

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6190275号
(P6190275)

(45) 発行日 平成29年8月30日 (2017. 8. 30)

(24) 登録日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47 Z N A

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C O 7 K 19/00

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 D

C 1 2 Q 1/42 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/42

A 6 1 K 38/17 (2006. 01)

A 6 1 K 38/17

請求項の数 25 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-554904 (P2013-554904)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月24日 (2012. 2. 24)
 (65) 公表番号 特表2014-508760 (P2014-508760A)
 (43) 公表日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/053142
 (87) 国際公開番号 W02012/113900
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
 審査請求日 平成27年1月15日 (2015. 1. 15)
 (31) 優先権主張番号 11305197.3
 (32) 優先日 平成23年2月24日 (2011. 2. 24)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル
 フランス国、エフー75013 パリ、リ
 ュ・ドゥ・トルビアック 101
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄
 (74) 代理人 100135873
 弁理士 小澤 圭子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I G F B P-3 誘導体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含む I G F B P-3 ポリペプチド誘導体であって、

N末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P-3 の、または、その生物学的に活性なフラグメントの、N末端ドメインのアミノ酸配列からなり、ここで前記野生型ヒト I G F B P-3 の生物学的に活性なフラグメントのN末端ドメインは、I G F-I 及び I G F-I I に結合する野生型ヒト I G F B P-3 のN末端ドメインの能力を保持し、；

中間ドメインは、野生型ヒト I G F B P-3 の中間ドメインのアミノ酸配列の85個又は85個超の連続したアミノ酸残基がタンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーで置換されたアミノ酸配列からなり、ここで前記タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーは、配列番号4に示された配列を有し、；そして

C末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P-3 の、または、その生物学的に活性なフラグメントの、C末端ドメインのアミノ酸配列からなり、ここで前記野生型ヒト I G F B P-3 の生物学的に活性なフラグメントのC末端ドメインは、I G F-I、I G F-I I、ヘパリンおよびA L S (酸不安定サブユニット、Acid Labile Subunit) に結合する野生型ヒト I G F B P-3 のC末端ドメインの能力を保持する、
 前記 I G F B P-3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 2】

I G F B P-3 が、

10

20

野生型ヒト I G F B P - 3 の N 末端ドメインのアミノ酸配列が配列番号 1 に示された通りであり；

野生型ヒト I G F B P - 3 の中間ドメインのアミノ酸配列が配列番号 2 に示された通りであり；そして

野生型ヒト I G F B P - 3 の C 末端ドメインのアミノ酸配列が配列番号 3 に示された通りである、請求項 1 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 3】

I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体に対して融合した、免疫グロブリン I g G 1 F c フラグメントをさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 4】

I G F - I のアミノ酸配列をさらに含む、I G F - I が I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と複合体を形成している、請求項 1 又は 2 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 5】

I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体の C 末端ドメインの末端に共有結合した B i r A 酵素基質をさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 6】

B i r A 酵素基質が配列番号 6 に示された配列を有する、請求項 5 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 7】

B i r A 酵素基質に共有結合したビオチンをさらに含む、請求項 5 または請求項 6 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 8】

I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体に対して融合した、S e A P（分泌型アルカリホスファターゼ）のアミノ酸配列をさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体。

【請求項 9】

癌および増殖網膜症から選択された疾患の処置のための医薬品を製造するための請求項 1 ～ 3、5 および 6 のいずれか 1 項記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体の使用。

【請求項 10】

成長ホルモン抵抗性、I G F - I 欠乏症、重度の熱傷、H I V 消耗、嚢胞性線維症、セリアック病、神経性食欲不振症、筋肉消耗疾病、筋緊張性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、骨粗鬆症、重度のインスリン抵抗性、I 型糖尿病、I I 型糖尿病、脳虚血、心虚血、および移植からなる群より選択された疾患の処置のための医薬品を製造するための請求項 4 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体の使用。

【請求項 11】

治療有効量の請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と、薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項 12】

生物学的試料中の p r o - I G F - I I 濃度を決定するための方法であって、前記方法は、

生物学的試料を、請求項 8 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と接触させて、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と、生物学的試料中に存在するあらゆる p r o - I G F - I I との間の複合体の形成を可能とさせる工程、ここで、p r o - I G F - I I は I G F - I I の部分的にプロセシングされた形態である；および

複合体における S e A P のアルカリ活性を測定することによって、生物学的試料中の p r o - I G F - I I の濃度を決定する工程を含む、前記方法。

【請求項 13】

請求項 8 記載の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と、アルカリ活性を測定するための

10

20

30

40

50

少なくとも1つの試薬とを含むキット。

【請求項14】

N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含むIGFBP-3ポリペプチド誘導体であって、

N末端ドメインは、野生型ヒトIGFBP-3の、または、その生物学的に活性なフラグメントの、配列番号1に示されたN末端ドメインのアミノ酸配列からなり、ここで前記野生型ヒトIGFBP-3の生物学的に活性なフラグメントのN末端ドメインは、IGF-I及びIGF-IIに結合する野生型ヒトIGFBP-3のN末端ドメインの能力を保持し、；

中間ドメインは、野生型ヒトIGFBP-3の中間ドメインの配列番号2に示されたアミノ酸配列の85個又は85個超の連続したアミノ酸残基がタンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーで置換されたアミノ酸配列からなり、ここで前記タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーは、配列番号4に示された配列を有し、；そして

C末端ドメインは、野生型ヒトIGFBP-3の、または、その生物学的に活性なフラグメントの、配列番号3に示されたC末端ドメインのアミノ酸配列からなり、ここで前記野生型ヒトIGFBP-3の生物学的に活性なフラグメントのC末端ドメインは、IGF-I、IGF-IIおよびヘパリンに結合する野生型ヒトIGFBP-3のC末端ドメインの能力を保持し、

配列番号3におけるアミノ酸残基43～47が、ALSに結合しないAGSG（配列番号5）またはその任意の変異体で置換されている、
前記IGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項15】

IGFBP-3ポリペプチド誘導体に対して融合した、免疫グロブリンIgG1Fcフラグメントをさらに含む、請求項14記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項16】

IGF-Iのアミノ酸配列をさらに含み、IGF-IがIGFBP-3ポリペプチド誘導体と複合体を形成している、請求項14記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項17】

IGFBP-3ポリペプチド誘導体のC末端ドメインの末端に共有結合したBirA酵素基質をさらに含む、請求項14記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項18】

BirA酵素基質が配列番号6に示された配列を有する、請求項17記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項19】

BirA酵素基質に共有結合したビオチンをさらに含む、請求項17または請求項18記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項20】

IGFBP-3ポリペプチド誘導体に対して融合した、SeAP（分泌型アルカリホスファターゼ）のアミノ酸配列をさらに含む、請求項14項記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体。

【請求項21】

癌および増殖網膜症から選択された疾患の処置のための医薬品を製造するための請求項14、15、17および18記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体の使用。

【請求項22】

成長ホルモン抵抗性、IGF-I欠乏症、重度の熱傷、HIV消耗、嚢胞性線維症、セリアック病、神経性食欲不振症、筋肉消耗疾病、筋緊張性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、骨粗鬆症、重度のインスリン抵抗性、I型糖尿病、II型糖尿病、脳虚血、心虚血、および移植からなる群より選択された疾患の処置のための医薬品を製造するための請求項16記載のIGFBP-3ポリペプチド誘導体の使用。

【請求項23】

10

20

30

40

50

治療有効量の請求項 14～18 のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの I G F B P－3 ポリペプチド誘導体と、薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項 24】

生物学的試料中の p r o－I G F－I I 濃度を決定するための方法であって、前記方法は、

生物学的試料を、請求項 20 記載の I G F B P－3 ポリペプチド誘導体と接触させて、I G F B P－3 ポリペプチド誘導体と、生物学的試料中に存在するあらゆる p r o－I G F－I I との間の複合体の形成を可能とさせる工程、ここで、p r o－I G F－I I は I G F－I I の部分的にプロセシングされた形態である；および

複合体における S e A P のアルカリ活性を測定することによって、生物学的試料中の p r o－I G F－I I の濃度を決定する工程を含む、前記方法。

【請求項 25】

請求項 20 記載の I G F B P－3 ポリペプチド誘導体と、アルカリ活性を測定するための少なくとも 1 つの試薬とを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2011 年 2 月 24 日に提出された欧州特許出願第 E P 1 1 3 0 5 1 9 7、3 号の優先権を主張し、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の背景

I G F（インスリン様成長因子）系は、細胞がその生理学的環境と情報交換するために使用する、十分に特徴付けられたポリペプチドのセットからなる。この系は、2 つの細胞表面レセプター（I G F 1 R および I G F 2 R）、2 つのペプチド性リガンド（I G F－I および I G F－I I）、6 つの高親和性 I G F 結合タンパク質ファミリー（I G F B P－1～6）、並びに関連した I G F B P 分解酵素（まとめてプロテアーゼと呼ばれる）を含む。I G F シグナル伝達経路は、哺乳動物の身長増加に主要な役割を果たしているだけでなく、細胞の増殖および生存にも関与している。成長ホルモン（GH）は多くの組織において I G F－I 産生の主要なレギュレーターであるが、I G F は、ほぼ遍在的に産生され、そして血清中において I G F B P とほぼ結合して高い濃度で循環している。I G F が、そのチロシンキナーゼ細胞表面レセプターである I G F 1 R との会合を通してその効果を発揮するためには、それらはまず、I G F B P と形成された複合体から解離しなければならず、I G F－I および I G F－I I に対する I G F B P の親和性は、時に I G F 1 R よりも高い。従って、レセプター－リガンド相互作用は、「遊離」I G F レベルに高度に依存し、前記レベルは、血清および他の生物学的液体中に存在する I G F B P によって堅固に調節されている。それ故、I G F と I G F B P の相互作用は、制御されない細胞増殖または低血糖などの望ましくない I G F 作用を防ぐことができる。逆に、I G F／I G F B P 複合体の破壊は、I G F レセプターを通して I G F がその分裂促進作用および代謝作用を発揮するためのほぼ確実な必要条件である。

【0003】

調節不全の I G F シグナル伝達経路は、数多くの悪性腫瘍の発病、並びに、化学療法剤へのその耐性における主要なプレーヤーとして出現した（Samani et al., Endocr. Rev., 2006, 24: 24）。この経路において増加した活性は、R a s／M A P K／E R K 経路の活性化を介して細胞の増殖を促進し、そして P I 3 キナーゼシグナル伝達経路の活性化を通してアポトーシス促進性のシグナルに対抗する。これらの理由のために、I G F の活性を減少させるために I G F シグナル伝達経路をターゲティングすることは、現代の医学研究の大きな挑戦となっている（Yuen および Macaulay, Expert. Opin. Ther. Targets, 2008, 12: 589-603）。

10

20

30

40

50

【0004】

さらに、特定の組織への IGF の供給を改変することは、IGF 欠乏症に因る低身長症、I 型および II 型糖尿病、しかしまた変性疾病、例えば筋緊張性ジストロフィー (Heat wole et al., Arch. Neurol., 2011, 68: 37-44)、筋萎縮性側索硬化症神経変性 (Gober dhan et al., Differentiation, 2003, 71: 375-397) および血管増殖網膜症、例えば糖尿病合併症、未熟および加齢およびさらには動脈硬化症を含む、多種多様なヒト疾病の経過を制御することを助け得る。さらに、生物学的に利用可能な IGF の急性増加は、火傷、脳虚血または心虚血、消耗症候群および骨密度の減少を患う患者に有益であり得る (Clemmons, Nat. Rev. Drug Discov., 2007, 6: 821-833)。

【0005】

血中の IGF-I および IGF-II の濃度は、少なくとも部分的には、IGFBP のレベルによって間接的に決定される。インスリン様成長因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) は、血中において最も豊富な IGFBP であり、そして IGF-I および IGF-II に対して最も高い親和性を有し、そしてそれ故、血流における主要な IGF の貯蔵庫である (Jones および Clemmons, Endocr. Rev., 1995, 16: 3-34)。IGFBP-3 は、IGF の捕捉および輸送におけるその役割に加えて、それ自体の生物学的作用を有し得る。その 5 つの IGFBP 同属種と同じように、IGFBP-3 は、ほぼ同じサイズの 3 つのドメインからなり、その中で N 末端ドメインおよび C 末端ドメインのみが IGF 結合に参与している (Sitar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 13028-13033)。ゆるく構築された中間ドメインは、その機能のいくつかに極めて重要なタンパク質分解的開裂のターゲットである (Fowlkes et al., Endocrinology, 2004, 145: 620-626)。IGFBP 分解プロテアーゼは、IGF/IGFBP-3 複合体からの IGF の遊離を誘導し、これにより IGF が生物学的作用のために利用可能となる。さらに、特定の遊離 IGFBP はまた、プロテアーゼによっても作用を受け得、これにより、IGF に対する親和性が低下する。

【0006】

IGF シグナル伝達経路をターゲティングするためにいくつかのアプローチが使用されており、これには、(1) リガンド特異的抗体 (Goya et al., Cancer Res., 2004, 64: 6252-6258) または成長ホルモン (GH) アンタゴニスト (Divisova et al., Breast Cancer Res. Treat., 2006, 98: 315-327) を使用した IGF-1 のレベルまたは生物活性の低減、および (2) (a) Pfizer (CP-751871 - Lacy et al., J. Clin. Oncol., 2008, 26: 3196-3203; Haluska et al., Clin. Cancer Res., 2007, 13: 5834-5840; De Bono et al., Clin. Cancer Res., 2007, 13: 3611-3616)、Amgen (AMG479 - Tolcher et al., J. Clin. Oncol., 2007, 25: 3002; Sarantopoulos et al., J. Clin. Oncol., 2008, 26: 3583)、Sanofi-Aventis (AVE1642 - Tolcher et al., J. Clin. Oncol., 2008, 25: 3582)、Imclone (A12 - Higano et al., J. Clin. Oncol., 2007, 25: 3505)、Merck (MK0646 - Hidalgo et al., J. Clin. Oncol., 2008, 26: 3520; Atzori et al., J. Clin. Oncol., 2008, 26: 3519) および Roche (R1507 - Rodon et al., J. Clin. Oncol., 2007, 26: 3590) によって開発された抗 IGF1R 抗体などのレセプター特異的抗体、または (b) 小分子チロシンキナーゼ阻害剤 (Haluska et al., Cancer Res., 2006, 66: 362-371; Ji et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 2158-2167; Zimmermann et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18: 4075-4080; Mulvihill et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 16: 1359-1375; Hofmann et al., Drug Discov. Today, 2005, 10:1041-1047; Vasilcanu et al., Oncogene, 2008, 27: 1629-1638) を使用した IGF レセプター機能の阻害が含まれる。

【0007】

組換え IGF-I (メカセルミンと呼ばれる、商品名: Tercica, Inc. による Increlex (商標)) の投与は、適応された場合、低血糖などの望ましくない副作用、遊離 IGF-I の短い半減期および同時に内因性 IGFBP に因る低下した効力により妨害される。組換えヒト IGF-1 (rh IGF-1) のこれらの副作用を減少させつつ半減期を増加さ

10

20

30

40

50

せる試みにおいて、等モル量の r h I G F - 1 および組換えヒト I G F B P - 3 (r h I G F B P - 3) (メカセルミンリンファベート (rinfabate)、商品名: Insmad Corp. による SomatoKine (商標) または Iplex (商標)) からなる複合体の投与からなるアプローチが開発された。r h I G F - 1 / r h I G F B P - 3 複合体の効力は、重度のインスリン抵抗性 (Regan et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., May 2010, 95: 2113-2122)、成長ホルモン非感受性症候群 (Kemp et al., Endocr. & Metabol., 2006, 15: 409-415; Tonella et al., Horm. Res. Paediatr., Feb. 2010, 73: 140-147)、1型糖尿病 (Clemmons et al., J. Clin. Endocrin. Metab., 2000, 85: 1518-1524)、2型糖尿病 (Clemmons et al., J. Clin. Endocrin. Metab., 2005, 90: 6561-6568)、骨粗鬆症 (Boonen et al., Endocrinol. Metab., 2002, 87: 1593-1599)、火傷 (Jeschke et al., Mol. Med., 2002, 8: 238-246)、1型筋緊張性ジストロフィー (Heatwole et al., Arch. Neurol., Sept. 2010) を有する被験体、並びに低出生体重児 (Iniguez et al., Clin. Endocrinol., 2006, 65: 687-392) において試験された。

10

【0008】

これらの研究は、それらが治療目的のために I G F - I を送達するというこのアプローチの有用性を実証することを促す。

【0009】

発明の要約

本発明は、種々の治療的および／または診断的適用において有用である I G F B P - 3 の誘導体に関する。

20

【0010】

特に、1つの局面において、本発明は、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であり、そして野生型 I G F B P - 3 の対応する結合親和性と同一または実質的に類似した I G F - I、I G F - I I、ヘパリンおよび A L S (酸不安定サブユニット、Acid Labile Subunit) に対する結合親和性を示す、I G F B P - 3 誘導体を提供する。

【0011】

より特定すると、本発明は、N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含む I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体を提供し、(i) N末端ドメインは、野生型 I G F B P - 3 の、その生物学的に活性な変異体の、またはその生物学的に活性なフラグメントの、N末端ドメインのアミノ酸配列を含み；(ii) 中間ドメインは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーを含み；そして(iii) C末端ドメインは、野生型 I G F B P - 3 の、その生物学的に活性な変異体の、またはその生物学的に活性なフラグメントの、C末端ドメインのアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

特定の態様において、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体の中間ドメインは、野生型 I G F B P - 3 の中間ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなり、前記アミノ酸配列の一部は、タンパク質分解ドメインに対して抵抗性のあるリンカーで置換されている。

【0013】

特定の態様において、I G F B P - 3 は、ヒト I G F B P - 3 であり、そして(i) 野生型 I G F B P - 3 のN末端ドメインのアミノ酸配列は配列番号1に示された通りであり；(ii) 野生型 I G F B P - 3 の中間ドメインのアミノ酸配列は配列番号2に示された通りであり；そして(iii) 野生型 I G F B P - 3 のC末端ドメインのアミノ酸配列は配列番号3に示された通りである。

40

【0014】

特定の態様において、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のある配列番号4に示された配列またはその任意の変異体を有する。

【0015】

関連した局面において、本発明は、野生型 I G F B P - 3 のそれぞれの結合親和性と同

50

一または実質的に類似した I G F - I、I G F - I I およびヘパリンに対する結合親和性を示すが、A L S には結合しない、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のある I G F B P - 3 誘導体を提供する。より特定すると、このような I G F B P - 3 誘導体は、配列番号 3 におけるアミノ酸残基 4 3 ~ 4 7 が、A L S に結合しない A G G S G (配列番号 5) またはその任意の変異体で置換されている以外は、本明細書において定義した通りである。

【0016】

別の関連した局面において、本発明は、I G F に対する増加した親和性および延長された血漿中半減期を有する、I G F B P - 3 誘導体を提供する。より特定すると、このような I G F B P - 3 誘導体は、本明細書において定義した通りであり、そしてさらに、それ

10

【0017】

別の関連した局面において、本発明は、I G F - I のアミノ酸配列をさらに含む I G F B P - 3 誘導体を提供する。より特定すると、このような I G F B P - 3 誘導体において、I G F - I は、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と複合体を形成している。特定の好ましい態様において、I G F - I のアミノ酸配列は、ヒト I G F - I のアミノ酸配列である。

【0018】

さらに別の関連した局面において、本発明は、B i r A 酵素によるビオチニル化を受け入れられる I G F B P - 3 誘導体を提供する。より特定すると、このような I G F B P - 3 誘導体は、本明細書において定義した通りであり、そしてさらに、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体の C 末端ドメインの末端に共有結合した B i r A 酵素基質を含む。特定の態様において、B i r A 酵素基質は、配列番号 6 に示された配列を有する。特定の態様において、I G F B P - 3 誘導体はさらに、B i r A 酵素基質に共有結合したビオチンを含む。

20

【0019】

さらに別の関連した局面において、本発明は、I G F - I および I G F - I I の両方に対して高い親和性を付与された安定なレポータータンパク質である I G F B P - 3 誘導体を提供する。より特定すると、このような I G F B P - 3 誘導体は、本明細書において定義した通りであり、そしてさらに、それに対して融合した、S e A P (分泌型アルカリホスファターゼ) のアミノ酸配列を含む。

30

【0020】

本発明の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体は、種々の治療処置において有用であり得る。従って、特定の態様において、本明細書に記載された I G F B P - 3 誘導体 (I G F - I のアミノ酸配列と会合したものを除く) は、癌および血管増殖網膜症から選択された疾患の処置における使用のために提供される。他の態様において、I G F - I のアミノ酸配列と会合した I G F B P - 3 誘導体は、成長ホルモン抵抗性、I G F - I 欠乏症、重度の火傷、H I V 消耗、嚢胞性線維症、セリアック病、神経性食欲不振症、筋肉消耗疾病、筋緊張性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、骨粗鬆症、重度のインスリン抵抗性、I 型糖尿病、I I 型糖尿病、脳虚血、心虚血、および移植からなる群より選択された疾患の処置において使用するために提供される。

40

【0021】

関連した局面において、本発明は、被験体における疾患の処置法を提供し、前記方法は、有効量の本発明の I G F B P - 3 誘導体を被験体に投与する工程を含む。被験体への本発明の I G F B P - 3 誘導体の投与は、例えば、非経口、エアゾール、経口、眼内および局所経路を含む、任意の適切な経路により得る。本発明の I G F B P - 3 誘導体は、単独で、または任意の追加の治療剤または手順と組み合わせて投与され得る。特定の態様において、処置しようとする疾患は、癌および増殖網膜症からなる群より選択される。他の態様において、処置しようとする疾患は、成長ホルモン抵抗性、I G F - I 欠乏症、重度の火傷、H I V 消耗、嚢胞性線維症、セリアック病、神経性食欲不振症、筋肉消耗疾病、筋

50

緊張性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、骨粗鬆症、重度のインスリン抵抗性、I型糖尿病、II型糖尿病、脳虚血、神経変性状態（例えばアルツハイマー病）、心虚血、未熟児網膜症、および移植からなる群より選択される。

【0022】

本発明のIGFBP-3誘導体は、それ自体または薬学的組成物として投与され得る。従って、別の局面において、本発明は、癌および増殖網膜症からなる群より選択された疾患の処置のための、または成長ホルモン抵抗性、IGF-I欠乏症、重度の火傷、HIV消耗、嚢胞性線維症、セリアック病、神経性食欲不振症、筋肉消耗疾病、筋緊張性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、骨粗鬆症、重度のインスリン抵抗性、I型糖尿病、II型糖尿病、脳虚血、心虚血および移植からなる群より選択された疾患の処置のための、医薬品、薬学的組成物または薬学的キットの製造のための本発明のIGFBP-3誘導体の使用を提供する。

10

【0023】

関連した局面において、本発明は、有効量の本発明のIGFBP-3誘導体および少なくとも1つの生理学的に許容される担体または賦形剤を含む、薬学的組成物を提供する。特定の態様において、薬学的組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤と組み合わせての投与に適応される。他の態様において、薬学的組成物はさらに、少なくとも1つの追加の治療剤を含む。

【0024】

別の局面において、本発明は、生物学的試料中のpro-IGF-II濃度を決定するための方法を提供し、前記方法は、

20

生物学的試料を、IGFBP-3ポリペプチド誘導体に対して融合したSeAPのアミノ酸配列を含むIGFBP-3ポリペプチド誘導体と接触させ、これにより、IGFBP-3誘導体と、生物学的試料中に存在するあらゆるpro-IGF-IIとの間の複合体の形成を可能とさせる工程、ここで、pro-IGF-IIは、IGF-IIの部分的にプロセッシングされた形態である；および

複合体中のSeAPのアルカリ活性を測定することによって、生物学的試料中のpro-IGF-IIの濃度を決定する工程を含む。

【0025】

30

関連した局面において、本発明は、IGFBP-3ポリペプチド誘導体に対して融合したSeAPのアミノ酸配列を含むIGFBP-3ポリペプチド誘導体およびアルカリ活性を測定するための少なくとも1つの試薬を含むキットを提供する。

【0026】

本発明のこれらおよび他の目的、利点および特徴は、以下の好ましい態様の詳細な説明を読んだ当業者には明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、部位特異的突然変異誘発によってH6-ミニ-IGFBP-3をコードする突然変異プラスミド(pDB3s-H6-IGFBP-3)（下のパネル）を生成するための鋳型としてその後使用されたpDB3s-H6-IGFBP-3プラスミド（上のパネル）の制限酵素地図を示す。前者のプラスミドは、図2に輪郭を描いたミニ-IGFBP-3タンパク質をコードする。

40

【図2A】図2(A)は、野生型(H6-IGFBP-3)および突然変異組換えIGFBP-3(ミニ-IGFBP-3)の図解である。図2(B)は、H6-IGFBP-3およびミニ-IGFBP-3ムテインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。N末端ドメインは青で、中間ドメインは灰色で、そしてC末端ドメインはオレンジ色で提示されている。ヘキサヒスチジン精製配列は緑色で提示され、そして可能性あるN-グリコシル化部位は旗印によって表されている。

【図2B】図2(A)は、野生型(H6-IGFBP-3)および突然変異組換えIGF

50

B P-3 (ミニ-IGFBP-3) の図解である。図2 (B) は、H6-IGFBP-3 およびミニ-IGFBP-3 ムテインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。N末端ドメインは青で、中間ドメインは灰色で、そしてC末端ドメインはオレンジ色で提示されている。ヘキサヒスチジン精製配列は緑色で提示され、そして可能性あるN-グリコシル化部位は旗印によって表されている。

【図3】図3は、表面プラスモン共鳴によって分析されたミニ-IGFBP-3 / IGF-1 I 複合体の会合および解離の動態を示したグラフである (実験の詳細については実施例2参照)。

【図4】図4は、トロンビンによるタンパク質分解に対する野生型IGFBP-3 (左) およびミニ-IGFBP-3 (右) の感受性を示したゲルを示す (実験の詳細については実施例2参照)。

10

【図5】図5は、部位特異的突然変異誘発によって得られたpRH-3s-avitag 導入ベクターの制限酵素地図を示し、そしてミニ-IGFBP-3 のコード配列が挿入されることにより、順にpRH-3s-H6-ミニ-IGFBP-3 ベクター、AcMNPV-ミニ-IGFBP-3 組換えウイルスおよびミニ-IGFBP-3-avitag 組換えタンパク質が産生される。

【図6】図6は、ターゲティングされた酵素的ビオチニル化後の組換えミニ-IGFBP-3-Avitag の電気泳動分析の結果を示す。左のパネル：精製された組換えH6-IGFBP-3 (A)、ミニ-IGFBP-3 (B)、ミニ-IGFBP-3-Avitag (C) がSDS-PAGEによって分析され、そしてクーマシーブリリアントブルーで染色された。右のパネル：精製されたミニ-IGFBP-3-Avitag は、ビオチンおよびBirA酵素を用いてのビオチニル化にかけられ、そして反応産物のアリコート (E)、前以て化学的にビオチニル化しておいたモノクローナル抗体 (7E8) (D) と並べてSDS-PAGEにローディングした。実験の詳細については実施例3を参照されたい。

20

【図7A】図7 (A) は、(a) 親ミニ-IGFBP-3 を産生するウイルスによって感染されたSf-9細胞の培養上清からの種々のタンパク質抽出物、(b) ミニ-IGFBP-3-Avitag を産生するウイルスによって感染されたSf-9細胞の培養上清からの種々のタンパク質抽出物、および(c) 精製されたミニ-IGFBP-3-Avitag の電気泳動分析を示す。図7 (B) は、ターゲティングされたBirAによるビオチニル化後のタンパク質抽出物の電気泳動分析、SDS-PAGEによる分離、PVDF膜への転写、ストレプトアビジン-APとのインキュベーション、およびNBT/BCIPの添加によるAPase活性を示す。レーンc、dおよびeはビオチニル化レーンa、bおよびcにそれぞれ対応する。図7 (C) において、PBSに対する十分な透析後、ミニ-IGFBP-3-Avitag-ビオチン (レーンe) を含む粗培養培地をストレプトアビジンチップに注入した。1M NaClで洗浄した後、6E8抗IGFBP-3モノクローナル抗体を含む溶液およびIGF-1 Iを含む溶液を順次注入した。

30

【図7B】図7 (A) は、(a) 親ミニ-IGFBP-3 を産生するウイルスによって感染されたSf-9細胞の培養上清からの種々のタンパク質抽出物、(b) ミニ-IGFBP-3-Avitag を産生するウイルスによって感染されたSf-9細胞の培養上清からの種々のタンパク質抽出物、および(c) 精製されたミニ-IGFBP-3-Avitag の電気泳動分析を示す。図7 (B) は、ターゲティングされたBirAによるビオチニル化後のタンパク質抽出物の電気泳動分析、SDS-PAGEによる分離、PVDF膜への転写、ストレプトアビジン-APとのインキュベーション、およびNBT/BCIPの添加によるAPase活性を示す。レーンc、dおよびeはビオチニル化レーンa、bおよびcにそれぞれ対応する。図7 (C) において、PBSに対する十分な透析後、ミニ-IGFBP-3-Avitag-ビオチン (レーンe) を含む粗培養培地をストレプトアビジンチップに注入した。1M NaClで洗浄した後、6E8抗IGFBP-3モノクローナル抗体を含む溶液およびIGF-1 Iを含む溶液を順次注入した。

40

【図7C】図7 (A) は、(a) 親ミニ-IGFBP-3 を産生するウイルスによって感

50

染された S f - 9 細胞の培養上清からの種々のタンパク質抽出物、(b) ミニー I G F B P - 3 - a v i t a g を産生するウイルスによって感染された S f - 9 細胞の培養上清からの種々のタンパク質抽出物、および(c) 精製されたミニー I G F B P - 3 - a v i t a g の電気泳動分析を示す。図 7 (B) は、ターゲティングされた B i r A によるビオチニル化後のタンパク質抽出物の電気泳動分析、S D S - P A G E による分離、P V D F 膜への転写、ストレプトアビジン-AP とのインキュベーション、および N B T / B C I P の添加による A P a s e 活性を示す。レーン c、d および e はビオチニル化レーン a、b および c にそれぞれ対応する。図 7 (C) において、P B S に対する十分な透析後、ミニー I G F B P - 3 - a v i t a g - ビオチン (レーン e) を含む粗培養培地をストレプトアビジンチップに注入した。1 M N a C l で洗浄した後、6 E 8 抗 I G F B P - 3 モノ

10

【図 8 A】図 8 (A) は、S e A P - ミニー I G F B P - 3 リポーター融合タンパク質を産生するために構築された p M J - S e A P - ミニー I G F B P - 3 導入ベクターの制限酵素地図を示す。図 8 (B) は、ヒト血漿中の p r o - I G F - I I 濃度を決定するために開発された固相「サンドイッチ」アッセイの図解である。図 8 (C) は、健康成人、非

【図 8 B】図 8 (A) は、S e A P - ミニー I G F B P - 3 リポーター融合タンパク質を産生するために構築された p M J - S e A P - ミニー I G F B P - 3 導入ベクターの制限酵素地図を示す。図 8 (B) は、ヒト血漿中の p r o - I G F - I I 濃度を決定するために開発された固相「サンドイッチ」アッセイの図解である。図 8 (C) は、健康成人、非

20

【図 8 C】図 8 (A) は、S e A P - ミニー I G F B P - 3 リポーター融合タンパク質を産生するために構築された p M J - S e A P - ミニー I G F B P - 3 導入ベクターの制限酵素地図を示す。図 8 (B) は、ヒト血漿中の p r o - I G F - I I 濃度を決定するために開発された固相「サンドイッチ」アッセイの図解である。図 8 (C) は、健康成人、非

30

【図 9 A】図 9 (A) は、ミニー I G F B P - 3 - F c I g G 1 融合タンパク質を産生するために構築された p Y M - ミニー I G F B P - 3 導入ベクターの制限酵素地図を示す。図 9 (B) は、得られたイムノアドヘシンの図解である。

【図 9 B】図 9 (A) は、ミニー I G F B P - 3 - F c I g G 1 融合タンパク質を産生するために構築された p Y M - ミニー I G F B P - 3 導入ベクターの制限酵素地図を示す。図 9 (B) は、得られたイムノアドヘシンの図解である。

【図 10 A】図 10 (A) は、I G F - I I に対するミニー I G F B P - 3 およびミニー I G F B P - 3 - F c の相対的な結合親和性を示したグラフである。使用した固相アッセイは、漸増濃度の遊離 I G F - I I が、支持体上に固定されたミニー I G F B P - 3 およびミニー I G F B P - 3 - F c へのビオチニル化 I G F - I I トレーサの結合を置換する能力を測定した (実験の詳細については実施例 5 参照)。図 10 (B) は、10 % F C S の存在下で培養した 3 つのヒト腫瘍細胞株: H e p 3 B、H u H 7 および I N A - 6 の増殖および生存に対するミニー I G F B P - 3 - F c の効果を示したグラフである。ミニー I G F B P - 3 - F c の効果を、I G F - R シグナル伝達経路と干渉することが知られる化合物であるピクロポドフィリン (p p p) の効果と比較する (実験の詳細については実施例 5 参照)。

40

【図 10 B】図 10 (A) は、I G F - I I に対するミニー I G F B P - 3 およびミニー I G F B P - 3 - F c の相対的な結合親和性を示したグラフである。使用した固相アッセ

50

イは、漸増濃度の遊離 IGF-I が、支持体上に固定されたミニ-IGFBP-3 およびミニ-IGFBP-3-Fc へのビオチニル化 IGF-I トレーサの結合を置換する能力を測定した（実験の詳細については実施例 5 参照）。図 10（B）は、10% FCS の存在下で培養した 3 つのヒト腫瘍細胞株：He p 3 B、Hu H 7 および I N A - 6 の増殖および生存に対するミニ-IGFBP-3-Fc の効果を示したグラフである。ミニ-IGFBP-3-Fc の効果を、IGF-R シグナル伝達経路と干渉することが知られる化合物であるピクロポドフィリン（p p p）の効果と比較する（実験の詳細については実施例 5 参照）。

【図 11 A】図 11（A）は、I N A - 6 骨髄腫細胞における A K T のリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fc の阻害効果を示す。これらの効果を p p p のそれと比較する（実験の詳細については実施例 5 参照）。図 11（B）は、示されているような種々のインキュベーション時間後の、M i a P a C a - 2 細胞（左上）、H T - 2 9 細胞（右上）および A 5 4 9 細胞（左下）における A K T のリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fc の効果、および A 5 4 9 細胞（右下）における A K T のリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fc の効果を示したグラフである（実験の詳細については実施例 5 参照）。

【図 11 B】図 11（A）は、I N A - 6 骨髄腫細胞における A K T のリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fc の阻害効果を示す。これらの効果を p p p のそれと比較する（実験の詳細については実施例 5 参照）。図 11（B）は、示されているような種々のインキュベーション時間後の、M i a P a C a - 2 細胞（左上）、H T - 2 9 細胞（右上）および A 5 4 9 細胞（左下）における A K T のリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fc の効果、および A 5 4 9 細胞（右下）における A K T のリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fc の効果を示したグラフである（実験の詳細については実施例 5 参照）。

【図 12】図 12 は、マウス血漿中のミニ-IGFBP-3 誘導体濃度の減衰を示す。250 μg の示されたタンパク質を、時間 0 においてマウス群（n = 3）に静脈内注射した。血液試料を示された時点で採取し、遠心分離にかけ、そして凍結して保持した。注射されたタンパク質の濃度を、抗ヒト IGF-BP-3 特異的モノクローナル抗体を使用してインハウスサンドイッチ型 E L I S A によって決定した。

【図 13】図 13 は、H T - 2 9 ヒト結腸直腸腫瘍異種移植片を有するマウスに投与されたミニ-IGFBP-3 またはミニ-IGFBP-Fc を用いての 12 時間の処理の、腫瘍の重要なシグナル伝達パラメーターに対する in vivo における効果を示す（実験の詳細については実施例 6 参照）。

【0028】

定義

明細書全体を通して、以下の段落で定義されたいくつかの用語が使用される。

【0029】

本明細書において使用する「被験体」という用語は、ヒトまたは別の哺乳動物（例えば霊長類、マウス、ラット、ウサギなど）を指す。本発明の多くの態様において、被験体はヒトである。このような態様において、被験体はしばしば「個体」または「患者」と呼ばれる。「個体」および「患者」という用語は特定の年齢を示さない。

【0030】

「処置」という用語は、本明細書において、（1）疾病または状態の発症を遅延または予防すること；（2）疾病または状態の症状の進行、増悪または悪化を減速または停止させること；（3）疾病または状態の症状の寛解をもたらすこと；または（4）疾病または状態を治療することを目指した、方法または工程を特徴付けるために使用される。処置は、予防的作用（prophylactic action）または予防的作用（preventive action）のために疾病または状態の発症前に投与されてもよい。代替的にまたは追加的に、処置は、治療的作用のために疾病または状態の開始後に投与されてもよい。

【0031】

「薬学的組成物」は、本明細書において、有効量の本発明の少なくとも 1 つの IGF-BP-3 ポリペプチド誘導体および少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体または賦形剤

10

20

30

40

50

を含むとして定義される。

【0032】

本明細書において使用する「有効量」という用語は、その意図する目的、例えば細胞、組織、系または被験体における所望の生物学的または医学的応答などを満たすに十分な任意の量の化合物、薬剤、抗体または組成物を指す。

【0033】

「薬学的に許容される担体または賦形剤」という用語は、活性成分の生物学的活性の有効性に干渉せず、そしてそれが投与される濃度においては宿主に対して過度に毒性ではない、担体媒体 (medium) を指す。この用語は、溶媒、分散剤、媒体 (media)、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤、および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である (例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」, E.W. Martin, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0034】

タンパク質またはポリペプチドに言及して本明細書において使用する「単離された」という用語は、元々または操作によって、天然に会合したまたは最初に得られた時に会合していた少なくともいくつかの成分から分離されている、タンパク質またはポリペプチドを意味する。「単離された」によって、対象のタンパク質またはポリペプチドが、人間の手によって産生または合成されることを代替的にまたは追加的に意味する。

【0035】

「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は本明細書において同義語として使用され、そしてその中性 (非荷電) 形態でまたは塩としてのいずれかの、そして修飾されていないか、またはグリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化によって修飾されているかのいずれかである、多種多様な長さのアミノ酸配列を指す。特定の態様において、アミノ酸配列は完全長のネイティブなタンパク質である。他の態様において、アミノ酸配列は、完全長タンパク質のより小さなフラグメントである。さらに他の態様において、アミノ酸配列は、グリコシル単位、脂質または無機イオン、例えばホスフェートなどのアミノ酸側鎖に付着した追加の置換基、並びに、スルフヒドリル基の酸化などの鎖の化学的変換に関連した修飾によって修飾されている。従って、「タンパク質」という用語 (またはその等価な用語) は、その特異的な特性を有意に変化させない修飾を受けた、完全長のネイティブなタンパク質またはそのフラグメントのアミノ酸配列を含むことを意味する。特に、「タンパク質」という用語は、タンパク質アイソフォーム、すなわち、同じ遺伝子によってコードされているが、その pI または MW においてまたはその両方において異なっている変異体を包含する。このようなアイソフォームは、そのアミノ酸配列が異なり得るか (例えば、対立遺伝子変異、選択的スプライシングまたは限定タンパク質分解の結果として)、または代替的には、異なる翻訳後修飾から生じ得る (例えばグリコシル化、アシル化、リン酸化)。

【0036】

タンパク質またはタンパク質部分に言及して本明細書において使用する「類似体」という用語は、タンパク質もしくはタンパク質部分と類似もしくは同一の機能を有するが、タンパク質もしくはタンパク質部分のアミノ酸配列と類似もしくは同一のアミノ酸配列、またはタンパク質もしくはタンパク質部分と類似もしくは同一の構造を含む必要は必ずしもない、ポリペプチドを指す。好ましくは、本発明の脈絡において、タンパク質類似体は、タンパク質またはタンパク質部分のアミノ酸配列に対して少なくとも 30%、より好ましくは少なくとも 35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% または 99% 同一であるアミノ酸配列を有する。

【0037】

「タンパク質フラグメント」という用語は、タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも 5 つ連続したアミノ酸残基 (好ましくは少なくとも約 10、15、20、25、30、35

10

20

30

40

50

、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250またはそれ以上のアミノ酸残基)のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。タンパク質のフラグメントは、タンパク質の機能的活性を有していてもいなくてもよい。

【0038】

タンパク質またはタンパク質部分の変異体、類似体またはフラグメントを特徴付けるために本明細書において使用する「生物学的に活性」という用語は、タンパク質またはタンパク質部分と類似または同一の特性を示すに十分なタンパク質またはタンパク質部分とのアミノ酸配列の同一性または相同性を共有する分子を指す。例えば、本発明の多くの態様において、IGFBP-3のN末端ドメインの生物学的に活性なフラグメントは、IGF-I、IGF-II、ヘパリンおよびALSに結合するためのIGFBP-3のN末端ドメインの能力を保持したフラグメントである。同様に、IGFBP-3のC末端ドメインの生物学的に活性なフラグメントは、IGF-I、IGF-II、ヘパリンおよびALSに結合するためのIGFBP-3のC末端ドメインの能力を保持したフラグメントである。

10

【0039】

本明細書において使用する「相同」（または「相同性」）という用語は、「同一性」という用語と同義であり、そして2つのポリペプチド分子間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。両方の比較された配列中の位置が、同じ塩基または同じアミノ酸残基によって占有されている場合、それぞれの分子は、よって、その位置で相同である。2つの配列間の相同性の比率は、2つの配列によって共有される一致または相同な位置の数を、比較される位置の数で割り、そして100を乗じることに対応する。一般的に、最大の相同性が得られるように2つの配列をアラインさせて比較が行なわれる。相同なアミノ酸配列は、同一または類似したアミノ酸配列を共有する。類似の残基は、リファレンス配列中の対応するアミノ酸残基の保存的置換または「許容される点突然変異」である。リファレンス配列中の残基の「保存的置換」は、対応するリファレンス残基と物理的にまたは機能的に類似した、例えば、類似したサイズ、形状、電荷、化学的特性（共有結合または水素結合の形成能を含む）などを有する、置換である。特に好ましい保存的置換は、Dayhoff et al. (「Atlas of Protein Sequence and Structure」, 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22: 354-352)によって記載されたような「許容される点突然変異」について定義された基準を満たすものである。

20

30

【0040】

数値に言及して本明細書において使用する「約 (approximately)」および「約 (about)」という用語は、一般的に、特記しない限りまたはさもない限り内容から明らかでない限り、数値のいずれの方向（前記数値より大きいまたは前記数値より少ない）においても10%の範囲内に該当する数値を含む（このような数値が100%という可能な値を超える場合を除く）。

【0041】

特定の好ましい態様の詳細な説明

前記したように、本発明は、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるIGFBP-3ポリペプチド誘導体を提供する。これらのIGFBP-3誘導体は、種々の治療的および/または診断的適用において適用を見出し得る。

40

【0042】

I-IGFBP-3ポリペプチド誘導体

本発明によるIGFBP-3ポリペプチド誘導体は、一般的に、N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含み、(a) N末端ドメインは、野生型IGFBP-3の、その生物学的に活性な変異体の、またはその生物学的に活性なフラグメントの、N末端ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなり；(b) 中間ドメインは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーを含み；そして(c) C末端ドメインは、野生型IGFBP-3の、その生物学的に活性な変異体の、またはその生物学的に活性なフラグメントの、C末端ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそ

50

れからなる。

【0043】

I G F B P－3 または I G F B P－3 部分を特徴付けるために本明細書において使用する「野生型」という用語はその当技術分野において理解されている意味を有し、そして I G F B P－3 または I G F B P－3 部分の天然に存在する（またはネイティブな）配列を指す。本発明の特定の好ましい態様において、野生型 I G F B P－3 は野生型ヒト I G F B P－3 である。

【0044】

ヒト I G F B P－3

前記したように、I G F は、ほぼ全体が、I G F 利用能および作用の重要な決定因子である 6 個の特異的で高親和性の結合タンパク質（I G F B P－1～6）と会合して、ヒトの身体全体に存在している。血漿中の I G F－I の 90% 超が、同定された 6 個の I G F B P の中で最も豊富である I G F B P－3 と結合している。I G F B P－3 は、主要な循環担体タンパク質としての作用に加えて、多くの組織において産生され、ここで I G F 作用を調節するその能力を介しておよびまた直接的な内因性作用に因り、細胞機能に対して複数の効果を及ぼす。

【0045】

ヒトにおいては、I G F B P－3 は I G F B P 3 遺伝子によってコードされる。異なるアイソフォームをコードする選択的転写変異体の特徴付けられている。2つの選択的転写物が、アクセッションナンバー NP_000589.2 および NP_001013416.1 の下で知られている。

【0046】

従って、特定の態様において、本発明による I G F B P－3 誘導体の N 末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインのアミノ酸配列、すなわち、ヒトに天然に存在する任意の I G F B P－3 の N 末端ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなる。他の態様において、本発明による I G F B P－3 誘導体の N 末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインの生物学的に活性なフラグメントのアミノ酸配列、すなわち、I G F－I、I G F－I I、ヘパリンおよび A L S（酸不安定サブユニット）と結合する野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインの能力を保持した野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインのフラグメントのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなる。さらに他の態様において、本発明による I G F B P－3 誘導体の N 末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインの生物学的に活性な変異体のアミノ酸配列、すなわち、欠失、置換、付加および／または改変によって野生型ヒト I G F B P－3 とは異なるが、野生型ヒト I G F B P－3 に対するその全体的な配列類似性は、野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインと比較して、I G F－I、I G F－I I、ヘパリンおよび A L S に対して、より高くはないにしても、少なくとも同一または類似した結合親和性を示すようなものである、ポリペプチドのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなる。特定の好ましい態様において、野生型ヒト I G F B P－3 の N 末端ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 1 に示された通りである。

【0047】

同様に、特定の態様において、本発明による I G F B P－3 誘導体の C 末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P－3 の C 末端ドメインのアミノ酸配列、すなわち、ヒトに天然に存在する任意の I G F B P－3 の C 末端ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなる。他の態様において、本発明による I G F B P－3 誘導体の C 末端ドメインは、野生型ヒト I G F B P－3 の C 末端ドメインの生物学的に活性なフラグメントのアミノ酸配列、すなわち、I G F－I、I G F－I I、ヘパリンおよび A L S に結合する野生型ヒト I G F B P－3 の C 末端ドメインの能力を保持した野生型ヒト I G F B P－3 の C 末端ドメインのフラグメントのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなる。さらに他の態様において、本発明による I G F B P－3 誘導体の C 末端は、野生型ヒト I G F B P－3 の C 末端ドメインの生物学的に活性な変異体のアミノ酸配列、すなわち、欠

失、置換、付加および／または改変によって野生型ヒト I G F B P－3とは異なっているが、野生型ヒト I G F B P－3に対するその全体的な配列類似性は、野生型ヒト I G F B P－3と比較して、I G F－I、I G F－I I、ヘパリンおよびA L Sに対して、より高くないにしても、少なくとも同一または類似した結合親和性を示すようなものである、ポリペプチドのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなる。特定の好ましい態様において、野生型ヒト I G F B P－3のC末端ドメインのアミノ酸配列は、配列番号3に示された通りである。

【0048】

タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカー

本発明の I G F B P－3 誘導体は、タンパク質分解的開裂に対する抵抗性によって特徴付けられる。前記したように、野生型 I G F B P－3 の中間ドメインはゆるく構築され、そしてタンパク質分解的開裂のターゲットである。いくつかのプロテアーゼが I G F B P－3 を開裂することが示されており、これにはプラスミン、トロニン、カリクレイン、前立腺特異的抗原、マトリックスメタロプロテアーゼおよびカテプシンが挙げられる。I G F B P－3 のタンパク質分解は、I G F に対するその親和性を低下させ、従って、完全に結合した I G F に対する遊離 I G F の全体的な比は増加する。

【0049】

これに対し、本発明による I G F B P－3 誘導体は、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるように設計された。I G F B P－3 誘導体（またはリンカー）に言及して本明細書において使用する場合「タンパク質分解的開裂に対して抵抗性」という用語は、I G F B P－3 誘導体（またはリンカー）が、野生型 I G F B P－3 を開裂するプロテアーゼの存在下において *in vitro* および／または *in vivo* において有意な（すなわち検出可能な）酵素的分解を受けないことを意味する。当業者は、タンパク質分解的開裂に対するポリペプチドの感受性を試験および評価する方法を知っているだろう。

【0050】

本発明の I G F B P－3 誘導体によって示されるプロテアーゼの分解作用に対する抵抗性は、その中間ドメインがタンパク質分解的開裂に対して抵抗性となるように設計されているという事実から生じる。特定の態様において、中間ドメインは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるリンカーからなる。他の態様において、中間ドメインは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるリンカーを含む。例えば、本発明の I G F B P－3 誘導体の中間ドメインは、野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなり、前記アミノ酸配列の一部は、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるリンカーで置換されている。野生型 I G F B P－3 が野生型ヒト I G F B P－3 である態様において、野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列は、配列番号2に示された通りであり得る。

【0051】

一般的に、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるリンカーで置換された野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列の一部は、生じる I G F B P－3 誘導体の中間ドメインがタンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるようなものである。従って、好ましくは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるリンカーで置換された野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列の一部は、野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列の実質的な一部である。本明細書において使用する「野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列の実質的な一部」は、野生型 I G F B P－3 の全中間ドメインの少なくとも85%、または野生型 I G F B P－3 の全中間ドメインの少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、または90%超を指す。代替的にまたは追加的に、「野生型 I G F B P－3 の中間ドメインのアミノ酸配列の実質的な一部」は、I G F B P－3 の中間ドメインの85の連続したアミノ酸残基、または I G F B P－3 の中間ドメインの85超の連続したアミノ酸残基、例えば I G F B P－3 の中間ドメインの86、87、88、89、90、91または92の連続したアミノ酸残基を指す。

【0052】

本発明の脈絡において、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーは、野生型 I G F B P - 3 を開裂するプロテアーゼの存在下において *in vitro* および／または *in vivo* において全く有意な酵素的分解を受けない任意のポリペプチドであり得る。特定の好ましい態様において、リンカーは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のある配列番号 4 に示された配列または配列番号 4 の任意の変異体の配列を有する。

【0053】

特定の態様において、リンカーは、条件的タンパク質分解のエレメント、すなわち、特定の条件下でのみタンパク質分解を受ける実体を含み得る。タンパク質またはポリペプチドに条件的タンパク質分解を受けさせる戦略およびシステムは当技術分野において公知である。

10

【0054】

ミニ I G F B P - 3 誘導体

前記した I G F B P - 3 誘導体は、少なくとも 2 つの主要な特性を共有する：（１）それらはタンパク質分解的開裂に対して抵抗性である、そして（２）それらは、野生型 I G F B P - 3 の対応する結合親和性と同一、実質的に類似またはさらにはより高い、I G F - I、I G F - I I、ヘパリンおよび A L S に対する結合親和性を示す。本発明者らは、これらの I G F B P - 3 誘導体を「ミニ I G F B P - 3」と呼ぶ。

【0055】

本発明者らの計画の構築基盤または土台としてミニ I G F B P - 3 を使用して、本発明者らは、異なる特性および可能性ある適用を有する他の I G F B P - 3 誘導体を設計および開発した。

20

【0056】

ミニ I G F B P - 3 A L S - 誘導体

従って、1 つの局面において、本発明は、（１）タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であり、（２）野生型 I G F B P - 3 の対応する結合親和性と同一、実質的に類似またはさらにはより高い、I G F - I、I G F - I I およびヘパリンに対する結合親和性を示すが、（３）A L S には結合しない（または実質的に結合しない）、I G F B P - 3 誘導体を提供する。これらの I G F B P - 3 誘導体は、本明細書において、「ミニ I G F B P - 3 A L S -」誘導体と呼ばれる。

30

【0057】

このようなミニ I G F B P - 3 A L S - 誘導体は、一般的に、N 末端ドメイン、中間ドメインおよび C 末端ドメインを含み、（a）N 末端ドメインは、野生型 I G F B P - 3 の、その生物学的に活性な変異体の、またはその生物学的に活性なフラグメントの、N 末端ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなり；（b）中間ドメインは、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性のあるリンカーを含み；そして（c）C 末端ドメインは、野生型 I G F B P - 3 の、その生物学的に活性な変異体の、またはその生物学的に活性なフラグメントの、C 末端ドメインのアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれからなり、A L S に結合する C 末端ドメインの一部は、A L S に結合しない A G G S G（配列番号 5）または配列番号 5 の任意の変異体で置換されている。

40

【0058】

野生型 I G F B P - 3 が野生型ヒト I G F B P - 3 であり、そして野生型ヒト I G F B P - 3 の C 末端ドメインのアミノ酸配列が配列番号 3 に示した通りである態様において、配列番号 3 におけるアミノ酸残基 43～47 は、A L S に結合しない A G G S G（配列番号 5）またはその任意の変異体で置換されている。

【0059】

ミニ I G F B P - 3 - F c 誘導体

本発明はまた、（１）タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であり、（２）野生型 I G F B P - 3 の対応する親和性よりも高い、I G F - I および／または I G F - I I に対する結合親和性を示し、そして（３）野生型 I G F B P および／または他のミニ I G F B

50

P-3 誘導体の血漿中半減期よりも長い血漿中半減期を有する、IGFBP-3 誘導体を提供する。これらのIGFBP-3 誘導体は、「ミニ-IGFBP-3-Fc」誘導体と呼ばれる。

【0060】

実際に、本発明のミニ-IGFBP-3-Fc 誘導体は、本明細書において定義したようなN末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインに加えて、それに対して融合した免疫グロブリンIgG1 Fcフラグメントを含む。「免疫グロブリンIgG1 Fcフラグメント」という用語は、本明細書において、その当技術分野において理解されている意味を有し、そしてヒト血清中で最も豊富であるグロブリンタンパク質のIgG1クラスの抗体の結晶化可能なフラグメント領域を指す。好ましくは、免疫グロブリンIgG1 Fcフラグメントは、IGFBP-3-Fc 誘導体のC末端ドメインの末端に融合している。特定の態様において、IgG1 Fcフラグメントの各「アーム」（すなわち、Fcフラグメントを構成する2つの同一のポリペプチドの各々）は、ミニ-IGFBP-3 誘導体のC末端ドメインの末端に融合している。結果として、本発明はまた、2つのミニ-IGFBP-3-Fc 誘導体に融合した免疫グロブリンIgG1 Fcフラグメントを含む融合タンパク質を提供する。本発明者らは、このような融合タンパク質（実施例の章を参照）が、IgG1 Fcフラグメントに融合していないIGFBP-3 誘導体よりも7倍高い、見かけの親和性IC₅₀を有することを発見した。

10

【0061】

当業者によって理解されるであろうように、「ミニ-IGFBP-3-Fc」融合タンパク質のミニ-IGFBP-3部分は、前記したように、ALSへの結合を全く示さない（または有意ではない結合しか示さない）ように改変されていても改変されていなくてもよい。

20

【0062】

ミニ-IGFBP-3 / IGF-I 複合体

本発明はまた、タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であるIGFBP-3 / IGF-I 複合体を提供する。

【0063】

このようなIGFBP-3 / IGF-I 複合体は、一般的に、本明細書において定義したようなN末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含み、そしてさらに、IGF-Iのアミノ酸配列を含み、IGF-Iは、IGFBP-3ポリペプチド誘導体と複合体を形成している。本明細書において使用する「IGF-I」という用語はその当技術分野において理解されている意味を有し、そしてヒトにおいてはIGF1遺伝子（アクセッションナンバーNP_0011004753、NP_001104754、およびNP_000609）によってコードされるインスリン様成長因子1と呼ばれる小さなタンパク質（約7,500 kDa）を指す。

30

【0064】

IGF-Iは、3つの分子内ジスルフィド橋を有する一本鎖のアミノ酸からなる。それは最初は生物学的に不活性なpro-IGF-Iペプチドとして合成され、これは続いて調節されたエンドタンパク質分解的開裂を受けて成熟形となる。本発明の脈絡において、IGF-Iのアミノ酸配列は、好ましくは、野生型ヒトIGF-I（すなわち、ヒトに天然に存在する任意のIGF-I）またはその生物学的に活性なフラグメントまたはその生物学的に活性な変異体のアミノ酸配列を含む（または代替的にそれからなる）。野生型ヒトIGF-Iの適切な生物学的に活性なフラグメントおよび変異体は、野生型ヒトIGF-Iの生物学的特性（特にIGFBP-3およびIGF-1Rへの結合）を保持したフラグメントおよび変異体を包含する。

40

【0065】

IGFBP-3 / IGF-I 複合体において、IGFBP-3 誘導体およびIGF-Iは、非共有結合によって会合している。非共有結合的相互作用は、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力および疎水性相互作用を含む。一般的に、IGFBP-3 / IGF

50

F-I複合体において、IGFBP-3誘導体およびIGF-Iは、(生体内に)天然に存在するIGFBP-3/IGF-I複合体と同一または類似した様式で会合している。

【0066】

特定の態様において、本発明のミニ-IGFBP-3:IGF-I複体のリンカーは、同義の条件的タンパク質分解の要素を含む。例えば、条件的タンパク質分解の要素は、IGF-Iのターゲティング送達を可能とするように設計され得る。

【0067】

ミニ-IGFBP-3-Avitag誘導体

本発明はまた、(1)タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であり、(2)野生型IGFBP-3の対応する結合親和性と同一、実質的に類似またはさらにはより高い、IGF-I、IGF-II、ヘパリンおよびALSに対する結合親和性を示し、そして(3)BirA酵素によるビオチニル化を受け入れられる、IGFBP-3誘導体を提供する。これらのIGFBP-3誘導体は、「ミニ-IGFBP-3-avitag」誘導体と呼ばれる。

【0068】

このようなミニ-IGFBP-3-avitag誘導体は、一般的に、本明細書において定義したような、N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含み、そしてさらに、IGFBP-3誘導体のC末端ドメインの末端に共有結合したBirA酵素基質を含む。本明細書において使用する「BirA酵素」は、その当技術分野において理解されている意味を有し、そして、認識配列中の特定の残基においてタンパク質(すなわちBirA酵素基質)をビオチニル化する能力を有するE.coliビオチンリガーゼ酵素を指す(O'callaghan et al., Anal. Biochem., 1999, 266: 9-15)。本明細書において使用する

「BirA酵素基質」という用語は、BirA酵素によって認識され、そしてBirA酵素がビオチンを付着させることのできる、任意のターゲットアミノ酸配列を指しそしてこれを包含する。多種多様なBirA酵素基質が当技術分野において知られており、これには、本発明の脈絡において使用するに適した、例えば米国特許第5,723,584号、米国特許第5,487,993号、欧州特許第0550693号およびWO第95/04069号に記載されているものが挙げられる。しかしながら、特定の好ましい態様において、BirA酵素基質は、配列番号6において示された配列を有する。

【0069】

本発明はさらに、本明細書において定義したような、N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを一般的に含み、そしてさらに、IGFBP-3誘導体のC末端ドメインの末端に共有結合したBirA酵素基質およびBirA酵素基質に共有結合的に付着したビオチン分子を含む、ミニ-IGFBP-3-avitag誘導体を提供する。これらのIGFBP-3誘導体は、本明細書において、「ミニ-IGFBP-3-avitag-ビオチン」誘導体と呼ばれる。

【0070】

当業者によって理解されるであろうように、ミニ-IGFBP-3-avitag誘導体またはミニ-IGFBP-3-avitag-ビオチン誘導体のミニ-IGFBP-3部分は、前記したようなALSへの結合を全く示さない(または有意ではない結合しか示さない)ように改変されていても改変されていなくてもよい。

【0071】

SeAP-ミニ-IGFBP-3誘導体

本発明はまた、(1)タンパク質分解的開裂に対して抵抗性であり、(2)野生型IGFBP-3の対応する結合親和性と同一、実質的に類似またはさらにはより高い、IGF-I、IGF-II、ヘパリンおよびALSに対する結合親和性を示し、そして(3)リポータータンパク質で標識されることによって検出可能である、IGFBP-3誘導体を提供する。例えば、リポータータンパク質は、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなどであり得る。リポータータンパク質がアルカリホスファターゼである場合、これらのIGFBP-3誘導体は、「SeAP-ミニ-IGFBP-3」

誘導体と呼ばれる。

【0072】

このような S e A P－ミニ－I G F B P－3 誘導体は、一般的に、本明細書において定義したような、N末端ドメイン、中間ドメインおよびC末端ドメインを含み、そしてさらに、N末端ドメインの末端に融合した、S e A P（分泌型アルカリホスファターゼ）のアミノ酸配列を含む。当業者によって理解されるであろうように、S e A P－ミニ－I G F B P－3 誘導体のミニ－I G F B P－3 部分は、前記したような A L S への結合を全く示さない（または有意ではない結合しか示さない）ように改変されていても改変されていなくてもよい。

【0073】

「S e A P」および「分泌型アルカリホスファターゼ」という用語は、本明細書において同義語として使用される。それらは、S E A P 遺伝子（G e n B a n k アクセションナンバー N P _ 0 0 1 6 2 3）によってコードされ、そしてヒト胎盤アルカリホスファターゼ（P L A P）の切断短縮形である、酵素を指す。S E A P は、極めて熱に安定であり、そしてホスファターゼ阻害剤 L－ホモアルギニンに対して抵抗性であるという珍しい特性を有する（Micanovic et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1990, 87: 157-161）。

【0074】

I G F B P－3 誘導体の調製

本発明による I G F B P－3 誘導体は、本発明者らによって使用されたような部位特異的突然変異誘発および組換え技術を含む、当技術分野において公知の多種多様な適切な方法のいずれかを使用して調製され得る（実施例の章を参照）。本発明は、本発明者らによって開発された発現ベクター並びにこのような発現ベクターを含む宿主細胞を包含する。

【0075】

I I－I G F B P－3 ポリペプチド誘導体の使用

本発明の I G F B P－3 ポリペプチド誘導体は、種々の治療的および／または診断的適用において使用され得る。それらは、ヒト起源のタンパク質から誘導されたという利点を有し、これはいくつかの治療適応症のために F D A によってすでに認可され、そしてこれは大きな二次的作用を全く伴わないことが証明された。

【0076】

1－治療的適用

A. 適応症

本発明の I G F B P－3 ポリペプチド誘導体は、I G F（I G F－I および／または I G F－I I）を捕捉し、そしてこれによりそのバイオアベイラビリティを低下させる薬剤として有用であり得る。従って、それらは、ヒト悪性腫瘍の化学療法または放射線療法におけるアジュバントとして、既存の抗 I G F 1－R モノクローナル抗体およびチロシンキナーゼ阻害剤の代替物を構成し得る（Klinakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106: 2359-2364; Pollack et al., Nat. Rev. Cancer, 2004, 4: 505-518; Ryan and Goss; Oncologist, 2008, 13: 16-24; Sachdev and Yee, Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 1-12; Samani et al., Endocr. Rev. 2006）。本発明のいくつかの I G F B P－3 ポリペプチド誘導体、例えばミニ－I G F B P－3－F c は、血流中に存在する I G F－I および I G F－I I の両方を捕捉することができ、一方、ミニ－I G F B P－3 A L S－などのその他は、生物学的に利用可能な組織中 I G F を減少させることができる。この後者の特徴はさらに、I G F B P－3 誘導体にビオチン残基を付加することによって（ミニ－I G F B P－3－A L S－a v i t a g－ビオチン）腫瘍組織それ自体へとターゲティングさせることができる。両方の戦略において、本発明の I G F B P－3 ポリペプチド誘導体の投与により、I G F シグナル伝達経路のダウンレギュレーションが起こる。このアプローチは、インタクトな I G F B P－3 の循環が強く抑制されている転移性腫瘍患者の場合には特に関連性がありそして見込みがあると思われる（Fowlkes et al., Endocr., 2004, 145: 620-626; Miyamoto et al., Cancer Res., 2004, 64: 665-371; Nakamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 333: 1011-1016）。プロテアーゼに抵

10

20

30

40

50

抗性の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体の投与は、腫瘍にとって有害な持続的な I G F の欠乏をもたらし、これは腫瘍量を減少させるための他の化学療法剤の効果を増強するはずである。

【0077】

本発明の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体による I G F の捕捉はまた、特定の眼疾患の管理においても有益であり得る。本発明により処置することのできる I G F - I の過剰に関連した眼疾患の例としては、I G F - I が病原的な V E G F の過剰産生に参与していることが示された、増殖網膜症、例えば加齢黄斑変性および糖尿病性網膜症が挙げられるがそれらに限定されない (Chang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104: 10595-10600; Grant et al., Expert Opin. Invest. Drugs, 2004, 13: 1275-1293)。他の例としては、網膜創傷、続発性白内障、角膜上皮創傷およびシェーグレン症候群が挙げられる。このような適用において、本発明の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体は、例えば、眼への注入または角膜への適用 (例えば、点眼液または結膜嚢に配置された徐放性カプセルを介して) によって投与され得る。

10

【0078】

本発明の I G F B P - 3 誘導体はまた、I G F - 1 の全身投与が適応される場合に、I G F - 1 を供給するためのベクターとしても使用され得る。このような適応症としては、成長ホルモン抵抗性、I G F - 1 欠乏症、重度の熱傷、H I V 消耗、嚢胞性線維症、セリアック病、神経性食欲不振症、筋肉消耗疾病、筋緊張性ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、骨粗鬆症、重度のインスリン抵抗性 (Clemmons, Nat. Rev. Drug Discov., 2007, 6: 821-833)、I 型糖尿病、II 型糖尿病、脳虚血、心虚血、および移植が挙げられるがそれらに限定されない。

20

【0079】

本発明の処置法は、本発明の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体またはその薬学的組成物を使用して達成され得る。これらの方法は、一般的に、有効量の少なくとも 1 つの I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体 (同義の) またはその薬学的組成物をそれを必要とする被験体に投与することを含む。投与は、当業者に公知の方法のいずれかを使用して実施され得る。特に、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体またはその組成物は、エアゾール、非経口、経口または局所経路を含むがそれらに限定されない種々の経路のいずれかによって投与され得る。

30

【0080】

一般的に、本発明の I G F B P - 3 誘導体またはその組成物は、有効量で、すなわち、その意図する目的を満たすに十分な量で投与される。投与しようとする I G F B P - 3 誘導体または薬学的組成物の正確な量は、処置しようとする被験体の年齢、性別、体重および全般的な健康状態、所望の生物学的または医学的応答などに依存して、被験体ごとに異なる。特定の態様において、有効量は、I G F シグナル伝達経路の効率的なダウンレギュレーション、血流中に存在する I G F - I および／または I G F - I I の効率的な捕捉、および／または生物学的に利用可能な組織中 I G F の効率的な減少を可能とするものである。他の態様において、有効量は、I G F - 1 の効率的な供給を可能とするものである。大半の態様において、I G F B P - 3 誘導体またはその薬学的組成物の有効量は、疾患 (このために投与される) を処置、例えば疾患の症状の進行、増悪もしくは悪化を減速もしくは停止、および／または疾患の症状を寛解、および／または疾患を治癒するものである。本発明による処置の効果は、処置される疾病の診断のための当技術分野において公知のアッセイのいずれかを使用してモニタリングされ得る。

40

【0081】

特定の態様において、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体またはその組成物は、本発明の処置法に従って単独で投与される。他の態様において、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体またはその組成物は、少なくとも 1 つの追加の治療剤または治療手順と組み合わせて投与される。I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体または組成物は、治療剤の投与または治療手順の前に、治療剤または手順と同時に、および／または治療剤の投与または手順の後

50

に投与され得る。

【0082】

本発明のIGFBP-3ポリペプチド誘導体または組成物と組み合わせて投与され得る治療剤は、疾病（このためにIGFBP-3誘導体が投与される）の処置において有益な効果を有することが知られる多種多様な生物学的に活性な化合物の中から選択され得る（例えば、抗癌剤、抗炎症剤、免疫調節剤、鎮痛剤、抗微生物剤、抗細菌剤、抗生物質、抗酸化剤、消毒剤、およびその組合せ）。本発明のIGFBP-3ポリペプチド誘導体または組成物の投与と組み合わせて実施され得る治療手順としては、手術、放射線療法などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0083】

本発明のIGFBP-3ポリペプチド誘導体または組成物が単独でまたは他の療法と併用して有益に投与され得る病気のより具体的な例としては、非小細胞肺癌およびEGFRターゲティング療法（ゲフィチニブ、エルロチニブ）に対して抵抗性を発達させた疾病形態、肝細胞癌（ソラフェニブ）およびこのような薬剤に対して抵抗性を発達させた形態、HER2ターゲティング療法（トラスツズマブ）に関連したHER2増幅乳癌およびこの薬剤に対して抵抗性を発達させた形態、ホルモン療法に関連したエストロゲンレセプター陽性（ER+）乳癌、および顕著にはホルモン療法に対して応答しない低レベルのERを有するエストロゲンレセプター陽性（ER+）乳癌のサブセット（luminal B）、いくつかの三種陰性の乳癌、エストロゲンレセプターターゲティング療法（フルベストラント）に対して抵抗性を発達させた乳癌、PDGFRターゲティング療法（イマチニブ）に対して非感受性または抵抗性のいずれかである消化管間葉性腫瘍、前立腺癌におけるアンドロゲンレセプターターゲティング療法に対する抵抗性、メラノーマおよび大腸癌のBRAFV600Eターゲティング療法に対する抵抗性、IGF-I産生ユーイング肉腫および他の肉腫の療法、他の療法と併用しての多発性骨髄腫療法（顕著にはIGF-I産生骨髄腫）、肝細胞癌療法（顕著にはIGF-I産生腫瘍）、大腸腺癌の療法（顕著にはIGF-I産生腫瘍）、卵巣癌の療法（顕著には卵巣上皮癌およびIGF-I産生腫瘍）、副腎皮質癌の療法、いくつかの膵臓癌の療法、および乳癌および前立腺癌のホルモン療法のアジュバントとして、頭頸部の扁平上皮細胞癌の療法、ウィルムス腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫などの小児腫瘍の療法、しかしまた成人神経膠芽腫の療法、非膵島細胞腫瘍性低血糖症（NICTH）などのIGF-I産生腫瘍の療法、骨肉腫の療法、中皮腫の療法が挙げられる。

【0084】

B. 投与

IGFBP-3ポリペプチド誘導体（場合により1つ以上の適切な薬学的に許容される担体または賦形剤を用いて製剤化した後）を、所望の投与量で、それを必要とする被験体に任意の適切な経路によって投与することができる。種々の送達システムが知られており、そしてこれを使用して、本発明のIGFBP-3誘導体を投与することができ、これには錠剤、カプセル剤、注射溶液、封入（リポソーム、マイクロ粒子、マイクロカプセルなどへの）が含まれる。投与方法としては、経皮、皮内、筋肉内、腹腔内、病巣内、静脈内、皮下、鼻腔内、肺内、硬膜外、眼内および経口経路が挙げられるがそれらに限定されない。本発明のIGFBP-3誘導体または組成物は、任意の簡便なまたは他の適切な経路によって、例えば点滴またはボラス注入によって、上皮または皮膚粘膜裏打ち（mucocutaneous lining）（例えば経口、粘膜、直腸および腸管粘膜など）を通した吸収によって投与され得る。投与は全身的であっても局所的であってもよい。非経口投与は、カテーテル法によるなどの、患者の特定の組織に向けられ得る。当業者には理解されるであろうように、本発明のIGFBP-3誘導体が追加の治療剤と共に投与される態様において、IGFBP-3誘導体および治療剤は、同じ経路（例えば経口）によって、または異なる経路（例えば経口および静脈内）によって投与され得る。

【0085】

C. 投与量

本発明の I G F B P - 3 誘導体（またはその組成物）の投与は、送達される量が意図する目的のために効果的であるような投与量である。投与経路、投与される製剤および投与量は、所望の治療効果、処置する疾患の重度、あらゆる感染の存在、患者の年齢、性別、体重および全般的な健康状態並びに使用される I G F B P - 3 誘導体の効力、バイオアベイラビリティおよび in vivo における半減期、併用療法の使用（または不使用）および他の臨床因子に依存する。これらの因子は、療法の過程で担当の医師によって容易に決定され得る。代替的にまたは追加的に、投与しようとする投与量は、動物モデルを使用した研究から決定され得る。これらまたは他の方法に基づいて最大効力を達成するように投与量を調整することは、当技術分野において周知であり、そしてこれは訓練された医師の能力の範囲内である。研究は本発明の I G F B P - 3 誘導体を使用して実施されるので、適切な投与量レベルおよび処置期間に関するさらなる情報が現れるだろう。

10

【0086】

本発明による処置は、1回量または複数回の投与量からなり得る。従って、本発明の I G F B P - 3 誘導体またはその組成物の投与は、特定の期間の間または周期的におよび特定の間隔で、例えば1時間間隔、1日間間隔、1週間間隔（または数日間の間隔で）；1カ月間隔、1年間間隔（例えば徐放形）で一定であり得る。あるいは、送達は、特定の期間の間に数回、例えば1週間に2回以上、1ヶ月間に2回以上などで行ない得る。送達は、しばらくの間連続的な送達であり得、例えば静脈内送達であり得る。

【0087】

2 - 診断適用

20

本発明の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体のいくつかは、診断適用において有用であり得る。特に、本発明は、生物学的試料中の p r o - I G F - I I 濃度を決定するための方法を提供し、前記方法は、（1）生物学的試料を、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体に対して融合した、S e A P のアミノ酸配列を含む、I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体と接触させて、I G F B P - 3 誘導体と、生物学的試料中に存在するあらゆる p r o - I G F - I I との間の複合体の形成を可能とする工程、ここで、p r o - I G F - I I は I G F - I I の部分的にプロセシングされた形態である；および（2）複合体中の S e A P のアルカリ活性を測定することによって生物学的試料中の p r o - I G F - I I の濃度を決定する工程を含む。

【0088】

30

本明細書において使用する「p r o - I G F - I I」という用語は、その当技術分野において理解されている意味を有し、そして I G F - I I の部分的にプロセシングされた形態を指し、これは最初に合成され、その後、調節されたエンドタンパク質分解的開裂を受けて成熟形（I G F - I I）となる。

【0089】

「生物学的試料」という用語は、本明細書においてその最も広い意味で使用される。生物学的試料は、一般的に、被験体から得られる。試料は、p r o - I G F - I I を含む任意の生物学的組織または液体であり得る。ヒトにおいて、I G F - I I の p r o 形は、血清中並びに脳脊髄液および羊水に検出される。頻繁には、生物学的試料は「臨床的試料」であり、すなわち、患者（すなわち疾病を有すると診断されたまたは疾病を有することが疑われる被験体）から得られた試料である。

40

【0090】

複合体中の S e A P のアルカリ活性を測定することによって生物学的試料中の p r o - I G F - I I の濃度を決定する工程は、実施例の章において記載したような p - ニトロフェニルホスフェートの使用を通すことを含む、当技術分野において公知の任意の方法を使用して実施され得る。

【0091】

I I I - 薬学的組成物

前記したように、本発明の I G F B P - 3 ポリペプチド誘導体は、それ自体または薬学的組成物として投与され得る。従って、本発明は、有効量の少なくとも1つの I G F B P

50

ー 3 ポリペプチド誘導体および少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、薬学的組成物を提供する。いくつかの態様において、前記組成物はさらに、1 つ以上の追加の生物学的に活性な薬剤を含む。

【0092】

I G F B P-3 ポリペプチド誘導体およびその薬学的組成物は、所望の予防効果および／または治療効果を達成するために効果的な任意の量および任意の投与経路を使用して投与され得る。最適な薬学的製剤は、投与経路および所望の投与量に依存して変化し得る。このような製剤は、物理的状态、安定性、in vivoにおける放出速度、および投与された活性成分のin vivoにおけるクリアランス速度に影響を及ぼし得る。

【0093】

本発明の薬学的組成物は、投与し易さおよび投与量の均一性のために、単位投与形で製剤化され得る。本明細書において使用する「単位投与形」という表現は、処置しようとする患者のための I G F B P-3 ポリペプチド誘導体の物理的に分離した単位を指す。しかしながら、前記組成物の 1 日全投与量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当の医師によって決定されることが理解されるだろう。

【0094】

A. 製剤

注射調製物、例えば無菌注射水性または油性懸濁液を、公知の技術に従って、適切な分散剤または湿潤剤、および懸濁化剤を使用して製剤化し得る。無菌注射調製物はまた、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌注射溶液、懸濁液またはエマルション、例えば 2, 3-ブタンジオール溶液などであり得る。使用され得る許容されるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンガー液、U. S. P. および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の不揮発性油が溶液または懸濁媒体として慣用的に使用される。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性の不揮発性油を使用することができる。オレイン酸などの脂肪酸もまた、注射製剤の調製に使用し得る。無菌液体担体は、非経口投与のための無菌液体形組成物に有用である。

【0095】

注射製剤は、例えば細菌保持フィルターを通してのろ過によって滅菌することができるか、または無菌固体組成物の形態で除菌剤を取り込み、これを使用前に滅菌水もしくは他の無菌注射媒体に溶解または分散させることによって滅菌することができる。無菌溶液または懸濁液である液体の薬学的組成物は、例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内または皮下注射によって投与され得る。注射は、1 回押すことを介して、またはゆっくりとした点滴によってであり得る。必要である場合または所望である場合、前記組成物は、注射部位における痛みを和らげるための局所麻酔薬を含んでいてもよい。

【0096】

活性成分の効果を延長するために、しばしば、皮下または筋肉内注射からの成分の吸収を遅くすることが望ましい。非経口的に投与された活性成分の吸収遅延は、油ビヒクルに成分を溶解または懸濁することによって達成され得る。注射用デポー形は、ポリ乳酸-ポリグリコライドなどの生分解性ポリマー中でマイクロカプセル化された活性成分のマトリックスを形成することによって製造される。活性成分とポリマーの比および使用する特定のポリマーの性質に依存して、成分の放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられる。デポー注射製剤はまた、身体組織と適合性であるリボソームまたはマイクロエマルション中に活性成分を封入することによって調製され得る。

【0097】

経口投与のための液体投与形としては、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、エリキシルおよび加圧組成物が挙げられるがそれらに限定されない。I G F B P-3 ポリペプチド誘導体に加えて、液体投与形は、当技術分野において一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチ

10

20

30

40

50

ル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロプレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステルおよびその混合物を含み得る。不活性希釈剤の他に、経口組成物はまた、湿潤剤、懸濁化剤、保存剤、甘味剤、香味剤および芳香剤、増粘剤、着色剤、粘度調節剤、安定化剤または浸透圧調節剤などの補助剤を含み得る。経口投与のために適切な液体担体の例としては、水（カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液などの例えばセルロース誘導体などの、前記のような添加剤を含む可能性がある）、アルコール（一価アルコールおよび多価アルコール、例えばグリコールを含む）およびその誘導体、および油（例えば分別ヤシ油およびピーナッツ油（arachis oil））が挙げられる。加圧組成物のための液体担体は、ハロゲン化炭化水素または他の薬学的に許容される噴射剤であり得る。

10

【0098】

経口投与用の固体投与形としては、例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤および顆粒剤が挙げられる。このような固体投与形では、本発明のIGFBP-3ポリペプチド誘導体は、少なくとも1つの不活性で薬学的に許容される賦形剤または担体、例えばクエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および（a）充填剤または増量剤、例えばデンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよびケイ酸；（b）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよびアカシア；（c）湿潤剤、例えばグリセロール；（d）崩壊剤、例えばアガーアガー、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸、および炭酸ナトリウム；（e）溶液遅延剤（solution retarding agents）、例えばパラフィン；吸収促進剤、例えば第4級アンモニウム化合物；（g）湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびグリセロールモノステアレート；（h）吸収剤、例えばカオリンおよびベントナイト粘土；および（i）潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形のポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびその混合物の1つ以上と混合され得る。固形製剤に適した他の賦形剤としては、表面改質剤、例えば非イオン性およびアニオン性表面改質剤が挙げられる。表面改質剤の代表例としては、ポロキサマー188、塩化ベンザルコニウム、ステアリン酸カルシウム、セトステアリルアルコール、セトマクロゴール乳化ワックス、ソルビタンエステル、コロイド状二酸化ケイ素、ホスフェート、ドデシル硫酸ナトリウム、ケイ酸マグネシウムアルミニウムおよびトリエタノールアミンが挙げられるがそれらに限定されない。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、投与形はまた、緩衝剤を含んでもよい。

20

30

【0099】

類似のタイプの固形組成物はまた、ラクトースまたは乳糖などの賦形剤並びに高分子量ポリエチレングリコールなどを使用した、軟および硬充填ゼラチンカプセルにおける充填剤として使用され得る。錠剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤および顆粒剤の固体投与形は、腸溶性コーティング、放出制御コーティングおよび薬学製剤技術において周知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルを用いて調製され得る。それらは場合により、不透明化剤を含み得、そしてまた、それらが活性成分を消化管の特定の部分でのみ、または好ましくは消化管の特定の部分で、場合により遅延した様式で放出するような組成物であり得る。使用することのできる包埋組成物（embedding compositions）の例としては、ポリマー性物質およびワックスが挙げられる。

40

【0100】

特定の態様において、本発明の組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望ましくあり得る。これは、例えであって、制限するものではないが、手術中の局所的注入によって、局所的適用によって、注射によって、カテーテルによって、坐剤によって、または皮膚パッチもしくはステントもしくは他のインプラントによって達成され得る。

【0101】

局所適用のために、前記組成物は、好ましくは、ゲル、軟膏、ローションまたはクリー

50

ムとして製剤化され、これは、水、グリセロール、アルコール、プロピレングリコール、脂肪アルコール、トリグリセリド、脂肪酸エステルまたは鉱油などの担体を含み得る。他の局所担体としては、液化石油、パルミチン酸イソプロピル、ポリエチレングリコール、エタノール（95%）、モノラウリン酸ポリオキシエチレン水溶液（5%）、ラウリル硫酸ナトリウム水溶液（5%）が挙げられる。抗酸化剤、湿潤剤、粘度安定化剤および類似の薬剤などの他の材料も必要であれば加えてもよい。

【0102】

さらに、特定の場合、本発明の組成物を、皮膚の上、中または下に配置された経皮装置内に配置し得ることが期待される。このような装置としては、パッチ、インプラントおよび注射が挙げられ、これは活性成分を受動的または能動的な放出機序のいずれかによって放出する。経皮投与は、身体の表面および身体の通路の内層（上皮および粘膜組織を含む）を横切る全ての投与を含む。このような投与は、本発明の組成物を使用して、ローション、クリーム、泡状物、パッチ、懸濁液、溶液および坐剤（直腸および膣）で実施され得る。

10

【0103】

経皮投与は、活性成分（すなわちIGFBP-3ポリペプチド誘導体）と、皮膚に無毒性である担体とを含み、そして皮膚を介した血流中への全身的吸収のための成分の送達を可能とする、経皮パッチの使用を通して達成され得る。担体は、クリームおよび軟膏、ペースト、ゲルおよび眼内装置などの任意の数の形態をとり得る。クリームおよび軟膏は、水中油滴型または油中水滴型のいずれかの粘性液体または半固体のエマルションであり得る。活性成分を含む石油または親水性石油に分散された吸収性粉末からなるペーストが、適切であり得る。多種多様な眼内装置を使用して、血流中に活性成分を放出し得、これには、例えば、担体と共にまたは非存在下で活性成分を含むレザバリーザーバーを覆う半透過性膜、または活性成分を含むマトリックスなどがある。

20

【0104】

坐剤製剤は、坐剤の融点を変化させるためのワックスの添加されたまたは添加されていないココアバター、およびグリセリンを含む、伝統的な材料から製造され得る。水溶性坐剤基剤、例えば種々の分子量のポリエチレングリコールなども使用し得る。

【0105】

種々の製剤を作製するための材料および方法は当技術分野において公知であり、そして本発明を実施するために適応させ得る。抗体の送達のために適切な製剤は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」, E.W. Martin, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PAに見出され得る。

30

【0106】

B. 追加の生物学的に活性な薬剤

特定の態様において、本発明のIGFBP-3ポリペプチド誘導体は、本発明の薬学的組成物における唯一の活性成分である。他の態様において、薬学的組成物はさらに、1つ以上の生物学的に活性な薬剤を含む。適切な生物学的に活性な薬剤の例としては、抗癌剤、抗炎症剤、免疫調節剤、鎮痛剤、抗微生物剤、抗細菌剤、抗生物質、抗酸化剤、消毒剤およびその組合せが挙げられるがそれらに限定されない。

40

【0107】

このような薬学的組成物において、IGFBP-3ポリペプチド誘導体および少なくとも1つの追加の治療剤は、IGFBP-3ポリペプチド誘導体および治療剤（群）の同時、別々または連続的投与のために1つ以上の調製物において合わせられていてもよい。より特定すると、本発明の組成物は、IGFBP-3ポリペプチド誘導体および治療剤（群）が一緒にまたは互いに独立して投与することができるように製剤化され得る。例えば、IGFBP-3ポリペプチド誘導体および治療剤は、一緒に1つの組成物に製剤化されていてもよい。あるいは、それらは別々に維持（例えば異なる組成物および／または容器に）および投与されてもよい。

【0108】

50

C. キットの医薬パック (pharmaceutical pack)

別の局面において、本発明は、本発明の I G F B P-3 ポリペプチド誘導体の投与を可能とする、本発明の薬学的組成物の 1 つ以上の成分を含む 1 つ以上の容器（例えばバイアル、アンプル、試験管、フラスコまたは瓶）を含む医薬パックまたはキットを提供する。本発明はまた、生物学的試料中の p r o- I G F- I I 濃度の決定を可能とする 1 つ以上の成分を含む 1 つ以上の容器を含むキットを提供する。このようなキットは、一般的に、I G F B P-3 ポリペプチド誘導体に対して融合した S e A P のアミノ酸配列を含む本発明の I G F B P-3 ポリペプチド誘導体、および S e A P のアルカリ活性を測定するための少なくとも 1 つの試薬を含む。

【0109】

10

医薬パックまたはキットの種々の成分が、固体形（例えば凍結乾燥形）または液体形で供給され得る。各成分は、一般的に、そのそれぞれの容器に分注されて、または濃縮形で提供されるのが適切であり得る。本発明によるパックまたはキットは、凍結乾燥された成分の復元のための媒体を含み得る。キットの個々の容器は、好ましくは、市販のために厳重に密閉して維持される。

【0110】

特定の態様において、パックまたはキットは、1 つ以上の追加の治療剤（群）を含む。場合により容器（群）に付随して、医薬品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当局によって規定された形式の注意書きまたは添付文書があり得、この注意書きは、ヒト投与のための製造、使用または販売の当局による認可を反映する。添付文書の注意書きは、本明細書において開示した処置法に従って薬学的組成物を使用するための説明書を含み得る。

20

【0111】

識別因子、例えばバーコード、電波による識別 (radio frequency)、I D タグなどが、キット中またはキット上に存在し得る。識別因子は、例えば、品質制御、在庫管理、ワークステーション間の移動の追跡の目的のためにキットを比類なく同定するために使用され得る。

【0112】

実施例

以下の実施例は、本発明を製造および実施する好ましい形態のいくつかを記載する。しかしながら、実施例は説明の目的のためだけのものであり、そして本発明の範囲を制限する意味はないと理解されるべきである。さらに、もし実施例中の記載が過去時制で提示されてはいなければ、明細書の残りと同様に、本文は、実験が実際に実施されたか、またはデータが実際に得られることを示唆するものではない。

30

【0113】

実施例 1 : I G F B P-3 ポリペプチド誘導体の調製
導入ベクターの構築

以下の導入ベクターを本研究に使用した : p D B-3 s-H 6、p M J-S e A P および p Y M-F c-I g G 1。p D B-3 s-H 6 は、以前に記載されているように (Netchine et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2009, 94: 3913-3921) 本発明者らの研究室で構築された分泌タンパク質発現のためのバキュロウイルス導入ベクターである。同様に、アルカリホスファターゼ (S e A P) またはヒト I g G 1 の F c フラグメントのいずれかを有する分泌融合タンパク質を産生するために使用された p M J-S e A P および p Y M-F c-I g G 1 ベクターもまた、本発明者らの研究室で構築され、そしてこれは以前に記載されている (Bara et al., Int. J. Cancer, 1998, 75: 767-773; Mahiou et al., Biochem. J., 1998, 330: 1051-1058、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

40

【0114】

全ての組換え導入ベクターは、スパーサーおよび適切なエンドヌクレアーゼ制限酵素部位を含むプライマーを使用して P C R フラグメントを作製した後に構築された。二次構造

50

の形成を最小限にするために、これらの反応を、以前に記載されているように (Chakrabarti and Schutt, Nucleic Acids Res., 2001, 29: 2377-2381) 10%ジメチルスルホキシド中でPerkinElmer Life Sciences (Norwalk, CT)サーモサイクラーを使用して以下の条件下で実施した: 94℃で10分間かけての最初の変性、その後、94℃、60℃および72℃で30から40秒間のサイクル。

【0115】

最初に、pDB-3s-H6においてヘキサヒスチジンN末端伸長部の下流にヒトIGFBP-3の完全コード配列を有する導入ベクターを構築した (図1)。使用したPCR反応は:

【化1】

5' - ATC GAA ggc cgt ggg ggc cAG

GGC GCG AGC TCG GGG GGC TTG GG - 3' および 5' - Cct cga gTT ATC AGC

TGC CCT TGC TCT GCA TGC TGT AGC AGT GCA CGT CCT C - 3'

(終止コドンに下線を引いている) をそれぞれセンスおよびアンチセンスプライマーとして; および、IGFBP-3 cDNAを有するプラスミドを鋳型として、使用した。上のプライマーに加えられた制限酵素部位SfiIおよびXhoIは小文字で提示されている。815bpのPCR産物を、SfiIおよびXhoI制限エンドヌクレアーゼで消化し、そして同酵素で前以て消化しておいたpDB-3s-H6導入ベクターにライゲーションした。ライゲーション産物を使用して、エレクトロコンピテントなE.coli細胞を形質転換した。pDB-3s-H6-IGFBP-3と呼ばれる組換えプラスミドを、ヌクレオチドシーケンシングの後を選択し、そしてバキュロウイルスDNAと一緒にSf9細胞に同時トランスフェクションして、H6-IGFBP-3組換えタンパク質をコードする対応する組換えウイルスを産生した。

【0116】

部位特異的突然変異誘発

部位特異的突然変異誘発を、実質的には以前に記載されているように (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82: 488-492) 変異原性オリゴヌクレオチドおよび一本鎖DNA鋳型を使用して、「MutaGene (登録商標) Phagemid in vitro mutagenesis kit version 2」(BioRad)を使用して実施した。簡潔に言うと、導入ベクターpMJ-H6-IGFBP-3およびpDB-3s-H6-IGFBP-3 (各々、M13複製起点を含む) を使用して、CJ236 (ung-duct) 突然変異株を形質転換した。ファージミドクロンを選択して、ヘルパーファージM13KO7を用いての感染後にウイルス粒子を産生させた。抽出後、対応する一本鎖DNAは、Kunkelによって記載されたような5'-リン酸化変異原性オリゴヌクレオチド、T7DNAポリメラーゼおよびT4DNAリガーゼを含む重合反応における鋳型として作用した。

【0117】

二本鎖産物を使用して、エレクトロコンピテントなung duct能のあるE.coli株を形質転換した。形質転換クロンを、制限酵素マッピングおよびヌクレオチドシーケンシングによって突然変異の存在についてスクリーニングした。このアプローチを使用して、一本鎖IGFBP-3 DNA鋳型を以下の変異原性オリゴヌクレオチド:

【化2】

5' - GGG ACC

ATA TTC TGT CTC acc acc aga ccc gcc aga ccc gcc aga ccc gcc acc

GCT GAC GGC ACT AGC GTT GAC - 3'

10

20

30

40

50

にアニーリングさせることによって、ヒト I G F B P-3 の中間ドメインを短くした。得られたムテインでは、野生型 I G F B P-3 中間ドメインに存在する 85 アミノ酸（残基 95 から残基 179）は、15 アミノ酸のスペーサー（その配列は【化 3】

NH₂-GGGSGGSGGSGGSGG-COOH

である）によって置換されている。得られた突然変異したプラスミド（p D B-ミニー I G F B P-3）は、ネイティブな中間ドメインの大半を欠失した、「ミニー I G F B P-3」と呼ばれる、この I G F B P-3 ムテインをコードする組換えバキュロウイルスを生成するように作用した。

【0118】

一旦この親配列が得られたら、新たな一本鎖 DNA 鋳型を合成し、そしてこれを使用して、部位特異的突然変異誘発によって新たな突然変異したミニー I G F B P-3 s を生成した。

【0119】

これらの突然変異体の 1 つは、A L S 結合に關与する配列を排除することによって作製され、これにより、ミニー I G F B P-3 A L S⁻が生成された。この目標を達成するために、I G F B P の C 末端ドメインにおける塩基性アミノ酸 K G R K R を、p B P-ミニー I G F B P-3 から誘導された一本鎖鋳型と変異原性オリゴヌクレオチド：

【化 4】

CCACACACCAGCAGAAGCCGCCGCTGCCGCCCCGCGGAAGGGCGACACTGC

とを使用して、配列 A G G S G に置換した。

【0120】

同じ鋳型を、以下の変異原性オリゴヌクレオチド：

【化 5】

CCCCTCGAGTCATTATTCGTGCCATTCAATTTTTTGGGCTTCAAAAATGTC

GTTCAGGCCGCTGCCCTTGCTCTGC

と併せて使用して、ミニー I G F B P-3 の C 末端に、B i r A 酵素のための基質（Schatz, Biotechnology, 1993, 11: 1138-1143）である G L N D I F E A Q K I E W H E ペプチド（Beckett et al., Protein Sci., 1999, 8: 921-929）を付加した。得られたタンパク質、すなわちミニー I G F B P-3-a v i t a g を酵素的にビオチニル化することができた。

【0121】

融合タンパク質の産生

ミニー I G F B P-3 リポータータンパク質を得るために、ミニー I G F B P-3 コード配列を、S f i I および X h o I 制限エンドヌクレアーゼを用いてのその二重消化後に得られたベクター p D B-3 s-H6-ミニー I G F B P-3 からのミニー I G F B P-3 の切り出し、およびその後の同酵素を用いて前以て消化しておいた p M J-S e A P ベクターへの得られたフラグメントのライゲーションによって、分泌型アルカリホスファターゼ（S e A P）の 3' 末端に融合させた。得られた組換えプラスミドを使用して、「S e A P-ミニー I G F B P-3」と呼ばれるリポーター融合タンパク質をコードする組換えバキュロウイルスを生成した。

【0122】

ヒト I g G 1 の F c フラグメントにミニー I G F B P-3 を結合させて、「ミニー I G F B P-3 イムノアドヘシン」融合タンパク質を得るために、適切な制限酵素部位を含む

10

20

30

40

50

ミニー I G F B P-3 アンプリコンを P C R によって作製し、そして適切に消化された p Y M-F c g G 1 ベクターにライゲーションした。得られた組換えプラスミドを使用して、「I G F B P-3-F c」と呼ばれるイムノアドヘシン融合タンパク質をコードする組換えバキュロウイルスを生成した。

【0123】

組換えタンパク質の精製

前記した組換えウイルスのいずれかを用いて感染させた昆虫細胞の培養培地を収集し、そして組換えタンパク質を、実質的に以前に記載されたように (Mahiou et al., 1998、上を参照) I M A C によって精製した。組換えタンパク質は、イオン交換クロマトグラフィーによるさらなる精製工程を必要としたので、I G F B P-3-F c イムノアドヘシンを、プロテイン A-セファロースアフィニティクロマトグラフィーによってさらに精製した (Mahiou et al., 1998、上を参照)。

【0124】

実施例 2：ミニー I G F B P-3 の特性

図 2 は、野生型 I G F B P-3 (H 6-I G F B P-3) および突然変異した組換え I G F B P-3 (ミニー I G F B P-3) の図解を示し、これは、後者が、部位特異的突然変異誘発によって達成された示された 15 アミノ酸の可動性リンカーによるその中間ドメインの大半の置換により、野生型 H 6-I G F B P-3 から誘導されるという事実を示す。また、図 2 には、H 6-I G F B P-3 およびミニー I G F B P-3 のアミノ酸配列も提示されている。

【0125】

結合特性。ミニー I G F B P-3 および I G F-I I の会合および解離の動態を、表面プラスモン共鳴 (BIAcore) によって研究した。ミニー I G F B P-3 を、カルボジイミドを介して C M-5 表面に共有結合させた。1 M エタノールアミン溶液を用いて飽和させた後、I G F-I I の P B S 溶液を表面上に注入し、そしてこれを 80 秒後に緩衝液によって置換した。得られた結果を図 3 に提示する。

【0126】

野生型 (wt) I G F B P-3 および突然変異 I G F B P-3 (ミニー I G F B P-3) の I G F-I および I G F-I I に対する親和性を、放射性トレーサーとして ^{125}I -I G F-I を使用して決定した。種々の濃度の I G F-I および I G F-I I を競合物質として使用し、そして親和性定数をスキッチャード分析によって決定した。得られた結果を以下の表に提示する。

【0127】

【表 1】

表 1. IGF-I および IGF II に対する野生型(wt) IGFBP-3 および突然変異 IGFBP-3 (ミニ-IGFBP-3)

	IGF-I	IGF-II
wt IGFBP-3	$2.96 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$	$3.50 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$
ミニ-IGFBP-3	$2.40 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$	$3.14 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$

【0128】

タンパク質分解に対するミニー I G F B P-3 の抵抗性。トロンビンによるタンパク質分解に対する野生型 I G F B P-3 およびミニー I G F B P-3 の感受性を、精製されたタンパク質 (100 ng) を、漸増濃度のトロンビン (0.0008; 0.004; 0.02 および 0.1 N H I U/mL) と共に 1 時間インキュベーションすることによって研究した。その後、消化産物を S D S-P A G E によって分離し、P V D F 膜に転写し、そして完全 I G F B P-3 分子に対して生じたウサギポリクローナル抗体を使用してイムノブ

ロットによって分析した。得られた結果を図4に提示する。

【0129】

実施例3：ミニ-IGFBP-3-avitagの特性

図5は、部位特異的突然変異誘発によって得られたpRH-3s-H6-avitag導入ベクターの制限酵素地図の図解を示す。このベクターにおいて、SfiIおよびPvuII制限酵素部位によってフランクされるあらゆるオープンリーディングフレーム配列をPCRによって同酵素によって消化されたベクターに導入することができる。構築物の翻訳から生じた分泌ポリペプチドは、そのC末端にAvitagペプチドを有し、そしてBirA酵素を使用したターゲティングされた酵素的ビオチニル化を受け入れられる。ミニ-IGFBP-3のコード配列をこのベクターに導入することにより、順にpRH-3s-H6-ミニ-IGFBP-3ベクター、AcMNPV-ミニ-IGFBP-3組換えウイルスおよびミニ-IGFBP-3-avitag組換えタンパク質が得られた。

10

【0130】

ミニ-IGFBP-3-Avitagの酵素的ビオチニル化。酵素的ビオチニル化に対するミニ-IGFBP-3-Avitagの感受性を評価するために、精製された組換えH6-IGFBP-3、ミニ-IGFBP-3およびミニ-IGFBP-3-Avitag（各々1μg）をSDS-PAGEによって分析し、そしてクーマシーブリリアントブルーで染色した。ミニ-IGFBP-3-Avitagをまず、ビオチンおよびBirA酵素を含むビオチニル化反応混合物に加える前に精製した。反応産物のアリコート、前以て化学的にビオチニル化しておいたモノクローナル抗体（7E8）と共にSDS-PAGE上に並べてローディングした。ゲルをPVDf膜に転写し、これを飽和後、ストレプトアビジン-HRPと共にインキュベーションした。ペルオキシダーゼ活性を化学発光によって決定した。得られた結果を図6に提示する。

20

【0131】

粗抽出物におけるミニ-IGFBP-3-Avitagのターゲティングされた酵素的ビオチニル化。（a）親ミニ-IGFBP-3を産生するウイルスによって感染されたSf-9細胞の培養上清からのタンパク質抽出物、（b）ミニ-IGFBP-3-Avitagを産生するウイルスによって感染されたSf-9細胞の培養上清からのタンパク質抽出物、および（c）精製されたミニ-IGFBP-3-avitagを、ターゲティングされたBirAビオチニル化にかけた。その後、各試料のアリコートをSDS-PAGEによって分離し、そしてその後、PVDf膜に転写し、これをその後、ストレプトアビジン-APと共にインキュベーションした。その後、APase活性は、NBT/BCIPの添加によって実証された。得られた結果を図7に提示する。

30

【0132】

PBSに対する十分な透析の後、ミニ-IGFBP-3-avitag-ビオチンを含む粗培養培地（図7のパネルBのレーンe）をストレプトアビジンチップに注入した。1M NaClで洗浄した後、6E8抗IGFBP-3モノクローナル抗体を含む溶液およびIGF-IIを含む溶液を順次注入した。得られた結果を図7（C）に提示する。

【0133】

実施例4：SeAP-ミニ-IGFBP-3リポーター融合タンパク質およびその使用

40

図8（A）は、SeAP-ミニ-IGFBP-3リポーター融合タンパク質を産生するために構築および使用されたpMJ-SeAP-ミニ-IGFBP-3導入ベクターの制限酵素地図を示す。

【0134】

固相サンドイッチアッセイ。ヒト血漿中のpro-IGF-II濃度を決定するために開発された固相「サンドイッチ」アッセイの図解を図8（B）に提示する。この「サンドイッチ」アッセイは、支持体上に固定されたポリクローナル抗IGF-II Eペプチド抗体を捕獲剤として、およびSeAP-ミニ-IGFBP-3を特異的リポーター試薬として、使用する。

【0135】

50

このアッセイは、健康成人（ $n = 40$ ）、非膵島細胞腫瘍性低血糖症（NICTH）と診断された患者（ $n = 25$ ）、および腫瘍除去後にNICTHを有する患者（ $n = 4$ ）の血漿中のp r o - I G F - I I レベルを決定することによって検証された。得られた結果を図8（C）に提示する。

【0136】

実施例5：ミニ-IGFBP-3-Fcの特性

図9（A）は、ミニ-IGFBP-3-Fc IgG1融合タンパク質（図9（B）に図解により提示する）を産生するために使用された、構築されたpYM-ミニ-IGFBP-3導入ベクターの制限酵素地図を示す。

【0137】

IGF-IIに対するミニ-IGFBP-3-Fcの親和性。固相アッセイを使用して、IGF-IIに対するミニ-IGFBP-3-Fcの結合親和性を研究した。このアッセイにおいて、2つの結合タンパク質（ミニ-IGFBP-3およびミニ-IGFBP-3-Fc）を支持体上に固定した。それらをビオチニル化されたIGF-IIトレーサーと共にインキュベーションし、そしてその後、漸増濃度のIGF-IIを加えた。得られた結果は、図10（A）に提示され、これはミニ-IGFBP-3-FcがIGF-IIに、その融合していない対応物（ミニ-IGFBP-3）よりも高い見かけの親和性で結合することを示す。

【0138】

ミニ-IGFBP-3-Fcの抗増殖活性。3つのヒト腫瘍細胞株、すなわちHep3BおよびHuH7（肝細胞癌細胞株）およびINA-6（多発性骨髄腫細胞株）の増殖および生存に対するミニ-IGFBP-3-Fcの効果を研究した。10%ウシ胎児血清（FCS）の存在下で培養した各細胞株について、ミニ-IGFBP-3-Fcの効果を、IGF1-Rシグナル伝達経路に干渉することが知られる化合物であるピクロポドフィリン（ppp）の効果と比較した。細胞生存度アッセイを、ミニ-IGFBP-3-Fc（100nM）またはppp（1μM）の存在下10%FCSを含む培地中で培養開始から72時間後に、WST-1を添加しそしてホルマザン変換をモニタリングすることによって実施した。得られた結果を図10Bに提示する。それらは、ミニ-IGFBP-3-Fcが、試験した3つのヒト腫瘍細胞株に対する抗増殖活性を有することを示す。

【0139】

ミニ-IGFBP-3-FcによるAKTリン酸化阻害

INA-6骨髄腫細胞株を、10%FCSの存在下で増殖させた。細胞を、ミニ-IGFBP-3（100nm）またはppp（1μM）と共に3、6または24時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を、溶解緩衝液を使用して溶解し、そして細胞抽出物（タンパク質含量について標準化された）をSDS-PAGEゲルにローディングし、ニトロセルロース膜に転写し、これをさらにAKTタンパク質のホスホ-S273残基に対して作られたモノクローナル抗体と共にインキュベーションした。膜をまた、等価なローディングを確認するために、ストリッピング後に抗アクチン抗体を用いて再ブローブした。得られた結果を図11Aに提示する。

【0140】

AKTリン酸化に対するミニ-IGFBP-3-Fcの阻害活性をまた、種々のヒト腫瘍細胞株：MiPaCa-2（膵臓癌）、HT-29（大腸癌）およびA549（肺癌）で評価した。AKTリン酸化に対するミニ-IGFBP-3の阻害活性をA549細胞で評価した。得られた結果を図11Bに提示し、これは、ミニ-IGFBP-3-Fcおよびミニ-IGFBP-3が、試験した全てのヒト腫瘍細胞株のAKTリン酸化を遮断することができることを示す。

【0141】

実施例6：in vivoにおけるミニ-IGFBP-3および誘導体の特性

ミニ-IGFBP-3のin vivo活性の将来の評価のための根拠を築くために、ミニ-IGFBP-3およびその誘導体をマウスに注入した。ヒト特異的IGFBP-3ELI

10

20

30

40

50

S A試験を使用して測定した場合、いくつかの動態を観察することができた。

【0142】

図12に見られるように、投与後、ミニ-IGFBP-3は、血流から2つの異なる動態でもって排除された：初回投与量の80～90%は最初の3～4時間の間に血流に残ったが、残りの10～20%は48時間までに非常にゆっくりと消失した。予期されたように、ALSに対する結合を抑制する突然変異を有するミニ-IGFBP-3は、はるかに速く消失し、注入から8時間後にはほぼ全くタンパク質が残っていなかった。これに対し、ミニ-IGFBP-3-Fcの血清中濃度は、はるかにゆっくりとした単一勾配の動態で減衰し、半減期は約12時間であった。

【0143】

ミニ-IGFBP-3に対してin vitroにおいて応答性であることが以前に示されていた、IGF-1を産生するHT-29ヒト大腸腺癌細胞株を使用して、in vivoにおけるミニ-IGFBP-3活性を評価した。従って、HT-29異種移植片をヌードマウスにおいて確立した。腫瘍が臨界サイズに達した後、マウスを、3時間の間隔を置いた3回の腹腔内注射でミニ-IGFBP-3またはミニ-IGFBP-3-Fcのいずれかで処置し、そしてマウスをさらに3時間後に屠殺した。腫瘍MEKおよびPI3キナーゼシグナル伝達経路を、これらの腫瘍において、細胞周期レギュレーターRbと一緒に、ウェスタンブロットを使用してそれぞれAKT、ERK-1/2およびRbのリン酸化状態を評価することによって評価した。

【0144】

より特定すると、 2.5×10^6 個のHT-29細胞を、5週令のNMRI-nuマウスの各側腹部に皮下注射した。腫瘍を500mm³の容積まで成長させ、その後、マウスを個々の処置群(n=2)に無作為に分類し、そして3時間毎にミニ-IGFBP-3またはミニ-IGFBP-3-Fcのいずれかの3回の腹腔内注射(340μg)を受けた。対照群には、食塩水を注射した。処置開始から12時間後、マウスを屠殺し、そして切り出した腫瘍を半分に切断した。一方の半分を液体窒素中で瞬間凍結し、そして-80℃で保存した。もう一方の半分をFixで固定し、パラフィンに含め、そして免疫組織化学法のために加工した。ウェスタンブロット分析のために、腫瘍を溶解緩衝液(pH7.4の10mMトリスHCl、150mM NaCl、1%Nonidet P-40、0.1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、1mMEDTA、2mMオルトバナジン酸ナトリウム、錠剤型プロテアーゼ阻害剤[Roche Molecular Biochemicals])中でホモジナイズした。遠心分離後、タンパク質濃度を、Bio-Radタンパク質アッセイ(Bio-Rad)によって決定した。15μgのタンパク質を、4%～12%のSDS-PAGEゲル(Invitrogen)上で泳動させた。メンブランをTBS-T中5%脱脂乳で4℃で一晩かけてブロックし、TBS-Tで洗浄し、TBS-T中の抗マウスまたは抗ウサギセリウワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共に1時間かけて室温でインキュベーションし、そしてTBS-Tで洗浄した。シグナルを、増強された化学発光溶液を使用して可視化し、そしてフィルムに感光させた。使用したブロッティング抗体は、リン酸化Akt、Akt、マイトジェン活性化プロテインキナーゼERK1/2、リン酸化マイトジェン活性化プロテインキナーゼpErk1/2、Rb(BD Biosciences)、β-アクチンおよびG3PDHであり；抗体は、特記しない限り、Cell Signalling Technology製であった。

【0145】

図13に見られるように、ミニ-IGFBP-3またはミニ-IGFBP-3-Fcのいずれかをを用いての12時間の処置は、各々の処置されたマウスの腫瘍におけるAktS473リン酸化を消失させ、このことはPI3Kシグナル伝達経路の強力な遮断を示す。予期された通り、MEKシグナル伝達経路も同様に妨害された。というのも、Erk1/2リン酸化もまた、処置された腫瘍において、その非処置の対応物と比較してかなり減少したからである。従って、細胞周期制御は、Rbタンパク質のリン酸化状態を調べることによって評価された。図13に示したように、Rbタンパク質は非処置の腫瘍において完

10

20

30

40

50

全にリン酸化されたが、Rbリン酸化は全ての処置された腫瘍においては減少した。これらのデータと一致して、有糸分裂指数は、これらの腫瘍において、その非処置の対応物と比較して僅かに低かった（-12%）。合わせて、これらのデータは、ミニ-IGFBP-3およびその誘導体であるミニ-IGFBP-3-Fcが両方共にin vivoにおいて活性であり、IGF-1RまたはIR-Aレセプターチロシンキナーゼのいずれかによって活性化される2つの主要なシグナル伝達経路を妨害し、これにより細胞周期停止のイニシエーションに至ることを示す。従って、IGF-1I産生腫瘍を有する動物におけるプロテアーゼ抵抗性IGF結合タンパク質による遊離IGF-1および遊離IGF-1Iの捕捉は、腫瘍にとって生物学的に利用可能なIGFを枯渇させ、これにより腫瘍を飢餓させ、そして腫瘍細胞周期進行に関与するシグナル伝達経路を遮断する。これらの実験において使用した処置期間は、アポトーシスに関連したマーカーの活性化を観察するには短すぎた。

10

【0146】

実施例7：現在および将来の研究

エストロゲンに対するその依存性を回避する細胞の出現を妨げるミニ-IGFBP-3の能力は、現在処理中である。Luminal A型の腫瘍に典型的なMCF-7細胞はエストロゲンレセプター陽性であり、そしてその増殖をエストロゲンに依存する。これらの実験において、これらの細胞を、ミニ-IGFBP-3の存在下または非存在下においてエストロゲンを枯渇させた培地中に蒔く。エストロゲン非依存性増殖を、クリスタルバイオレットを用いての染色によって対照および試験プレートにおいて評価する。いくつかの対照細胞はそうした条件下で増殖するが、ミニ-IGFBP-3で処理されたプレートにおいては全く細胞は増殖しないと予期される。

20

【0147】

マトリックスメタロプロテイナーゼ、MMP-7およびMMP-9によるタンパク質分解的消化に抵抗するミニ-IGFBP-3の能力もまた現在試験されている。MMP-7およびMMP-9は腫瘍細胞によって発現され、そして癌患者の血流中により多くの量で存在し、そこでネイティブな内因性のIGFBP-3の分解に寄与する。実験において、これらの酵素をまず1mM APMAを用いて活性化する。ミニ-IGFBP-3および完全長IGFBP-3を、活性化MMP-7およびMMP-9に対する基質として比較する。各基質の濃度（20 μM）を、MMP-7またはMMP-9のいずれかと共に1：10

30

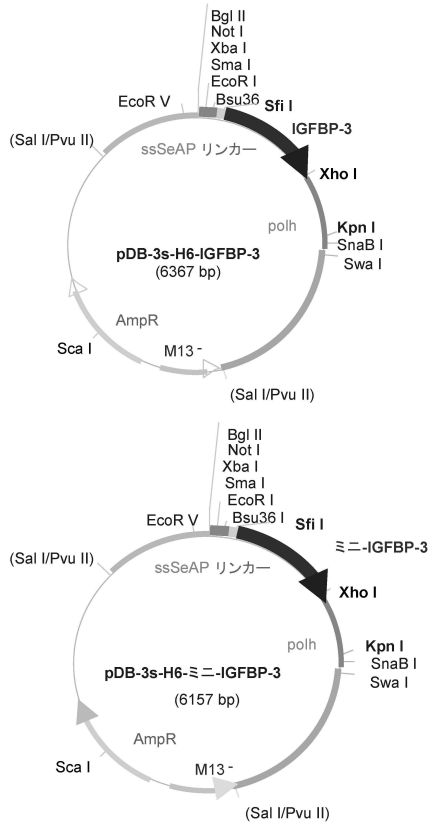
のモル比でインキュベーションする。インキュベーション期間の終了時に、タンパク質をSDS-PAGEによって分析して、そのそれぞれのフラグメントへの開裂を評価する。完全長IGFBP-3は、MMP-7およびMMP-9の両方によって消化されるが、ミニ-IGFBP-3はこのタンパク質分解的攻撃に抵抗性である。

【0148】

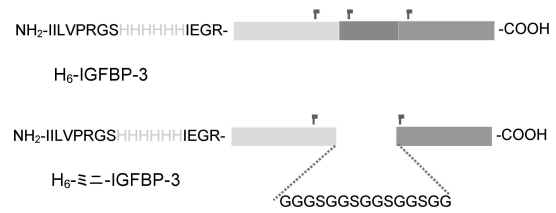
他の態様

本発明の他の態様は、本明細書において開示した本発明の明細書または実施の考察から当業者には明らかであろう。明細書および実施例は、単に例示として考えられ、本発明の真の範囲は以下の特許請求の範囲によって示されることが意図される。

【図 1】



【図 2 A】



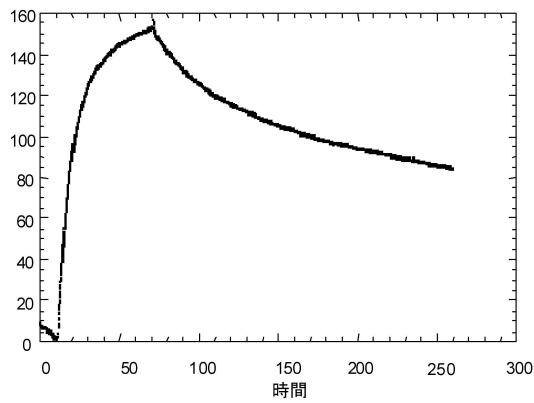
【図 2 B】

```

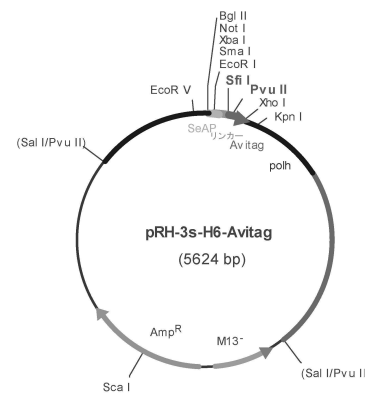
1          20
IILVPRGSHHHHHHIEGRGGQGASSGGLGPVVRCEPCDARALAQCAPPPA
IILVPRGSHHHHHHIEGRGGQGASSGGLGPVVRCEPCDARALAQCAPPPA
40          60
VCAELVREPGCGCCLTCALSEGQPCGIYTERCGSLRCQPSPEARPLQA
VCAELVREPGCGCCLTCALSEGQPCGIYTERCGSLRCQPSPEARPLQA
100         120
LLDGRGLCVNASAVSRLRAYLLPAPPAPGNASESEEDRSAGSVESPSVSS
LLDGRGLCVNASAVS-----
140         160
THRVSDPKFPHLSKIIIIKKGHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKR
-----GGGSGGSGGSGGSGG-----
200         220
ETEGGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNCDKKGFKKKQCRPSKG
ETEGGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNCDKKGFKKKQCRPSKG
240         260
RKRGFVCWCVDKYGQPLPGYTTKGKEDVHCYSMQSK
RKRGFVCWCVDKYGQPLPGYTTKGKEDVHCYSMQSK

```

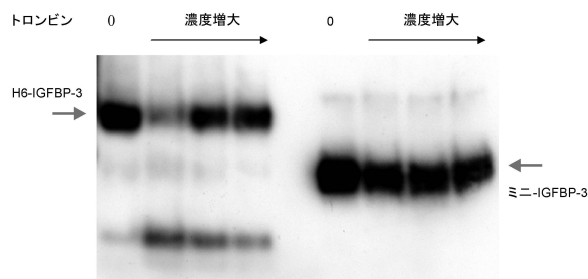
【図 3】



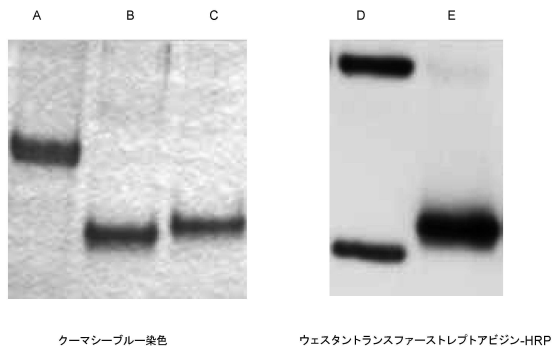
【図 5】



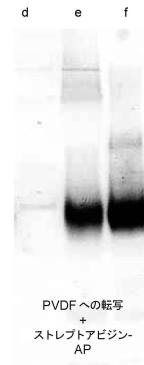
【図 4】



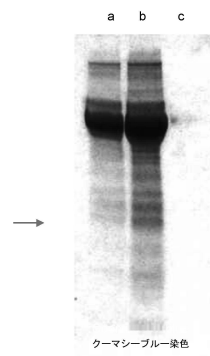
【図 6】



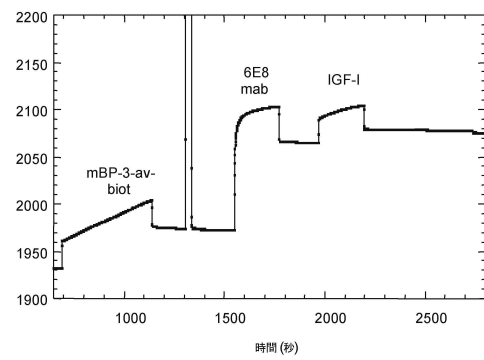
【図 7 B】



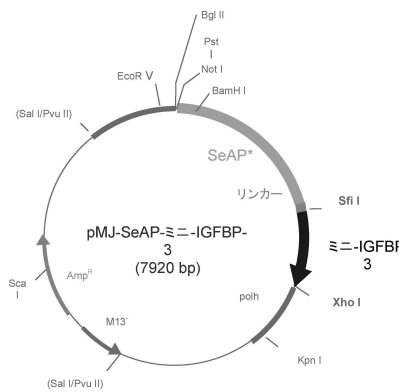
【図 7 A】



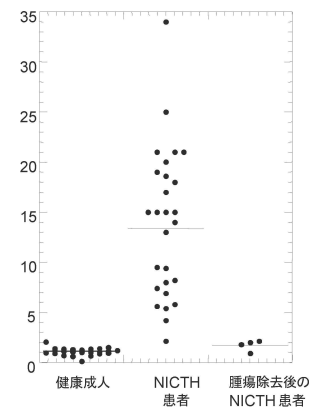
【図 7 C】



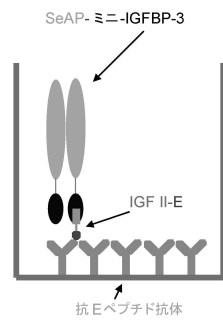
【図 8 A】



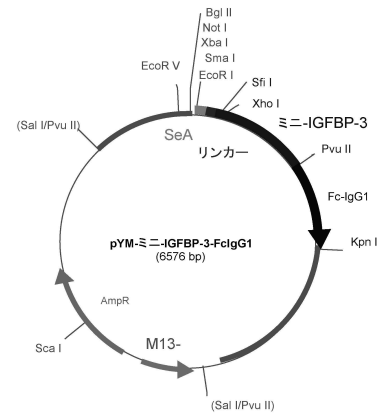
【図 8 C】



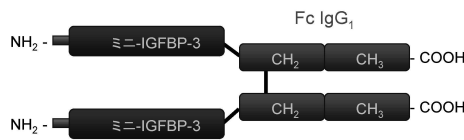
【図 8 B】



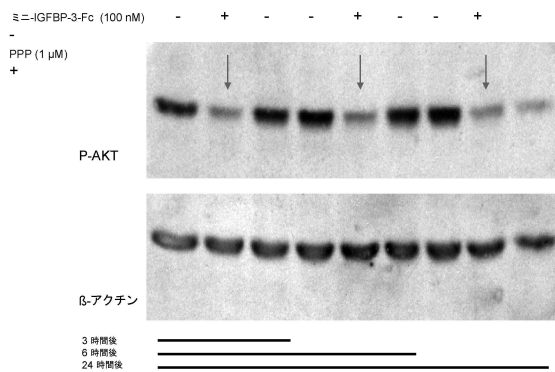
【図 9 A】



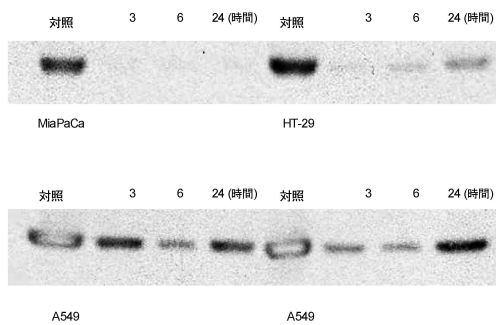
【図 9 B】



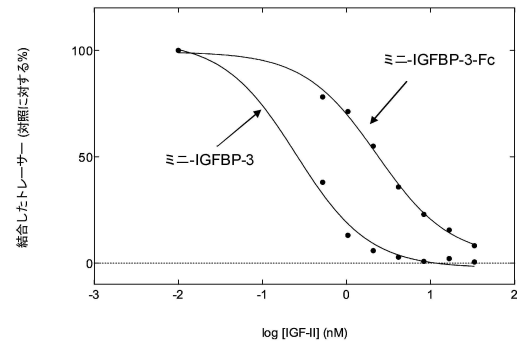
【図 11 A】



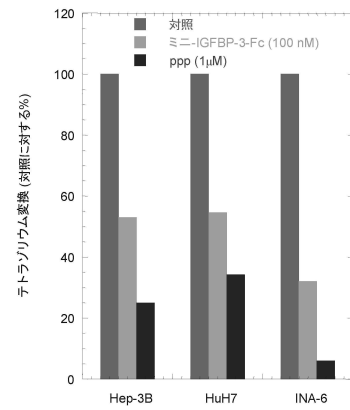
【図 11 B】



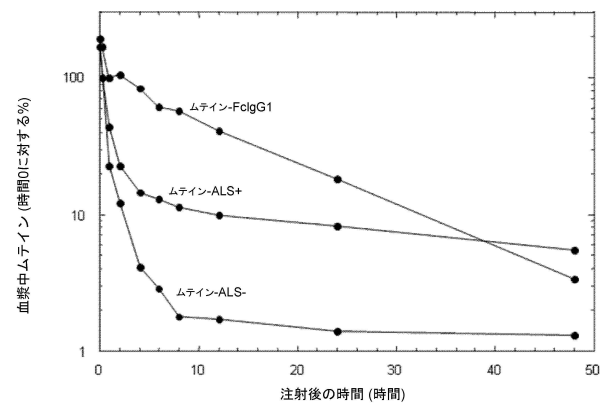
【図 10 A】



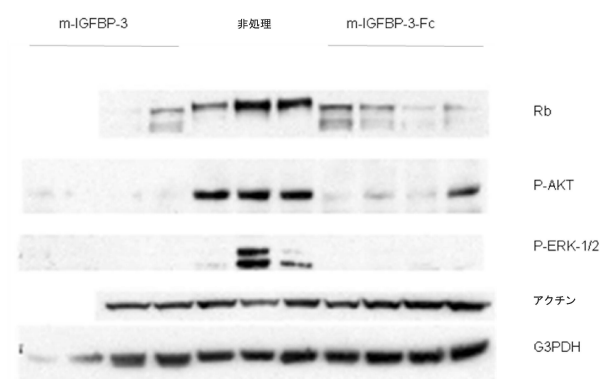
【図 10 B】



【図 12】



【図 1 3】



【配列表】

0006190275000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100181102
弁理士 後藤 孝明

(72)発明者 ゴドー, ジャンーフランソワ
フランス国、エフー75571 パリ・セデックス 12、リュ・デュ・フォブール・サンーアントワヌ 184、オピタル・サンーアントワヌ、アンセルム・ユ938

(72)発明者 ル・ブック, イヴ
フランス国、エフー75571 パリ・セデックス 12、リュ・デュ・フォブール・サンーアントワヌ 184、オピタル・サンーアントワヌ、バティマン・クリルスキー、アンセルム・ユ938

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 国際公開第03/068160 (WO, A1)
特表2006-514535 (JP, A)
Kubler B et al., Isolation and characterization of circulating fragments of the insulin-like growth factor binding protein-3., FEBS Lett., 2002年 5月 8日, 518(1-3), 124-128

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 4 / 0 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

专利名称(译)	IGFBP-3衍生物及其用途		
公开(公告)号	JP6190275B2	公开(公告)日	2017-08-30
申请号	JP2013554904	申请日	2012-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
当前申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
[标]发明人	ゴドー・ジャン・フランソワ ル・ブック・イヴ		
发明人	ゴドー,ジャン-フランソワ ル・ブック,イヴ		
IPC分类号	C07K14/47 C07K19/00 G01N33/53 C12Q1/42 A61K38/17 A61P43/00 A61P17/02 A61P31/18 A61P15/00 A61P25/00 A61P21/02 A61P3/10 A61P9/00 A61P37/06 A61P27/02 A61P35/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/30 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/10 A61P21/02 A61P25/00 A61P27/02 C07K14/4743 G01N33/74 G01N2333/65 C07K14/71 C07K16/2863		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K19/00 G01N33/53.D C12Q1/42 A61K38/17 A61P43/00.105 A61P17/02 A61P31/18 A61P15/00 A61P25/00 A61P21/02 A61P3/10 A61P9/00 A61P37/06 A61P27/02 A61P35/00 C12N15/00.A		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥・希巴达 后藤孝明		
优先权	2011305197 2011-02-24 EP		
其他公开文献	JP2014508760A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了对蛋白水解切割具有抗性的IGFBP-3多肽衍生物。这些IGFBP-3衍生物可用于各种治疗和诊断应用。还提供了包含此类IGFBP-3衍生物的药物组合物和试剂盒以及使用这些衍生物治疗多种疾病的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6190275号 (P6190275)
(45) 発行日 平成29年8月30日 (2017. 8. 30)	(24) 登録日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)	
(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/42 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)	F I C07K 14/47 C07K 19/00 G01N 33/53 C12Q 1/42 A61K 38/17	Z N A D
請求項の数 25 (全 38 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2013-554904 (P2013-554904)	(73) 特許権者 591100596	
(86) (22) 出願日 平成24年2月24日 (2012. 2. 24)	アンステイチュ ナショナル ドク ラ	
(65) 公表番号 特表2014-508760 (P2014-508760A)	サンテ エ ドク ラ ルシエルシュ メ	
(43) 公表日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)	ディカル	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2012/053142	フランス国、エフー 75013 バリ、リ	
(87) 国際公開番号 W02012/113900	ュ・ドゥ・トルビアク I O I	
(87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)	(74) 代理人 110001508	
審査請求日 平成27年1月15日 (2015. 1. 15)	特許業務法人 津国	
(31) 優先権主張番号 11305197. 3	(74) 代理人 100078662	
(32) 優先日 平成23年2月24日 (2011. 2. 24)	弁理士 津国 肇	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100131808	
	弁理士 柳橋 泰雄	
	(74) 代理人 100135873	
	弁理士 小澤 圭子	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 I G F B P - 3 誘導体およびその使用		