブティト、フェニル酢酸ナトリウム、ソルベロール(*solverol*)、ソマトメジン結合タンパク質、ソネルミン、スバルホシン酸(*sparfosic acid*)、スピカマイシンD、スピロムスチン(*spiromustine*)、スプレノペンチン、スポンジスタチン1、スクアラミン、幹細胞インヒビター、幹細胞分裂インヒビター、スチピアミド(*stipiamide*)、ストロメリシンインヒビター、スルフィノシン(*sulfinosine*)、超活性血管作用性腸ペプチドアンタゴニスト、スラジスタ(*suradista*)、スラミン、スワンソニン、合成グリコサミノグリカン、タリムスチン(*tallimustine*)、タモキシフェンメチオジド、タウロムスチン(*tauromustine*)、タキソール、タザロテン、テコガランナトリウム、テガフル、テルラピリリウム(*tellurapyrylium*)、テロメラーゼインヒビター、テモポルフィン、テモゾロマイド、テニポシド、テトラクロロデカオキシド、テトラゾミニン(*tetrazomine*)、タリブラスチン(*thaliblastine*)、サリドマイド、チオコラリン(*thiocoraline*)、チオグアニン、トロンボポエチン、トロンボポエチン・ミメチック、チマルファシン(*thymalfasin*)、チモポエチン受容体アゴニスト、チモトリナン(*thymotrinan*)、甲状腺刺激ホルモン、スズエチルエチオブルプリン、チラバザミン、二塩化チタノセン、トプセンチン(*topsentin*)、トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳インヒビター、トレチノイン、トリアセチルウリジン、トリシリビン(*triciribine*)、トリメトレキセート、トリプトレリン、トロピセトロン、ツロステライド(*turosteride*)、チロシンキナーゼインヒビター、チルホスチン、UBCインヒビター、ウベニメクス、尿生殖洞由来成長阻害因子、ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト、バプレオチド(*vapreotide*)、バリオリン(*variolin*)B、ベクター系、赤血球遺伝子治療薬、ベラレゾール(*velaresol*)、ベラミン(*veramine*)、ベルジンス(*verdins*)、ベルテポルフィン、ビノレルビン、ビンキサルチン(*vinxaline*)、バイタクシン、ボロゾール、ザノテロン(*zanoterone*)、ゼニプラチン(*zeniplatin*)、ジラスコルブ(*zilascorb*)、およびジノスタチン・スチマラマーなどが挙げられる。具体的な実施形態において、さらなる抗癌薬は、5-フルオロウラシルおよびロイコボリンである。

## 【0222】

さらに特別な実施形態において、本発明はまた、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の投与と1以上の療法、例えば、限定されるものでないが、表2に開示したまたは下記の第5.2.3.1節に考察した抗癌薬の投与とを組合させて含むものである。

【表2】

表2

治療薬	投与	用量	間隔
塩酸ドキソルビシン(アドリアマイシンRDF(登録商標)およびアドリアマイシンPFS(登録商標))	静脈内	1日目に60~75mg/m <sup>2</sup>	21日間隔
塩酸エビルビシン(Ellence(登録商標))	静脈内	各サイクルの1日目に100~120mg/m <sup>2</sup> または均等に分割してサイクルの1~8日目に投与	3~4週サイクル
フルオロウラシル	静脈内	供給剤形: 5mlおよび10mlバイアル(それぞれフルオロウラシルを250および500mgを含有)	
ドセタキセ(Taxotere(登録商標))	静脈内	1時間かけて60~100mg/m <sup>2</sup>	3週毎に1回
パクリタキセル(Taxol(登録商標))	静脈内	3時間かけて175mg/m <sup>2</sup>	3週毎に4コース(ドキソルビシン含有する化学治療薬に続いて投与)
クエン酸タモキシフェン(Nolvadex(登録商標))	経口(錠剤)	20~40mg 20mgより多い用量は分割投与(朝と晩)すること	毎日
注射用ロイコボリンカルシウム	静脈内または筋肉内注射	供給剤形: 350mgバイアル	用量はテキストPDR 3610から不明
酢酸リュープロライド(Lupron(登録商標))	単独皮下注射	1mg(0.2mlまたは20ユニットマーク)	1日1回
フルタミド(Eulexin(登録商標))	経口(カプセル)	250mg(各カプセルは125mgフルタミドを含有する)	8時間間隔で1日3回(合計1日用量750mg)
ニルタミド(Nilandron(登録商標))	経口(錠剤)	300mgまたは150mg(各錠剤はニルタミド50または150mgを含む)	30日間300mgを1日1回、続いて150日間150mgを1日1回
ビカルタミド(Casodex(登録商標))	経口(錠剤)	50mg(各錠剤はビカルタミド50mgを含む)	1日1回
プロゲステロン	注入	USP:ゴマ油中に50mg/ml	
ケトコナゾール(Nizoral(登録商標))	クリーム	症状に応じて2%クリーム剤を毎日1回または2回塗布する	
プレドニゾン	経口(錠剤)	治療している特定の疾患実体に応じて初期投与量は1日当たり5mg~60mgであつてよい。	
リン酸エストラムスチンナトリウム(Emcyt(登録商標))	経口(カプセル)	14mg/kg体重(すなわち10kgまたは22lb体重当たり140mgカプセル1個)	3または4分割コースで毎日投与
エトボシドまたはVP-16	静脈内	20mg/ml溶液5ml(100mg)	
ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))	静脈内	2~4.5mg/kg	10日間1日1回、4週間隔で繰り返しもよい
ポリフェプロサン20とカルムスチンを組合せたインプラント(BCNU)(ニトロソ尿素)(Gliadel(登録商標))	ウエーハを切除空洞内に置く	切除空洞のサイズと形状が許容すれば、それぞれカルムスチン7.7mg、合計で61.6mgを含有する8個のウエーハ	

10

20

30

40

治療薬	投与	用量	間隔	
シスプラチン	注入	[PDR 861 では n/a] 供給剤形 : 1mg/ml を含む 50mL および 100mL 液の多 用量バイアル		
マイトマイシン	注入	5mg および 20mg バイアル(マ イトマイシン 5mg および 20mg を含有する)で供給さ れる		
塩酸ゲムシタビン (Gemzar (登録商標))	静脈内	NSCLC 用に 2 つのスケジュー ルを検討したが、最適スケ ジュールは決定されなかっ た  4 週スケジュール-30 分間か けて 1000mg/m <sup>2</sup> で静脈内に 投与  3 週スケジュール-30 分間か けて 1250mg/m <sup>2</sup> で静脈内に Gemzar を投与	4 週スケジュール-各 28 日 サイクルの 1、8 および 15 日目。シスプラチン 100mg/m <sup>2</sup> を静脈内に 1 日 目、Gemzar の注入後に投与 する。  3 週スケジュール-各 21 日 サイクルの 1 および 8 日目。 シスプラチン 100mg/m <sup>2</sup> を静 脈内に 1 日目、Gemzar の注 入後に投与する。	10
カルボプラチニ (Paraplatin (登録商 標))	静脈内	単剤療法：  1 日日に 360mg/m <sup>2</sup> I.V. (注入 は 15 分またはそれより長く 続く)  他の投与量計算：  シクロホスファミドを用い た併用療法、用量調整推奨 基準、処方投薬など。	4 週毎に	30
イホスファミド (Ifex (登録商標))	静脈内	毎日 1.2g/m <sup>2</sup>	5 日間連続  3 週間毎または血液毒性か ら回復後に繰り返す	40
塩酸トポテカン (Hycamtin (登録商標))	静脈内	毎日 30 分間かけて静脈内注 入によって 1.5mg/m <sup>2</sup>	5 日間連続、  21 日コースの 1 日目に開始 する	

【 0 2 2 3 】

本発明はまた、EphB受容体結合ペプチドおよび / またはEphB受容体結合化合物の投与と

50

癌細胞を破壊するためのx線、γ線および他の照射源の使用を含む放射線療法との組合わせを包含する。具体的な実施形態においては、放射線治療を外部ビーム照射または照射を遠隔の供給源から向ける遠隔療法として投与する。他の具体的な実施形態においては、放射線治療を内部療法または放射性供給源を癌細胞もしくは腫瘍塊に近接した身体内部に配置する近接放射線療法として投与する。

## 【0224】

癌療法およびその投与量、投与経路および推奨される使用法は当技術分野で公知であり、*Physicians' Desk Reference* (61<sup>st</sup> ed., 2007)のような文献および下記第5.4に記載されている。

## 【0225】

10

## 5.2.3.1 抗癌薬

癌（良性、悪性または転移性の）、またはその1以上の症候群などの増殖障害の予防、治療、および／または管理に有用である、使用されたことのある、または現在使用されていることが公知の任意の療法（例えば、治療薬または予防薬）を、本明細書に記載の組成物および方法に利用することができる。療法（例えば、治療薬または予防薬）には、限定されるものでないが、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、核酸分子、小分子、ミメチック剤、合成薬物、無機分子、および有機分子が含まれる。癌療法の限定されるものでない例には、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および／または生物学的療法/免疫療法が含まれる。

## 【0226】

20

ある特定の実施形態において、抗癌薬は化学治療薬などの免疫調節薬である。ある特定の他の実施形態において、抗癌薬は化学治療薬以外の免疫調節薬である。他の実施形態において、抗癌薬は免疫調節性でない。具体的な実施形態において、抗癌薬は抗血管形成薬である。他の実施形態において、抗癌薬は抗血管形成薬でない。具体的な実施形態において、抗癌薬は抗炎症薬である。他の実施形態において、抗癌薬は抗炎症薬でない。

## 【0227】

30

特別な実施形態において、抗癌薬は限定されるものでないが：アシビシン (acivicin)；アクラルビシン；塩酸アコダゾール (acodazole)；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アムボマイシン (ambomycin)；酢酸アメタントロン (a metantrone)；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アンスラマイシン；アスピラギナーゼ；アスペルリン (asperlin)；アザシチジン (azacitidine)；アゼテパ (azetepa)；アゾトマイシン (azotomycin)；バチマスタッフ；ベンゾデパ (ben zodepa)；ビカルタミド；塩酸ビサントレン；ビスナフィドジメシレート (bisnafide di mesylate)；ビスフォスフォネート（例えば；パミドロン酸塩 (Aredria)；クロンドロン酸ナトリウム (Bonefos)；ゾレドロン酸 (Zometa)；アレンドロン酸塩 (Fosamax)；エチドロン酸塩；イバンドロン酸塩；シマドロン酸塩；リセドロン酸塩；および チルドロン酸塩）；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナール・ナトリウム；プロピリミン；ブルスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド (caracemide)；カーベタイマー；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン (carubicin)；カルゼレシン (carzelesin)；セデフィンゴル (cedefingol)；クロラムブシリ；シロレマイシン (cirolemycin)；シスプラチン；クラドリビン；クリスナトールメシレート；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；デシタビン (decitabine)；デキソマプラチン (dexormaplatin)；デザグアニン (dezaguanine)；デザグアニンメシレート；ジアジコン；ドセタキセル；ドキソルビシン；塩酸ドキシリビシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン (duazomycin)；エダトレキセート (edatrexate)；塩酸エフロルニチン；EphA2 インヒビター（例えば；EphA2 のリン酸化と EphA2 の分解をもたらす抗-EphA2 抗体（それぞれ参照により本明細書にその全てが組み入れられる米国特許公開US 2004/0091486 A1 および US 2004/0028685 A1；および US 2006/0121042 A1 を参照）；エピプロピジン (epipropidine)；塩酸エピルビシン；エルブゾロール (erbuloz

40

50

ole) ; 塩酸エソルビシン (esorubicin) ; エストラムスチン ; リン酸エストラムスチンナトリウム ; エタニダゾール ; エトポシド ; リン酸エトポシド ; エトプリン (etoprime) ; 塩酸ファドロゾール ; ファザラビン (fazarabine) ; フエンレチニド (fenretinide) ; フロクスウリジン ; リン酸フルダラビン ; フルオロウラシル ; フルロシタビン (flurocitabine) ; ホスキドン (fosquidone) ; ホストリエシン・ナトリウム ; ゲムシタビン ; 塩酸ゲムシタビン ; ヒドロキシ尿素 ; 塩酸イダルビシン ; イホスファミド ; イルモホシン ; インターロイキン2 (組換えインターロイキン2; またはrIL2を含む) ; インターフェロン -2a ; インターフェロン -2b ; インターフェロン -n1 ; インターフェロン -n3 ; インターフェロン -la ; インターフェロン -lb ; イプロプラチン ; 塩酸イリノテカン ; 酢酸ランレオチド ; レトロゾール ; 醋酸リュープロライド ; 塩酸リアロゾール ; ロメトレキソール (lometrexol) ・ナトリウム ; ロムスチン ; 塩酸ロソキサントロン (losoxantrone) ; マソプロコール (masoprolol) ; メイタンシン ; 塩酸メクロレタミン ; 抗-CD2 抗体 (例えば、シプリズマブ (siplizumab) (MedImmune Inc.) ; 本明細書に参照によりその全てが組み入れられる国際特許公開 WO 02/098370を参照) ) ; 醋酸メゲストロール ; 醋酸メレンゲストロール ; メルファラン ; メノガリル ; メルカプトプリン ; メトレキサート ; メトレキサレート・ナトリウム ; メトプリン ; メツレデパ (meturedepa) ; ミチンドミド (mitindomide) ; マイトカルシン (mitocarcin) ; マイトクロミン (mitocromin) ; マイトギリン (mitogillin) ; マイトマルシン (mitomalcin) ; マイトマイシン ; マイトスパー (mitosper) ; ミトタン (mitotane) ; 塩酸ミトキサントロン ; ミコフェノール酸 ; ノコダゾール ; ノガラマイシン ; オルマプラチン (ormaplatin) ; オキシスラン (oxisuran) ; パクリタキセル ; ペガスパルガーゼ (pegaspargase) ; ペリオマイシン (pe liomycin) ; ペンタムスチン (pentamustine) ; 硫酸ペプロマイシン ; ベルホスファミド (perfosfamide) ; ピポプロマン ; ピポスルファン (piposulfan) ; 塩酸ピロキサンtron (piroxantrone) ; プリカマイシン ; プロメスタン (plomestane) ; ポルフィマー・ナトリウム ; ポルフィロマイシン ; プレドニムスチン (prednimustine) ; 塩酸プロカルバジン ; ピューロマイシン ; 塩酸ピューロマイシン ; ピラゾフリン (pyrazofurin) ; リボプリン (riboprine) ; ログレチミド (rogletimide) ; サфинゴル (safingol) ; 塩酸サфинゴル (safingol) ; セムスチン ; シムトラゼン (simtrazene) ; スバルフォセート・ナトリウム ; スバルソマイシン ; 塩酸スピロゲルマニウム ; スピロムスチン (spiromustine) ; スピロプラチン (spiropatin) ; ストレプトニグリン ; ストレプトゾシン ; スロフェヌール (sulofenur) ; タリソマイシン ; テコガラン・ナトリウム ; テガフル ; 塩酸テロキサンtron (teloxantrone) ; テモポルフィン ; テニポシド ; テロキシリ酮 (teroxirone) ; テストラクトン ; チアミプリン (thiamiprime) ; チオグアニン ; チオテバ ; チアゾフリン (tiazofurin) ; チラバザミン ; クエン酸トレミフェン ; 醋酸トレストロン (trestolone) ; リン酸トリシリビン (triciribine) ; トリメトレキセート ; グルクロロン酸トリメトレキセート ; トリプトレリン ; 塩酸チュプロゾール (tubulozole) ; ウラシル・マスター ; ウレデパ (uredepa) ; バプレオチド (vapreotide) ; ベルテボルフィン ; 硫酸ビンプラスチン ; 硫酸ビンクリスチン ; ビンデシン ; 硫酸ビンデシン ; 硫酸ビネピジン (vinepidine) ; 硫酸ビングリシネット (vinglycinate) ; 硫酸ビンロイロシン (vinleurosine) ; 酒石酸ビノレルビン ; 硫酸ビンロシジン (vinrosidine) ; 硫酸ビンゾリジン (vinzolidine) ; ボロゾール (vorozole) ; ゼニプラチン (zeniplatin) ; ジノスタチン ; 塩酸ゾルビシンである。

### 【0228】

他の抗癌薬としては、限定されるものでないが、20-epi-1,25ジヒドロキシビタミンD3 ; 5-エチニルウラシル ; アビラテロン (abiraterone) ; アクラルビシン ; アシルフルベン ; アデシペノール (adecyphenol) ; アドゼレシン ; アルデスロイキン ; ALL-TKアンタゴニスト ; アルトレタミン ; アンバムスチン (ambamustine) ; アミドクス (amidox) ; アミフォスチン ; アミノレブリン酸 ; アムルビシン ; アムサクリン ; アナグレリド ; アナストロゾール ; アンドログラホライド ; 血管形成インヒビター ; アンタゴニストD ; アンタゴニストG ; アンタレリクス (antarelix) ; 抗背側化形態形成タンパク質1 ; 抗アンドロ

10

20

30

40

50

ゲン；前立腺癌；抗エストロゲン；アンチネオプラスチック；アンチセンス オリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシネット；アポトーシス遺伝子調節剤；アポトーシス調節剤；アプリン酸；ara-CDP-DL-PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン (asulacrine)；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナスタチン (axinastatin) 1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バッカチンII誘導体；バラノール (balanol)；バチマstatt；BCR/ABLアンタゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスボリン；-ラクタム誘導体；-アレチン (alethine)；-クラミシンB；ベツリン酸；bFGFインヒビター；ビカルタミド；ビサントレン；ビスマジリジニルスペルミン；ビスナファイド (bisnafide)；ビストラテン (bistratene) A；ビゼレシン；ブレフレート (breflate)；ブロピリミン；ブドチタン (budotitane)；ブチオニン・スルホキシミン；カルシポトリオール；カルフォスチンC；カンプトセシン誘導体；カナリア痘IL-2；カペシタピン；カルボキサミド-アミノ-トリアゾール；カルボキシアミドトリアゾール；CaRest M3；CARN 700；軟骨由来インヒビター；カルゼレシン (carzelesin)；カゼイン・キナーゼインヒビター (ICOS)；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリクス；クロリン類 (chlorins)；クロロキノキサリン・スルホンアミド；シカプロスト；cis-ポルフィリン；クラドリピン；クロミフェン類似体；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンプレタスタチンA4；コンプレタスタチン類似体；コナゲニン；クラムベスシジン (crambescidin) 816；クリスナトール (crisnatol)；クリプロファイシン (cryptophycin) 8；クリプロファイシンA誘導体；クラシン (curacin) A；シクロペンタ-アントラキノン；シクロプラタム；シペマイシン (cypemycin)；シタラビンオクホスフェート；細胞溶解因子；サイトスタチン (cytostatin)；ダクリキシマブ (daclizimab)；デシタビン (decitabine)；デヒドロジデムニンB；デスロレリン；デキサメタゾン；デキシホスファミド；デクスラゾキサン；デクスペラバミル；ジアジコン；ジデムニンB；ジドクス (didox)；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール；ジオキサマイシン (dioxamycin)；ジフェニル・スピロムスチン (diphenyl spiromustine)；ドセタキセル；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エブセレン；エコムスチン (ecomustine)；エデルホシン (edelfosine)；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフール；エピルビシン；エプリステリド；エストラムスチン類似体；エストロゲン・アゴニスト；エストロゲン・アンタゴニスト；エタニダゾール；リン酸エトポシド；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン (fazarabine)；フェンレチナイド；フィルグラスチム；フィナステライド；フラボピリドール；フレゼラスチン (flezelastine)；フルアステロン；フルダラビン；塩酸フルオロダウノルニシン (fluorodauunomicin)；フォルフェニメクス (forfenimex)；フォルメスタン；フォストリエシン；フォテムスチン；ガドリニウム・テキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタビン；ガニレリックス；ゲラチナーゼインヒビター；ゲムシタビン；グルタチオン・インヒビター；HMG CoAレダクターゼインヒビター（例えば；アトルバスタチン；セリバスタチン；フルバスタチン；レスコール；ルピター (lupitor)；ロバスタチン；ロスバスタチン；および シムバスタチン）；ヘブルスファム (hepsulfam)；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマントン (idramantone)；イルモホシン (ilmofosine)；イロマスタッ (ilomastat)；イミダゾアクリドン；イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成長因子-1受容体インヒビター；インターフェロン・アゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；イオベングアン (iobenguane)；ヨードドキソルビシン (iododoxorubicin)；イポメアノール (ipomeanol)；イロプラクト (iroplact)；イルソグラジン；イソベンガゾール (isobengazole)；イソホモハリコンドリン (isohomohalicondrin) B；イタセトロン；ジャスプラキノライド；カハラリド (kahalalide) F；ラメラリン-Nトリアセテート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；硫酸レンチナン；レプトルスタチン (leptolstatin)；レトロゾール；白血病阻害因子；白血球 インターフェロン；ロイプロリド + エストロゲン + プロゲステロン；ロイプロレリン；レバミゾール；LF

10

20

30

40

50

A-3TIP (Biogen, Cambridge, MA ; 国際特許公開WO 93/0686および米国特許第6,162,432号) ; リアロゾール ; 直鎖ポリアミン類似体 ; 親油性二糖類ペプチド ; 親油性白金化合物 ; リッソクリナミド (lissoclinamide) 7 ; ロバプラチン (lobaplatin) ; ロンブリシン ; ロメトレキソール (lometrexol) ; ロニダミン ; ロソキサントロン (losoxantrone) ; ロバスタチン ; ロキソリビン (loxoridine) ; ルルトテカン (lurtotecan) ; ルテチウム・テキサフィリン ; リソフィリン (lysofylline) ; 溶解ペプチド ; メイタンシン ; マンノスタチンA ; マリマstatt ; マソプロコール (masoprolac) ; マスピン (maspin) ; マトリリシンインヒビター ; マトリックス・メタロプロテイナーゼインヒビター ; メノガリル ; メルバロン (merbarone) ; メテレリン (meterelin) ; メチオニナーゼ (methioninase) ; メトクロラミド ; MIFインヒビター ; ミフェプリストン ; ミルテホシン ; ミリモスチム ; ミスマッチ二重鎖RNA ; ミトグアゾン ; ミトラクトール (mitolactol) ; マイトマイシン類似体 ; ミトナファイド (mitonafide) ; マイトトキシン (mitotoxin) 線維芽細胞成長因子-サポリン ; ミトキサントロン ; モファロテン ; モルグラモスチム ; モノクローナル抗体 ; ヒト絨毛性ゴナドトロphin ; モノホスホリル脂質A+マイコバクテリア細胞壁sk ; モピダモール (mopidamol) ; 多剤耐性遺伝子インヒビター ; 多発腫瘍抑制剤1系治療薬 ; マスター抗癌薬 ; マイカペルオキシド (mycaperoxide) B ; マイコバクテリウム細胞壁抽出物 ; ミリアポロン (myriaporone) ; N-アセチルジナリン ; N-置換ベンズアミド ; ナファレリン ; ナグレスチップ (nagrestip) ; ナロキソン + ペンタゾシン ; ナパビン (napavine) ; ナフテルビン ; ナルトグラスチム ; ネダプラチン ; ネモルビシン (nemorubicin) ; ネリドロン酸 (neridronic acid) ; 中性エンドペプチダーゼ ; ニルタミド ; ナイサマイシン (nisamycin) ; 一酸化窒素調整剤 ; ニトロキシド抗酸化剤 ; ニトルリン (nitrullyn) ; O6-ベンジルグアニン ; オクトレオチド ; オキセノン (okicenone) ; オリゴヌクレオチド ; オナブリストン ; オンダンセトロン ; オラシン ; 経口サイトカイン誘発剤 ; オルマプラチン (ormaplatin) ; オサテロン ; オキサリプラチン ; オキザウノマイシン ; パクリタキセル ; パクリタキセル類似体 ; パクリタキセル誘導体 ; パラウアミン (palauamine) ; パルミトイリゾキシン ; パミドロン酸 ; パナキシトリオール ; パノミフェン ; パラバクチン (parabactin) ; パゼリプチニン (pazelliptine) ; ペガスバルガーゼ (pegaspargase) ; ペルデシン ; ポリ硫酸ペントサンナトリウム ; ペントスタチン ; ペントロゾール (pentrozole) ; パーフルブロン ; パーhosファミド ; ペリリルアルコール ; フェナジノマイシン ; 酢酸フェニル ; ホスファターゼインヒビター ; ピシバニル ; 塩酸ピロカルピン ; ピラルビン ; ピリトレキシム (piritrexim) ; プラセチン (placetin) A ; プラセチンB ; プラスミノゲン活性化剤インヒビター ; 白金錯体 ; 白金化合物 ; 白金トリアミン錯体 ; ポルフィマー・ナトリウム ; ポルフィロマイシン ; ブレドニゾン ; プロピルビス-アクリドン ; プロスタグラジンJ2 ; プロテアソームインヒビター ; タンパク質A系免疫調節剤 ; タンパク質キナーゼCインヒビター ; 微細藻類 ; タンパク質チロシン・ホスファターゼインヒビター ; プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター ; プルプリン ; ピラゾロアクリジン ; ピリドキシル化ヘモグロビン・ポリオキシエチレン接合体 ; rasアンタゴニスト ; ラルチトレキセド ; ラモセトロン ; rasファルネシル・タンパク質トランスフェラーゼインヒビター ; rasインヒビター ; ras-GAPインヒビター ; 脱メチル化レチノイド (retinoid demethylated) ; レニウムRe 186エチドロネート ; リゾキシン ; リボザイム ; RIIレチンアミド ; ログレチミド (rogletimide) ; ロヒツカイン (rohitukine) ; ロムルチド ; ロキニメクス (roquinimex) ; ルビギノン (rubiginone) B1 ; ルボキシル (ruboxyl) ; サフィンゴル (safingol) ; サイントピン (saintopin) ; SarcNU ; サルコフィトールA ; サルグラモスチム ; Sdi 1ミメチック ; セムスチン ; 老化由来インヒビター-1 ; センス・オリゴヌクレオチド ; シグナル伝達インヒビター ; シグナル伝達調整剤 ; 一本鎖抗原結合タンパク質 ; シゾフィラン ; ソブゾキサン ; ナトリウムボロカブティト ; フェニル酢酸ナトリウム ; ソルベロール (solverol) ; ソマトメジン結合タンパク質 ; ソネルミン ; スバルホシン酸 (sparfosic acid) ; スピカマイシンD ; スピロムスチン (spiromustine) ; スプレノペンチン ; スポンジスタチン1 ; スクアラミン ; 幹細胞インヒビター ; 幹細胞分裂インヒビター ; スチピアミド (stipiamide) ; ストロメリシンイン 10  
20  
30  
40  
50

ヒビター；スルフィノシン (sulfinosine)；超活性血管作用性腸ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ (suradista)；スラミン；スワンソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン (tallimustine)；5-フルオロウラシル；ロイコボリン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン (tauromustine)；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム (tellurapyrylium)；テロメラーゼインヒビター；テモポルフィン；テモゾロマイド；テニポシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン (tetrazomine)；タリblastine (thaliblastine)；チオコラリン (thiocoraline)；トロンボポエチン；トロンボポエチン・ミメチック；チマルファシン (thymalfasin)；チモポエチン受容体アゴニスト；チモトリナン (thymotrinan)；甲状腺刺激ホルモン；スズエチルエチオプルプリン；チラバザミン；二塩化チタノセン；トプセンチン (topsentin)；トレミフェン；全能性幹細胞因子；翻訳インヒビター；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリビン (triciribine)；トリメトレキセート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステライド (turosteride)；チロシンキナーゼインヒビター；チルホスチン；UBCインヒビター；ウベニメクス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；バブレオチド (vapreotide)；バリオリン (variolin) B；ベクター系；赤血球遺伝子治療薬；サリドマイド；ベラレゾール (velaresol)；ベラミン (veramine)；ベルジンス (verdins)；ベルテポルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン (vinxaltine)；バイタクシン (米国特許公開US 2002/0168360 A1、(2002年11月14日)、表題「インテグリン  $\alpha$  3アンタゴニストを他の予防薬または治療薬と組合させて投与することによる、炎症性または自己免疫性障害を予防または治療する方法 (Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin  $\alpha$  3 Antagonists in Combination With Other Prophylactic or Therapeutic Agents)」を参照)；ボロゾール；ザノテロン (zanoterone)；ゼニプラチン (zeniplatin)；ジラスコルブ (zilascorb)；およびジノスタチン・スチマラマーである。  
10  
20

## 【0229】

本明細書に記載の抗癌薬は細胞傷害薬または癌化学治療薬であってもよい。限定されるものでない例として、DNA関連プロセスを標的化する細胞傷害薬はシクロホスファミド、メルファラン、マイトマイシンC、ビゼレシン、シスプラチン、ドキソルビシン、エトポシド、ミトキサントロン、SN38、Et743、アクチノマイシンD、ブレオマイシンおよびTLK286を包含する。癌化学治療薬は、限定されるものでないが、タキサン、例えばドセタキセル；アントラサイクリン、例えばドキソルビシン；アルキル化剤；ビンカアルカロイド；抗代謝物；白金剤、例えばシスプラチンまたはカルボプラチン；ステロイド、例えばメトトレキセート；抗生物質、例えばアドリアマイシン；イソファミド；または選択的エストロゲン受容体モジュレーター；抗体、例えばトラスツズマブであってもよい。  
30

## 【0230】

タキサンは併用治療に有用な化学治療薬である。有用なタキサンとしては、限定するものでなく、ドセタキセル (Taxotere ; AventisPharmaceuticals, Inc. ; Parsippany, NJ) およびパクリタキセル (Taxol ; Bristol Myers Squibb ; Princeton, NJ) が挙げられる。例えば、Chan et al, 1999 J Clin Oncol 17 : 2341-2354 および Paridaens et al, 2000 J Clin Oncol 18 : 724 を参照されたい。  
40

## 【0231】

併用治療に有用な他の癌化学治療薬はアントラサイクリン、例えばドキソルビシン、イダルビシンまたはダウノルビシンである。ドキソルビシンは通常使用される癌化学治療薬であり、例えば、乳癌を治療するのに有用である (Stewart and Ratain, In: "Cancer : Principles および Practice of Oncology" 5th ed., chap. 19, eds. DeVita, Jr. et al. ; J.P. Lippincott 1997 ; Harris et al., In: "Cancer: Principles and practice of oncology," 前掲, 1997)。さらにドキソルビシンは抗血管形成活性を有して癌を治療する効能に寄与しうる (Folkman, 1997 Nature Biotechnology 15:510; Steiner, In: "Angiogenesis: Key principles Science, technology and medicine," pp. 449-454, eds. Steiner et al. Birkhauser Verlag, 1992)。  
50

## 【0232】

メルファランまたはクロランプシルなどのアルキル化剤は併用治療に有用な癌化学治療薬である。同様に、ビンカアルカロイド、例えばビンデシン、ビンプラスチンまたはビノレルビン；または代謝拮抗薬、例えば5-フルオロウラシル、5-フルオロウリジンまたはそれらの誘導体は併用治療に有用な癌化学治療薬である。

## 【0233】

白金剤は併用治療に有用な化学治療薬である。かかる白金薬は、例えば、Crown, 2001 Seminars in Oncol 28 : 28-37に記載の、例えばシスプラチニまたはカルボプラチニであってもよい。併用治療に有用な他の癌化学治療薬としては、限定されるものでないが、メトトレキセート、マイトイマイシンC、アドリアマイシン、イホスファミドおよびアンサマイシンが挙げられる。10

## 【0234】

乳癌および他のホルモン依存性癌を治療するために用いる癌化学治療薬もまた、選択的エストロゲン受容体モジュレーターまたは抗エストロゲンなどのエストロゲンの効果をアンタゴナイズする薬剤として使用することができる。選択的エストロゲン受容体モジュレーター、タモキシフェンは乳癌を治療するための併用治療に利用できる癌化学治療薬である (Fisher et al. 1998 J Natl Cancer Inst 90:1371 1388)。

## 【0235】

併用治療に有用な治療薬はヒト化モノクローナル抗体などの抗体であってもよい。一例として、抗上皮成長因子受容体2(HER2)抗体、トラスツズマブ(Herceptin; Genentech, South San Francisco, CA)は、コンジュゲートでHER2/neuを過剰発現する乳癌を治療するのに有用な治療薬である (White et al. 2001 Ann Rev Med 52:125-141)。20

## 【0236】

本発明に有用な他の治療薬はまた、本明細書で用いられるように、直接または間接に細胞死を促進する任意の分子である細胞傷害薬であってもよい。本発明に有用な細胞傷害薬としては、限定されるものでないが、小分子、ポリペプチド、ペプチド、ペプチドミメチック、核酸分子、細胞およびウイルスが挙げられる。限定されるものでない例として、本発明に有用な細胞傷害薬としては、ドキソルビシン、ドセタキセルまたはトラスツズマブなどの細胞傷害性小分子；さらに以下に記載するような抗菌性ペプチド；カスパーゼなどのプロアポトーシス性ポリペプチドおよび毒素、例えば、カスパーゼ8；ジフテリア毒素A鎖、シュードモナス外毒素A、コレラ毒、DAB389EGFなどのリガンド融合毒素、トウゴマ毒素(リシン(ricin))；および細胞傷害性T細胞などの細胞傷害性細胞が挙げられる。例えば、Martin et al. 2000 Cancer Res 60:3218-3224 ; Kreitman and Pastan 1997 Blood 90:252-259 ; Allam et al. 1997 Cancer Res 57:2615-2618 ; Osborne and Coronado Heinoth 1996 Cancer J Sci Am 2:175を参照されたい。当業者は、本明細書に記載のまたは当業者に既知のこれらおよびさらなる細胞傷害薬が、本発明の治療薬として有用であることを理解する。30

## 【0237】

具体的な実施形態において、癌細胞を破壊するためのX線、線および他の照射源の使用を含む放射線療法を、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物と併用する。具体的な実施形態においては、放射線治療を外部ビーム照射または照射を遠隔の供給源から向ける遠隔療法として投与する。他の具体的な実施形態においては、放射線治療を内部療法または放射性供給源を癌細胞もしくは腫瘍塊に近接した身体内部に配置する近接放射線療法として投与する。40

## 【0238】

癌療法およびその投与量、投与経路および推奨される使用法は当技術分野で公知であり、Physicians' Desk Reference (61<sup>st</sup> ed., 2007)などの文献および下記第5.4に記載されている。

## 【0239】

ある特定の実施形態において、本発明は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物と1以上の抗血管形成薬とを含む組成物、ならびに前記組成物の投与を含む被験体のEphB関連疾患（例えば、異常な血管形成）を治療および/または管理する方法を提供する。当業者が周知の任意の抗血管形成薬を、本明細書に記載の組成物および方法に用いることができる。

## 【0240】

当業者が周知の任意の抗血管形成薬を、本明細書に記載の組成物および方法に用いることができる。限定されるものでない抗血管形成薬の例としては、血管形成を低減または阻害するタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、TNF- $\alpha$ と免疫特異的に結合する抗体などの抗体（例えば、ヒト、ヒト化、キメラ、モノクローナル、ポリクローナル、Fv、ScFv、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、およびそれらの抗原結合断片）、核酸分子（例えば、アンチセンス分子または3本らせん体）、有機分子、無機分子、および小分子が挙げられる。特に、抗血管形成薬の例としては、限定されるものでないが、エンドスタチン、アンギオスタチン、アポミグレン、抗血管形成性アンチトロンビンIII、フィブロネクチンの29kDaN末端および40kDaC末端タンパク質分解性断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解性断片、血小板因子4の7.8kDaタンパク質分解性断片、血小板因子4の抗血管形成性24アミノ酸断片、13.40と名付けられた抗血管形成性因子、トロンボスポンジンIの抗血管形成性22アミノ酸ペプチド断片、SPARC、RGDおよびNGRの抗血管形成性20アミノ酸ペプチド断片を含有するペプチド、ラミニンの小抗血管形成性ペプチド、フィブロネクチン、プロコラーゲンおよびEGF、インテグリン $\alpha_3\beta_1$ アンタゴニスト、酸性纖維芽細胞成長因子(aFGF)アンタゴニスト、塩基性纖維芽細胞成長因子(bFGF)アンタゴニスト、血管内皮成長因子(VEGF)アンタゴニスト（例えば、抗-VEGF抗体（例えば、AVASTIN(登録商標)(Genentech)）、VEGF受容体(VEGFR)アンタゴニスト（例えば、抗-VEGFR抗体）および抗-インテグリンアンタゴニスト（例えば、血小板上のtheglycoprotein IIb/IIIa受容体と結合して血塊形成を防止するREOPRO(登録商標)(アブシキシマブ)(Centocor)）が挙げられる。

## 【0241】

限定されるものでない抗血管形成薬の例としては、血管形成を低減または阻害するタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、TNF- $\alpha$ と免疫特異的に結合する抗体などの抗体（例えば、ヒト、ヒト化、キメラ、モノクローナル、ポリクローナル、Fv、ScFv、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、およびそれらの抗原結合断片）、核酸分子（例えば、アンチセンス分子または3本らせん体）、有機分子、無機分子、および小分子が挙げられる。特に、抗血管形成薬の例としては、限定されるものでないが、エンドスタチン、アンギオスタチン、アポミグレン、抗血管形成性アンチトロンビンIII、フィブロネクチンの29kDaN末端および40kDaC末端タンパク質分解性断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解性断片、血小板因子4の7.8kDaタンパク質分解性断片、血小板因子4の抗血管形成性24アミノ酸断片、13.40と名付けられた抗血管形成性因子、トロンボスponジンIの抗血管形成性22アミノ酸ペプチド断片、SPARC、RGDおよびNGRの抗血管形成性20アミノ酸ペプチド断片を含有するペプチド、ラミニンの小抗血管形成性ペプチド、フィブロネクチン、プロコラーゲンおよびEGF、インテグリン $\alpha_3\beta_1$ アンタゴニスト、酸性纖維芽細胞成長因子(aFGF)アンタゴニスト、塩基性纖維芽細胞成長因子(bFGF)アンタゴニスト、血管内皮成長因子(VEGF)アンタゴニスト（例えば、抗-VEGF抗体）およびVEGF受容体(VEGFR)アンタゴニスト（例えば、抗-VEGFR抗体）が挙げられる。

## 【0242】

インテグリン $\alpha_3\beta_1$ アンタゴニストの例としては、限定されるものでないが、非触媒性メタロプロテイナーゼ断片などのタンパク質性薬剤、RGDペプチド、ペプチド擬似体、融合タンパク質、ディスインテグリンまたはそれらの誘導体または類似体、およびインテグリン $\alpha_3\beta_1$ と免疫特異的に結合する抗体、核酸分子、有機分子、および無機分子が挙げられる。限定されるものでないインテグリン $\alpha_3\beta_1$ と免疫特異的に結合する抗体の例としては、11D2(Searle)、LM609(Scripps)、およびビタキシン(登録商標)(MedImmune, Inc.)が挙げられる。

10

20

30

40

50

nc.) が挙げられる。限定されるものでない小分子ペプチドミメチックのインテグリン<sub>v</sub><sub>3</sub>アンタゴニストの例としては、S836 (Searle) およびS448 (Searle) が挙げられる。ディスインテグリンの例としては、限定されるものでないが、Accutinが挙げられる。本発明はまた、次の米国特許および国際特許公開に開示されたインテグリン<sub>v</sub><sub>3</sub>アンタゴニストの本明細書に記載の組成物および方法におけるいずれの使用も包含する：米国特許第5,149,780号；第5,196,511号；第5,204,445号；第5,262,520号；第5,306,620号；第5,478,725号；第5,498,694号；第5,523,209号；第5,578,704号；第5,589,570号；第5,652,109号；第5,652,110号；第5,693,612号；第5,705,481号；第5,753,230号；第5,767,071号；第5,770,565号；第5,780,426号；第5,817,457号；第5,830,678号；第5,849,692号；第5,955,572号；第5,985,278号；第6,048,861号；第6,090,944号；第6,096,707号；第6,130,231号；第6,153,628号；第6,160,099号；および第6,171,588号；ならびに国際特許公開WO95/22543；WO98/33919；WO00/78815（これらはそれぞれ本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。ある特定の実施形態において、抗血管形成薬はビタキシン（登録商標）（MedImmune, Inc.）またはその抗原結合断片である。

#### 【0243】

ある具体的な実施形態において、抗血管形成薬はエンドスタチンである。天然のエンドスタチンはコラーゲンXVIIIのC末端～180アミノ酸から成る（コラーゲンXVIIIの2つのスプライス型をコードするcDNAはGenBank受託番号AF18081およびAF18082を有する）。他の実施形態において、抗血管形成薬はプラスミノーゲン断片である（プラスミノーゲンをコードする配列はGenBank受託番号NM\_000301およびA33096に見出すことができる）。アンギオスタチンペプチドは、天然にプラスミノーゲンの4つのクリングルドメインkringle1～kringle4を含む。組換え体kringle1、2および3は生来のペプチドの抗血管形成特性を持つが、kringle4はかかる活性を持たないことが実証されている（Cao et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 29461-29467）。従って、アンギオスタチンペプチドは、少なくとも1つの、好ましくは1以上のkringle1、kringle2およびkringle3からなる群より選択されるkringleドメインを含む。ある具体的な実施形態において、抗血管形成性ペプチドはヒトアンギオスタチン分子の40kDaアイソタイプ、ヒトアンギオスタチン分子の42kDaアイソタイプ、ヒトアンギオスタチン分子の45kDaアイソタイプ、またはそれらの組合せである。他の実施形態において、抗血管形成薬は、アンギオスタチン（アンギオスタチンはkringleドメイン1～4を含む）より強力な血管形成のインヒビターであるプラスミノーゲンのkringle5ドメインである。他の実施形態において、抗血管形成薬はアンチトロンビンIIIである。本明細書で以後、アンチトロンビンと呼ぶアンチトロンビンIIIは、タンパク質を脈管構造壁に繫留するヘパリン結合ドメイン、およびトロンビンと相互作用する活性部位ループを含む。アンチトロンビンがヘパリンに繫留されると、このタンパク質はコンフォメーションの変化を誘発して、活性ループがトロンビンと相互作用できるようになり、トロンビンによる前記ループのタンパク質分解性切断をもたらす。タンパク質分解性切断事象は、アンチトロンビンのコンフォメーションの別の変化をもたらし、（i）トロンビンとアンチトロンビンの間の相互作用界面を改変しあつ（ii）ヘパリンから複合体を放出する（Carrell, 1999, Science 285: 1861-1862、およびその参考文献）。O'Reillyら（1999, Science 285: 1926-1928）は、切斷されたアンチトロンビンが強力な抗血管形成活性を有することを発見した。従って、一実施形態において、抗血管形成薬はアンチトロンビンの抗血管形成型である。他の実施形態において、抗血管形成薬はフィブロネクチンの40kDaおよび/または29kDaタンパク質分解性断片である。

#### 【0244】

他の実施形態において、抗血管形成薬はウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター（uPA）受容体アンタゴニストである。実施形態の一様式において、アンタゴニストはuPAのドミナントネガティブ突然変異体である（例えば、Crowley et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5021～5025を参照）。実施形態の他の様式において、アンタゴニストはペプチドアンタゴニストまたはその融合タンパク質である（Goodson et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7129-7133）。実施形態のなお他の様式において、ア

10

20

30

40

50

ンタゴニストはドミナントネガティブな可溶性uPA受容体である (Min et al., 1996, Cancer Res. 56: 2428-2433)。他の実施形態において、治療薬分子は、ほぼ120アミノ酸またはその生物学的活性断片を含むプロラクチンの16kDaN末端断片である（プロラクチンをコードする配列はGenBank受託番号NM\_000948に見出すことができる）。他の実施形態において、抗血管形成薬は7.8kDa血小板第4因子断片である。他の実施形態において、治療薬分子は、血小板第4因子の抗血管形成性13アミノ酸断片に対応する小ペプチド、13.40と名付けられた抗血管形成性因子、トロンボスponginの抗血管形成性22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管形成性20アミノ酸ペプチド断片、ラミニンの小抗血管形成性ペプチド、フィブロネクチン、プロコラーゲン、またはEGF、またはインテグリン $\alpha_3\beta_1$ の小ペプチドアンタゴニストまたはVEGF受容体である。他の実施形態において、小ペプチドはRGDまたはNGRモチーフを含む。ある特定の実施形態において、抗血管形成薬はTNF-αアンタゴニストである。他の実施形態において、抗血管形成薬はTNF-βアンタゴニストでない。

10

## 【0245】

抗血管形成活性をもつタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドをコードする核酸分子、または抗血管形成活性をもつタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドを、非新生物の過増殖性上皮および/または内皮細胞障害のリスクがあるかまたはかかる障害を持つ被験体に、本明細書に記載の方法に従って投与することができる。さらに、抗血管形成活性をもつタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの誘導体、類似体、断片もしくは変異体をコードする核酸分子、または、抗血管形成活性をもつタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの誘導体、類似体、断片もしくは変異体を、非新生物の過増殖性上皮および/または内皮細胞障害のリスクがあるかまたはかかる障害を持つ被験体に、本明細書に記載の方法に従って投与することができる。具体的な実施形態において、かかる誘導体、類似体、変異体、および断片は全長、野生型タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの抗血管形成活性を保持する。

20

## 【0246】

抗血管形成薬として利用できるタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを、当技術分野で周知のいずれかの技法により作製することができる。抗血管形成活性をもつタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを、当技術分野で周知のまたは本明細書に記載の技法を用いて遺伝子操作で作製し、かかるタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの半減期を増加することができる。ある特定の実施形態においては、市販される抗血管形成薬を本発明の組成物および方法に用いることができる。薬剤の抗血管形成活性は、in vitroおよび/またはin vivoで当業者に周知のいずれかの技法により測定することができる。

30

## 【0247】

5.2.3.3 神経保護薬

神経保護薬は当技術分野で周知であり、神経細胞の死を予防または遅延する化合物でありうる。限定されるものでない例として、単独でまたはEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物と組合させて投与することができる神経保護薬は、小分子薬物、ペプチド、タンパク質、抗体またはそれらの組合せなどの抗アポトーシス化合物でありうる。神経保護薬は、1以上のアポトーシスまたはネクロシス経路の干渉、神経成長ホルモン受容体の活性化またはイオンチャネルのモジュレーションを介して作用することができる。当業者は、本明細書に記載のまたは当技術分野で公知の、これらのおよびさらなる神経保護薬が治療薬として有用でありうることを理解している。

40

## 【0248】

5.3 生物学的アッセイ

プロトコルおよび組成物は、ヒトで使用する前に、in vitroで、次にin vivoで、所望の活性について試験する。当業者に周知である様々なin vitroアッセイを利用して、本明細書に記載の方法により同定したEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の生物学的活性または特性を試験または決定することができる。例えば、表面プラズモン共鳴（例えば、BIAcoreアッセイ）を利用して、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の1以上のEphB受容体に対する結合親和性定数（例えば、 $K_a$ 、 $K_d$ 、 $K_{on}$ および $K_{off}$ ）を測定する。

50

$K_{off}$ ) を測定することができる。限定されるものでないが、 $K_d$ および / または  $IC_{50}$ を測定して EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物の結合親和性を特徴づけることができるアッセイの例としては、ELISA、等温滴定カロリメトリー、および蛍光偏光アッセイが挙げられる。親和性定数(例えば、 $K_a$ 、 $K_d$ 、 $K_{on}$ 、および $K_{off}$ )を測定するELISAアッセイについては、EphB受容体を表面上に固定して、様々な濃度のEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物を試験する。EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物がEphB受容体のエフリンBリガンドとの結合を阻害しうる場合の $IC_{50}$ 値を測定するELISAアッセイについては、EphB受容体またはエフリンBリガンドのどちらかを表面上に固定することができる。続いて、様々な濃度のEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物を試験してEphB受容体とエフリンBリガンドの結合の50%阻害が検出される濃度を決定する。具体的な実施形態においては、EphB受容体を表面上に固定し、可溶性エフリンBリガンドのEphB受容体との結合を阻害する、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の能力を試験する。ある特定の実施形態においては、エフリンBリガンドを表面上に固定し、可溶性EphB受容体の固定されたエフリンBリガンドとの結合を阻害する、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の能力を試験する。具体的な実施形態において、 $IC_{50}$ 値を測定するアッセイに使用される可溶性エフリンBリガンドまたはEphB受容体の濃度は、ほぼ0.001 μM、0.005 μM、0.01 μM、0.05 μM、0.1 μM、0.5 μM、1 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、200 μM、300 μM、400 μM、500 μM、600 μM、700 μM、800 μM、900 μM、1000 μM、または5000 μMである。 $K_d$ および $IC_{50}$ 値の測定に影響を与える具体的なパラメーターとしては、限定されるものでないが、次のパラメーター、EphB受容体またはエフリンBリガンドの種、EphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物調製物の純度、および検出薬の感受性が挙げられる。

10

20

30

40

## 【0249】

等温滴定熱量測定( ITC )はMicrocal MCS ITCを用いて25℃で実施することができる。1シリーズのEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物をサンプル細胞のEphB受容体中へ注入し、最初の注入後に滴定を実施する。希釈データを、対応する滴定データから求めたラインにフィットさせ、これをOrigin ITCソフトウェアversion 5.0(Microcal Software Inc.)を用いて分析する。その曲線を単一結合部位モデルにフィットさせる(Wiseman et al., Anal. Biochem.、1989、179：131-137)。

## 【0250】

蛍光偏光アッセイは、蛍光マーカーと(例えば、Alexa-532)コンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物によって実施することができる。EphB受容体の連続希釈物を、蛍光マーカーにコンジュゲートした標識したEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物と、非特異的結合に対する対照としてのコンジュゲートしないEphB受容体結合ペプチドまたはEphB受容体結合化合物の非存在または存在のもとで混合する。その混合液を30分間室温で平衡化した後、Tecan Genios Pro(Tecan Instruments)により、適当な励起と発光波長を用いて測定を行う。実験データはPrismソフトウェアversion 4.0(GraphPad Software Inc.、San Diego、CA)により解析することができる。解離定数( $K_d$ )値は、1位置結合の双曲線非線形回帰モデルを用いて実験データをフィットすることにより求めることができる。

## 【0251】

原形質膜上の受容体運動またはクラスター形成を測定するために利用できるin vitroアッセイとしては、例えば、蛍光顕微鏡(例えば、Dove, 2006, Nature Methods 3: 223-229を参照)が挙げられる。受容体リン酸化を測定するin vitroアッセイとしては、p-32を用いるタンパク質キナーゼアッセイが挙げられる。分解を測定するアッセイとしては、標的タンパク質(例えば、目的のEphB受容体)と免疫特異的に結合する抗体を用いるウェスタンプロットが挙げられる。

## 【0252】

具体的な治療薬または予防薬プロトコルの投与が効能を示すかどうかを決定するのに利

50

用できるin vitroアッセイとしては、患者組織サンプルを培養で増殖し、プロトコルに曝すかまたはそうでなければ投与し、かかるプロトコルの組織サンプルに与える効果、例えば細胞増殖または生存の阻害を観察するin vitro細胞培養アッセイが挙げられる。接触した細胞（例えば、癌細胞、血管細胞、または神経細胞）の増殖または生存のより低いレベルは、その治療薬が患者の症状を治療するのに有効であることを示す。あるいは、患者からの細胞を培養する代わりに、治療薬および方法を、腫瘍の細胞または悪性細胞株を用いてスクリーニングすることができる。当技術分野で標準の多くのアッセイを利用して、かかる生存および増殖を評価することができる：例えば、細胞増殖は、<sup>3</sup>H-チミジン組込みをフローサイトメトリーで測定することにより、直接細胞計数により、プロトオノコジン（例えば、fos、myc）または細胞サイクルマーカーなどの公知の遺伝子の転写活性の変化を検出することにより評価できるし；細胞生存率はトリパンブルー染色により評価できるし、分化は目視で、形態学の変化、増加したクラスター形成、リン酸化、インターナリゼーションおよび／またはEph受容体、好ましくは、EphB1、EphB2またはEphB4受容体の分解に基づいて評価できる。特別な組成の癌細胞増殖に与える影響を決定するさらなるアッセイとしては、軟寒天などの三次元基質中のコロニーの形成、または三次元基底膜もしくはMATRIGEL（登録商標）などの細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワークもしくはウエブ様マトリックスの形成を観察することが挙げられる。非癌細胞は軟寒天中でコロニーを形成せず、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中で明確な球様構造を形成する。

10

## 【0253】

20

療法に用いる化合物は、ヒトで試験する前に好適な動物モデル系で、限定されるものでないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなどを含む動物モデルで試験することができる。例えば、限定されるものでないが、癌を研究するためには、当技術分野で公知であって、それぞれ参照により本明細書にその全てが組み入れられる Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig and Burger) ; Contributions to Oncology (1999, Karger) ; The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd) ; およびAnticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher)に記載されたSCIDマウスモデル、またはEphB受容体をヒトEphB受容体により置き換えたトランスジェニックマウス、ヒト異種移植体をもつヌードマウス、または任意の動物モデル（ハムスター、ウサギ、などを含む）を利用することができる。次いでその化合物を適当な臨床試験に用いることができる。

30

## 【0254】

本明細書に記載の予防および／または治療プロトコルの毒性と効力は、細胞培養または実験動物において、例えば、LD<sub>50</sub>（集団の50%に対する致死用量）およびED<sub>50</sub>（集団の50%に治療上有効な用量）を測定する標準の製薬上の手順によって決定することができる。毒性と治療効力の間の用量比が治療指數であり、これは比LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>として表現することができる。大きい治療指數を示す予防薬および／または治療薬が好ましい。有毒な副作用を示す予防薬および／または治療薬を用いることはできるものの、かかる薬剤は患部組織の部位に標的化するよう送達系の設計に注意し、無感染細胞を損傷する可能性を最小化し、それにより、副作用を軽減しなければならない。

40

## 【0255】

細胞培養アッセイと動物研究から得たデータは、ヒトに使用する予防薬および／または治療薬の投与量範囲を処方するのに利用することができる。かかる薬剤の投与量は、好ましくは、毒性が低いかまたは全くないED<sub>50</sub>を含む循環濃度の範囲にある。投与量は、使用する投与剤形および利用する投与経路に応じてこの範囲内で変化しうる。本発明の方法に用いる任意の薬剤の治療上有効な用量は、最初に細胞培養アッセイから見積もることができる。1用量を、動物モデルにおいて細胞培養で決定したIC<sub>50</sub>（すなわち、症候群の最大抑制の半値(half-maximal inhibition)）を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように製剤することができる。かかる情報をを利用してヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体ク

50

ロマトグラフィにより測定することができる。

**【0256】**

本発明はさらに、EphB受容体結合化合物のIC<sub>50</sub>値を同定する方法を提供するものであり、このIC<sub>50</sub>値は例えば、エフリン-BリガンドのEphB受容体との結合の50%阻害に必要なEphB受容体結合化合物の濃度を表す。C<sub>50</sub>値を決定するプロトコルは当業者に公知であり、例えば、下記実施例6に記載されている。

**【0257】**

本発明はさらに、EphB受容体結合化合物の効力を決定するアッセイを提供する。例えば、アゴニストのEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）が有効であるかどうかを試験するには、EphB受容体結合化合物を患者から得た細胞、例えば、癌細胞と接触させ、そして、癌細胞の増殖、EphB受容体クラスター形成、トランスリン酸化、インターナリゼーションおよび／または分解などの様々な終点にEphB受容体結合化合物の与える効果を決定するアッセイを実施する。アゴニストのEphB受容体結合化合物が次の項について有効であるかを決定する：(1)対照と比較して、癌細胞の増殖の減少または阻害があるか；(2)対照と比較して、EphB受容体トランスリン酸化に増加があるか；(3)対照と比較して、EphB受容体クラスター形成に増加があるか；(4)対照と比較して、EphB受容体インターナリゼーションに増加があるか；または(5)対照と比較して、EphB受容体分解に増加があるか。アンタゴニストのEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）が次の項について有効であるかを決定する：(1)対照と比較して、癌細胞の増殖の減少または無変化があるか；(2)対照と比較して、EphB受容体トランスリン酸化に減少があるか；(3)対照と比較して、EphB受容体クラスター形成に減少があるか；(4)対照と比較して、EphB受容体インターナリゼーションに減少があるか；または(5)対照と比較して、EphB受容体分解に減少があるか。

**【0258】**

さらに、当業者に公知のいずれかのアッセイを用いて、本明細書に開示した癌の治療または予防のための併用療法の予防／治療上の効用を評価することができる。

**【0259】**

#### 5.4 組成物および投与の方法

本発明は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載の多量体ペプチドおよび／またはコンジュゲート）を含む組成物を提供する。かかる組成物はさらに、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、生物学的療法または免疫療法を含んでもよい。かかる組成物はまたさらに製薬上許容される担体または賦形剤を含んでもよい。本発明はまた、EphB受容体関連疾患を予防、治療または管理する方法であって、それを必要とする被験体に、1以上のEphB受容体結合化合物（例えば、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物）の予防上または治療上有効な量を投与するステップを含む前記方法も提供する。ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合化合物が本発明で提供される方法において使用する单一の活性薬である。他の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドが本発明で提供される方法において使用する单一の活性薬である。一実施形態においては、EphB受容体結合化合物またはEphB受容体結合ペプチドを他の療法と組合させて使用しない。本明細書に記載の方法により予防、治療および／または管理されるEphB受容体関連疾患としては、限定されるものでないが、新生物疾患、癌、血管疾患（例えば、黄斑変性症）および神経障害（例えば、脊椎損傷）が挙げられる。

**【0260】**

#### 5.4.1 医薬組成物

具体的な実施形態において、本発明は、被験体にEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の有効量を単独でまたは製薬上許容される担体と組合させてのどちらかで投与することによる、治療および予防の方法を提供する。他の具体的な実施形態において、本発明は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を、単独でまたは本明細書に記載の方法に有用である1以上の他の治療薬または予防

10

20

30

40

50

薬と組合わせてのどちらかを含む医薬組成物を提供する。

【0261】

ある具体的な実施形態において、医薬組成物は、精製されたEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を含む（例えば、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物は好ましくはその効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含有しない）。

【0262】

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば、不純なまたは非無菌組成物）および投与剤形の調製に利用できる医薬組成物（すなわち、被験体または患者への投与に好適な組成物）を含む。かかる組成物は、本明細書に開示した治療薬（例えば、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物）の治療上有効な量および製薬上許容される担体を含む。具体的な実施形態において、組成物は、1以上のタンパク質の治療上有効な量および製薬上許容される担体を含む。さらなる実施形態において、組成物はさらに追加の癌または非癌治療薬を含む。好ましくは、組成物中の治療薬は純粋である。

10

【0263】

ある具体的な実施形態において、用語「製薬上許容される」は、動物、さらに特にヒトにおける使用について、連邦または州政府の規制機関により認可されているかまたは米国薬局方または他の一般的に認識されている薬局方に掲載されていることを意味する。用語「担体」は、治療薬とともに投与される、希釈剤、アジュバント（例えば、フロイント（Freund）のアジュバント（完全および不完全）、またはChiron、Emeryville、CAから入手しうるMF59C.1アジュバント）、賦形剤、またはビヒクルを意味する。かかる製薬用担体は水および、落花生油、大豆油、鉱物油、胡麻油などの石油、動物、植物または合成起源のものを含む油のような無菌の液体でありうる。具体的な実施形態においては、水が医薬組成物を静脈内に投与するときの好ましい担体である。生理食塩水およびデキストロースおよびグリセロール水溶液も、特に注射溶液用の液状担体として使用することができる。適当な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、コムギ粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、組成物はまた、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤を含有してもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁剤、乳濁剤、錠剤、丸薬、カプセル剤、粉剤、徐放製剤などの剤形をとってもよい。

20

【0264】

一般的に、本発明の組成物の成分は、別々にまたは一緒に混合して単位剤形で、例えば、乾燥した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、活性薬剤の量を示すアンプルなどの密封容器またはサシェット（sachette）に入れて供給する。組成物を輸液により投与する場合、それを無菌の製薬グレードの水または生理食塩水を含有する輸液ボトルを用いて調剤することができる。組成物を注射により投与する場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供し、投与前に成分を混合することができる。

30

【0265】

組成物は、中性もしくは塩ので製剤することができる。製薬上許容される塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するアニオンにより形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するカチオンにより形成される塩が挙げられる。

40

【0266】

一実施形態において、組成物は、内毒素および／または関連する発熱物質を実質的に含まない発熱物質非含有製剤である。内毒素は、微生物の内部に閉じ込められ、該微生物が分解されるかまたは死ぬときにのみ遊離する毒素を意味する。発熱物質はまた、細菌およ

50

びその他の微生物の外膜由来の熱誘発性、熱安定性物質（糖タンパク質）も含む。これらの物質は両方ともヒトに投与すると、熱、低血圧およびショックを引き起こしうる。有害な作用が考えられるため、たとえ低レベルの量の内毒素でも、静脈内投与する医薬剤溶液から除去しなければならない。米国食品医薬品局（FDA）は、静脈内の薬剤適用の場合、1時間に体重1キログラム当たりの用量につき5内毒素単位（EU）の上限を定めている（The United States Pharmacopeial Convention, Pharcopoeial Forum 26 (1):223(2000)）。モノクローナル抗体の場合にありうる、体重1キログラム当たり数百から数千ミリグラムの量の治療タンパク質を投与する場合、有害かつ危険な内毒素は痕跡量でも除去しなければならない。特別な形態において、組成物中の内毒素および発熱物質レベルは、10 EU/mg未満、または5 EU/mg未満、または1 EU/mg未満、または0.1 EU/mg未満、または0.01 EU/mg未満、または0.001 EU/mg未満である。

10

#### 【0267】

様々な送達系が公知であり、疾患またはその症候群を予防、治療または管理するのに有用な療法、例えば、予防薬または治療薬を投与するために用いることができ、それらの送達系としては、例えば、リポソーム中の封入、微粒子、マイクロカプセル、ポリペプチド断片を発現できる組換え細胞、受容体介在性エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987) を参照）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸構築などがある。療法、例えば、予防薬もしくは治療薬を投与する方法としては、限定されるものでないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下投与）、硬膜外、および粘膜（例えば、鼻腔内、吸入および経口経路）投与が挙げられる。ある具体的な実施形態においては、療法、例えば、予防もしくは治療薬を、筋肉内、静脈内または皮下に投与する。療法、例えば、予防薬または治療薬を、任意の好都合な経路により、例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜皮膚ライニング（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を介する吸収により投与してもよく、また他の生物学的活性薬と一緒に投与してもよい。投与は全身であっても局所であつてもよい。

20

#### 【0268】

ある具体的な実施形態においては、本明細書に記載の方法に使用する療法、例えば、予防薬または治療薬を、治療を必要とする領域へ局所投与することが望ましく；これは、例えば、限定されるものでないが、局所注入により、注射により、または、シアラスチック膜などの膜もしくは纖維を含む多孔質、非多孔質またはゼラチン状材料であるインプラントを使うことにより達成することができる。

30

#### 【0269】

さらに他の実施形態においては、療法、例えば、予防薬または治療薬を、制御放出または持続放出システムで送達することができる。一実施形態においては、ポンプを利用して制御または持続放出を達成してもよい（Langer, 前掲；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20 ; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507 ; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照）。他の実施形態においては、ポリマー材料を利用して薬剤の制御または持続放出を達成することができる（例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) ; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984) ; Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照；またLevy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105 ; 米国特許第5,679,377号；米国特許第5,916,597号；米国特許第5,912,015号；米国特許第5,989,463号；米国特許第5,128,326号；国際公開WO 99/15154；および国際公開WO 99/20253も参照）。持続放出製剤に使用されるポリマーの例としては、限定されるものでないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(P-LG)、ポリ酸無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリ

40

50

ルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられる。ある具体的な実施形態においては、持続放出製剤に利用されるポリマーは不活性であって、浸出可能な不純物を含まず、貯蔵に安定で、無菌かつ生物分解性である。さらに他の実施形態においては、制御または持続放出システムを治療標的の近くに配置することができ、従って全身用量のほんの一部しか必要としない(例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 前掲, vol.2, pp.115-138 (1984)を参照)。

## 【0270】

制御放出システムはLanger (1990, Science 249:1527-1533) の総説に考察されている。当業者に公知のいずれの技術を利用して1以上の療法、例えば、予防薬または治療薬を含む持続放出製剤を作製することができる。例えば、米国特許第4,526,938号、国際特許公開WO 91/05548およびWO 96/20698、Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39: 179-189、Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397、Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854、およびLam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照されたい。10

## 【0271】

5.4.2 製剤

本発明に従って使用される医薬組成物は、1以上の生理的に許容される担体または賦形剤を用いて、通常の方法で製剤することができる。20

## 【0272】

従って、本発明の方法に使用する薬剤およびその生理的に許容される塩および溶媒和物は、吸入法またはガス吹送法(口か鼻のどちらかを通じて)による投与、または経口、非経口あるいは粘膜(頬、膣、直腸、舌下など)投与用に製剤してもよい。ある特定の実施形態においては、局所的または全身的な非経口投与を用いる。

## 【0273】

経口投与では、医薬組成物は例えば、結合剤(例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)；充填剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロース、リン酸水素カルシウム)；滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ)；崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプン、デンブングリコール酸ナトリウム)；または湿潤剤(例えばラウリル硫酸ナトリウム)などの製薬上許容される賦形剤を用いて、通常の方法で調製した錠剤またはカプセル剤の剤形をとることができる。錠剤は当技術分野で周知の方法によりコーティングすることができる。経口投与用の液調製物は、例えば溶液、シロップ剤、または懸濁剤の形をとることができ、または、これらを使用前に水もしくは他の適切なビヒクルを使って構成する乾燥品として提供することができる。かかる液調製物は、懸濁化剤(例えば、ソルビトール・シロップ、セルロース誘導体、水添食用脂)；乳化剤(例えば、レシチン、アカシア)；非水性ビヒクル(例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコール、分留植物油)；および保存剤(例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、ソルビン酸)などの製薬上許容される添加剤を用いて、通常の方法で調製することができる。30  
調製物はまた、緩衝塩、香料、着色剤、および甘味剤を適宜含有してもよい。40

## 【0274】

経口投与用調製物は、有効化合物を制御放出するように好適に製剤することができる。

## 【0275】

バッカル投与では、これらの組成物は、通常の方法で製剤した錠剤またはトローチ剤の剤形を取ることができる。

## 【0276】

吸入による投与では、本発明に従って使用する療法、例えば、予防薬または治療薬を、適切な噴霧剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の好適なガスを使用して、加圧パックまた

10

20

30

40

50

は噴霧器からエアロゾル・スプレーの形態で好都合に送達する。加圧エアロゾルの場合、所定の量を送達するバルブを提供することにより、投与単位を決定することができる。吸入器または吹送器で使用する、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、この化合物とラクトースやデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有するように製剤することができる。

#### 【0277】

療法、例えば、予防薬または治療薬は、注射、例えばボーラス注射または連続輸液による非経口投与用に製剤することができる。注射用製剤は、保存剤を加えた単位投与剤形、例えば、アンプルや多用量容器で提供することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁剤、溶液、乳剤などの形をとることができ、また懸濁化剤、安定化剤、および／または分散化剤などの製剤用薬剤を含有してもよい。あるいは、活性成分は粉末の形であって、使用前に適切なビヒクル、例えば発熱物質を含まない無菌水を用いて構成するようにしてもよい。

10

#### 【0278】

これらの療法、例えば、予防薬または治療薬はまた、例えばココアバターや他のグリセリドなどの通常の坐薬基剤を含有する坐薬や停留浣腸などの直腸用組成物で製剤することもできる。

#### 【0279】

前記の組成物に加えて、これらの療法、例えば、予防薬または治療薬はまた、デポー調製物として製剤することもできる。かかる持効性製剤は、（例えば皮下もしくは筋肉内）移植または筋肉内注射により投与することができる。従って、例えば、これらの予防薬または治療薬は、好適なポリマー材料もしくは疎水性材料（例えば、許容可能な油中の乳濁液）またはイオン交換樹脂を用いて、あるいは難溶性の誘導体、例えば難溶性の塩として製剤することができる。

20

#### 【0280】

本発明はまた、その量を表示するアンプルやサシェットなどの気密性密封容器に封入された療法、例えば予防薬または治療薬も提供する。一実施形態では、療法、例えば予防薬または治療薬を、気密性密封容器中の滅菌凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給し、例えば水や生理食塩水で適当な濃度に再構成して被験体に投与することができる。

30

#### 【0281】

ある具体的な実施形態において、EphB受容体関連疾患、例えば、新生物疾患、癌、血管疾患（例えば、黄斑変性症）または神経疾患に対する様々な療法の製剤および投与は当技術分野で公知であり、しばしばPhysicians' Desk Reference、61<sup>st</sup> ed.（2007）に記載されている。

#### 【0282】

組成物は、所望であれば、活性成分を含有する1以上の単位投与剤形を含有しうるパックまたはディスペンサー装置で提示してもよい。パックは、ブリストーパックなどの金属やプラスチック箔であってもよい。包装またはディスペンサー装置には投与のための説明書を添付してもよい。

40

#### 【0283】

### 5.4.3 投与の用量および頻度

EphB受容体関連疾患またはその1以上の症候群の予防、治療および／または管理に有効でありうる療法、例えば予防薬もしくは治療薬または組成物の量は、標準の臨床的な方法により決定することができる。頻度および用量はまた、それぞれの患者に対する具体的な因子によって、すなわち、投与する具体的な療法（例えば具体的な予防薬または治療薬）、障害、疾患もしくは症状の重篤度、投与経路、ならびに年齢、体重、応答性、および過去の患者の医療歴に応じて変わりうる。例えば、EphB受容体関連疾患またはその1以上の症候群の治療、予防および／または管理に有効でありうる予防薬または治療薬または組成物（例えば、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物を含む組成物

50

)の用量は、その組成物を、例えば、本明細書に開示したまたは当業者に公知の動物モデルに投与することにより決定することができる。さらに、場合によっては、*in vitro*アッセイを使って最適な用量範囲を特定するのを助けることができる。当業者はかかる因子を考慮することにより、および、例えば、文献に報じられかつPhysician's Desk Reference (61<sup>th</sup> ed., 2007) に推奨されている用量により、好適なレジメンを選択することができる。

#### 【0284】

小分子の用量の例としては、被験体もしくはサンプル重量1kg当たり小分子mgまたはμg量（例えば、1kg当たり約1μg～1kg当たり約500mg、1kg当たり約100μg～1kg当たり約5mg、または1kg当たり約1μg～1kg当たり約50μg）が挙げられる。本発明が包含する抗体、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドおよび融合タンパク質（例えば、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物）について、患者に投与される用量は、典型的には0.0001mg/kg～100mg/kg患者体重である。特別な実施形態において、患者に投与する用量は、ほぼ0.0001mg/kg～ほぼ20mg/kg、ほぼ0.0001mg/kg～ほぼ10mg/kg、ほぼ0.0001mg/kg～ほぼ5mg/kg、ほぼ0.0001～ほぼ2mg/kg、ほぼ0.0001～ほぼ1mg/kg、ほぼ0.0001mg/kg～ほぼ0.75mg/kg、ほぼ0.0001mg/kg～ほぼ0.5mg/kg、ほぼ0.0001mg/kg～ほぼ0.25mg/kg、ほぼ0.0001～ほぼ0.15mg/kg、ほぼ0.0001～ほぼ0.10mg/kg、ほぼ0.001～ほぼ0.5mg/kg、ほぼ0.01～ほぼ0.25mg/kgまたはほぼ0.01～ほぼ0.10mg/kg患者体重である。EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の用量と頻度は、ペプチドまたは化合物の取り込みおよび組織貫入を、例えば、リピド化などの改変により促進することによって、低下させることができる。  
10

#### 【0285】

ある具体的な実施形態において、患者のEphB受容体関連疾患を予防、治療および／または管理するために投与するEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の用量は、患者体重1kg当たり150μg/kg以下、125μg/kg以下、100μg/kg以下、95μg/kg以下、90μg/kg以下、85μg/kg以下、80μg/kg以下、75μg/kg以下、70μg/kg以下、65μg/kg以下、60μg/kg以下、55μg/kg以下、50μg/kg以下、45μg/kg以下、40μg/kg以下、35μg/kg以下、30μg/kg以下、25μg/kg以下、20μg/kg以下、15μg/kg以下、10μg/kg以下、5μg/kg以下、2.5μg/kg以下、2μg/kg以下、1.5μg/kg以下、1μg/kg以下、0.5μg/kg以下、または0.5μg/kg以下である。他の実施形態において、患者のEphB受容体関連疾患を予防、治療および／または管理するために投与するEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の用量は、単位用量で、0.1mg～20mg、0.1mg～15mg、0.1mg～12mg、0.1mg～10mg、0.1mg～8mg、0.1mg～7mg、0.1mg～5mg、0.1～2.5mg、0.25mg～20mg、0.25～15mg、0.25～12mg、0.25～10mg、0.25～8mg、0.25mg～7mg、0.25mg～5mg、0.5mg～2.5mg、1mg～20mg、1mg～15mg、1mg～12mg、1mg～10mg、1mg～8mg、1mg～7mg、1mg～5mg、または1mg～2.5mgである。  
20

#### 【0286】

ある特定の実施形態においては、被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の有効量の1以上の用量を投与し、ここで前記EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の有効量は、当技術分野で周知のおよび／または本明細書に記載のアッセイ、例えば、ELISA、BIAcoreアッセイ、免疫蛍光アッセイ、*in vivo*イメージングアッセイで測定して、ネガティブ対照と比較して、内因性リガンド（例えば、エフリン）の少なくとも20%～25%、少なくとも25%～30%、少なくとも30%～35%、少なくとも35%～40%、少なくとも40%～45%、少なくとも45%～50%、少なくとも50%～55%、少なくとも55%～60%、少なくとも60%～65%、少なくとも65%～70%、少なくとも70%～75%、少なくとも75%～80%、または少なくとも85%までがその受容体と結合するのを防止するものである。  
30

#### 【0287】

他の実施形態においては、被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）の有効量の1以上の用量を投与し、ここ  
50

で有効量の用量はEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の少なくとも $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $125\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $150\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $175\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $200\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $225\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $250\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $275\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $300\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $325\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $350\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $375\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の血清力価を達成する。さらに他の実施形態においては、被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の有効量の用量を投与して、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の少なくとも $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $125\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $150\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $175\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $200\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $225\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $250\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $275\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $300\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $325\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $350\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $375\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の血清力価を達成し、そして、引き続いて1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の有効量の用量を投与して、EphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の少なくとも $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $125\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $150\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $175\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $200\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $225\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $250\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $275\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $300\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $325\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $350\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $375\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の血清力価を維持する。これらの実施形態によれば、被験体に引き続いて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上の用量を投与することができる。

### 【0288】

ある具体的な実施形態において、本発明は、EphB受容体関連疾患、またはその1以上の症候群を予防、治療および／または管理する方法であって、それを必要とする被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $30\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $35\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $40\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $45\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $55\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $60\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $65\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $70\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $75\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $80\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $85\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $90\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $95\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $105\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $110\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $115\text{ }\mu\text{g}$ 、または少なくとも $120\text{ }\mu\text{g}$ の用量を投与することを含む前記方法を提供する。他の実施形態において、本発明はEphB受容体関連疾患を予防、治療および／または管理する方法であって、それを必要とする被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結合化合物の少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $30\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $35\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $40\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $45\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $55\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $60\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $65\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $70\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $75\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $80\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $85\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $90\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $95\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $105\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $110\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $115\text{ }\mu\text{g}$ 、または少なくとも $120\text{ }\mu\text{g}$ の用量を、3日毎に1回、4日毎に1回、5日毎に1回、6日毎に1回、7日毎に1回、8日毎に1回、10日毎に1回、2週毎に1回、3週毎に1回、または1ヶ月に1回投与することを含む前記方法を提供する。

### 【0289】

本発明はEphB受容体関連疾患を予防、治療および／または管理する方法であって、(a)それを必要とする被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび／またはEphB受容体結

10

20

30

40

50

合化合物の予防上または治療上有効な量の1以上の用量を投与するステップ；および(b)EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物のある特定の用量数を投与した後に、前記被験体中の前記投与したEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の血漿レベル/濃度をモニターするステップを含む前記方法を提供する。さらに、具体的な実施形態において、前記ある特定の用量数は、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の予防上または治療上有効な量の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12用量である。具体的な実施形態において、その方法は、1以上の療法、例えば、予防薬または治療薬を1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、または12ヶ月の期間、投与することを含む。ある特定の実施形態において、その方法は、1以上の療法、例えば、予防薬または治療薬を1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間の期間、投与することを含む。いくつかの実施形態において、その方法は、1以上の療法、例えば、予防薬または治療薬を1年間、2年間、3年間、4年間、5年間、6年間、7年間、8年間、9年間、または10年間の期間、投与することを含む。

## 【0290】

ある具体的な実施形態において、本発明はEphB受容体関連疾患、または1以上のその症候群を予防、治療および/または管理する方法であって、(a)それを必要とする被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）の少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $30\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $35\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $40\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $45\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $55\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $60\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $65\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $70\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $75\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $80\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $85\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $90\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $95\text{ }\mu\text{g}$ 、または少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}$ の用量を投与するステップ；および(b)前記被験体中の投与したEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の血漿レベルが $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $0.25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $0.75\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、または $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であるとき、1以上の引き続いての用量を前記被験体に投与するステップを含む前記方法を提供する。他の実施形態において、本発明はEphB受容体関連疾患を予防、治療および/または管理する方法であって、(a)それを必要とする被験体に1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）の少なくとも $10\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $15\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $20\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $25\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $30\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $35\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $40\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $45\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $50\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $55\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $60\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $65\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $70\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $75\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $80\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $85\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $90\text{ }\mu\text{g}$ 、少なくとも $95\text{ }\mu\text{g}$ 、または少なくとも $100\text{ }\mu\text{g}$ の1以上の用量を投与するステップ；(b)ある特定の用量数を投与した後に、前記被験体中の投与したEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の血漿レベルをモニターするステップ；および(c)前記被験体中の投与したEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の血漿レベルが $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $0.25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $0.75\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、または $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であるとき、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の引き続いての用量を投与するステップを含む前記方法を提供する。特別な実施形態において、前記ある特定の用量数は1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の有効量の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12用量である。

## 【0291】

ある特定の実施形態においては、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）を、静脈内注射用に $1\text{mg}/\text{ml}$ 、 $5\text{mg}/\text{ml}$ 、 $10\text{mg}/\text{ml}$ および $25\text{mg}/\text{ml}$ にて製剤し、反復皮下投与および筋肉内注射用に $5\text{mg}/\text{ml}$ 、 $10\text{mg}/\text{ml}$ および $80\text{mg}/\text{ml}$ にて製剤する。

## 【0292】

EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物については、患者に投与する用量は、典型的には、患者体重 $1\text{kg}$ 当たり $0.01\text{mg}/\text{kg}$ ～ $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、または $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $10$

10

20

30

40

50

0mg/kgである。具体的な実施形態において、患者に投与する用量は、患者体重のほぼ0.1mg/kg～ほぼ20mg/kg、または患者体重のほぼ1mg/kg～患者体重のほぼ10mg/kgである。

#### 【0293】

有効な用量は、動物モデル試験系から誘導した用量-応答曲線から外挿することができる。ある特定の例示の実施形態において、その用量範囲はマウスLD<sub>50</sub>の0.001倍～10,000倍、マウスLD<sub>50</sub>の0.01倍～1,000倍、マウスLD<sub>50</sub>の0.1倍～500倍、マウスLD<sub>50</sub>の0.5倍～250倍、マウスLD<sub>50</sub>の1倍～100倍およびマウスLD<sub>50</sub>の5倍～50倍である。ある特定の具体的な実施形態において、その用量範囲はマウスLD<sub>50</sub>の0.001倍、0.01倍、0.1倍、0.5倍、1倍、5倍、10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍、5,000倍または10,000倍である。

#### 【0294】

具体的な実施形態において、下流のシグナル伝達事象を活性化または不活化するために有効であるEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の量は、少なくとも0.05μM、少なくとも0.1μM、少なくとも0.2μM、少なくとも0.3μM、少なくとも0.4μM、少なくとも0.5μM、少なくとも0.6μM、少なくとも0.7μM、少なくとも0.8μM、少なくとも0.9μM、少なくとも1μM、少なくとも5μM、少なくとも10μM、少なくとも20μM、少なくとも30μM、少なくとも40μM、少なくとも50μM、少なくとも60μM、少なくとも70μM、少なくとも80μM、少なくとも90μM、少なくとも100μMまたは少なくとも200μMの濃度を含む。本明細書に記載されてない他の有効濃度の決定は、当業者が容易に決定することができる。

#### 【0295】

EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物以外の、EphB受容体関連疾患を予防、治療および/または管理するために使用されていたまたは現在使用されている療法（例えば、予防薬または治療薬）を、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物と組合させて本明細書に記載の方法によって投与し、EphB受容体関連障害を予防、治療および/または管理することができる。ある具体的な実施形態において、併用療法に使用される予防薬または治療薬の投与量はEphB受容体関連疾患を予防し、治療しおよび/または管理するために使用されていたまたは現在使用されているより低い。EphB受容体関連疾患の予防、治療および/または管理のために現在使用されている薬剤の推奨される投与量は、限定されるものでないが、全て本明細書に参照によりその全文が組み入れられるHardman et al., eds., 2001, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York ; Physician's Desk Reference (PDR) 60<sup>th</sup> ed., 2006, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ ; Physicians' Desk Reference (PDR) 61<sup>st</sup> ed., 2007, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJを含む、当技術分野のいずれかの参考文献から得ることができる。

#### 【0296】

様々な実施形態においては、療法（例えば、予防薬または治療薬）を5分間未満離れて、30分間未満離れて、1時間離れて、約1時間離れて、約1時間～約2時間離れて、約2時間～約3時間離れて、約3時間～約4時間離れて、約4時間～約5時間離れて、約5時間～約6時間離れて、約6時間～約7時間離れて、約7時間～約8時間離れて、約8時間～約9時間離れて、約9時間～約10時間離れて、約10時間～約11時間離れて、約11時間～約12時間離れて、約12時間～18時間離れて、18時間～24時間離れて、24時間～36時間離れて、36時間～48時間離れて、48時間～52時間離れて、52時間～60時間離れて、60時間～72時間離れて、72時間～84時間離れて、84時間～96時間離れて、または96時間～120時間離れて投与する。具体的な実施形態においては、2以上の療法を同じ患者訪問時に投与する。

#### 【0297】

ある特定の実施形態においては、1以上のEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物と1以上の他の療法（例えば、予防薬または治療薬）をサイクルで投与する。サイクル療法は、ある期間は第1の療法（例えば、第1の予防薬または治療薬）の投与、続いている期間は第2の療法（例えば、第2の予防薬または治療薬）の投与、場合によっては、続いて、ある期間は第3の療法（例えば、第3の予防薬または治療薬）の投

10

20

30

40

50

与という具合に、この経時的な投与、すなわち、サイクルを繰り返すことに関わり、両方の1つに対する耐性の出現を抑制し、療法の1つの副作用を回避または軽減し、および/または療法の有効性を改善する。

#### 【0298】

ある特定の実施形態においては、同じEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物の投与を繰り返してもよく、そしてその投与を少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2ヶ月、75日、3ヶ月、または少なくとも6ヶ月だけ離れて投与してもよい。他の実施形態において、抗体以外の同じ療法（例えば、予防薬または治療薬）の投与を繰り返してもよく、そしてその投与を少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2ヶ月、75日、3ヶ月、または少なくとも6ヶ月だけ離れて投与してもよい。10

#### 【0299】

##### 5.5 キット

本発明は、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物を充填した1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。さらに、EphB受容体関連疾患の治療に有用な1以上の他の予防薬または治療薬または他の関係薬剤を、医薬品パックまたはキットに含んでもよい。ある特定の実施形態において、他の予防薬または治療薬は免疫調節性薬（例えば、抗Eph受容体抗体）である。本発明はまた、医薬組成物の成分の1以上を充填した1以上の容器を含む医薬品パックまたはキットも提供する。場合によっては、かかる容器には、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が指定した形式で、ヒト投与用の製造、使用または販売に対する前記機関による認可を記載した注意書きを添付することができる。本発明はさらに、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物を充填した1以上の容器を含む、EphB受容体関連疾患を診断および/またはモニターするための診断パックまたはキットを提供する。診断パックまたはキットはさらに、EphB受容体関連疾患を診断および/またはモニターするための検出薬を含むことができる。20

#### 【0300】

##### 5.6 製品

本発明はまた完成した包装しあつ標識した医薬製品も包含する。本製品は、ガラスバイアルもしくは他の密栓した容器などの適当な容器中にに入った適当な単位投与剤形を含む。医薬製品を、単一用量バイアルにpH 6.0の10mMヒスチジンバッファーと150mM塩化ナトリウムを含有する無菌液として製剤してもよい。それぞれの1.0mLの溶液は、注射用水中にタンパク質100mg、ヒスチジン1.6mgおよび塩化ナトリウム8.9mgを含有してもよい。非経口投与用に好適な投与剤形の場合、活性成分、例えば、EphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物は無菌でありかつ微粒子を含まない溶液が投与用に好適である。言い換えると、本発明は非経口溶液と凍結乾燥粉末を包含し、それぞれが無菌でありかつ後者は注射前の再構成に好適なものである。あるいは、単位投与剤形は経口、経皮、鼻腔内、または局所送達用に好適な固体であってもよい。30

#### 【0301】

ある具体的な実施形態において、単位投与剤形は、静脈内、筋肉内、鼻腔内、経口、局所または皮下送達用に好適である。従って本発明は、溶液、好ましくは無菌で、それぞれの送達経路に好適な溶液を包含する。40

#### 【0302】

いずれの医薬製品もそうであるように、包装材料および容器は、貯蔵および輸送中の製品の安定性を保護するように設計する。さらに、本発明の製品は、医師、技師または患者に、問題の障害を巧く予防または治療する方法を手引きするための、使用の指示書または他の情報材料を含んでもよい。言い換えれば、製品は、限定されるものでないが、実投与量、モニター実施手順、全リンパ球、肥満細胞数、T細胞数、IgE産生、および他のモニター実施情報を含む投与レジメンを示すかまたは示唆する指示手段を含むものである。

#### 【0303】

10

20

30

40

50

具体的に、本発明は、箱、瓶、チューブ、バイアル、コンテナ容器、噴霧器、吸入器、静脈内注入(i.v.)バッグ、袋などの包装材料；および前記包装材料内に収容された少なくとも1つの単位剤形の医薬を含む製品であって、前記医薬はEphB受容体結合化合物（例えば、多量体ペプチド）を含有し、かつ前記包装材料は前記EphB受容体結合化合物が、本明細書に記載の特定の用量を投与することによりかつ特定の投与レジメンを用いることにより、EphB受容体関連疾患またはその1以上の症候群を予防、管理、治療、または改善するため使用できることを示す指示手段を含む前記製品を提供する。

#### 【0304】

本発明はまた、箱、瓶、チューブ、バイアル、コンテナ容器、噴霧器、吸入器、静脈内注入(i.v.)バッグ、袋などの包装材料；および前記包装材料内に収容された少なくとも1つの単位剤形の医薬を含む製品であって、1つの医薬はEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物を含みかつ他の医薬は第2の異なる療法（例えば、異なる予防薬または治療薬）を含み、そして前記包装材料は前記薬剤が、本明細書に記載の特定の用量を投与することによりかつ特定の投与レジメンを用いることにより、EphB受容体関連疾患、またはその1以上の症候群を治療、予防および/または改善するために利用できることを示す指示手段を含む前記製品を提供する。

10

#### 【0305】

本発明はまた、箱、瓶、チューブ、バイアル、コンテナ容器、噴霧器、吸入器、静脈内注入(i.v.)バッグ、袋などの包装材料；および前記包装材料内に収容された少なくとも1つの単位剤形の医薬を含む製品であって、1つの医薬はEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物を含みかつ他の医薬はEphB受容体結合ペプチドおよび/またはEphB受容体結合化合物以外の予防薬または治療薬を含み、そして前記包装材料は前記薬剤が、本明細書に記載の特定の用量を投与することによりかつ特定の投与レジメンを用いることにより、EphB受容体関連疾患に関連する1以上の症候群を治療、予防および/または改善するために利用できることを示す指示手段を含む前記製品を提供する。

20

#### 【0306】

本発明は、EphB受容体関連疾患に関連する1以上の症候群を予防、治療および/または管理するために使用する製品に同封した情報資料において、本明細書に記載の方法により軽減または回避しうる有害な作用を示す。本明細書に記載の方法により低下または回避しうる有害な作用としては、限定するものでないが、生命徵候の異常（熱、頻脈、徐脈、高血圧、低血圧）、血液学的事象（貧血、リンパ球減少症、白血球減少症、血小板減少症）、頭痛、悪寒、めまい、吐き気、無力症、背痛、胸痛（胸部圧迫感）、下痢、筋肉痛、疼痛、そう痒、乾癬、鼻炎、発汗、注射部位反応、および血管拡張が挙げられる。

30

#### 【0307】

さらに、EphB受容体関連疾患を予防、治療、および/または管理するために使用する製品に同封される情報資料は、外来タンパク質が、アナフィラキシーを含むアレルギー反応、またはシトシン放出症候群ももたらす可能性があることを示すことがありうる。情報資料は、アレルギー反応が軽度のそう痒性癢疹としてのみ示されることもあるし、または紅皮症、スチーピンス・ジョンソン症候群、血管炎、またはアナフィラキシーのように重篤なこともあります。情報資料はまた、アナフィラキシー反応（アナフィラキシー）は重篤でありかつ場合によっては致命的な過敏性反応であることを示さなければならない。アナフィラキシーを含むアレルギー反応は、いかなる外来タンパク質が体内に注入された場合にも起こりうる。これらは、じんま疹もしくは癢疹などの軽度の症状から致命的な全身性反応までにわたる。アナフィラキシー反応は、暴露直後、通常10分以内に起こる。患者は、知覚異常、血圧低下、喉頭浮腫、精神状態変動、顔面または咽頭の血管性浮腫、気道閉塞、気管支開いたれん、じんま疹およびそう痒、血清病、関節炎、アレルギー性腎炎、糸球体腎炎、一過性関節炎、または好酸球増加症を経験しうる。

40

#### 【0308】

##### 5.7 他の効用

本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物はEph受容体（

50

例えば、EphB受容体)の生物学的役割を理解するユニークなツールとしてin vitroで有用であり、前記役割には、エフリンリガンド(例えば、エフリン-Bリガンド)の産生及び受容体結合過程に影響を与える、及び影響を受けると考えられる多くの因子の評価が含まれる。また、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物はまた、Eph受容体と結合してこれを活性化する他の化合物の開発にも有用である、何故なら、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物は、構造と活性との関連性に重要な情報を提供してかかる開発を促進するからである。

## 【0309】

EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物はまた、新規Eph受容体アゴニストをスクリーニングするアッセイにおける競合的結合剤として有用である。かかるアッセイの実施態様において、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物は修飾することなく使用することができるし、または様々な方法で、例えば、共有結合による連結部分又は非共有結合による連結部分などの標識で修飾して直接的もしくは間接的に検出可能シグナルを与えることができる。これらのアッセイのどの場合にも、該物質を、直接的に又は間接的に標識することができる。直接標識の可能性としては、<sup>125</sup>Iなどの放射性標識、ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼなどの酵素(米国特許第3,645,090号)、並びに蛍光強度、波長シフト又は蛍光偏光の変化をモニターすることができる蛍光標識(米国特許第3,940,475号)などの標識基が挙げられる。間接標識の可能性としては、1つの構成成分のビオチン化と続いて前記標識基の1つに連結したアビジンへの結合が挙げられる。EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を固相支持体に付着させる場合、EphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物はまた、スペーサー又はリンカーも含みうる。

10

20

30

## 【0310】

核磁気共鳴(NMR)分光法は、高分子構造を特徴付ける能力が公知であり、標的分子とのリガンド結合の静的及び過渡的特性の両方を調べる技法である(Pellecchia et al., 2002 Nature Rev Drug Disc 1:211)。NMR分光法は、リガンドと標的分子との結合を測定するための有用な手段であり、タンパク質機能の知見を予め必要とせず、高感度で相互作用を検出して定量できるという利点を有する。さらに、NMR分光法は、標的とリガンドの両方の構造情報を提供することができ、その後の、弱い結合ヒットから高親和性リード物質への最適化を助ける。

## 【0311】

一様に標識されている標的生体分子から第一及び第二核磁気共鳴相関スペクトルを作製することによって、標的生体分子へのリガンド化合物の結合を検出する方法は、米国特許第5,698,401号及び第5,804,390号に報告されている。第1スペクトルをリガンド不在のもとで標的物質で得たデータから作製し、第2スペクトルを1以上のリガンド存在もとで標的物質で得たデータから作製する。2つのスペクトルを比較すると、推定リガンドの混合物中のどの化合物が標的生体分子と結合するかを決定することができる。

## 【0312】

EphB受容体を、1以上のアミノ酸残基側鎖中への<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>Nおよび/または<sup>19</sup>Fの取り込みによって選択的に標識することができる。EphB受容体結合リガンドと結合したEph受容体の選択的標識複合体を第二分子に曝露して、いずれかの分子相互作用をNMR分光法で測定することができる。例えば、<sup>2</sup>D、<sup>13</sup>C、<sup>1</sup>H-HMQC(異種核多重量子コヒーレンス)および<sup>13</sup>C-編集<sup>1</sup>H、<sup>1</sup>H-NOESY NMR実験を利用して分子相互作用を検出し、任意の複合体の解離定数を測定することができる。さらに、標的の三次元構造に基づいて、および標識側鎖に対するリガンドの相対位置から、予測モデルを作成することができる。単一の選択的に標識した標的分子で、いくつかの異なる標識側鎖を使用すると、モデルの解像度ならびに予測特性を改善しうる。

40

## 【0313】

臨床開発には、非ペプチド性小分子がペプチドより好適でありうるので、ハイスループットスクリーニングを利用して、Eph-エフリン複合体を破壊するかまたはその形成を阻止

50

する小分子について、化学ライブラリーを選別してもよい。アッセイは、エフリン-アルカリホスファターゼ融合タンパク質と複合した固定化Eph受容体外部ドメインを使用する。結合したアルカリホスファターゼ活性を減少させる能力は、Eph-エフリン相互作用の小分子阻害剤を同定しうる。

#### 【0314】

さらに、Eph受容体に選択的に結合する能力に基づいて、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を、生細胞上、固定細胞上、体液中、組織ホモジネート中、精製した天然生体物質中などのEph受容体を選択的に検出するための試薬として使用することができる。例えば、本明細書に記載のペプチドを標識することによって、それらの表面のEphB1、EphB2、EphB3又はEphB4などの受容体を有する細胞を選択的に同定することができる。さらに、それらのEph受容体と結合する能力に基づいて、ペプチドを、*in situ*染色、FACS(蛍光活性化細胞ソーティング)、ウエスタンブロッティング、ELISAなどに使用することができる。さらに、それらのEph受容体と選択的に結合する能力に基づいて、ペプチドを、受容体精製に、または細胞表面(または透過処理細胞内)に特異的Eph受容体のみを発現する細胞を精製するのに使用することができる。

10

#### 【0315】

本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物はまた、様々な医学研究及び診断用の市販試薬として利用することもできる。かかる用途は、限定されるものでないが：(1)様々な機能アッセイにおける、候補EphBアゴニストの活性を定量するための較正標準としての使用；(2)EphB依存性細胞株の増殖及び成長を維持するための使用；(3)共結晶化を介するEphB受容体リガンドが結合する界面の構造解析における使用；(4)EphBシグナル伝達/受容体活性化の機構を研究するための使用；(5)EphB受容体が活性化されるかまたはかかる活性化がEphBアゴニストの既知量に対して較正するのに好都合である、他の研究及び診断応用など；および(6)EphB受容体が阻害されるかまたはかかる阻害がEphBアンタゴニストの既知量に対して較正するのに好都合である他の研究及び診断用途などを含む。ある特定の実施形態においては、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を用いて被験体のEphB受容体関連疾患を診断することができる。いくつかの実施形態においては、EphB受容体結合化合物を用いて患者サンプルから得た細胞を浄化することができる。具体的な実施形態においては、本明細書に記載のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を用いて、被験体のEphB受容体関連疾患の進行をモニターすることができる。例えば、検出可能なマーカーまたはイメージング剤とコンジュゲートしたEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物を被験体に投与してEphB受容体の異常発現を有する組織を同定することができる。コンピューター断層撮影(CT)、ポジトロン放出断層撮影(PET)、磁性共鳴イメージング(MRI)および他の放射線学のイメージング技法は、医療診断および他のイメージングに基づく応用の技術分野において周知である。

20

#### 【0316】

特別な実施形態において、被験体のEphB受容体関連障害を検出または診断する方法は、前記被験体のサンプル(すなわち、細胞、組織、体液、生体物質)を、ほぼ5～ほぼ50アミノ酸残基の長さを有するEphB受容体結合ペプチドおよび検出可能な薬剤を含む単離されたコンジュゲート(ここで、単離されたコンジュゲートはEphB受容体ファミリーのメンバーと選択的に結合している)と接触させることを含む。*in vivo*および*in vitro*技法についての方法および技法は、例えば、参照により本明細書にその全てが組み入れられる米国特許出願第6,572,856号で考察されている。他の実施形態において、本発明はまた、被験体におけるEphB受容体の異常発現を検出する方法であって、(a)被験体のサンプルまたは細胞を、検出可能な薬剤を含む単離されたEphB受容体結合化合物と接触させるステップ；および(b)単離されたEphB受容体結合化合物と被験体のサンプルまたは細胞との結合を検出する(ここで、もし単離されたEphB受容体結合化合物と被験体の前記サンプルとの結合が、単離されたEphB受容体結合化合物と対照サンプルまたはEphB受容体の正常な発現を有する細胞との結合より高いかまたは低ければ、EphB受容体の異常な発現が検出される)

30

40

50

ステップを含む前記方法を提供する。具体的な実施形態においては、被験体のEphB受容体発現のレベルを測定して、健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体と、または健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体に対する予め定めた参照範囲と比較する。ある特定の実施形態において、EphB受容体発現の正常なレベルは、健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体におけるEphB受容体発現のレベルである。他の実施形態において、被験体におけるEphB受容体の異常な発現を検出する方法は、被験体のサンプル中のまたは被験体中のEphB受容体発現のレベルを測定するステップ、およびサンプルまたは被験体中のEphB受容体発現のレベルを健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体の発現のレベルとまたはEphB受容体を異常に発現するまたはEphB受容体関連疾患を有する被験体に予め定めた参照範囲と比較する（ここで、もしサンプルまたは被験体におけるEphB受容体発現が、健康な被験体または検出可能なEphB受容体関連疾患を有しない被験体におけるEphB受容体発現のレベルまたは予め定めた参照範囲と比較して等価かまたはより高いレベルで存在すれば、EphB受容体の異常な発現が検出される）ステップを含む。ある特定の実施形態においては、EphB受容体関連疾患を診断する目的で、EphB受容体の異常な発現を検出する方法である。他の実施形態において、EphB受容体の異常な発現を検出する方法はEphB受容体関連疾患の進行をモニターするためであるかまたは療法の有効性をモニターするためである。

10

**【実施例】****【0317】**

20

**6. 実施例**

以下の限定されるものでない実施例は、本発明のある特定のEphB受容体結合ペプチドおよびEphB受容体結合化合物の合成、分析および／または効用を説明する。

**【0318】**

30

**実施例1 PEG-ペプチドコンジュゲーション**

ペプチドおよびタンパク質のアミノ基と反応しうるよう活性化したPEGが市販されている（例えば、Nektar Therapeutics, Huntsville Ala.より）。ペプチドのアミノ基と規定したサイズのPEGとの連結はアミンPEG化と名付けられ、ペプチドの血清半減期プロファイルの改善をもたらしうる。TNYL-Rawペプチド（配列番号39、表1）のPEG化は、ペプチドのアミノ基と単官能性の活性化PEGとの間の化学カップリング反応に関わり、生理学的に安定なアミド連鎖を生成する。このタイプの反応に通常使用される活性化PEGは、PEGカルボン酸のモノメトキシ-N-ヒドロキシスルシンイミドエステル（MePEG-NHS）である。反応は、TNYL-Rawペプチド1モル当たりMe-PEG NHS 1～10モル当量を組合わせて、ペプチド0.5～5mg/mlの溶液濃度で実施する。カップリングは、pH 7～9、温度4～25、全反応時間15～120分で実施する。PEGとコンジュゲートしたペプチドを次いで単離して特徴付ける。

30

**【0319】**

40

**実施例2 ペプチドと二官能性PEGとのコンジュゲーション**

本明細書に記載のコンジュゲーション反応を、2以上のペプチドと一緒に連結するために多官能性PEGを用いて実施し、PEGで連結した多量体ペプチドを形成することができる。リン酸塩バッファー溶液（PBS）中に再構成したTNYL-Raw-ビオチンペプチドを、SMB-PEG-SMB（両末端をスクシンイミジル-メチルブタノアート基を用いて活性化した二官能性直鎖PEG）と反応させた。反応は、SMB-PEG-SMBをPBSにより6～11mMに再構成し、次いでTNYL-Raw-ビオチン（260 μM）100 μlを再構成したSMB-PEG-SMBと混合することにより実施した。反応は、2つの異なるサイズのSMB-PEG-SMB反応物（3.4kDaおよび10kDa）を用いて実施した。反応を、2つの異なるペプチド：PEGモル比（3:1および5:1）を用いて繰り返した。3:1比については、260 μMのTNYL-Rawを87 μMのSMB-PEG-SMBとほぼ100 μlの全体積で組合わせた。5:1比については、260 μMのTNYL-Rawを52 μMのSMB-PEG-SMBとほぼ100 μlの全体積で組合わせた。反応物を30分間、周囲温度で、次いで4℃で一晩インキュベートした。反応物を、24時間4℃にて500ml PBSを2～3回交換して透析した。反応物を透析ユニットから回収し、光学吸収（OD<sub>280</sub>）により特徴付けてペプチド濃度を測定した。結果を図

50

1に示す。この結果は、生成物がPEGリンカー1分子当たりほぼ2分子のペプチドを含有することを示し、ペプチド二量体が生成したことを示唆する。

#### 【0320】

##### 実施例3 PEGとカップリングしたTNYL-RawペプチドはEphB4と結合する

抗PEG抗体をコートしたウエル上に捕捉されたPEG-TNYL-Raw-ビオチンがマウスEphB4 APと結合しうるかどうかを評価する実験を設計した。Reacti-Bindタンパク質でコートしたプレートをTBST/Caによって3回洗浄した(前記)。プレートを、TBST/Ca(100μl/ウエル)に希釈したAGP3(マウス抗PEG IgM)1μg/mlを用いて1.5時間、周囲温度でコートした。プレートをTBST/Caにより4回洗浄した。異なるPEGサイズにより異なるPEG:ペプチド出発比で実施した(前記通り)いくつかのPEG化反応の生成物を含む合計40μlのTBST/Caをプレートに加えた。PEG化生成物には、PEG 3.4kDa-TNYL-Raw(1:3PEG:ペプチド);PEG 10kDa-TNYL-Raw(1:3PEG:ペプチド);PEG 3.4kDa-TNYL-Raw(1:5PEG:ペプチド);PEG 10kDa-TNYL-Raw(1:5PEG:ペプチド)が含まれる。対照(TNYL-Raw-ビオチン;SMB-PEG-SMB 3.4 kDa;およびSMB-PEG-SMB 10 kDa)をPEG化反応生成物と同じ濃度で加えた。プレートを1.5時間、周囲温度でインキュベートし、次いでTBST/Caを用いて4時間洗浄した。基質、1mg/ml PNPPを含むSEAPバッファーを100μl/ウエルの量だけ加えた(基質は前記通り調製した)。光学密度分析(OD405)をプレートリーダーを用いて実施し、PEG-TNYL-RawがEphB4と結合することを実証した。結果を図2に示す。

#### 【0321】

##### 実施例4 アミノ酸配列改変のEphB4受容体との結合親和性に与える影響

TNYLFSPNGPIARAWペプチド(「TNYL-Raw」;表1の配列番号39)中の特定のアミノ酸の、EphB4結合親和性に対する重要性を評価する実験を実施した。具体的には、TNYL-Rawペプチド(表1の配列番号39)の最初の3つのアミノ酸の、EphB4結合親和性に対する重要性を評価した。以下に詳述した通り実施した実験は、TNYL-Rawペプチドの最初のアミノ酸または最初の2つのアミノ酸を除去してもEphB4結合親和性が有意に変わらないことを実証した。

#### 【0322】

合成ペプチドTNYL-Raw、NYL-Raw、YL-RawおよびL-Raw(それぞれ表1の配列番号39、40、41および42に対応する)をBiopeptide(SanDiego、CA)により合成して、これらがアルカリホスファターゼ-タグ付きエフリン-B2(エフリン-B2-AP)とEphB受容体との結合を阻害する能力について試験した。マウスEphB4外部ドメインによりコートしたウエルを、マウスエフリン-B2 APおよび示した異なる濃度のペプチドと共にインキュベートした。固定したEphB4受容体外部ドメインとのエフリン-B2AP結合を様々な濃度のペプチドの存在のもとで測定して、アルカリホスファターゼ活性を測定することにより検出した。ペプチドの存在のもとでのエフリン-B2 AP結合を、ペプチドの非存在のもとでの結合に対して正規化した。

#### 【0323】

マウスEphB4とのエフリン結合を阻害する能力について試験したペプチドのなかで、TNYL-Raw、NYL-RawおよびYL-Rawがそれぞれ効果的な結合阻害を示す一方、L-Rawペプチドはエフリン-B2 AP結合を効果的に阻害しなかった。二量体エフリン-B2 APの結合を50%( $IC_{50}$ )だけ阻害するのに必要なペプチドの濃度は、TNYL-Raw、NYL-RawおよびYL-Rawについてはほぼ40μMであった。対照的に、L-Rawについては、 $IC_{50}$ が10μMを超えると測定された。

#### 【0324】

##### 実施例5 細胞培地中のTNYL-Rawペプチドの安定性

細胞培地中のTNYL-Rawペプチド(配列番号39)の安全性を評価した。TNYL-RawペプチドをBurnham Institute(La Jolla, CA)によるビオチントラグを用いて合成した。ビオチン化TNYL-Rawペプチドを1μMの濃度で、一晩培養したPC3前立腺癌細胞に加え、そして細胞培地中に残存する官能性(EphB4-およびストレプトアビジンに結合する)ペプチドを様々な時点に、ニュートラアビジンを用いてコートしたELISAプレートに捕獲した(図3A)。

10

20

30

40

50

結合したTNYL-Rawペプチドを、アルカリホスファターゼ(AP)とコンジュゲートしたEphB4を用いて検出した。PC3細胞による細胞培地中のTNYL-Rawペプチドの半減期はほぼ104分である(図3A)。図3Bは、ペプチド添加直前に細胞培地を新鮮な培地で置き換えたことを除くと、本質的に図3Aに記載の通り行った実験から得たデータを示す。ペプチドは数時間にわたって無傷のままであり、ペプチドの添加前に細胞培地を新鮮な培地により置き換えなかった実験のペプチドと比較すると、より安定であった。図3Cは、TNYL-Rawペプチドを、細胞の不在のもとでの細胞順化培地でインキュベートした実験から得たデータを表す。ペプチドはまた、急速に失われた(図3C)。図3Bと3Cの結果は、細胞がペプチドを分解するプロテアーゼを細胞培地中に分泌していることを示唆する。従って、プロテアーゼインヒビターの混合物(アプロチニン、PMSF、ロイペプチド、およびペプスタチンを含む)を細胞順化培地に加え、その培地を用いてペプチドをインキュベートすると、ペプチド不安定性を軽減することができる(図3D)。

10

## 【0325】

実施例6 二官能性PEGとの共有結合カップリングによるTNYL-Rawペプチドの二量体化は、官能性PEG化TNYL-Rawペプチドを生成する

The Burnhan Institute社(La Jolla, CA)が合成してビオチンとコンジュゲートしたTNYL-Rawペプチド(配列番号39)を、前記実施例2に記載した3.4kDaまたは10kDaの単官能性PEG(mPEG)(1:5の比で)または二官能性PEG(bPEG)とカップリングした。PEG化TNYL-Rawペプチドが首尾よく合成されたのを確かめるために、抗PEG抗体によりコートしたELISAウエルに捕獲し、ストレプトアビジン-HRPにより検出した。bPEG(bPEG-TNYL-Raw)と結合したペプチドからのシグナルは、ペプチド単独のバックグラウンドシグナル(破線)およびペプチドがPEGとカップリングしたことを示す単官能性PEGとカップリングしたペプチド(mPEG-TNYL-Raw)からのシグナルより高い(図4)。図4に掲げたデータは2~4件の測定値の平均と標準偏差である。さらに、PEG化TNYL-Rawは高いEphB受容体結合親和性(表3)およびEphB4-エフリン-B2相互作用を阻害する能力を保持した(表4)。

20

## 【0326】

表3の解離定数は下記の結合アッセイで測定した。Reacti-Bindタンパク質Aをコートしたストリッププレートを、洗浄バッファー-TBST/Ca(TBS、0.01%Tween、1mM CaCl<sub>2</sub>)を用いて3回洗浄した。プレートをマウスEphB4-Fc(PBS 200 μg/mlで再構成し、1 μg/mlへTBST/Caで希釈した)100 μl/ウエルを用いて1時間、周囲温度でコートした。プレートを4回、TBST/Caを用いて洗浄した。実施例2(前掲)で記載したPEG化反応から得たPEG-TNYL-Raw-ビオチン(The Burnham Institute, La Jolla, CAで作製)を、TBST/Ca(100 μl/ウエル)中の色々な濃度で、1時間、周囲温度にて加えた。プレートを再びTBST/Caを用いて4回洗浄した。100 μl TBST/Ca中のストレプトアビジン-HRP(1:2000)を、1時間、周囲温度にて加えた。プレートを再びTBST/Caを用いて4回洗浄した。それぞれのウエルに、100 μl ABTS基質(すなわち、2,2-アジン-ビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸、西洋わさびペルオキシダーゼに対する基質)を加えた。(ABTS基質は、100mg ABTSを450mの10.05M(0.22mm濾紙で)濾過したクエン酸溶液(pH=4)に加え、再び濾過し、4で箔に包んで保存し、次いで、使用の日に、18 μlの30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を10.5ml ABTSストック溶液に加えることより調製した)。光学密度分析(OD<sub>405</sub>)をプレートリーダーにより実施し、コンジュゲートしていないTNYL-RawペプチドとPEG(3.4および10kDa)にコンジュゲートしたTNYL-RawペプチドとのマウスEphB4受容体に対する結合親和性を測定した。

30

## 【0327】

表3の解離定数は、3.4kDaPEGまたは10kDaPEGとコンジュゲートしたTNYL-Rawペプチドが、マウスEphB4受容体に対して、PEGとコンジュゲートしていないTNYL-Rawペプチドと比較しうる結合親和性を保持することを示した。

40

## 【0328】

表4のIC<sub>50</sub>値は阻害アッセイから得た。マウスエフリンB2-FcをELISAプレート上に固定し、EphB4-APの結合を、PEG(3.4kDaまたは10kDa)とコンジュゲートした示されたTNYL-Rawペプチドの存在または非存在のもとで下記の通り測定した。Reacti-Bindタンパク質Aで

50

コートしたストリッププレートを洗浄バッファー-TBST/Caを用いて3回洗浄した。プレートをマウスエフリン-B2-Fc (PBS 200 μg/mlで再構成し、TBS/Caを用いて1 μg/mlに希釈した) 100 μl/ウェルを用いて、1時間、周囲温度でコートした。使用した対照はヒト-Fc (1 μg/ml; 100 μl/ウェル) であった；ヒト-Fcはエフリン-B2-Fc (ヒトIgG1のFc部と融合したエフリン-B2の細胞外ドメインを含有する)に対する対照である。プレートをTBS/Caを用いて4回洗浄した。各ウェルに、次を加えた：PEG-TNYL-Raw-ビオチン（前記実施例2のPEG化反応から色々な濃度で）；10 μlマウスEphB4-アルカリホスファターゼ（EphB4-AP）；およびTBS/Caを加えて50 μlにする。プレートを周囲温度で3時間インキュベートし、次いでTBS/Caを用いて4回洗浄した。基質、1mg/ml PNPPを含むSEAPバッファーを100 μl/ウェルの量だけ加えた。（2 × SEAPバッファー（pH=9.8）は、2.1mlジエタノールアミンおよび10 μl 1M MgCl<sub>2</sub>を10ml（合計で）の水に加え；pHを9.8に調節し；箔に包んで周囲温度で保存し；使用の日に水を用いて1×に希釈することにより調製した）。光学密度分析（OD<sub>405</sub>）をプレートリーダーを用いて実施して、PEG-TNYL-Raw-ビオチンがEphB4-エフリン-B2相互作用を阻害する程度を決定した。対照TNYL-Rawペプチドはビオチンとコンジュゲートしていなかった、しかしPEGとコンジュゲートしたTNYL-Rawもビオチンを含有した。二量体は、2つのTNYL-RawペプチドがPEG分子とコンジュゲートしたことを示し、かつモノマーは、1つのTNYL-RawペプチドがPEG分子とコンジュゲートすることを示す。

10

## 【表3】

表3：マウス EphB4に対するTNYL-Raw結合のK<sub>d</sub>値

20

PEG サイズ	K <sub>d</sub> ± SE*	実験番号
PEG 無し	1.3 ± 0.2 nM	2
10 Kd (単量体)	1.4 ± 0.7 nM	2
3.4 Kd (二量体)	0.9 ± 0.3 nM	8
10 Kd (二量体)	0.9 ± 0.2 nM	8

\*ペプチドとカップリングしたPEG分子の見積濃度に基づく

## 【表4】

表4：TNYL-Rawによるマウス EphB4/マウスエフリン-B2結合の阻害に対するIC<sub>50</sub>

30

PEG サイズ	IC <sub>50</sub> ± SE*	実験番号
PEG 無し	16 nM	1
10 Kd (単量体)	21 ± 5 nM	2
3.4 Kd (二量体)	7 ± 4 nM	3
10 Kd (二量体)	9 ± 2 nM	5

\*ペプチドとカップリングしたPEG分子の見積濃度に基づく

40

## 【0329】

## 実施例7 ヒトFcとの融合によるTNYL-Rawペプチドの二量体化

TNYL-RawペプチドをヒトIgG<sub>1</sub>のFc部分と融合することは、TNYL-Rawペプチドを二量体化して安定性を改善するために取る別の手法であった。TNYL-Rawペプチドをコードする合成DNA配列を、発現ベクター中にクローニングした。クローニングしたベクターが产生するペプチドは、培地中へ分泌するためのシグナル配列（このシグナル配列は成熟TNYL-Raw Fcタンパク質で切断される）が先行し、そして介在するGSGSK（配列番号76）リンカーとヒトFcが後続する（図5A）。2つのTNYL-Raw Fc融合タンパク質は、Fcドメイン経由で二量体化して、2つのTNYL-Rawペプチドと2つのFcドメインを含む1つの分子を产生する。

## 【0330】

50

HEK293細胞培養上清から精製した、コードされたTNYL-Raw Fc融合タンパク質をタンパク質A ELISAプレート上に固定し、検出のためAPとコンジュゲートしたマウスEphB4（「EphB4 AP」）と結合する能力についてアッセイした。図5Bに示したように、TNYL-Raw Fc融合タンパク質はEphB4 APと実質的な親和性で結合することができた。TNYL-Raw Fc融合タンパク質のマウスEphB4 APに対する結合親和性およびエフリン-B2FcのマウスEphB4 APに対する親和性をアッセイする1つの結合実験から得た結果を図5Cおよび5Dにそれぞれ示す。

### 【0331】

TNYL-Raw Fc融合タンパク質を産生するHEK293細胞は4日間増殖した培地から精製したので、TNYL-Raw Fcタンパク質の半減期は、Fcなしの合成ペプチドの半減期より長いようである。10

### 【0332】

2 μg/mlでかつ抗Fc抗体によりクラスター化したTNYL-Raw Fcタンパク質は、ポジティブ対照エフリンB2 Fcとは異なり、MDA-MB-231乳癌細胞のEphB4チロシンリン酸化を刺激しなかった（図5E）。EphB4チロシンリン酸化は、抗-ホスホチロシン抗体（PTyr）を用いる免疫プロットによりEphB4免疫沈降で検出した。MDA-MB-231乳癌細胞を2 μg/ml TNYL-Raw Fcタンパク質を用いて20分間刺激した後、細胞を溶解してEphB4免疫沈降物を得た。また細胞を、ポジティブおよびネガティブ対照としてそれぞれ1 μg/mlエフリン-B2FcまたはヒトFcを用いて刺激した。

### 【0333】

#### 実施例8 40kDa PEGと連結したTNYL-Rawペプチド

合成してビオチンとコンジュゲートしたTNYL-Rawペプチド（配列番号39）を分子量40kDa（TNYL-Raw-PEG40）をもつPEGとカップリングする。TNYL-Raw-PEG40を透析した後、結合アッセイに使用する。TNYL-Rawと40kDa PEGとのコンジュゲーションにより形成される化合物のサイズに因って、結合アッセイで通常検出用に使用されるTNYL-Rawとコンジュゲートしたビオチンは曝されないので検出できない。従って、AGP3抗PEG抗体を用いる変更アッセイを設計してTNYL-Raw-PEG40の解離定数（ $K_d$ ）およびIC<sub>50</sub>を測定する。20

### 【0334】

Ni-NTAプレート（Qiagen）を、TBST/Ca（TBS、0.01% Tween、1mM CaCl<sub>2</sub>）で最終濃度1 μg/mlに希釈したマウスEphB4-Fc（R&D Systems、#446-B4-200）の体積100 μl/ウエルを用いてコートする。室温で1時間後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄する。次いで、100 μlのTBST/Ca中のTNYL-Raw-PEG40を異なる濃度で各ウエルに加える。室温で1時間インキュベーションの後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄する。濃度1 μg/ml TBST/Ca中のAGP3マウス抗PEG IgM（Academia Sinica、Taiwanより入手）を50 μl/ウエルの体積だけ加え、さらに室温で1.5時間インキュベートし、続いてTBST/Caによって4回洗浄する。次いで、100 μlの抗-マウスIgM-HRP（Serotec、#STAR86P）（1:1000の希釈）を各ウエルに加える。室温で1時間インキュベーションの後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄し、結合した複合体をABTS基質（Sigma、#1888）によって検出する。OD405をプレートリーダーを用いて測定する。ABTS基質の濾過済みストックを、100mg ABTS（Sigma、#1888）を40mlの0.05Mクエン酸（pH 4、濾過済み）に加えることにより調製する。使用前に、18 μlの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を10.5ml ABTSストック溶液に加える。30

### 【0335】

阻害アッセイのために、プレートを、TBST/Ca（TBS、0.01% Tween、1mM CaCl<sub>2</sub>）で最終濃度1 μg/mlに希釈したマウスEphB4-Fc（R&D Systems、#446-B4-200）の体積100 μl/ウエルを用いてコートする。室温で1時間後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄する。次いで、様々な濃度の100 μlのTBST/Ca中のTNYL-Raw-PEG40の存在または非存在のもとで、マウスエフリンB2 APリガンドを、固定したEphB4-Fcを含有するウエルに加える。室温で1時間インキュベーションの後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄する。EphB4受容体と結合するエフリンB2 APの濃度をOD405にてプレートリーダーを用いて測定する。類似した阻害アッセイでは、プレートを、TBST/Ca（TBS、0.01% Tween、1mM CaCl<sub>2</sub>）に希釈し40

10

20

30

40

50

たマウスエフリンB2-Fcの体積100 μl/ウエルを用いてコートする。室温で1時間後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄する。次いで、様々な濃度の100 μlのTBST/Ca中のTNYL-R AW-PEG40の存在または非存在のもとで、マウスEphB4 APリガンドを、固定したエフリンB2-Fcを含有するウエルに加える。室温で1時間インキュベーションの後、プレートをTBST/Caによって4回洗浄する。EphB4受容体と結合するEphB4 APの濃度をOD405にてプレートリーダーを用いて測定する。

### 【0336】

#### 実施例9 標的化薬としてのEphB受容体結合多量体ペプチド

EphB受容体結合多量体ペプチドは、エフリンと結合して生物学的応答を誘発するEph受容体の能力を阻害するだけでなく、薬物またはイメージングプローブなどの他分子を、EphB受容体発現細胞に向けて選択的に標的化することができる。ペプチドの受容体結合特異性を確認するストリンジエントなアッセイは、高い結合活性で二量体EphB Fcを捕獲する特徴をもつ、ストレプトアビジンプレート上に固定したビオチン化ペプチド（見かけの解離定数は低nM領域にある）を使用する。ビオチン化多量体ペプチドをストレプトアビジンでコートしたプレート上に固定し、EphB受容体Fcタンパク質を捕獲するために用いる。ペプチドの結合親和性は、EphB4 Fcをタンパク質Aプレートに固定し、ストレプトアビジン-HRPを用いてビオチン化ペプチドの結合を測定して結合したビオチン化ペプチドを検出することにより測定する。結合した受容体を、アルカリホスファターゼとカップリングした抗Fc抗体を用いて検出し、最高の受容体結合をもつウエルの値に対して規準化する。これらの実験はある特定のペプチドと1以上のEphB結合受容体との結合を示すように設計する。

10

20

30

40

### 【0337】

#### 実施例10 多量体ペプチドの結合安定性

多量体ペプチドの安定して結合する能力は標的化および競合阻害の両方にとって重要であり、この能力はプルダウン実験で試験される。ペプチド・プルダウン実験については、60cmプレート中の70%集密度の細胞または成人マウス脳組織をプルダウンバッファー（50 mM HEPES pH7.5、150mM NaCl、10%グリセロール、1% Triton-X100、5mM KC1および1mM EDTA）に可溶化する。3 μgのビオチン化多量体ペプチドを5 μlストレプトアビジンアガロースビーズ（Sigma）と共に45~90分間インキュベートし、無結合の多量体ペプチドを洗浄除去し、そのビーズを細胞溶菌液と共に45~90分間インキュベートする。ビーズと結合したタンパク質を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、そしてEphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5またはEphB6抗体による免疫プロットによって探索する。EphB1抗体（Santa Cruz）は、二次抗-ヤギIgGペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗体（BioRad Laboratories）を用いて検出する。EphB2およびEphB4抗体は、EphB2またはEphB4受容体由来のカルボキシ-末端からのほぼ100アミノ酸を含有するGST融合タンパク質に対するポリクローナル抗体で親和性精製し（Noren、N.K. ら 2004 PNAS USA 101 : 5583-5588； Holloway、J.A. & Pasquale、E.B. 1995 Devel Biol 172 : 683-693）、そして二次抗ウサギIgGペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗体（Amersham Biosciences）を用いて検出する。内因性EphB受容体は、ストレプトアビジンビーズ状に固定した多量体ペプチドを用いて、マウス脳の溶菌液または培養細胞から単離する。本研究を用いてストレプトアビジンビーズ上に固定した多量体ペプチドの、組織および細胞株由来のEphB受容体と結合する能力を検出する。

30

40

### 【0338】

#### 実施例11 多量体ペプチドの標的化能力

EphB受容体結合多量体ペプチドの標的化能力を実証するために、多量体ペプチドを用いて、蛍光ストレプトアビジン-コートした量子ドットナノ結晶とトランスフェクトされたならびに内因性のEphB受容体を発現する細胞との結合を媒介することができる。トランスフェクトされたEphB受容体を発現する細胞を標識するために、6cmプレート中のCOS細胞を、励起緑色蛍光タンパク質（EGFP）と融合したEphB細胞外および膜貫通のドメインをコードする3 μgのプラスミド（Ogawa、K. et al., 2000 Oncogene 19 : 6043-6052）、または

50

対照としてファルネシル化EGFP ( pEGFP-F ) をコードする3 μgのベクター ( BD Biosciences Clontech ) によって、SuperFectトランスフェクション試薬を用いてトランスフェクトする。トランスフェクションの1日後に細胞をガラスカバースリップ上にプレーティングし、トランスフェクションの2日後に標識する。標識実験については、20nMストレプトアビジン-コンジュゲートQdot 655量子ドット ( Quantum Dot Corp. ) を500nMビオチン化多量体ペプチドと共に量子ドット結合バッファー ( PBS中の、1mM CaCl<sub>2</sub>、2% BSA) 中で、氷上にて20分間プレインキュベートする。細胞を、結合した多量体ペプチドを含有する量子ドットと共に、または対照として多量体無しの量子ドットと共に、20分間4 にてインキュベートし、氷冷したPBS中の1mM CaCl<sub>2</sub>を用いて洗浄する。EphB受容体を内因的に発現する細胞の標識付けについては、フィブロネクチン ( 10 μg/ml ) によりコートしたガラスカバースリップ上にプレーティングしたMCF-7細胞を、量子ドット結合バッファーに希釈した100 μMビオチン化多量体ペプチドと共に20分間4 にてインキュベートする。次いで細胞をPBS中の1mM CaCl<sub>2</sub>を用いて洗浄し、次いで20nMストレプトアビジン量子ドットと共に20分間4 にてインキュベートする。標識付け後、細胞を4%ホルムアルデヒド / 4%スクロースに10分間固定し、PBS中の0.05% Triton-X100を用いて5分間透過化処理をする。核をDAPIを用いてカウンター染色し、カバースリップをProLong Goldマウンティングメディア ( Molecular Probes ) を用いてガラススライド上にマウントし、そしてイメージングおよび写真撮影を蛍光顕微鏡下で行う。緑色蛍光タンパク質がトランスフェクトした細胞のマークとなる。

10

20

30

40

## 【 0 3 3 9 】

EphB4を内因的に発現するMCF7細胞は、多量体ペプチドと結合した量子ドットにより標識付けされるが、多量体ペプチド無しの対照量子ドットによっては標識付けされない。EphB4を内因的に発現するMCF-7ヒト乳癌細胞は、最小必須Eagle培地 ( MEM ) ( ATCC ) で10%ウシ胎児血清、0.01mg/mlウシインスリン、およびPen/Strepを用いて増殖させる。EphB2を内因的に発現するCOS細胞、および293ヒト胎生腎臓 ( HEK ) 細胞は、高グルコースのDulbecco改变Eagles培地 ( DME ) ( Irvine Scientific ) で、10%ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、およびPen/Strepを用いて増殖させる。10cmプレートの293HEK細胞は、pcDNA3中のEphB4cDNAの9 μg、および励起緑色蛍光タンパク質プラスミド ( BD Biosciences Clontech ) の1 μgを用いてトランスフェクトし、SuperFectトランスフェクション試薬 ( Qiagen ) を用いてトランスフェクション効率を実証する。細胞をトランスフェクション1日後に継代させ、そしてトランスフェクション2日後にプルダウン実験に使用する。トランスフェクトしたおよびトランスフェクトしていない両方の細胞の核をDAPIを用いて標識付けする。多量体ペプチドを、4%ホルムアルデヒドによる細胞の固定後にEphB4と結合する能力について試験する。

## 【 0 3 4 0 】

実施例 1 2 癌治療における、EphB受容体-結合多量体ペプチドの投与

患者を、様々な診断方法により、結腸直腸癌の治療を必要とするかを同定する。EphB受容体結合化合物、例えば、多量体であるEphB受容体結合コンジュゲートの治療上有効な量を患者に投与し、その患者を結腸直腸癌の改善についてモニターする。かかる治療後に、患者の結腸直腸癌の軽減が見出される。

## 【 0 3 4 1 】

実施例 1 3 癌治療におけるEphB受容体-結合多量体ペプチドの投与

患者を、様々な診断方法により、異常な血管形成に関連する新生物障害の治療を必要とするかを同定する。EphB受容体結合化合物、例えば、多量体であるEphB受容体結合コンジュゲートの治療上有効な量を患者に投与した後、腫瘍の新血管形成を低下させそれにより腫瘍の縮小を誘導する手術および / または化学治療薬を行う。かかる治療後に、患者を腫瘍のサイズの低下についてモニターする。

## 【 0 3 4 2 】

実施例 1 4 慢性疼痛の治療におけるEphB受容体結合多量体ペプチドの投与

神経障害性疼痛を訴える患者に、EphB受容体結合化合物、例えば、多量体であるEphB受

50

容体結合コンジュゲートの治療上有効な量を投与する。患者について疼痛のレベルの軽減を観察し測定する。

【0343】

実施例15 脊椎損傷の治療におけるEphB受容体結合多量体ペプチドの投与

脊椎損傷をもつ患者に、EphB受容体結合化合物、例えば、多量体であり、EphB受容体の活性を阻害するEphB受容体結合コンジュゲートの治療上有効な量を投与する。損傷部位における神経再生が刺激される。かかる治療の後、刺激部位における神経再生が患者に見られる。

【0344】

7. 同等物

当業者であれば、本明細書に記載の具体的な実施形態に対する多数の同等物を認識しうるかまたはさらに慣用的実験を行うことなく確認できるであろう。かかる同等物は以下の請求項に包含されると考える。

【0345】

本明細書に引用した全ての参考文献は、あたかもそれぞれの個々の公開文献、特許または特許出願が具体的にかつ個々に参照により本明細書に組み入れられると示されたのと同じように、本明細書に参照によりその全文が全ての目的のために組み入れられる。

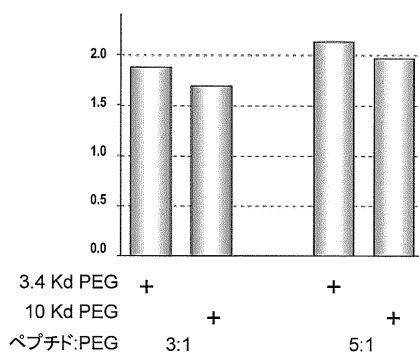
【0346】

本発明の範囲は、本明細書に記載の具体的な実施形態により限定されるものでない。実際、本明細書に記載したものだけでなく、先行する説明および添付の図面から、本発明の様々な改変が当業者には明らかになりうる。かかる改変は添付の請求の範囲内に入るものであると意図する。

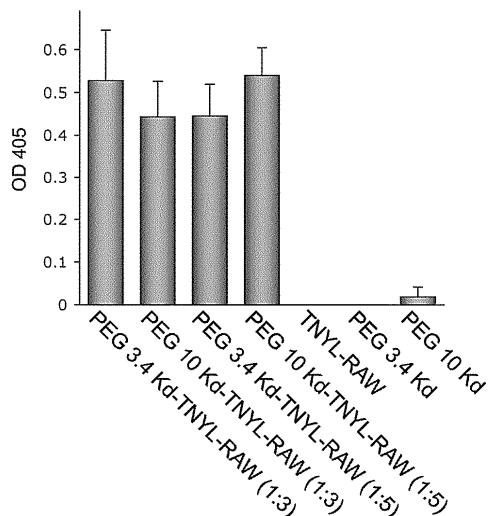
10

20

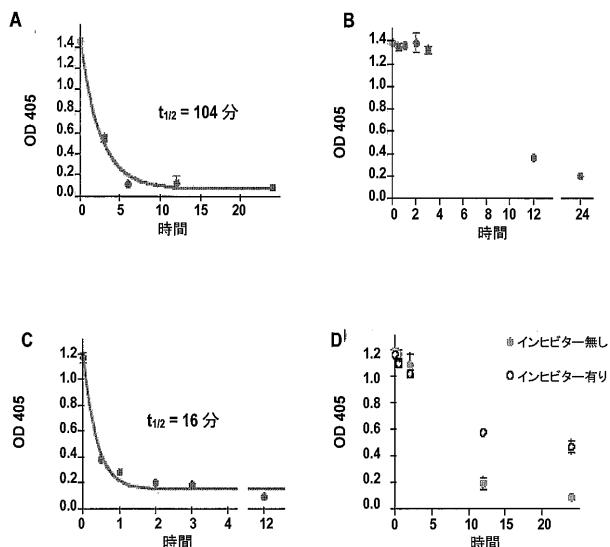
【図1】



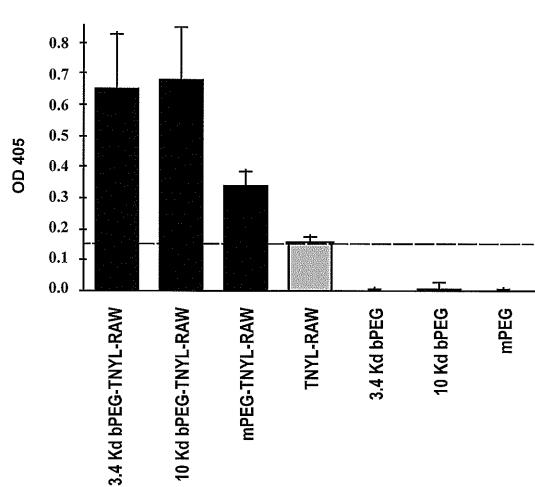
【図2】



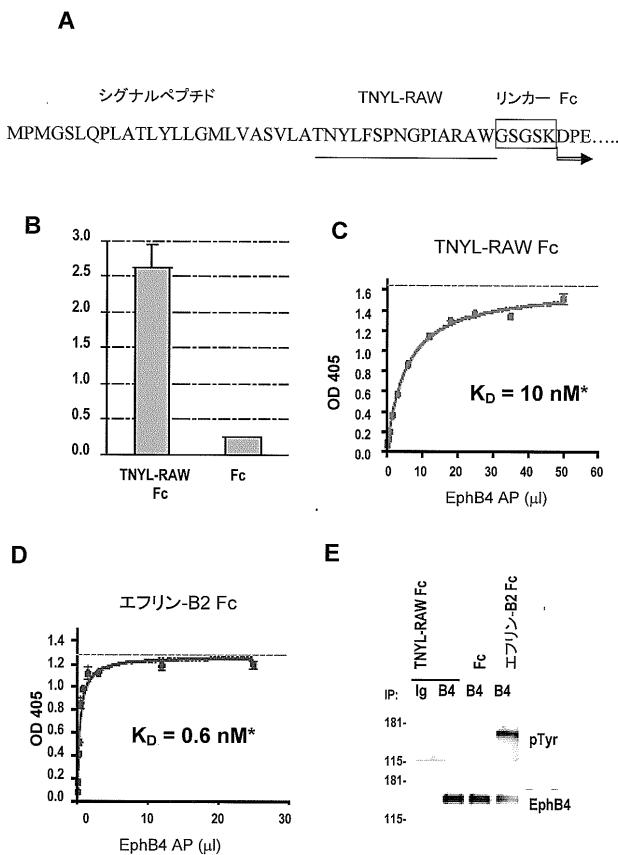
【図3】



【図4】



【図5】



【配列表】

2010503687000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/20200
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/00; G01N 33/53 (2008.04) USPC - 530/300; 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 38/00; G01N 33/53 (2008.04) USPC: 530/300; 435/7.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 530/300, 530/350; 435/7.1; 514/2; 424/184.1, 424/185.1, 424/192.1, 424/194.1		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); DialogPRO-Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts, INSPEC NTIS (National Technical Information Service), PASCAL, Current Contents Search, MEDLINE search terms: EphB1-6, ephrin, ephrin b, peptide, inhibit, binding, cancer, Kd, IC50, SEQ ID NO:1, 2, 41, 21		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOOLPE, et al., EphB Receptor Binding Peptides Identified by Phage Display Enable Design of an Antagonist with Eprin-like Activity, J. Biol. Chem. (2005) vol 280, no. 17, pg 17301-17311, table I, page 17302, para 3-4, pg 17310, col 2, para 1, pg 17305, col 2, para 2, pg 17307, col 2, para 2, pg 17308, Fig 5B.	1-23, 26-29, 32-33, 38-50, 53-65
Y	US 7,101,976 B1 (Kilpatrick, et al.) 05 September 2006 (05.09.2006), col 4, ln 35, col 10, ln 45-46, col 15, ln 49-62, col 16, ln 59-61, col 26 ln 18-20.	1-23, 26-29, 32-33, 38-50, 53-65
Y	US 2006/0177452 A1 (Pasquale, et al.) 10 August 2006 (10.08.2006), para [0009], [0010], [0015] [0030], [0036], [0085], [0087], [0102], [0104], [0105], [0106], [0109], [0121], [0157], [0199].	39-42, 44-50, 53-65
Y	US 2005/0147593 A1 (Kinch) 07 July 2005 (07.07.2005), para [0268].	20
Y	KOOLPE, et al., An Eprin Mimetic Peptide That Selectively Targets the EphA2 Receptor, J. Biol. Chem. (2002) Vol. 277, No. 49, pg 46974-46979, pg 46975, col 1, para 6.	43
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2008 (27.10.2008)	Date of mailing of the international search report 04 DEC 2008	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer  Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		<b>International application No.</b> PCT/US 07/20200
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p>   <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p>   <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 24, 25, 30, 31, 34-37, 51, 52, 66, 67 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
See extra sheet.		
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: Group I: 1-6, 15-23, 26-29, 32-33, 38-50, 53-65, limited to SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 Group II: 1-23, 26-29, 32, 33, 38-50, 53-65, limited to SEQ ID NO:41 and SEQ ID NO:21</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>		
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/20200

Continuation of Box III - Observations where unity is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-6, 15-23, 26-29, 32, 33, 38-50, 53-65, drawn to an isolated EphB receptor binding compound which selectively binds to an EphB receptor of the EphB receptor family, wherein claims 7, 8 are limited to SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2

Group II+, claims 1-23, 26-29, 32, 33, 38-50, 53-65 drawn to an isolated EphB receptor binding compound which selectively binds to an EphB receptor of the EphB receptor family. Should additional fees to be paid, Applicant is invited to elect SEQ IDs to be searched.

The inventions listed as Groups I-II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Although peptides of SEQ ID NO: 1-75 do share a common property of binding an EphB receptor, said peptides do not share a significant structural element that is essential to the common property or activity and is an improvement over the prior art. In addition, the article entitled "EphB Receptor-binding Peptides Identified by Phage Display Enable Design of an Antagonist with Ephrin-like Affinity" by Kooppe et al. (*The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280(7):17301-17311) teaches the claimed SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2 (pg 17304, Table 1, first and second entry, respectively).

Although Groups I and II+ do share the technical feature of an isolated EphB receptor binding conjugate comprising an EphB receptor binding peptide and a heterologous compound, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, the article entitled "Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses" by Stein et al. (*Genes & development* 1998, 12:667-678) discloses Ephrin-B1/Fc conjugate (Ephrin-B1/Fc ligand, pg 673, Fig 4; pg 676, col 2, 4th para). As the above conjugate was known at the time, as evidenced by the teaching of Stein et al., this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 17/12	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/12
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
		A 6 1 P 17/06

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 パスクアーレ , エレナ , ビー .

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 , サンディエゴ , ディラック ストリート 6 1  
0 5

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR55 QS31 QS39 QX01  
QX02  
4C084 AA02 AA06 BA01 BA08 BA18 CA17 DC22 NA14 ZA012 ZA062  
ZA332 ZA362 ZA452 ZA592 ZA752 ZA812 ZA892 ZA912 ZA962 ZB052  
ZB072 ZB152 ZB262 ZB272 ZC192  
4H045 AA10 AA30 BA10 BA16 CA40 DA50 EA20 EA50 FA33