

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-76294

(P2018-76294A)

(43) 公開日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 51/08 (2006.01)	A 6 1 K 51/08 2 0 0	2 G 0 4 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 5 4
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435	4 B 0 6 3
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B 5/05 3 8 3	4 C 0 7 6
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64 E	4 C 0 8 4
審査請求 有 請求項の数 31 O L (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-203922 (P2017-203922)	(71) 出願人	509029645
(22) 出願日	平成29年10月20日 (2017.10.20)		ビエリス ファーマシューティカルズ ゲ
(62) 分割の表示	特願2014-550714 (P2014-550714)		ーエムペーハー
原出願日	平成25年1月7日 (2013.1.7)		ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジ
(31) 優先権主張番号	61/584, 355		ンダーヴァイエンステファン リゼーマイ
(32) 優先日	平成24年1月9日 (2012.1.9)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/618, 050	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成24年3月30日 (2012.3.30)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 障害を予防、処置、または診断するための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 c-Metのシグナル伝達経路を遮断することにより障害を処置、改善、予防、または診断する方法を提供する。

【解決手段】 (i) c-Metに特異的なリポカリンムテインと、(ii) 検出可能なシグナル伝達標識と、(iii) 半減期延長部分とを含む、c-Metの存在を検出するための免疫画像化技術における使用に適した診断用組成物であって、対象において、検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる半減期を有する診断用組成物。リポカリンムテインの治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含む、c-Metの活性化に関連する障害を処置、改善、または予防する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(i) c-Met に特異的なリポカリウムテインと、(ii) 検出可能なシグナル伝達標識と、(iii) 半減期延長部分とを含む、c-Met の存在を検出するための免疫画像化技術における使用に適した診断用組成物であって、

対象において、検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる半減期を有する、診断用組成物。

【請求項 2】

対象において数時間から6日の範囲内の半減期を有する、請求項1に記載の診断用組成物。

10

【請求項 3】

対象において少なくとも約1、2、4、6、7、14、または21日の半減期を有する、請求項2に記載の診断用組成物。

【請求項 4】

検出可能なシグナル伝達標識が、活性を有するかまたは活性化可能である、請求項1～3のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項 5】

診断上許容される担体および/または賦形剤をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項 6】

c-Met を発現する細胞の表面から内部移行され得る、請求項1～5のいずれか一項に記載の診断用組成物。

20

【請求項 7】

血清半減期延長部分が、対象において組成物に、画像化結果を得るために必要とされる時間に適合した半減期を与えることができる、請求項6に記載の診断用組成物。

【請求項 8】

画像化結果が腫瘍対非腫瘍の比である、請求項7に記載の診断用組成物。

【請求項 9】

血清半減期延長部分が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルスターチ、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、請求項7または8に記載の診断用組成物。

30

【請求項 10】

血清半減期延長部分が、5キロダルトンから60キロダルトンまでの範囲のPEG化部分である、請求項9に記載の診断用組成物。

【請求項 11】

血清半減期延長部分が、30キロダルトンの重量を有するPEG化部分である、請求項10に記載の診断用組成物。

【請求項 12】

血清半減期延長部分が、40キロダルトンの重量を有するPEG化部分である、請求項10に記載の診断用組成物。

40

【請求項 13】

免疫画像化技術が、ガンマカメラ画像化技術、PET技術、およびMRI技術からなる群より選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項 14】

検出可能なシグナル伝達剤が、ガンマカメラ画像形成剤 (imageable agent)、PET画像形成剤、およびMRI画像形成剤からなる群より選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項 15】

検出可能なシグナル伝達剤が、放射性核種、蛍光剤、発蛍光団、発色団、色原体、リン

50

光剤、化学発光剤、および生物発光剤からなる群より選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項16】

リポカリンムテインが、成熟ヒト涙液リポカリン (SEQ ID NO: 3) の直鎖ポリペプチド配列の26～34位、56～58位、80位、83位、104～106位、および108位に対応する位置の任意の1つのアミノ酸に変異アミノ酸を有する、請求項1～15のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項17】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2またはその断片もしくは変異体に対して少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載の診断用組成物。

10

【請求項18】

(a) 対象の第1のコホートに、特定の半減期延長部分を含有する診断用組成物を投与する段階；

(b) 対象の第2のコホートに、第1のコホートに関連する半減期延長部分とは異なる特定の半減期延長部分を含有する診断用組成物を投与する段階；

(c) それぞれの診断用組成物の半減期を測定する段階；および

(d) コホート中の対象と同じ種または異なる種由来の対象において画像化結果を得るために必要とされる時間に最も適した半減期延長部分を選択する段階

を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の診断用組成物を選択するための方法。

20

【請求項19】

(a) 細胞、組織、器官、または試料を、請求項1～17のいずれか一項に記載の診断用組成物と接触させる段階；および

(b) 器官または生物学的試料がc-Metを過剰発現しているか否かを判定する段階を含む、細胞の表面上、細胞中、組織中、器官中、または生物学的試料中のc-Metの過剰発現の存在を検出するための方法。

【請求項20】

(a) 対象から採取した生物学的試料を請求項1～17のいずれか一項に記載の1つまたは複数の診断用組成物と接触させる段階；

(b) 本開示の免疫画像化技術により、試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を測定する段階；および

(c) 試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を対象におけるc-Metの量と関連させる段階

を含む、癌または腫瘍を有する対象においてc-Metを発現する癌または腫瘍の進行または退縮を判定する方法であって、

対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の増大が、対象におけるc-Met発現の量の増大を示し、かつ対象におけるMetの量の増大が、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の進行を示唆し；かつ

30

対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の減少が、対象におけるc-Metの量の減少を示し、かつ対象におけるMetの量の減少が次に、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の退縮を示唆する、方法。

40

【請求項21】

c-Metの過剰発現に関連する対象において疾患または状態を診断、予後判定、モニタリングするための、請求項1～17のいずれか一項に記載の少なくとも1つの診断用組成物と、診断用組成物を使用するための1つまたは複数の指示書とを含む、診断用キット。

【請求項22】

リポカリンムテインの治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含む、c-Metの活性化に関連する障害を処置、改善、または予防する方法における使用のための

50

リポカリンムテインであって、c-Metのシグナル伝達経路を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、リポカリンムテイン。

【請求項 2 3】

対象においてHGFのc-Metへの結合に依存しないc-Metシグナル伝達を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、請求項22に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 2 4】

HGFのc-Metへの結合を含むc-Metシグナル伝達を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、請求項22に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 2 5】

HGFのアンタゴニストの治療的有効量を対象に投与する段階をさらに含む、請求項22に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

10

【請求項 2 6】

c-Met分子への結合時にc-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 2 7】

前記組成物が、1日に2回まで、1日に1回まで、1日おきに1回まで、2日おきに1回まで、毎週2回まで、毎週1回まで、1週おきに1回まで、および毎月1回まで投与される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 2 8】

前記組成物が、少なくとも0.1 mg/kg、少なくとも1 mg/kg、少なくとも5 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも20 mg/kg、少なくとも50 mg/kgからなる群より選択される投薬量レベルで、それを必要とする対象に毎回投与される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

20

【請求項 2 9】

ムテインの血清半減期を延長する化合物にコンジュゲートされている、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 3 0】

血清半減期を延長する化合物が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルスターチ、タンパク質ドメイン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、請求項29に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

30

【請求項 3 1】

前記障害が細胞増殖性障害である、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 3 2】

前記障害が癌または転移である、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 3 3】

前記障害が、c-Met依存性癌またはc-Met依存性転移である、請求項32に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

40

【請求項 3 4】

前記障害が、肝臓癌、大腸癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、乳頭状腎癌、頭頸部扁平上皮癌(HNSC)、または頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移である、請求項33に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 3 5】

薬学的組成物が、腸管外経路または非腸管外経路を介して投与される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 3 6】

薬学的組成物が経腸経路を介して投与される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

50

【請求項 37】

前記組成物が、1日に2回まで、1日に1回まで、1日おきに1回まで、2日おきに1回まで、毎週2回まで、毎週1回まで、1週おきに1回まで、および毎月1回まで投与される、請求項35または36に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 38】

前記組成物が、少なくとも0.1 mg/kg、少なくとも1 mg/kg、少なくとも5 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも20 mg/kg、少なくとも50 mg/kgからなる群より選択される投薬量レベルで、それを必要とする対象に毎回投与される、請求項33～37のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 39】

成熟ヒト涙液リポカリン (SEQ ID NO: 3) の直鎖ポリペプチド配列の26～34位、56～58位、80位、83位、104～106位、および108位に対応する位置の任意の1つのアミノ酸に変異アミノ酸を有する、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【請求項 40】

SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、またはその断片もしくは変異体に対して少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する、前記請求項のいずれか一項に記載の使用に従うリポカリンムテイン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本開示は、c-Metのシグナル伝達経路を遮断することにより障害を処置、改善、または予防する方法であって、リポカリンムテインまたはその断片もしくは変異体を含む組成物の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含む方法に関する。1つの局面において、リポカリンムテインは、c-MetのリガンドであるHGFのc-Metへの結合を含むc-Metシグナル伝達を遮断することができるか、または遮断に寄与する。しかしながら、さらに別の局面において、リポカリンムテインはまた、HGFのc-Metへの結合には依存しないc-Metシグナル伝達も遮断することができるか、または遮断に寄与する。従って、リガンドに依存した腫瘍を標的とすることに加えて、本アプローチはまた、例えば、c-Metの過剰発現または細胞内ドメインの変異による、c-Metのリガンドに依存しない活性化も低下させることができる。さらに、本アプローチは、HGFが関与するc-Metシグナル伝達およびHGFのc-Metへの結合には依存しないc-Metシグナル伝達の両方の結果としての障害を処置するために、使用することができる。加えて、本開示は、例えば、c-Metの存在を検出するための免疫画像化技術における使用に適した診断用組成物、およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

非共有相互作用により選択された標的に選択的に結合するタンパク質は、概して、生物学、医学、生物分析学における、ならびに生物科学および生命科学における試薬として重大な役割を果たす。抗体、すなわち免疫グロブリンは、この種のタンパク質の顕著な例である。リガンド/標的の認識、結合、および/または分離に関連したそのようなタンパク質の多岐にわたる必要性にもかかわらず、現在使用されているものは、ほぼ独占的に免疫グロブリンである。

【0003】

抗体様の機能を有する追加的なタンパク質性結合分子は、リガンドに結合するように自然に進化してきたリポカリンファミリーのメンバーである。リポカリンは、脊椎動物、昆虫、植物、および細菌を含む多くの生物中に存在する。リポカリンタンパク質ファミリーのメンバー (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) FASEB J. 1, 209-214) は、典型的に小さな分泌タンパク質であり、単一のポリペプチド鎖を有する。それらは、以下の様々な分子

認識特性の範囲を特徴とする：種々の主に疎水性の分子（レチノイド、脂肪酸、コレステロール、プロスタグランジン、ビリベルジン、フェロモン、味物質、および臭気物質など）に結合する能力、特異的な細胞表面受容体への結合、および巨大分子複合体の形成。それらは過去に、主として輸送タンパク質と分類されていたが、リポカリンが様々な生理学的機能を果たすことが、現在明らかである。これらは、レチノール輸送、嗅覚、フェロモンシグナル伝達、およびプロスタグランジンの合成における役割を含む。リポカリンはまた、免疫応答の調節および細胞恒常性の媒介にも関与している（例えば、Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* 318, 1-14およびFlower, D.R. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24において概説されている）。

【 0 0 0 4 】

リポカリンは、異常に低いレベルの全体的な配列保存を共有し、しばしば20%より低い配列同一性を有する。非常に対照的に、それらの全体的な折り畳みパターンは、高度に保存されている。リポカリン構造の中心部分は、その上の背後で閉じた単一の8鎖の逆平行シートからなり、連続的に水素結合したバレルを形成する。このバレルが、中心腔を形成する。バレルの1つの末端は、その底部を横切って走るN末端ペプチドセグメントおよび鎖を連結する3つのペプチドループにより立体的に遮断される。バレルのもう1つの末端は、溶媒に対して開放性であり、4つの柔軟なペプチドループにより形成される標的結合部位を包含する。各々が異なるサイズ、形状、および化学的性質の標的に適応することができる、様々な異なる結合モードを生じさせるのは、そうでない場合は剛性のリポカリン骨格におけるこのループの多様性である（例えば、Flower, D.R. (1996)、上記；Flower, D.R. et al. (2000)、上記、またはSkerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350において概説されている）。

【 0 0 0 5 】

種々のPCT公報（例えば、国際公開公報第99/16873号、国際公開公報第00/75308号、国際公開公報第03/029463号、国際公開公報第03/029471号、および国際公開公報第2005/19256号）は、種々のリポカリン（例えば、ヒト涙液リポカリン）のムテインを、野生型リポカリンの天然のリガンドとは異なる標的に対して高い親和性および特異性を呈するように構築できる方法を開示している。これは、例えば、4つのペプチドループの少なくとも1つの、1つまたは複数のアミノ酸の位置を変異させることにより、行うことができる。加えて、PCT公報である国際公開公報第2009/095447号は、c-Metに対するリポカリンムテインの生成のための方法を教示している。

【 0 0 0 6 】

一般に、キナーゼは、細胞経路の大部分、特に細胞内のシグナル変換またはシグナルの伝播に関与する経路を調節することが公知の酵素である。タンパク質キナーゼは細胞に対して甚大な効果を有するため、キナーゼ活性は高度に調節されている。キナーゼは、リン酸化により、および活性化タンパク質または阻害タンパク質への結合により、オンまたはオフにすることができる。調節されていないキナーゼ活性は、疾患、特に細胞の成長、移動、および死を制御する多くの局面をキナーゼが調節する癌の、よくある原因である。これらの遺伝的欠陥の多くは、癌の増殖および分化を担うシグナル伝達経路の鍵となる成分として同定されている。トラスツズマブ、セツキシマブ、ペバシズマブ、イマチニブ、およびゲフィチニブ阻害剤などの受容体チロシンキナーゼ（RTK）標的剤は、選択された癌の処置のためにこのタンパク質の種を標的とする利益を例証している。

【 0 0 0 7 】

c-Metは、RTKのサブファミリーの原型メンバーである。c-Metファミリーは、他のRTKファミリーとは構造的に異なり、分散因子（SF）とも呼ばれる肝細胞増殖因子（HGF）に対する唯一の公知の高親和性受容体である（D. P. Bottaro et al., *Science* 1991, 251: 802-804；L. Naldini et al., *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 1991, 10:2867-2878）。この点で、HGF/SFは、c-Met受容体に対するリガンドであり、他方、c-Metは、HGF/SFにより活性化される受容体チロシンキナーゼである（Seidel, C., Borset, M., Hjorth-Hansen, H., Sundan, A.I., Waage, A., (1998) *Role of Hepatocyte Growth Factor and Its Recepto*

10

20

30

40

50

r c-Met in Multiple Myeloma *Med Oncol* 15, 145-53 ; Brset, M., Seidel, C., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Sundan, A. (1999) The Role of Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor c-Met in Multiple Myeloma and Other Blood Malignancies *Leukemia & Lymphoma* 32, 249-256)。

【 0 0 0 8 】

複数のシグナル伝達経路が、c-Metの活性化により媒介される生物学的応答に関連している (Abounader, R., et al. (2001) Signaling Pathways in the Induction of c-Met Receptor Expression by its Ligand Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor in Human Glioblastoma, *J. Neurochem*, 75, 1497-1508)。HGF/SFがc-Metを活性化する際、c-Metは次に、RasからRafへ、Mekへ、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼERK1へ、転写因子ETS1への経路を含むがこれに限定されない多数のキナーゼ経路を活性化し得る。変更されていないc-MetとHGF/SFとの共発現、および活性化変異は、発癌性である (Abounader, R., et al. (2001) Signaling Pathways in the Induction of c-Met Receptor Expression by its Ligand Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor in Human Glioblastoma, *J. Neurochem*, 75, 1497-1508)。

10

【 0 0 0 9 】

c-MetおよびHGFは両方とも、正常な哺乳動物の発生に必要であり、細胞遊走、形態形成分化、および三次元管状構造の組織化、ならびに成長および血管形成において特に重要であることが示されている (F. Baladt et al., *Nature* 1995, 376:768-771 ; C. Schmidt et al., *Nature*. 1995, 373:699-702 ; Tsarfaty et al., *Science* 1994, 263:98-101)。c-MetおよびHGFの制御された調節が、哺乳動物の発生、組織の維持、および修復において重要であることが示されている (Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., *Brain Res.* 2004, 5; 999(2):155-66 ; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307(1):146-51) 一方で、それらの調節不全が、癌の進行に関与している。

20

【 0 0 1 0 】

c-Metが正常な造血において役割を果たし、種々のリンパ系および白血病細胞株中に発現していることもまた、当技術分野において公知である。多種多様なヒト腫瘍がc-MetおよびHGF/SFの両方を発現し、それらの発現は神経膠腫の悪性進行に寄与する。加えて、HGFまたはc-Metのいずれかの過剰発現がいくつかの癌において見出され、疾患の進行および臨床転帰と相互に関連付けられている (Ferracini, R., DiRenzo, M. F., Scotlandi, J., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M., Comoglio, P. M. (1995) The Met/HGF Receptor Is Over-Expressed in Human Osteosarcomas and Is Activated By Either a Paracrine or an Autocrine Circuit *Oncogene* 10, 739-49 ; Rusciano, D., Lorenzoni, P., Burger, M. M. (1995) Expression of Constitutively Activated Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor (c-Met) in B16 Melanoma Cells Selected for Enhanced Liver Colonization *Oncogene* 11, 1979-87)。さらに、c-Metは、大腸癌の発生および進行 (Herynk, M. H., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Parikh, N. U., Abounader, R., Laterra, J., Radinsky, R., Ellis, L. M., Gallick, G. E. (2003) Down-Regulation of c-Met Inhibits Growth in the Liver of Human Colorectal Carcinoma Cells *Cancer Res* 63, 2990-6, prostate cancer, Kim, S. J., Johnson, M., Koterba, K., Herynk, M. H., Uehara, H., Gallick, G. E. (2003) Reduced c-Met Expression By an Adenovirus Expressing a c-Met Ribozyme Inhibits Tumorigenic Growth and Lymph Node Metastases of PC3-LN4 Prostate Tumor Cells in an Orthotopic Nude Mouse Model *Clin Cancer Res* 9, 5161-70)、および他の器官における癌 (Longati, P., Comoglio, P. M., Bardelli, A. (2001) Receptor Tyrosine Kinases as Therapeutic Targets: the Model of the MET Oncogene *Curr Drug Targets* 2, 41-55)、ならびに多発性骨髄腫などの血液悪性腫瘍 (Brset, M., Seidel, C., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Sundan, A. (1999) The Role of Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor c

30

40

50

-Met in Multiple Myeloma and Other Blood Malignancies *Leukemia & Lymphoma* 32, 249-256) において実行されている。c-Metの活性化は、癌患者における侵襲性の細胞表現型および不良な臨床転帰および薬物耐性に関連する特徴である、細胞増殖、遊走、形態形成、生存（アポトーシスからの保護を含む）、およびプロテアーゼ合成を増強する。

【0011】

不適切なc-Metの活性化は、例えば、いわゆるリガンドに依存した機構により生じ得る（J. G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., *Cancer Letters*. 2005, 226:1-26）。この意味において、HGFのc-Metへの結合は、受容体の二量体化または多量体化、細胞内領域中の複数のチロシン残基のリン酸化、触媒の活性化、および下流のシグナル伝達をもたらし得る。他方で、c-Metはまた、いわゆるリガンドに依存しない機構を介して活性化されてもよい。この活性化は、例えば、受容体の過剰発現および/もしくは増幅、または傍分泌もしくは自己分泌の活性化、ならびに/または変異により始められ得る。いずれの場合にも、c-Metの不適切な活性化により駆動される異常なシグナル伝達経路は、ヒト癌において最も頻繁な調節不全の経路の1つであり、固形腫瘍の事実上すべてのタイプに存在し、腫瘍形成および転移において重大な役割を果たす（Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer*. 2002, 2(4):289-300）。

【0012】

種々の治療アプローチが、HGF/c-Met経路に照準を当てている。しかしながら、本開示により提供される治療法に付随する特性を保有する治療法は、以前に記載されていない。

【0013】

さらに、種々の癌におけるc-Metの過剰発現および過剰活性化が、増殖の増大、転移性疾患への進行、および薬物耐性と結び付けられ（Peruzzi B, Bottaro DP: Targeting the c-met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12(15):3657-3660）、インビボでMet発現の変化を評価することに適したりポカリンムテインの開発により、c-Met媒介疾患の診断の精度、およびc-Met標的療法に対する応答のモニタリングが改善されると考えられる。

【0014】

従って、可能な限り好都合かつ経済的である、c-Metを発現する細胞（例えば、腫瘍形成細胞）のより信頼できる検出を可能にする改善された溶液が必要であると考えられ、本開示は、そのような改善された溶液を提供する。

【発明の概要】

【0015】

[本発明1001]

(i) c-Metに特異的なリポカリンムテインと、(ii) 検出可能なシグナル伝達標識と、(iii) 半減期延長部分とを含む、c-Metの存在を検出するための免疫画像化技術における使用に適した診断用組成物であって、

対象において、検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる半減期を有する、診断用組成物。

[本発明1002]

対象において数時間から6日の範囲内の半減期を有する、本発明1001の診断用組成物。

[本発明1003]

対象において少なくとも約1、2、4、6、7、14、または21日の半減期を有する、本発明1002の診断用組成物。

[本発明1004]

検出可能なシグナル伝達標識が、活性を有するかまたは活性化可能である、本発明1001~1003のいずれかの診断用組成物。

[本発明1005]

診断上許容される担体および/または賦形剤をさらに含む、本発明1001~1004のいずれかの診断用組成物。

10

20

30

40

50

[本発明1006]

c-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る、本発明1001～1005のいずれかの診断用組成物。

[本発明1007]

血清半減期延長部分が、対象において組成物に、画像化結果を得るために必要とされる時間に適合した半減期を与えることができる、本発明1006の診断用組成物。

[本発明1008]

画像化結果が腫瘍対非腫瘍の比である、本発明1007の診断用組成物。

[本発明1009]

血清半減期延長部分が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルスターチ、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、本発明1007または1008の診断用組成物。

10

[本発明1010]

血清半減期延長部分が、5キロダルトンから60キロダルトンまでの範囲のPEG化部分である、本発明1009の診断用組成物。

[本発明1011]

血清半減期延長部分が、30キロダルトンの重量を有するPEG化部分である、本発明1010の診断用組成物。

[本発明1012]

血清半減期延長部分が、40キロダルトンの重量を有するPEG化部分である、本発明1010の診断用組成物。

20

[本発明1013]

免疫画像化技術が、ガンマカメラ画像化技術、PET技術、およびMRI技術からなる群より選択される、本発明1001～1012のいずれかの診断用組成物。

[本発明1014]

検出可能なシグナル伝達剤が、ガンマカメラ画像形成剤 (imageable agent)、PET画像形成剤、およびMRI画像形成剤からなる群より選択される、本発明1001～1012のいずれかの診断用組成物。

[本発明1015]

検出可能なシグナル伝達剤が、放射性核種、蛍光剤、発蛍光団、発色団、色原体、リン光剤、化学発光剤、および生物発光剤からなる群より選択される、本発明1001～1012のいずれかの診断用組成物。

30

[本発明1016]

リポカリンムテインが、成熟ヒト涙液リポカリン (SEQ ID NO: 3) の直鎖ポリペプチド配列の26～34位、56～58位、80位、83位、104～106位、および108位に対応する位置の任意の1つのアミノ酸に変異アミノ酸を有する、本発明1001～1015のいずれかの診断用組成物。

[本発明1017]

リポカリンムテインが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2またはその断片もしくは変異体に対して少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する、本発明1001～1016のいずれかの診断用組成物。

40

[本発明1018]

(a) 対象の第1のコホートに、特定の半減期延長部分を含有する診断用組成物を投与する段階；

(b) 対象の第2のコホートに、第1のコホートに関連する半減期延長部分とは異なる特定の半減期延長部分を含有する診断用組成物を投与する段階；

(c) それぞれの診断用組成物の半減期を測定する段階；および

(d) コホート中の対象と同じ種または異なる種由来の対象において画像化結果を得るために必要とされる時間に最も適した半減期延長部分を選択する段階

50

を含む、本発明1001～1017のいずれかの診断用組成物を選択するための方法。

[本発明1019]

(a) 細胞、組織、器官、または試料を、本発明1001～1017のいずれかの診断用組成物と接触させる段階；および

(b) 器官または生物学的試料がc-Metを過剰発現しているか否かを判定する段階を含む、細胞の表面上、細胞中、組織中、器官中、または生物学的試料中のc-Metの過剰発現の存在を検出するための方法。

[本発明1020]

(a) 対象から採取した生物学的試料を本発明1001～1017のいずれかの1つまたは複数の診断用組成物と接触させる段階；

(b) 本開示の免疫画像化技術により、試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を測定する段階；および

(c) 試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を対象におけるc-Metの量と関連させる段階

を含む、癌または腫瘍を有する対象においてc-Metを発現する癌または腫瘍の進行または退縮を判定する方法であって、

対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の増大が、対象におけるc-Met発現の量の増大を示し、かつ対象におけるMetの量の増大が、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の進行を示唆し；かつ

対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の減少が、対象におけるc-Metの量の減少を示し、かつ対象におけるMetの量の減少が次に、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の退縮を示唆する、方法。

[本発明1021]

c-Metの過剰発現に関連する対象において疾患または状態を診断、予後判定、モニタリングするための、本発明1001～1017のいずれかの少なくとも1つの診断用組成物と、診断用組成物を使用するための1つまたは複数の指示書とを含む、診断用キット。

[本発明1022]

リボカリンムテインの治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含む、c-Metの活性化に関連する障害を処置、改善、または予防する方法における使用のためのリボカリンムテインであって、c-Metのシグナル伝達経路を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、リボカリンムテイン。

[本発明1023]

対象においてHGFのc-Metへの結合に依存しないc-Metシグナル伝達を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、本発明1022の使用に従うリボカリンムテイン。

[本発明1024]

HGFのc-Metへの結合を含むc-Metシグナル伝達を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、本発明1022の使用に従うリボカリンムテイン。

[本発明1025]

HGFのアンタゴニストの治療的有効量を対象に投与する段階をさらに含む、本発明1022の使用に従うリボカリンムテイン。

[本発明1026]

c-Met分子への結合時にc-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る、前記本発明のいずれかの使用に従うリボカリンムテイン。

[本発明1027]

前記組成物が、1日に2回まで、1日に1回まで、1日おきに1回まで、2日おきに1回まで、毎週2回まで、毎週1回まで、1週おきに1回まで、および毎月1回まで投与される、前記本発明のいずれかの使用に従うリボカリンムテイン。

[本発明1028]

10

20

30

40

50

前記組成物が、少なくとも0.1 mg/kg、少なくとも1 mg/kg、少なくとも5 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも20 mg/kg、少なくとも50 mg/kgからなる群より選択される投薬量レベルで、それを必要とする対象に毎回投与される、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1029]

ムテインの血清半減期を延長する化合物にコンジュゲートされている、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1030]

血清半減期を延長する化合物が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルスターチ、タンパク質ドメイン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、本発明1029の使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1031]

前記障害が細胞増殖性障害である、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1032]

前記障害が癌または転移である、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1033]

前記障害が、c-Met依存性癌またはc-Met依存性転移である、本発明1032の使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1034]

前記障害が、肝臓癌、大腸癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、乳頭状腎癌、頭頸部扁平上皮癌(HNSC)、または頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移である、本発明1033の使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1035]

薬学的組成物が、腸管外経路または非腸管外経路を介して投与される、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1036]

薬学的組成物が経腸経路を介して投与される、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1037]

前記組成物が、1日に2回まで、1日に1回まで、1日おきに1回まで、2日おきに1回まで、毎週2回まで、毎週1回まで、1週おきに1回まで、および毎月1回まで投与される、本発明1035または1036の使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1038]

前記組成物が、少なくとも0.1 mg/kg、少なくとも1 mg/kg、少なくとも5 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも20 mg/kg、少なくとも50 mg/kgからなる群より選択される投薬量レベルで、それを必要とする対象に毎回投与される、本発明1033~1037のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1039]

成熟ヒト涙液リポカリン(SEQ ID NO: 3)の直鎖ポリペプチド配列の26~34位、56~58位、80位、83位、104~106位、および108位に対応する位置の任意の1つのアミノ酸に変異アミノ酸を有する、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

[本発明1040]

SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、またはその断片もしくは変異体に対して少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する、前記本発明のいずれかの使用に従うリポカリンムテイン。

【図面の簡単な説明】

【0016】

10

20

30

40

50

【図1】Caki-1異種移植腫瘍モデルにおける、PEG40に連結したリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) の用量に依存した抗腫瘍効果を示す。確立された腫瘍 (100 ~ 150 mm³の平均容積) を有するヌードマウスを処置群 (n = 10) に分け、リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) または関連対照の1日腹腔内 (i.p.) 用量を受けさせた。リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) を受けた処置群のすべては、対照と比較して統計学的に有意な腫瘍増殖阻害を示した (P < 0.01)。

【図2】各研究群における重量変化のパーセンテージ (%) を示す。すべての群は、(恐らく適応ストレスにより) 処置の最初の週に類似したレベルの体重減少を経験したが、その後、研究を通して体重が増加した。いかなる毒性の徴候も観察されなかった。媒体対照群とリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) 群との間で体重パターンに差異は無く、化合物が試験されたすべての用量レベルで十分に耐容性を示すことを示唆した。

【図3A】リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) (7.5 mg/kg) または対照での処置の5日後の、Caki-1の異種移植腫瘍生検における全Metの発現の変化を示す。全Metの発現レベルは、リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) での処置後に有意に低減した。

【図3B】リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) (7.5 mg/kg) または対照での処置の5日後の、Caki-1の異種移植腫瘍生検におけるリン酸化Metの発現の変化を示す。リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) での処置はまた、リン酸化Metのレベルの有意な低減ももたらした。

【図3C】リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) (7.5 mg/kg) または対照での処置の5日後の、EBC-1の異種移植腫瘍生検における全Metの発現の変化を示す。全Metの発現レベルは、リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) での処置後に有意に低減した。

【図3D】リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) (7.5 mg/kg) または対照での処置の5日後の、EBC-1の異種移植腫瘍生検におけるリン酸化Metの発現の変化を示す。リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) での処置はまた、リン酸化Metのレベルの有意な低減ももたらした。

【図4】A549細胞におけるc-Met受容体に対するリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) の影響を示す。免疫蛍光染色により、SEQ ID NO: 1での処置は、受容体の分解を示す、LAMP-1陽性小胞中のc-Metの蓄積をもたらし得ることが示される。

【図5】A549およびH441細胞株モデルにおける結合時のSEQ ID NO: 1の内部移行を示す。A549細胞の免疫蛍光顕微鏡検査により、蛍光標識されたSEQ ID NO: 1の細胞内蓄積が示される。放射標識されたリポカリンムテインに曝露されたH441細胞の細胞表面、細胞内、および上清の画分の放射活性測定により、⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1の膜結合および内部移行が実証される。

【図6】H441を有するマウスの⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1 microPET画像化を示す。代表的な横断および冠状のmicroPET画像を、トレーサー注射の6、24、48、および96時間後に示す (a)。microPETデータの定量化を、すべてのマウスにおいて血液プール、肝臓、脾臓、腎臓、および腫瘍取り込みについて行った (b)。データを、平均標準取り込み値 (SUV平均) として表す。

【図7】H441、U87-MG、およびA2780を有するマウスの⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1 microPET画像化を示す。代表的な横断および冠状のmicroPET画像を、c-Metで駆動される腫瘍取り込みについては⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1の、および非特異的な腫瘍取り込みについては⁸⁹Zr-Tl₂c対照のトレーサー注射の96時間後に示す。⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1および⁸⁹Zr-Tl₂c対照のエキスビオ腫瘍取り込み。腫瘍モデル間で特異的な腫瘍取り込みを比較するために、腫瘍：血液の比を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

詳細な説明

A. 本開示の1つまたは複数のリポカリンムテイン

いくつかの態様において、本明細書において開示される薬学的組成物または診断用組成物中に含まれるような、本明細書において記載されるリポカリンムテインは、c-Metまた

10

20

30

40

50

はそのドメインもしくは断片に対して検出可能な結合親和性を有する。「検出可能な結合親和性」という表現は、本開示のリポカリンムテインが少なくとも200 nMまたはそれより小さい解離定数でc-Metに結合することを意味する。いくつかの態様において、本開示のリポカリンムテインは、c-Metまたはそのドメインもしくは断片に対して高い親和性を有し、例えば、リポカリンムテインは、細胞表面上のMetの発現レベルが非常に低い場合でさえも、c-Metに結合することができる。いくつかのさらなる態様において、本開示のリポカリンムテインは、少なくとも100、20、1 nM、またはそれよりさらに小さいc-Metに対する解離定数でc-Metに結合する。リポカリンムテインのc-Metに対する結合親和性は、蛍光滴定、競合ELISA、または表面プラズモン共鳴 (BIAcore) などの多数の方法により測定することができる。

10

【0018】

いくつかのさらなる態様において、本開示のリポカリンムテインは、それ自体でおよび/または1つもしくは複数の半減期延長部分に融合された際に、c-Metを発現する細胞の表面から、内部移行され得る。

【0019】

1つの態様において、本開示のリポカリンムテインは、本開示の種々の半減期延長部分に融合された際に、調整可能な半減期を有する。いくつかのさらなる態様において、リポカリンムテインは、本開示の薬学的組成物または診断用組成物のために関心対象の半減期を生じるように、本開示の半減期延長部分にコンジュゲートされる。1つのさらなる態様において、関心対象の半減期は、関心対象の特定の検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる時間に適合している。1つのさらなる態様において、関心対象の半減期は、それを必要とする患者にとって実用的かつ好都合である。結合は、当技術分野において公知である任意の従来のカップリング法を用いて行うことができる。

20

【0020】

本開示の1つまたは複数の診断用組成物は、特に、良好な腫瘍対非腫瘍の比を可能にし、その結果として腫瘍形成細胞の検出のための驚くべき感度および特異性を可能にする、細胞表面上のc-Met分子への結合時に内部移行する能力のために、この目的で特に魅力的である。本開示の診断用組成物はまた、様々な半減期延長部分 (PEGなど) のいずれかをリポカリンムテインに容易に融合、コンジュゲート、または他の方法で付着させ、それによって任意の半減期延長部分の使用を可能にする能力により駆動される調整可能な半減期のために、画像化剤としての使用に特に魅力的である。柔軟な滞留期間を有することにより、c-Metの結合、従ってc-Metレベルの検出に十分であるだけでなく、患者にとって好都合かつ経済的でもある期間、本開示の診断用組成物とc-Metとの間を接触させることが可能になり、本開示の1つまたは複数の診断用組成物は、種々の検出可能なシグナル伝達標識により視覚化できるような画像化結果 (例えば、腫瘍対非腫瘍の比) を得るために必要とされる時間に適合した半減期を有することができる。さらに、本開示の1つまたは複数の診断用組成物が腫瘍形成細胞内に内部移行され得ることは事実である。

30

【0021】

本明細書において記載されるリポカリンムテインは、成熟ヒト涙液リポカリン (SEQ ID NO: 3) の直鎖ポリペプチド配列の26~34位、56~58位、80位、83位、104~106位、および108位に対応する位置の任意の1つのアミノ酸に変異アミノ酸を有する、ヒト涙液リポカリン (hTLc; SEQ ID NO: 3) であってもよい。リポカリンムテインは、(i) Cys 61 Ser、Cys 101 Ser、およびCys 153 Serから選択される、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の少なくとも1つのアミノ酸置換、ならびに/または(ii) Arg 111 Pro およびLys 114 Trpから選択される、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の少なくとも1つの追加的なアミノ酸置換をさらに含んでもよい。特に好ましい態様において、本明細書中に記載されるリポカリンムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの配列に対して少なくとも75%の同一性を有してもよい。複数回の無作為化変異により、または構造と機能との関係のために、野生型涙液リポカリン配列のアミノ酸残基はまた、本開示のリ

40

50

ポカリンムテインにおいて保持されていてもよい。

【0022】

特定の態様において、本開示のリポカリンムテインは、SEQ ID NO: 1またはその変異体により表される。好ましくは、変異体は、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2により表されるアミノ酸に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の配列同一性または相同性を有する。

【0023】

本開示に従って使用される際の「位置」という用語は、本明細書において示されるアミノ酸配列内のアミノ酸の位置、または本明細書において示される核酸配列内のヌクレオチドの位置のいずれかを意味する。本明細書において使用される「対応する」という用語はまた、位置が前記のヌクレオチド/アミノ酸の数により決定されるだけではないことを含む。従って、置換され得る本開示に従う所定のアミノ酸の位置は、(変種または野生型の)リポカリンにおける他の場所のアミノ酸の欠失または付加により変動してもよい。同様に、置換され得る本開示に従う所定のヌクレオチドの位置は、ムテインまたは野生型のリポカリンのプロモーターを含む5'-非翻訳領域(UTR)および/または遺伝子の任意の他の調節配列(エキソンおよびイントロンを含む)における他の場所の欠失または追加的なヌクレオチドにより変動してもよい。

【0024】

従って、本開示に従う「対応する位置」の下で、ヌクレオチド/アミノ酸は示される数が異なってもよいが、依然として類似した隣接ヌクレオチド/アミノ酸を有してもよいことが、好ましくは理解されるべきである。交換、欠失、または付加され得る該ヌクレオチド/アミノ酸はまた、「対応する位置」という用語により含まれる。本明細書において「位置に対応する位置で」使用される際、「クエリー」アミノ酸(またはヌクレオチド)配列中の位置は、「対象」アミノ酸(またはヌクレオチド)配列中の位置に対応することが意味される。

【0025】

本開示の1つまたは複数のムテインに関連して本開示において使用される「断片」という用語は、N末端および/またはC末端が短くなっている、すなわちN末端および/またはC末端のアミノ酸の少なくとも1個が欠如している、完全長成熟ヒト涙液リポカリンに由来するタンパク質またはペプチドに関する。そのような断片は、好ましくは、成熟ヒト涙液リポカリンの一次配列の、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは20個、最も好ましくは30個、またはより連続したアミノ酸を含み、成熟ヒト涙液リポカリンの免疫アッセイにおいて通常検出可能である。

【0026】

本開示において使用される「変異体」という用語は、例えば、置換、欠失、挿入、または化学修飾によるアミノ酸配列の修飾を含むタンパク質またはペプチドの誘導体に関する。好ましくは、そのような修飾は、タンパク質またはペプチドの機能性を低減させない。例証となる例として、最初の4個のN末端アミノ酸残基(HHLA)および2個の最後のC末端アミノ酸残基(SD)を、タンパク質(例えば、SEQ ID NO: 1)の生物学的機能に影響を与えずに、本開示の涙液リポカリンムテインにおいて欠失させることができる。そのような変異体は、1個または複数のアミノ酸が、そのそれぞれのD-立体異性体により、または、例えば、オルニチン、ヒドロキシプロリン、シトルリン、ホモセリン、ヒドロキシリジン、ノルバリンなどの天然に存在する20アミノ酸以外のアミノ酸により置き換えられているタンパク質を含む。しかしながら、そのような置換はまた、保存的であってもよく、すなわち、アミノ酸残基が、化学的に類似したアミノ酸残基で置き換えられている。保存的置換の例は、以下の群のメンバー間での置き換えである: 1) アラニン、セリン、およびスレオニン; 2) アスパラギン酸およびグルタミン酸; 3) アスパラギンおよびグルタミン; 4) アルギニンおよびリジン; 5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン; ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。

【0027】

50

本開示において使用される「同一性」または「配列同一性」により、その類似性または関係性を測る配列の特性が意味される。本開示において使用される「配列同一性」または「同一性」という用語は、本開示のポリペプチド（例えば、本開示の任意のリポカリンムテインまたは成熟ヒト涙液リポカリン（SEQ ID NO: 3））の配列の問題になっている配列との（相同）アラインメント後の、これらの2つの配列のより長い方における残基の数に対するペアをなす同一残基のパーセンテージを意味する。同一性パーセントは、同一残基の数を残基の総数で割り、結果に100をかけることにより決定される。「相同性」という用語は、本明細書においてその通常の意味で使用され、本開示のポリペプチド（例えば、本開示の任意のリポカリンムテインまたは野生型ヒト涙液リポカリン）の直鎖アミノ酸配列における同等の位置での同一アミノ酸および保存的置換（例えば、グルタミン酸残基のアスパラギン酸残基による交換）に関するアミノ酸を含む。

10

【0028】

SEQ ID NO: 1もしくは2に示されるリポカリンムテインに対して、または本明細書において開示される成熟ヒト涙液リポカリンムテイン、その断片もしくは変異体に対して相同であるリポカリンムテインは、c-Metのシグナル伝達経路を遮断するかまたは遮断に寄与する能力を依然として有する。好ましくは、これは、前記対象におけるHGFのc-Metへの結合に依存しないc-Metシグナル伝達を遮断するかまたは遮断に寄与することができる。また、相同のリポカリンムテインは、c-Met分子への結合時に、c-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得ることも好ましい。

【0029】

20

配列相同性または配列同一性のパーセンテージは、例えば、プログラムBLASTP、バージョンblastp 2.2.5（2002年11月16日；Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402参照）を用いて、本明細書において決定することができる。本態様において、相同性のパーセンテージは、ポリペプチド配列全体のアラインメントに基づく（マトリクス：BLOSUM 62；ギャップコスト：11.1；カットオフ値を一対比較において10-3に設定、例えば、SEQ ID NO: 1もしくは2に示されるリポカリンムテインのいずれか、または成熟ヒト涙液リポカリン（SEQ ID NO: 3）が参照として役立つ）。相同性または同一性は、それぞれ、アラインメントのためのプログラムにより選択されるアミノ酸の総数で割ったBLASTPプログラム出力における結果として示される「陽性」（相同アミノ酸）の数のパーセンテージとして算出される。

30

【0030】**B. 本開示の1つまたは複数の薬学的組成物およびその使用**

別の態様において、本開示は、c-Metのシグナル伝達経路を遮断することにより障害を処置、改善、または予防する方法であって、対象における本開示のリポカリンムテインまたはその断片もしくは変異体を含む薬学的組成物の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含む方法に関する。いくつかのさらなる態様において、本開示の薬学的組成物は、c-Met分子への結合時に、Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る。同様に、本開示は、c-Metのシグナル伝達経路を遮断することにより障害を処置、改善、または予防する方法における使用のための、本開示のリポカリンムテインまたはその断片もしくは変異体に関する。該方法は、本開示のリポカリンムテインまたはその断片もしくは変異体の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含むように意図され、該リポカリンムテイン、その断片、または変異体は、好ましくは、薬学的組成物の形態にある。概して、本明細書において記載される処置、改善、または予防の方法のすべては、前記で使用された請求項形式に転換可能である。

40

【0031】

前記方法により好ましくは処置、改善、または予防される障害は、細胞増殖性障害または癌に関連する。

【0032】

別の局面において、本開示は、腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するように意図される薬剤の調製のための、上記のようなリポカリンムテイン、またはその機能的断片

50

もしくは誘導体の1つ、および/または組成物の使用を教示する。本開示の別の局面は、癌の予防または処置について意図される薬剤の調製のための、上記のようなりポカリンムテイン、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つ、および/または組成物の使用を含む。

【0033】

1つの好ましい態様として、本開示はまた、患者において腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するように意図され、本開示に従うりポカリンムテイン、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つの、それを必要とする患者への投与を含む方法も提供する。

【0034】

本開示はさらに、それを必要とする患者における癌の予防または処置のための方法であって、本開示に従うりポカリンムテイン、またはその機能的断片もしくは誘導体の1つを含有する本明細書において提供される薬学的組成物の、患者への投与を含む方法に関する。

10

【0035】

特定の好ましい局面において、前記癌は、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、神経膠芽腫、または大腸癌から選択される癌である。

【0036】

上記で説明されるように、本開示の利点は、HGFに依存したおよび依存していない、Met活性化に関連した癌の処置を可能にすることである。

【0037】

本説明において、薬学的に許容される媒体は、二次的な反応を誘発せずに薬学的組成物中に入り、かつ、例えば、活性化合物の投与の促進、身体におけるその寿命および/またはその有効性の増大、溶液中のその溶解性の増大、あるいはその保存の改善を可能にする、化合物または化合物の組み合わせを示すように意図される。これらの薬学的に許容される媒体は周知であり、選択された活性化合物の性質および投与の方式に応じて当業者により適応されるであろう。

20

【0038】

好ましくは、これらの化合物は、全身経路により、特に、静脈内経路により、筋肉内、皮内、腹腔内により、または経口経路により投与することができる。より好ましい様式において、本開示に従う1つまたは複数のりポカリンムテインを含む組成物は、数回、逐次的様式で投与することができる。

30

【0039】

投与の方式、投薬量、および最適な薬学的形態は、例えば、患者の年齢または体重、彼の/彼女の全身状態の重篤度、処置に対する耐容性、および注目される二次的な効果などの、患者に適合した処置の確立において一般に考慮される基準に従って決定することができる。

【0040】

種々の好ましい態様において、本開示の薬学的組成物中に含まれるようなりポカリンムテインに、薬学的組成物の半減期、および従って薬物動態プロファイルを変更するために、半減期変更（例えば、延長）部分を付着させることが可能である。これを行う1つの方法は、半減期延長部分のための付着の点として働くことができる、りポカリンムテイン中の少なくとも1個のアミノ酸残基を変異させるかまたは付加することである。これは、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルスターチ（HES）、ビオチン、ペプチド、もしくはタンパク質などの他の化合物への結合のため、または天然に存在しないジスルフィド結合の形成のために反応基を導入する、例えば、システインの付加またはシステインへの置換（例えば、SEQ ID NO: 2に対してSEQ ID NO: 1における）であり得る。この点で、本明細書において提供される1つまたは複数のりポカリンムテインは、対象においてその薬物動態特性を変更するように修飾されていてもよい。

40

【0041】

種々のさらなる態様において、りポカリンムテインを含有する組成物の半減期などのPK

50

特性はまた、それ自体がムテインの血清半減期を延長するタンパク質により変更され得る。ムテインは、例えば、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される部分とコンジュゲートされ得るか、または融合タンパク質として発現され得る。

【0042】

本開示の適用を必要とする対象は、数個の例証となる例のみを挙げると、ヒト、イヌ、マウス、ラット、ブタ、カニクイザルなどの類人猿のような哺乳動物であってもよい。本開示において使用される「対象」という用語は、哺乳動物、および特にヒトを含む脊椎動物を指し、ヒトの場合は「患者」という用語もまた使用することができる。

10

【0043】

調節されていないc-Met経路は、転写の上方制御、c-Met遺伝子の増幅、特異的な遺伝子の変更、またはリガンドに依存した自己分泌もしくは傍分泌の機構により誘導され得る。ヒト腫瘍における構成性のc-Met活性化の最も頻繁な原因は、遺伝子増幅は無く、転写の上方制御の結果としてのタンパク質発現の増加である。加えて、結果として生じるタンパク質の過剰発現および構成性のキナーゼ活性化を伴うMET遺伝子の増幅は、胃癌および食道癌、非小細胞肺（NSCL）癌、ならびに髄芽細胞腫を含む、多数のヒト原発腫瘍において報告されている。骨肉腫および横紋筋肉腫などの間葉起源の腫瘍は、しばしば、HGFを産生することによる自己分泌機構を利用する。HGFレベルの上昇およびc-Metの過剰発現は、しばしば、より侵襲性の疾患、腫瘍転移の増大、および患者の生存の短縮を含む不良な臨床転帰に関連する。さらに、腫瘍中の高レベルのHGFおよび/またはc-Metタンパク質は、化学療法および放射線療法に対する抵抗性を与える。異常なHGFおよびc-Metの発現に加えて、c-Met経路は、c-Met変異、遺伝子増幅、および遺伝子再編成などの遺伝子の変更を通して活性化され得る。ミスセンスc-Met変異は、十分に特徴決定された遺伝性乳頭状腎細胞癌（PRCC）を有する個体のすべてにおいて、および散発性PRCC試料の小さなサブセット（13%）において見出される。変異のいくつかは、キナーゼ活性の増大による発癌可能性を有する。HGFおよびc-Met遺伝子の両方が存在する7番染色体のトリソミーは、PRCCにおいて頻繁に起こり、変種c-Met対立遺伝子の無作為でない重複を結果としてもたらす。加えて、体性c-Met変異は、胃癌、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、および甲状腺癌を含む他のヒト癌において、ならびにこれらの癌のいくつかの転移において同定されている。変異が典型的にキナーゼドメインに限定されているPRCCとは異なり、これらの変異は、しばしば、受容体の他の領域、例えば、膜近傍ドメインに位置している。変異に加えて、c-Met遺伝子は、しばしば、乳癌、肝臓癌、脳腫瘍、結腸直腸癌、胃癌（gastric cancer）、肺癌、および胃癌（stomach cancer）において増幅されており、何人かの患者においては疾患の進行と相関している。

20

30

【0044】

治療指標である異所性のHGF/c-Metシグナル伝達は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、鼻咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、および甲状腺癌、ならびに、胆管癌、骨肉腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、およびMFH/繊維肉腫を含む、広範なヒト悪性腫瘍において実証されている。加えて、異常なHGFおよび/またはc-Metの発現はまた、急性骨髄性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ腫、および多発性骨髄腫などの血液学的悪性腫瘍、ならびに、メラノーマ、中皮腫、ウィルムス腫瘍、神経膠芽腫、および星状細胞腫などの他の腫瘍においても報告されている（Liu et al. (2008) Expert Opin. Investig. Drugs 17(7):997-1011中に要約されている）。本開示のリボカリンムテインは、HGFに依存した腫瘍およびHGFに依存していない腫瘍の両方を阻害することができる。

40

【0045】

本明細書において開示されるように、リボカリンムテインは、c-Metのシグナル伝達経路を遮断するか、または遮断に寄与する。本開示において使用される「c-Metのシグナル伝達経路を遮断する」という用語は、「望ましい治療効果をもたらすために十分な量のc-

50

Metシグナル伝達を遮断する」として、本明細書により定義される。これは、例えば、c-Metに対するHGF結合および受容体活性化を阻害するため；HGFの存在下または非存在下で、およびまた機能獲得型変異を含有するc-Met変異体を含む細胞においても、細胞表面からのc-Metの内部移行を誘導するため；c-Metの分解およびリン酸化c-Metの低減を誘導し、それによりこの受容体を発現する腫瘍細胞のHGFに依存した増殖およびHGFに依存しない増殖を阻害するため；腫瘍細胞表面上のHGFにとって利用可能な結合部位の数を減少させ、それによりc-Metの過剰発現、増幅、または変異により引き起こされる経路の活性化を終結させるため；ならびに、HGFにより媒介されるc-Metのリン酸化および下流のシグナル伝達、細胞増殖、および細胞遊走を遮断するために、c-Metアンタゴニストリポカリンムテインを使用することにより、起こり得る。

10

【0046】

HGFのc-Metへの結合を含むc-Metシグナル伝達は、例えば、HGFがc-Metシグナル伝達を誘導する際、またはHGFがc-Metシグナル伝達をもたらすように寄与する場合に起こり得る。対照的に、HGFのc-Metへの結合に依存しないc-Metシグナル伝達は、例えば、c-Metシグナル伝達がHGFにより誘導されない場合に起こり得る。

【0047】

本開示の1つまたは複数のリポカリンムテインは、リガンド/HGFに依存したc-Met経路活性化およびリガンドに依存しないc-Met経路活性化の両方を阻害することができるか、または阻害に寄与するため、該1つまたは複数のリポカリンムテインは、様々な異なる機構を介して、c-Metにより媒介される障害を処置する際に治療的に有用であり得る。

20

【0048】

1つの好ましい態様において、c-Metにより媒介される障害は、c-Met依存性癌およびその後のc-Met依存性転移であり得る (Comoglio, P.M., Giordano, S. and Trusolino, L. (2008) Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 7: 504-516 ; Comoglio, P.M. and Trusolino, L. (2002) Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest* 109: 857-862)。本明細書において使用される際、「c-Met依存性癌」という用語は、その増殖および/または生存について過活動のc-Met遺伝子に依存している癌腫瘍に関する (Sharma, S.V. and Settleman, J. (2007) Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* 21: 3214-3231)。

30

【0049】

さらに別の好ましい態様において、本開示の1つまたは複数のリポカリンムテインは、c-Metにより媒介される障害を処置するための1つまたは複数のHGFのアンタゴニストと共に、それを必要とする対象に同時投与することができる。これは、HGFにより誘導されるc-Metシグナル伝達およびHGFのc-Metへの結合に依存しないc-Metシグナル伝達の両方の結果としての障害、例えば増殖する癌腫瘍を処置するために特に適用可能であり得、それによりHGFアンタゴニストの同時投与はさらに、HGFがc-Metシグナル伝達を誘導することを防止する手助けをする。

【0050】

本開示に従う、対象に投与され得る組成物の定量的な量は、広い範囲および頻度にわたり得る。例えば、投与される組成物の量は、4週毎に0.1mg/kgのように少なく、または、1日おきに50mg/kgのように多くてもよい。好ましくは、各用量での量は、対象において少なくとも0.1 mg/kg、少なくとも1 mg/kg、少なくとも5 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも20 mg/kg、少なくとも50 mg/kgからなる群より選択され、他方、投与の頻度は、1日に2回まで、1日に1回まで、1日おきに1回まで、2日おきに1回まで、毎週2回まで、毎週1回まで、1週おきに1回まで、および毎月または2か月毎に1回までからなる群より選択されてもよい。

40

【0051】

本開示はまた、開示される方法において、本開示の少なくとも1つのリポカリンムテインと、任意で薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を使用することに関する。

50

【 0 0 5 2 】

開示される方法において、薬学的組成物はまた、タンパク質性薬物について治療的に有効である任意の腸管外経路または非腸管外（経腸）経路を介するものを含む、様々な方法において、対象に投与／投薬されてもよい。腸管外適用法は、例えば、注射溶液、点滴溶液、またはチンキ剤の形態における、例えば、皮内、筋肉内、または静脈内の注射および点滴技術を含む。投与が静脈内点滴を介する場合、薬学的組成物は、15分まで、30分まで、45分まで、1時間まで、1時間半まで、2時間まで、2時間半まで、および3時間までからなる群より選択される期間にわたって投与することができる。

【 0 0 5 3 】

C. 本開示の1つまたは複数の診断用組成物およびその使用

疾患に關与するレベルのc-Metを発現する細胞の信頼できる検出を可能にするために、本開示は、任意の順序で：(i)本開示のリボカリンムテイン、またはその断片、誘導体、および／もしくは組み合わせと、(ii)半減期延長部分と、(iii)検出可能なシグナル伝達標識とを含み、検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる半減期を有する、例えば免疫画像化技術における使用のための診断用組成物を提供する。いくつかのさらなる態様において、検出可能なシグナル伝達標識は、活性を有するかまたは活性化可能である。いくつかのまたさらなる態様において、診断用組成物は、診断上許容される担体および／または賦形剤をさらに含む。

【 0 0 5 4 】

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物中に含有される際、リボカリンムテイン、ならびにその断片、誘導体、および／または組み合わせは、リボカリンムテイン、またはその断片、誘導体、および／もしくは組み合わせのc-Metに対する高親和性のために、その表面上にc-Metを過剰発現する細胞（例えば、腫瘍形成細胞）の早期の検出を可能にする。さらに、本開示の1つまたは複数のリボカリンムテイン、ならびにその断片、誘導体、および／または組み合わせは、腫瘍形成細胞内に内部移行され得、優れた画像化結果（例えば、腫瘍対非腫瘍の比により測定されるような）を可能にし、その結果として腫瘍形成細胞の検出のための驚くべき感度および特異性を可能にする。

【 0 0 5 5 】

実施例において行われるような研究のデータを含む、本明細書における開示から示されるように、組成物の半減期は、最適な取り込みを達成するために十分であり、さらに好都合な患者への投与および解析スケジュールを促進する、最適な半減期を定義する際に重要な役割を果たし得る。例えば、いくつかの態様において、診断用組成物を患者に投与する頻度は、1週に2回まで、1週に1回まで、1週おきに1回まで、2週おきに1回まで、毎月2回まで、毎月1回まで、1月おきに1回まで、および3か月毎に1回までからなる群より選択されてもよい。この点で、本開示の診断用組成物は、対象において約1、2、4、6、7、または14日の範囲内の半減期を有してもよい。

【 0 0 5 6 】

本開示の診断用組成物は、診断、予後判定、および／または治療後のモニタリングの目的で、細胞の表面上、細胞中、組織中、器官中、または生物学的試料中、すなわち、インビトロまたはインビボのいずれかのc-Met発現の検出を可能にする。

【 0 0 5 7 】

いくつかのさらなる態様において、本開示は、c-Metを発現する細胞の検出のための本開示の診断用組成物に関わる。本開示のさらなる態様において、該診断用組成物を使用する検出は、ガンマカメラ画像化技術／SPECT、MRI技術、またはPET技術などの免疫画像化技術により行われる。1つの例示的な態様において、本開示の免疫画像化技術は、インビボの免疫画像化技術であってもよい。

【 0 0 5 8 】

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物は、ガンマカメラ画像化技術、MRI技術、またはPET技術を含む免疫画像化技術における使用に適している。いくつかの態様において、該免疫画像化技術は、インビボの免疫画像化技術である。種々の画像化手順を、

10

20

30

40

50

当業者が利用可能である。例えば、放射活性の画像化のために、ガンマカメラでの平面画像化または単一光子放射コンピュータ断層撮影法（SPECT）を使用することができる。追加的な例において、陽電子放射断層撮影法（PET）は、三次元で放射活性の組織濃度を測定するための独特の能力と組み合わせて高解像度および感度を提供するため、非常に十分にインビボ画像化（免疫PET）についての別の魅力的な選択肢であり得る。

【0059】

1. 半減期延長部分

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物は、半減期延長部分を含む。いくつかのさらなる態様において、本開示の半減期延長部分は、診断用組成物について選択された特定の検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる時間に適合した半減期を、対象において診断用組成物に与えることができる。

10

【0060】

いくつかのさらなる態様において、本開示の診断用組成物は、患者にとって実用的かつ好都合である、診断用組成物を患者に投与する頻度を調整することができる半減期延長部分を含む。

【0061】

いくつかの態様において、本開示の1つまたは複数の診断用組成物は、その中で利用される特定の半減期延長部分に応じて、異なる半減期を有し得る。

【0062】

いくつかの態様において、本開示の半減期延長部分は、5キロダルトンから60キロダルトンまでの範囲またはさらにそれより大きいPEG化部分である。実施例において行われるような研究で、当業者は、(i) 対象におけるPK特性、および(ii) 薬力学的(PD) 応答（例えば、本開示のリポカリンムテインが、所定の用量およびc-Met代謝回転率で、どれほど長くc-Metに結合し得るか、および/またはMetを発現する細胞の表面から内部移行され得るか）、に対するPEGの長さの影響を三角測量することができる。本開示の診断用組成物の望ましい半減期は、本開示に従う使用のための治療用組成物の望ましい半減期とは異なっても（例えば、より短くても）よい。診断用組成物の望ましい半減期は、例えば、数時間から数日でもよく、好ましくは、完了するのに最大で1日または2日かかるインビボ画像化レジメンに寄与する半減期である。本開示に従う使用のために特に適したPEGは、20キロダルトン、30キロダルトン、または40キロダルトンのPEGである。

20

30

【0063】

この点で、本開示は、(a) 対象の第1のコホートに、特定の半減期延長部分を含有する診断用組成物を投与する段階；(b) 対象の第2のコホートに、第1のコホートに関連する半減期延長部分とは異なる特定の半減期延長部分を含有する診断用組成物を投与する段階；(c) それぞれの診断用組成物の半減期を測定する段階；および(d) コホート中の対象と同じ種または異なる種由来の対象において画像化結果を得るために必要とされる時間に最も適した半減期延長部分を選択する段階を含む、望ましい半減期を有する本開示の診断用組成物を選択するための方法を提供する。従って、2つより多いコホート、および2つより多い半減期延長部分を、最適な半減期延長部分を決定するために使用してもよい。選択される診断用組成物は、好ましくは、それを必要とする患者にとって実用的かつ好都合である半減期、例えば、c-Met発現に関連する対象の状態の正確な診断または他の評価を得るために必要とされるよりも長くはない半減期を有する。

40

【0064】

2. 検出可能なシグナル伝達標識

いくつかの態様において、免疫画像化技術における使用に適した本開示の診断用組成物は、適当な検出可能なシグナル伝達標識を含む。いくつかの態様において、そのような検出可能なシグナル伝達標識を含む本開示の診断用組成物は、試料または対象におけるc-Metレベルの検出または定量化を可能にする。いくつかのさらなる態様において、該検出可能なシグナル伝達標識は、インビボで検出可能である。

【0065】

50

いくつかの態様において、本開示の検出可能なシグナル伝達標識は、既に活性を有していてもよく、または活性化可能であってもよい。いくつかのさらなる態様において、検出可能なシグナル伝達標識は、例えば、活性要素、例えば、検出されるのに適した金属、放射性核種、または陽電子放射体での置換により、活性化可能である。

【0066】

本議論の検出可能なシグナル伝達標識は、例えば、診断のために使用される免疫画像化技術に基づいて、例えば、それぞれ、ガンマカメラ画像化技術 / SPECTの場合はガンマ放射する放射性核種（またはガンマ放射体）、MRIまたはPET画像化技術の場合は金属または陽電子放射体を選択することができる。この点で、本開示の1つまたは複数の検出可能なシグナル伝達標識は、ガンマカメラ画像形成剤（imageable agent）、PET画像形成剤、およびMRI画像形成剤、例えば、放射性核種、蛍光剤、発蛍光団、発色団、色原体、リン光剤、化学発光剤、および生物発光剤を含む。

10

【0067】

いくつかのさらなる態様において、本開示の適した検出可能なシグナル伝達標識は、放射性核種である。さらなる好ましい態様において、該放射性核種は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{99}Tc 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^mIn 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 、および ^{201}Tl からなる群より選択される。

【0068】

いくつかのさらなる態様において、本開示の適した検出可能なシグナル伝達標識は、蛍光剤または発蛍光団である。さらなる好ましい態様において、該蛍光剤または発蛍光団は、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、フルオレスカミン、フルオレセイン誘導体、Oregon Green、Rhodamine Green、Rhodol Green、またはTexas Redからなる群より選択される。

20

【0069】

本開示のいくつかの態様において、本開示の診断用組成物中に含まれるリポカリンムテインは、本開示の1つまたは複数の検出可能なシグナル伝達標識に結合しているか、コンジュゲートしているか、またはそれで標識されている。

【0070】

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物中に含まれるリポカリンムテインは、検出可能なシグナル伝達標識に直接的または間接的のいずれかでカップリングされる。いくつかのまたさらなる態様において、例えば、リポカリンムテインは、検出可能なシグナル伝達標識に直接的（例えば、リポカリンムテインのチロシン残基を介して）または間接的（例えば、金属キレート剤などのリンカーを介して）のいずれかでカップリングされる。いくつかの他の態様において、リポカリンムテインは、使用する時点および場所で、検出可能なシグナル伝達標識に（インビトロまたはインビボのいずれかで）カップリングすることができる分子にカップリングされる。

30

【0071】

いくつかの好ましい態様において、検出可能なシグナル伝達標識は、リポカリンムテインにカップリングされる1つまたは複数のジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）残基を通して、本開示の診断用組成物中に含まれるリポカリンムテインに結合される。

40

【0072】

いくつかの態様において、MRI技術における使用に適した本開示の1つまたは複数の診断用組成物は、1つまたは複数のDTPA残基にカップリングした本開示のリポカリンムテインを含み、このDTPA残基が次に1つまたは複数のMRI画像形成剤に結合し、従ってそれで標識される。いくつかのさらなる態様において、該MRI画像形成剤は金属原子である。例えば、ガドリニウム、マンガン、銅、鉄、金、およびユーロピウムを含む多数の金属が、MRI技術における標識のために有用であり得る。いくつかのさらなる好ましい態様において、ガドリニウムが使用される。

【0073】

いくつかの態様において、免疫画像化技術（例えば、PET）のいくつかにおいて使用さ

50

れる際、本開示の診断用組成物中に含まれるリポカリンムテインが標識される必要がある場合もある。いくつかの態様において、従って、本開示の診断用組成物は、リポカリンムテインにしっかりとカップリングした（例えば、直接的にまたは適当なキレート分子を通して）1つまたは複数の適切な検出可能なシグナル伝達標識を含んでもよい。いくつかのまたさらなる態様において、該検出可能なシグナル伝達標識は、画像化結果（例えば、腫瘍対非腫瘍の比）を得るために必要とされる時間に適合した半減期を有する。

【0074】

診断用組成物が標識されて研究/病院の現場に送達されるが、後に（例えば、1~2日以内に）使用される場合のいくつかの態様において、例えば、3~4日の半減期を有する長命の検出可能なシグナル伝達標識（例えば、陽電子放射体）が使用されてもよい。

10

【0075】

送達が約30時間かかる場合のいくつかの態様において、複合体の品質が2日まで十分に保存される、30%多い放射活性を有する標識された診断用組成物を送達することが好ましい。

【0076】

診断用組成物の送達が30時間より長くかかる場合のいくつかの態様において、他の標識手順に従ってもよい。例として、本開示の診断用組成物中に含まれるリポカリンムテインは、適当な二官能性キレート分子とのコンジュゲート（第1のコンジュゲート）として第1のバイアル中で送達されてもよく、他方、検出可能なシグナル伝達標識は、別に第2のバイアル中で送達されてもよい。いくつかのさらなる態様において、検出可能なシグナル伝達標識は、二官能性キレート分子を通してリポカリンムテインにカップリングされる準備ができています。そのような場合に、標識化を、使用する研究/病院の現場で容易に行うことができる。加えて、第1のコンジュゲートは、室温で、必要とされる時間に検出可能なシグナル伝達標識で標識されてもよい。

20

【0077】

本開示はまた、かなり長い期間にわたる診断用組成物の貯蔵を可能にする、本開示の診断用組成物中に含まれるリポカリンムテインを検出可能なシグナル伝達標識で標識するための代替的な手順に関する。この点で、診断用組成物は、適当に修飾されてもよいが、依然として標識され得る。いくつかのさらなる態様において、修飾された診断用組成物は、使用する日まで貯蔵することができる。あるいは、標識化は、使用の直前に行ってもよい。好ましい態様として、リポカリンムテインは、陽電子放射体、例えば、 ^{89}Zr または ^{68}Ga へのその後のカップリングを可能にする、p-イソチオシアナチベンジル-デスフェリオキサミンに事前にカップリングさせることができる。

30

【0078】

3. 本開示の1つまたは複数の診断用組成物の産業応用

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物を、c-Metの発現もしくは増強された発現またはHGFのc-Metへの結合が病理学的役割を果たす疾患または状態における、診断用マーカーまたは予後判定ツールとして使用することができる。

【0079】

いくつかの態様において、本開示は、c-Metの発現もしくは増強された発現またはHGFのc-Metへの結合が病理学的役割を果たす、対象における疾患または状態を診断する、予後判定する、モニタリングするための診断用マーカーまたは予後判定ツールの製造のための、本明細書において記載される診断用組成物の使用を提供する。いくつかのさらなる態様において、該疾患または状態は、癌または腫瘍である。

40

【0080】

本開示の診断用組成物は、1つまたは複数の対象、例えば、ヒト（例えば、患者）および望ましい動物種の任意の適切な細胞、組織、器官、または生物学的試料と共に、診断、予後判定、モニタリング、または研究手順において使用されてもよい。「生物学的試料」という用語により、血液、血清、血漿、リンパ液、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、乳、羊水、胆汁、腹水、膿汁などのような、正常または疾患を有する対象の身体に由来する任意の

50

流体または他の材料が意図される。器官または組織の抽出物、および対象由来の任意の細胞または組織調製物がインキュベーションされている培養液もまた、この用語の意味内に含まれる。「対象」という用語により、任意の哺乳動物、数個の例証となる例のみを挙げると、例えば、ヒト（この場合は「患者」という用語もまた使用することができる）、イヌ、マウス、ラット、ブタ、カニクイザルなどの類人猿を含む、任意の脊椎動物が意図される。

【 0 0 8 1 】

いくつかの態様において、本開示は、対象の細胞の表面上、細胞中、組織中、器官中、または生物学的試料中のc-Metの異常なレベルを検出するための方法を提供し、この細胞、組織、器官、または試料は、対象における正常の生理学的状態と比べてc-Metを過剰発現していることが疑われるものであり、本方法は、(a)細胞、組織、器官、または試料を本開示の診断用組成物と接触させる段階、および(b)診断用組成物と結合した検出可能なシグナル伝達標識を介してc-metのレベルを定量化することにより、器官または生物学的試料がc-Metを過剰発現しているか否かを判定する段階を含む。

10

【 0 0 8 2 】

いくつかの態様において、本開示は、対象においてc-Metを過剰発現する細胞、組織、または器官の位置を特定する方法であって、(a)細胞、組織、器官を本開示の診断用組成物と接触させる段階；(b)本開示の免疫画像化技術により、細胞、組織、器官、または試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の存在を検出する段階；および(c)それによりc-metのレベルを定量化する段階を含む方法を提供する。

20

【 0 0 8 3 】

いくつかの態様において、本開示は、癌または腫瘍を有する対象においてc-Metを発現する癌または腫瘍の進行または退縮を判定する方法であって、(a)対象から採取した生物学的試料を本開示の1つまたは複数の診断用組成物と接触させる段階；(b)本開示の免疫画像化技術により、試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を測定する段階；および(c)試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を対象におけるc-Metの量と関連させる段階を含む方法を提供する。この点で、対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の増大は、対象におけるc-Metの量の増大を示し、かつ対象におけるMetの量の増大は次に、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の進行を示唆し；対照的に、対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の減少は、対象におけるc-Metの量の減少を示し、かつ対象におけるMetの量の減少は次に、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の退縮を示唆する。

30

【 0 0 8 4 】

上記の方法において、接触させる段階および検出する段階は、インビトロであってもよく；接触させる段階はインビボであってもよいが、検出する段階はインビトロであってもよく、または、いくつかの態様において、接触させる段階および検出する段階は、両方ともインビボである。方法は、診断、予後判定、および/またはモニタリング（例えば、治療後）の目的で行われてもよい。いくつかの態様において、本開示は、対象におけるc-Metを過剰発現する細胞、組織、または器官の免疫画像化技術によるインビボ検出のための、本開示の診断用組成物を該対象に投与する段階を含む方法を提供する。いくつかのさらなる態様において、インビボ検出は、放射性核種により、いくつかの好ましい態様において、放射免疫シンチグラフィによる。

40

【 0 0 8 5 】

いくつかの態様において、上記の方法において使用される免疫画像化技術は、ガンマカメラ画像化技術、MRI技術、またはPET技術を含む。いくつかの態様において、該方法において使用される免疫画像化技術は、ガンマカメラ画像化技術、MRI技術、またはPET技術を含み、検出可能なシグナル伝達標識は、それぞれ、ガンマカメラ画像形成剤、PET画像形成剤、およびMRI画像形成剤であってもよい。

【 0 0 8 6 】

50

上記の方法において、細胞、組織、器官、または試料を本開示の1つまたは複数の診断用組成物と接触させる頻度、または該組成物を対象に投与する頻度は、例えば、異なる血清半減期延長部分を用いることにより、調整することができる。

【0087】

上述の方法のすべてにおいて検出可能性のために必要とされる本開示の診断用組成物の量は概して、年齢、状態、性別、および患者における疾患の程度、もしあれば禁忌、ならびに他の変数などの考慮に応じて変動すると考えられ、個々の内科医または診断医により調整されるべきである。インビボの適用のために、投薬量は、0.01 mgから100 mgまでの各単一の診断用組成物または診断用組成物の組み合わせの中で変動してもよく、好ましくは、5~50mgの範囲内である。

10

【0088】

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物を用いる上記の方法は、ガンマカメラ画像化技術を利用してよく、該方法は、本開示のガンマカメラ画像形成剤である検出可能な標識を含む。

【0089】

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物を用いる上記の方法は、MRI画像化技術を利用してよく、該方法は、本開示のMRI画像形成剤である検出可能な標識を含む。

【0090】

いくつかの態様において、本開示の診断用組成物を用いる上記の方法は、PET画像化技術を利用してよく、該方法は、本開示のPET画像形成剤である検出可能な標識を含む。

20

【0091】

大量のこれらの陽電子放射剤の製造、精製のための手順、および本開示のリポカリンムテインのインビボの生体内分布特徴の維持を伴うリポカリンムテインへの安定したカップリングのための手順は、当技術分野において公知である (Verel I, et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004; 31:1645-52およびVerel I, et al., J Nucl Med 2003; 44:1271-81を参照されたい)。

【0092】

いくつかのさらなる態様において、長命の陽電子放射剤である、残留性 (residualizing) 放射性核種⁸⁹Zrおよび非残留性放射性核種¹²⁴Iを、上記の方法において本開示のリポカリンムテインでのPET画像化のために利用することができる。いくつかの態様において、⁸⁹Zrは、キレートを介してリポカリンムテインのリジン残基にカップリングさせることができる。いくつかの態様において、¹²⁴Iは、チロシン残基を介して直接的にカップリングさせることができる。いくつかの好ましい態様において、⁸⁹Zrは、内部移行するリポカリンムテインのPET画像化のために使用される。いくつかの好ましい態様において、¹²⁴Iは、内部移行しないリポカリンムテインのために使用される。なぜなら、⁸⁹Zrは、直接標識される¹²⁴Iとは対照的に、リポカリンムテインの内部移行後に細胞中に捕捉されるからであり、これは当技術分野において残留化 (residualization) として公知である (Borjesson et al., Clin Cancer Res 2006; 12: 3133-40)。加えて、sup.89Zrの残留化は、肝臓、腎臓、および脾臓などのリポカリンムテインの異化に関連する器官において起こり得る。

30

40

【0093】

いくつかの好ましい態様において、⁸⁹Zrなどの残留性放射性核種は、¹²⁴Iなどの非残留性ヨウ素よりも、細胞への結合後に内部移行され得るリポカリンムテインでのPET画像化により良好に適している。いくつかの他の好ましい態様において、非残留性ヨウ素はまた、例えば、間接放射性ヨウ素化方法論が適用されて、標識されたりポカリンムテインの内部移行後に腫瘍細胞において放射活性のより高い保持を結果としてもたらず場合、細胞への結合後に内部移行され得るリポカリンムテインでのPET画像化に使用される。

【0094】

いくつかのさらなる態様において、残留性放射性核種 (例えば、⁸⁹Zr) -免疫PETを、リポカリンムテインの生体内分布の非侵襲性定量化のために使用することができる。いくつか

50

かの好ましい態様において、特に腫瘍がしばしば不均一であり（代表的でない生検を結果としてもたらず）かつ接近し難いため、定量的PET画像化は、繰り返される腫瘍生検を上回って好ましいと考えられる。

【0095】

いくつかの態様において、本開示は、c-Metの存在の検出の目的で、上述の方法のいずれかにおける使用のために、本明細書において記載される診断用組成物を提供する。いくつかの態様において、本開示は、Metの発現もしくは増強された発現またはHGFのMetへの結合が病理学的役割を果たす疾患または状態の、診断、予後判定、および/またはモニタリング（例えば、治療後）の目的で、上述の方法のいずれかにおける使用のために、本明細書において記載される診断用組成物を提供する。

10

【0096】

いくつかの態様において、本開示は、c-Metの発現もしくは増強された発現またはHGFのMetへの結合が病理学的役割を果たす、対象における疾患または状態（例えば、癌性状態または腫瘍）を診断、予後判定、モニタリングするための、本開示の少なくとも1つの診断用組成物と、診断用組成物を使用するための1つまたは複数の指示書とを含む診断用キットを提供する。またさらなる態様において、診断用組成物が細胞表面上のc-Met分子に結合した後、該組成物はc-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る。

【0097】

いくつかのさらなる態様において、本開示は、1つまたは複数の正常な対照試料と比較した際に、対象から採取した1つまたは複数の生物学的試料においてc-Metが過剰発現しているか否かを測定するための、本開示の少なくとも1つの診断用組成物と、診断用組成物を使用するための1つまたは複数の指示書とを含む診断用キットを提供する。キットは、本開示の少なくとも1つの診断用組成物を含むラベルの貼られた第1の容器；診断上許容される担体または賦形剤を含むラベルの貼られた第2の容器；および対象において前記疾患または状態を診断、予後判定、またはモニタリングするためにキットを使用するための指示書を含むしてもよい。

20

【0098】

本明細書において記載されるすべての特許、特許出願、教科書、および査読された刊行物は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0099】

以下の非限定的な実施例は、本開示の種々の局面を例証する。

30

【実施例】

【0100】

実施例1：Caki-1異種移植モデルにおけるリポカリンムテイン（SEQ ID NO: 1）の抗腫瘍効果の評定

研究の初めに、マウスの右側腹部に100 μ lの 5×10^6 Caki-1細胞を、皮下に（s.c.）移植した。すべてのマウスを毎日観察して、健康および腫瘍サイズをモニタリングした。腫瘍が100~150 mm³の平均容積に達した際に、96匹のマウスのうち80匹を、その腫瘍容積に基づいて選択し、投薬前に有効性群に無作為に割り当てた。各群は、10匹の腫瘍を有するマウスからなった（n=10/群）。処置群中の腫瘍を有するマウスを、無作為化後の日から開始して、媒体、TLC対照-PEG40（30mg/kg）、ならびにリポカリンムテイン（30mg/kg、15mg/kg、7.5mg/kg、2.5mg/kg、および0.75mg/kg）で（毎日腹腔内に（i.p.））処置した。マウスを、各投薬時に計量し、毎日記録した。図1は、Caki-1異種移植腫瘍モデルにおける、リポカリンムテイン（30 mg/kg、15 mg/kg、7.5 mg/kg、2.5 mg/kg、および0.75 mg/kg）群の腫瘍増殖阻害を示す。腫瘍容積の統計学的に有意な低減が、媒体群およびTLC対照と比較した際に、リポカリンムテイン処置群の各々において観察された。

40

【0101】

実施例2：リポカリンムテイン（SEQ ID NO: 1）のインビボ安全性（耐容性）の指標としての体重変化の解析

Caki-1腫瘍を有するヌードマウスの体重を、リポカリンムテイン（SEQ ID NO: 1）を含

50

む試験化合物の投与による変動についてモニタリングした。腫瘍を有するマウスを、媒体、TLC対照-PEG40 (30mg/kg)、ならびにリポカリンムテイン (30mg/kg、15mg/kg、7.5mg/kg、2.5mg/kg、および0.75mg/kg) で (毎日腹腔内に (i.p.)) 処置した。体重を毎日記録し、すべてのマウスを毒性の徴候についてモニタリングした。すべての群が、(恐らく適応ストレスにより) 処置の最初の週に類似したレベルの体重の減少を経験したが、その後、研究を通して体重が増加した。いかなる毒性の徴候も観察されなかった。図2に示されるように、媒体対照群とリポカリンムテイン群との間で体重パターンに差異は無く、化合物が試験されたすべての用量レベルで十分に耐容性を示すことを示唆した。

【0102】

実施例3: Caki-1およびEBC-1 (リガンドに依存しないモデル) における全Met受容体の発現およびMetのリン酸化 (シグナル伝達) に対するリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) の効果の判定

リン酸化Metおよび全MetのELISAベースの定量化を、媒体またはリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) での処置の5日後に、Caki-1およびEBC-1細胞異種移植モデルから切除した腫瘍組織に対して行った。リポカリンムテインは、両方のリガンドに依存しないCaki-1およびEBC-1の細胞異種移植モデルにおいて、リン酸化Metおよび全内在性c-Metを有意に低減させることが、図3において実証された ($P < 0.01$)。

【0103】

実施例4: A549およびCaki-1細胞株モデルにおける全Met受容体発現に対するリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) の効果の判定

リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) への曝露時のc-Met受容体の責務を評価するために、免疫蛍光顕微鏡検査をA549細胞に対して行った。カバーガラス上にプレーティングしたA549細胞を、SEQ ID NO: 1 (500 nM) またはHGF (50 ng/ml、R&D Systems, Minneapolis, Minnesota由来) または対照培地と共に1時間氷上でインキュベーションし、その後1時間37 °Cで内部移行させた。細胞を次に4%パラホルムアルデヒド中で固定し、適切なAlexa-Fluorタグ付加された二次抗体 (Life TechnologiesによるMolecular Probes, Karlsruhe, Germany) とのインキュベーションの前に、一次抗体 (Met受容体のc-末端尾部を認識する抗Met: Invitrogen, Camarillo, CAのマウスmAb 3D4; 抗LAMP-1カタログ番号L1418: Sigma Life Scienceのウサギポリクローナル抗体) での染色を促進するように透過処理した。核を、DAPIで青色に対比染色した (これは、各細胞内で大きな青色の円として視覚化され、単一細胞解析を手助けする)。免疫蛍光を、Leica TCS SP2 AOBs共焦点レーザー走査顕微鏡 (Leica Microsystems) を用いて解析した。c-Metに対するSEQ ID NO: 1の影響は、細胞内区画中の受容体の蓄積により明らかであった。図4の画像 (i) は、Met受容体染色 (緑色) の最も高いシグナル強度が、SEQ ID NO: 1とのインキュベーション後に細胞内小胞に局在化する (図4の画像ivおよびvii中の対照パネルと比較した際) ことを示す。LAMP-1 (赤色) での対比染色により、SEQ ID NO: 1に曝露された際のc-Met受容体と末端のリソソーム内小胞との共局在化 (黄色) が実証され、図4の画像 (iii) に示されるように、その分解が示される。免疫蛍光顕微鏡検査によりまた、SEQ ID NO: 1に応答したCaki-1細胞における細胞表面からのc-Metの除去が実証される。8チャンバースライドガラス中で増殖させた細胞を試験物質とインキュベーションし、c-Met発現パターンをウサギモノクローナルc-Met (C-12) (Santa Cruz, sc-10) を用いて評価した。共焦点画像を使用して、形質膜に局在化したc-met受容体から生じる蛍光シグナルの相対強度値を決定した。高倍率の画像を使用して、画像化された細胞の境界を越えて15画素幅の関心領域 (ROI) を描いた (imageJソフトウェア)。同じROI内の画素の平均強度を次に、独立した実験由来の対応する単一チャンネル蛍光画像において評価した。画素強度の有意な低減が、対照と比べてSEQ ID NO: 1で処置した試料において観察された。

【0104】

実施例5: H441およびA549細胞株モデルにおけるc-Met受容体結合時のリポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) の内部移行の判定

リポカリンムテイン (SEQ ID NO: 1) の内部移行を評価するために、A549細胞に対して

10

20

30

40

50

免疫蛍光顕微鏡検査を行った。カバーガラス上にプレーティングしたA549細胞を、SEQ ID NO: 1 Dylight⁶³³ (500 nm) と共に1時間氷上でインキュベーションした。細胞を次に、1時間37 °Cでインキュベーションして、内部移行させた。核を、DAPIで青色に対比染色した(これは、各細胞内で大きな青色の円として視覚化され、単一細胞解析を手助けする)。免疫蛍光を、Leica TCS SP2 AOBs共焦点レーザー走査顕微鏡(Leica Microsystems)を用いて解析した。図5Aにおいて観察される強いピンク色の細胞内染色により示されるように、リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1)がc-Met受容体に結合し、かつ内部移行されることが、実証された。

【0105】

リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1)の内部移行速度論をさらに評価するために、H441細胞を氷上で、0.1 µgの放射標識されたリポカリンムテイン、⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1と共に、1.5時間インキュベーションして、結合させた。洗浄後、細胞を37 °Cでインキュベーションして、内部移行させた。内部移行されたもの、膜結合されたもの、および培地中に放出された⁸⁹Zr-RS-110を、LKB-1282-Compu-gamma system(LKB Wallac)において計数した。⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1は、迅速に内部移行された(図5B)。内部移行された画分は、インキュベーションの開始3時間後から増加して、その後24時間まで安定していた。細胞表面の⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1は、この期間中に減少した。

【0106】

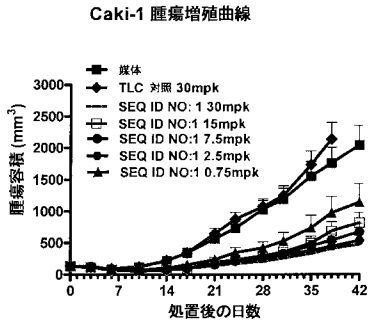
実施例6: 腫瘍特異的な⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1の取り込みの実証

H441腫瘍を有するマウスのmicroPET画像化を使用して、腫瘍特異的な⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1の取り込みおよび時間に依存した器官分布を評価した。動物を、microPET Focus 220げっ歯類走査装置(CTI Siemens)を用いて画像化した。画像再構築後、インビボ定量化を、AMIDE Medical Image Data Examinerソフトウェア(バージョン0.9.1, Stanford University)で行った。試料およびブライミングされた標準を、ウェルタイプのガンマカウンターにおいて放射活性を計数し、物理的崩壊について補正した。エクスピボの組織活性を、1グラムの組織当たりの注射された用量のパーセンテージ(%ID/g)として表す。代表的な横断および冠状のmicroPET画像を、図6(A)においてトレーサー注射(50 µg ⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1 (5 MBq))の6、24、48、および96時間後に示し、白色矢印が腫瘍取り込みを示す。腫瘍取り込みは、6~24時間の間に増加した。microPETデータの定量化を、すべてのマウスにおいて血液プール、肝臓、脾臓、腎臓、および腫瘍取り込みについて行った。異種移植マウスにおける非標的組織のmicroPET走査解析により、50 µg ⁸⁹Zr-SEQ ID NO: 1の注射の6時間後に、高い血液プール、ならびに肝臓および腎臓のトレーサー取り込みが明らかになった。これらの器官における非特異的な取り込みは、注射の24、48、および96時間後に行われた走査に基づくと時間と共に減少し、トレーサー注射の96時間後までに増大した腫瘍: 器官の比を結果としてもたらした(図6B)。特異的なc-Metに向けられた取り込みはまた、⁸⁹Zr-Tlc対照と比較してH441およびU87-MG腫瘍においても見られた(図7)。A2780異種移植(c-Met陰性)により、⁸⁹Zr-SEQ IDおよび⁸⁹Zr-Tlc対照の両方のバックグラウンドの非特異的腫瘍取り込みが示された。データを、平均標準取り込み値(SUV平均)として表す。

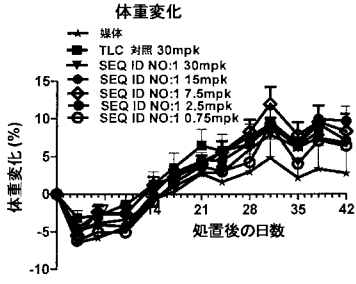
【0107】

最後の走査の後、マウスを生体内分布解析のために屠殺した。生体内分布データは、完全にmicroPETの知見と一貫性があり、c-Metの発現と関連した⁸⁹Zr-SEQ IDのエクスピボ腫瘍取り込みを示した(H441において5.9 %ID/gおよびU87-MGにおいて1.8 %ID/g)(P < 0.05)(図7)。これらのモデルにおける⁸⁹Zr-Tlc対照の対照トレーサーの腫瘍取り込みは3.9(H441)、1.2(U87-MG)、および2.5(A2780) %ID/gであった。A2780(c-Met陰性)モデルにおいて⁸⁹Zr-Tlc対照(1.7 %ID/g)と⁸⁹Zr-SEQ ID(2.5 %ID/g)の腫瘍取り込みの間に差異は見出されなかった。⁸⁹Zr-Tlc対照と比較した⁸⁹Zr-SEQ IDの腫瘍: 血液の比により、これらの知見が確認された。

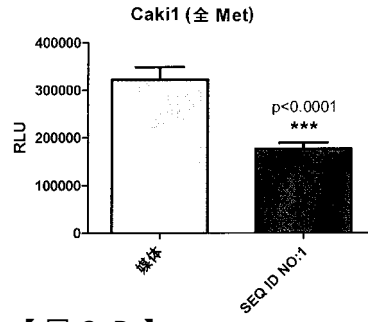
【 図 1 】



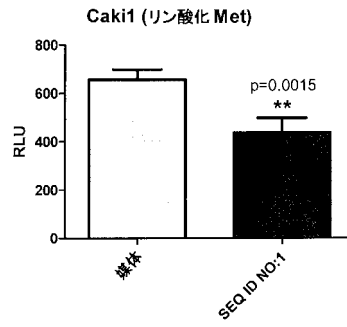
【 図 2 】



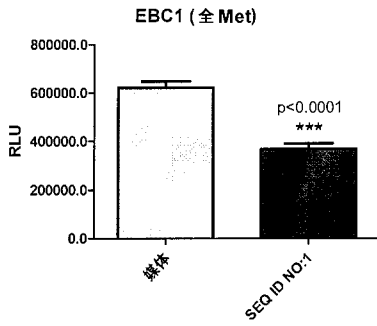
【 図 3 A 】



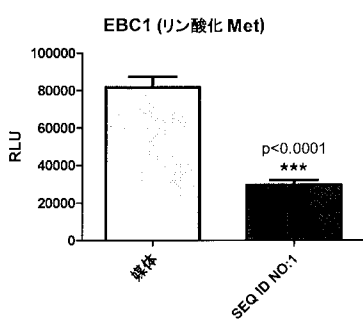
【 図 3 B 】



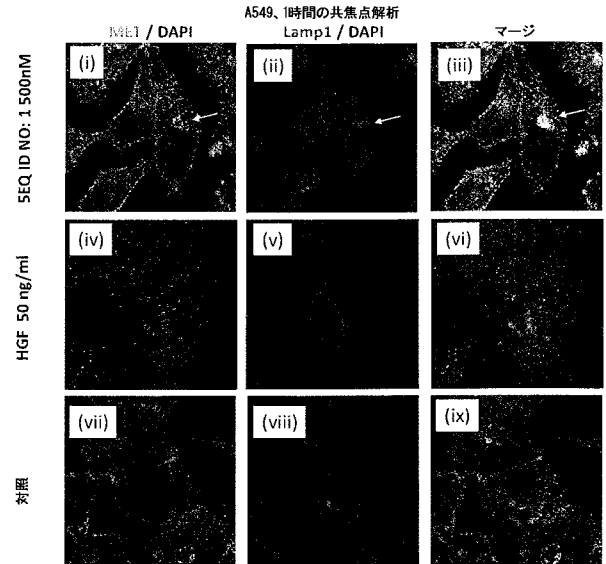
【 図 3 C 】



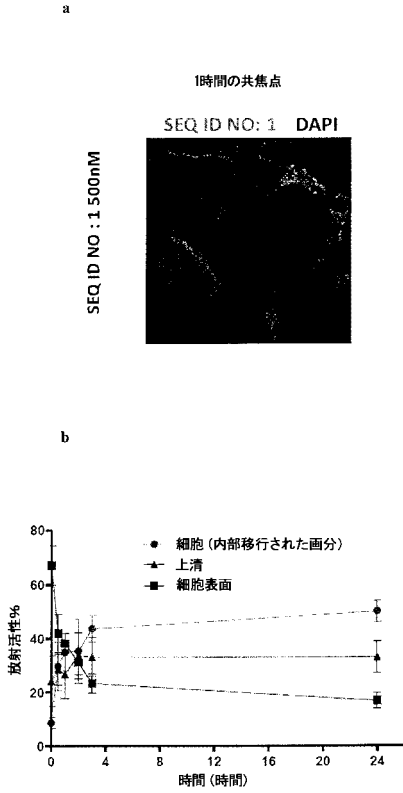
【 図 3 D 】



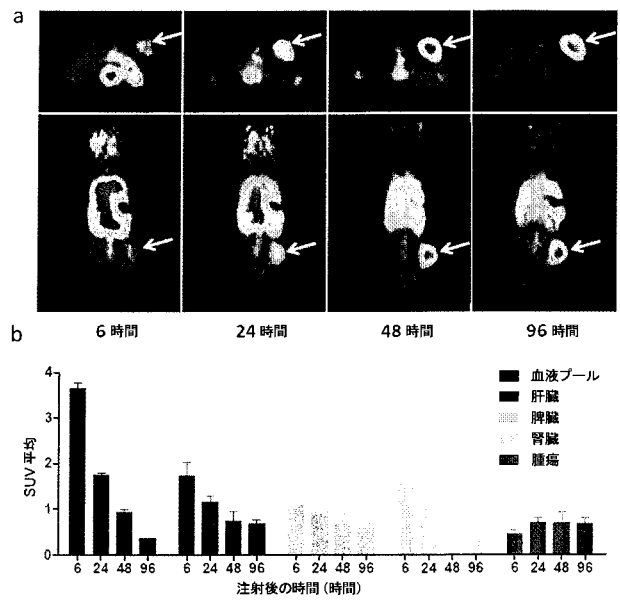
【 図 4 】



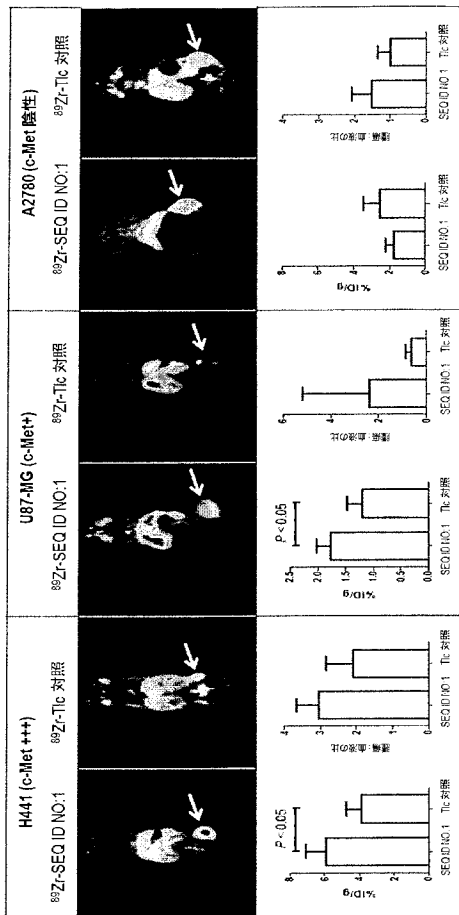
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2018076294000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月17日(2017.11.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有するヒト涙液リボカリウムテイン、またはその断片もしくは変異体と、 (ii) 検出可能なシグナル伝達標識と、 (iii) 血清半減期延長部分とを含む、c-Metの存在を検出するための免疫画像化技術における使用に適した診断用組成物であって、

対象において、検出可能なシグナル伝達標識により視覚化されるような画像化結果を得るために必要とされる半減期を有し、該ヒト涙液リボカリウムテインがc-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る、診断用組成物。

【請求項2】

対象において数時間から6日の範囲内の血清半減期を有する、請求項1に記載の診断用組成物。

【請求項3】

対象において少なくとも約1、2、4、6、7、14、または21日の血清半減期を有する、請求項1に記載の診断用組成物。

【請求項4】

診断上許容される担体および/または賦形剤をさらに含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項5】

血清半減期延長部分が、対象において組成物に、画像化結果を得るために必要とされる時間に適合した半減期を与えることができる、請求項1~4のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項6】

画像化結果が腫瘍対非腫瘍の比である、請求項1~5のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項7】

血清半減期延長部分が、ポリエチレングリコール(PEG)分子、ヒドロキシエチルスターチ、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、請求項1~6のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項8】

血清半減期延長部分が、5キログルトンから60キログルトンまでの範囲の分子量を有するPEG分子である、請求項7に記載の診断用組成物。

【請求項9】

血清半減期延長部分が、30キログルトンの分子量を有するPEG分子である、請求項8に記載の診断用組成物。

【請求項10】

血清半減期延長部分が、40キログルトンの分子量を有するPEG分子である、請求項8に記載の診断用組成物。

【請求項11】

免疫画像化技術が、ガンマカメラ画像化技術、PET技術、およびMRI技術からなる群より

選択される、請求項1～10のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項12】

検出可能なシグナル伝達標識が、ガンマカメラ画像形成剤 (imageable agent)、PET画像形成剤、およびMRI画像形成剤からなる群より選択される、請求項1～10のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項13】

検出可能なシグナル伝達標識が ^{89}Zr である、請求項1～12のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項14】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2に対して少なくとも90%の配列同一性、またはその断片もしくは変異体を有する、請求項1～13のいずれか一項に記載の診断用組成物。

【請求項15】

(a) 対象から採取した生物学的試料を請求項1～14のいずれか一項に記載の1つまたは複数の診断用組成物と接触させる段階；

(b) 本開示の免疫画像化技術により、試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を測定する段階；および

(c) 試料に結合した検出可能なシグナル伝達標識の量を対象におけるc-Metの量と関連させる段階

を含む、癌または腫瘍を有する対象においてc-Metを発現する癌または腫瘍の進行または退縮を判定する方法であって、

対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の増大が、対象におけるc-Met発現の量の増大を示し、かつ対象におけるc-Metの量の増大が、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の進行を示唆し；かつ

対照試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量に対する、対象から採取した試料中の検出可能なシグナル伝達標識の量の減少が、対象におけるc-Metの量の減少を示し、かつ対象におけるc-Metの量の減少が次に、対象におけるc-Metを発現する癌または腫瘍の退縮を示唆する、方法。

【請求項16】

c-Metの過剰発現に関連する対象において疾患または状態を診断、予後判定、モニタリングするための、請求項1～14のいずれか一項に記載の少なくとも1つの診断用組成物と、診断用組成物を使用するための1つまたは複数の指示書とを含む、診断用キット。

【請求項17】

SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2に対して少なくとも85%の配列同一性を有するヒト涙液リポカリンムテイン、またはその断片もしくは変異体を含む、c-Metの活性化に関連する障害を処置、改善、または予防するための薬学的組成物であって、該障害が癌または転移であり、該処置が該リポカリンムテインの治療的有効量をそれを必要とする対象に投与する段階を含み、該リポカリンムテインがc-Metのシグナル伝達経路を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、薬学的組成物。

【請求項18】

対象においてHGFのc-Metへの結合に依存しないc-Metシグナル伝達を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項19】

障害がHGFに依存していない腫瘍である、請求項17または18に記載の薬学的組成物。

【請求項20】

HGFのc-Metへの結合を含むc-Metシグナル伝達を遮断することができるかまたは遮断に寄与する、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項21】

処置がHGFのアンタゴニストの治療的有効量を対象に投与する段階をさらに含む、請求

項17に記載の薬学的組成物。

【請求項22】

リポカリンムテインが、c-Met分子への結合時にc-Metを発現する細胞の表面から内部移行され得る、請求項17~21のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項23】

リポカリンムテインが、該ムテインの血清半減期を延長する化合物にコンジュゲートされている、請求項17~22のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項24】

血清半減期を延長する化合物が、ポリエチレングリコール分子、ヒドロキシエチルスターチ、タンパク質ドメイン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項25】

前記障害が、c-Met依存性癌またはc-Met依存性転移である、請求項17~24のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項26】

前記障害が、肝臓癌、大腸癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、乳頭状腎癌、頭頸部扁平上皮癌(HNSC)、または頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移である、請求項25に記載の薬学的組成物。

【請求項27】

薬学的組成物が、腸管外経路または非腸管外経路を介して投与される、請求項17~26のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項28】

薬学的組成物が経腸経路を介して投与される、請求項17~27のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項29】

前記組成物が、1日に2回まで、1日に1回まで、1日おきに1回まで、2日おきに1回まで、毎週2回まで、毎週1回まで、1週おきに1回まで、または毎月1回まで投与される、請求項17~28のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項30】

前記組成物が、少なくとも0.1 mg/kg、少なくとも1 mg/kg、少なくとも5 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも20 mg/kg、および少なくとも50 mg/kgからなる群より選択される投与毎の投薬量レベルで、それを必要とする対象に投与される、請求項17~29のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項31】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2に対して少なくとも90%の配列同一性、またはその断片もしくは変異体を有する、請求項17~30のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N	21/78 (2006.01)	G 0 1 N	21/64	F 4 C 0 8 5
A 6 1 K	49/14 (2006.01)	G 0 1 N	21/78	C 4 C 0 9 6
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	49/14	4 C 1 8 8
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	38/17	4 H 0 4 5
A 6 1 K	47/61 (2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/61	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 T	1/161 (2006.01)	A 6 1 P	35/04	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 T	1/161	A
G 0 1 N	33/534 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	G 0 1 N	33/534	
		C 1 2 N	15/00	A

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 オルヴィル シェーン
ドイツ連邦共和国 フライジング ヴァイエンステファン リゼ マイトナー シュトラーセ 3
0 ピエリス アーゲー内
- (72)発明者 ジル ヘンドリック
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン フォルカルトシュトラーセ 2 8
- (72)発明者 オドリ ローレント
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 モーウォー ナッシュ コート 2 2 7 9
- (72)発明者 ヒンナー マーロン
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン オイゲン パプスト シュトラーセ 9
- (72)発明者 デ フリース エリザベート
オランダ王国 フローニンゲン ピー.オー. ボックス 3 0 . 0 0 1 インターナル コード
ディーエイ11 ユニバーシティー メディカル センター フローニンゲン デパートメント
オブ メディカル オンコロジー
- (72)発明者 テルウィスシャ ヴァン スヘルティンガ アントン ジー.ティー.
オランダ王国 フローニンゲン ピー.オー. ボックス 3 0 . 0 0 1 インターナル コード
イービー70 ユニバーシティー メディカル センター フローニンゲン ファーマシー デ
パートメント

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA14 CA05 DA06 EA01 FA01 FA02 KA09 LA01

2G054 AA04 AA08 AB04 BB08 CA23 CE02 EA03 GA04 GA05 GB02
GE03
4B063 QA19 QQ02 QQ08 QR48 QX01 QX02 QX07
4C076 CC27 EE23 EE38 EE41 EE59 FF31 FF63
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 CA18 MA55 MA66 NA14 ZB261
ZB262
4C085 HH03 HH07 HH11 HH13 KA03 KA27 KA29 KB07 KB82 LL18
4C096 AA11
4C188 EE02 EE27 FF04 FF07 JJ06
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50

专利名称(译)	预防, 治疗或诊断病症的方法		
公开(公告)号	JP2018076294A	公开(公告)日	2018-05-17
申请号	JP2017203922	申请日	2017-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	皮里斯制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	ピエ松鼠ファーマシューティカルズゲーエムベーハー		
[标]发明人	オルヴィルシェーン ジルヘンドリック オドリローレント ヒンナーマーロン デフリースエリザベート テルウィスシャヴァンスヘルティンガアントンジーティー		
发明人	オルヴィル シェーン ジル ヘンドリック オドリ ローレント ヒンナー マーロン デ フリース エリザベート テルウィスシャ ヴァン スヘルティンガ アントン ジー.ティー.		
IPC分类号	A61K51/08 C12Q1/02 C07K14/435 A61B5/055 G01N21/64 G01N21/78 A61K49/14 A61K38/17 A61K47/60 A61K47/61 A61K47/68 A61P43/00 A61P35/00 A61P35/04 G01T1/161 G01N33/53 G01N33/534 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K51/08 A61K51/088 A61K38/16 A61K49/00 A61K49/14 C07K14/47 C07K2319/30 C07K2319/60 C07K2319/70		
FI分类号	A61K51/08.200 C12Q1/02.ZNA C07K14/435 A61B5/05.383 G01N21/64.E G01N21/64.F G01N21/78.C A61K49/14 A61K38/17 A61K47/60 A61K47/61 A61K47/68 A61P43/00.105 A61P35/00 A61P35/04 G01T1/161.A G01N33/53.D G01N33/534 C12N15/00.A A61B5/055.383 A61K49/06 A61K49/08 A61K49/16 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA14 2G043/CA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/KA09 2G043/LA01 2G054/AA04 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BB08 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GB02 2G054/GE03 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4C076/CC27 4C076/EE23 4C076/EE38 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF31 4C076/FF63 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA03 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/KB82 4C085/LL18 4C096/AA11 4C188/EE02 4C188/EE27 4C188/FF04 4C188/FF07 4C188/JJ06 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/584355 2012-01-09 US 61/618050 2012-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供通过阻断c-Met信号传导途径来治疗，改善，预防或诊断病症的方法。溶剂：本发明提供了适用于检测c-Met存在的免疫成像技术的诊断组合物。 ，包括：(i) c-Met特异性脂质运载蛋白突变蛋白；(ii) 可检测的信号标签；(iii) 半衰期延长部分，并且具有获得在受试者中用可检测信号标记可视化的成像结果所必需的半衰期。还提供了治疗，改善或预防与c-Met活化相关的病症的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的脂质运载蛋白突变蛋白的步骤。所附图：无

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-76294

(P2018-76294A)

(43) 公開日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	51/08 (2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0	2 G 0 4 3
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A	2 G 0 5 4
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435		4 B 0 6 3
A 6 1 B	5/055 (2006.01)	A 6 1 B	5/05	3 8 3	4 C 0 7 6
G 0 1 N	21/64 (2006.01)	G 0 1 N	21/64	E	4 C 0 8 4
		審査請求 有		請求項の数 31	O L (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2017-203922 (P2017-203922)	(71) 出願人	509029645
(22) 出願日	平成29年10月20日(2017.10.20)		ビエリス ファーマシューティカルズ ゲ
(62) 分類の表示	特願2014-550714 (P2014-550714)		ーエムペーハー
原出願日	平成25年1月7日(2013.1.7)		ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジ
(31) 優先権主張番号	61/584,355		ングーヴァイエンステファン リゼーマイ
(32) 優先日	平成24年1月9日(2012.1.9)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/618,050	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成24年3月30日(2012.3.30)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 障害を予防、処置、または診断するための方法