

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6018585号
(P6018585)

(45) 発行日 平成28年11月2日(2016.11.2)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(51) Int.Cl.

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

F 1

A 6 1 K 49/00 Z N A
A 6 1 K 49/00 Z

請求項の数 7 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2013-553019 (P2013-553019)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月8日 (2012.2.8)
 (65) 公表番号 特表2014-508147 (P2014-508147A)
 (43) 公表日 平成26年4月3日 (2014.4.3)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2012/000133
 (87) 國際公開番号 WO2012/107725
 (87) 國際公開日 平成24年8月16日 (2012.8.16)
 審査請求日 平成27年2月6日 (2015.2.6)
 (31) 優先権主張番号 1102189.6
 (32) 優先日 平成23年2月8日 (2011.2.8)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 513200313
 キングス・カレッジ・ロンドン
 イギリス国ロンドン ダブリューシー2ア
 ル・2エルエス, ザ・ストランド
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100107386
 弁理士 泉谷 玲子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管イメージングに関する材料および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イメージングプローブに連結したトロポエラスチン特異的結合剤を含むコンジュゲートを含む、ブラークをイメージングするための医薬組成物であつて、該コンジュゲートによるブラークのイメージングは患者がブラークの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定するためのものであり、

該コンジュゲートが、

(DOTA-Gd) - VVGSPSAQDEASPLS,
(DOTA-Gd) - VVGSPSAQDEASPLS-K(DOTA-Gd),
K(DOTA-Gd) - VVGSPSAQDEASPLS-K(DOTA-Gd),
K(DOTA-Gd)K(DOTA-Gd) - VVGSPSAQDEASPLS,
K(DOTA-Gd) - VVGSPSAQDEASPLS,
K(DOTA-Gd) - YPDHVQYTHY - K(DOTA-Gd),
(DOTA-Gd) - YPDHVQYTHY - K(DOTA-Gd),
(DOTA-Gd) - YPDHVQYTHY,
K(DOTA-Gd) - YPDHVQYTHY または
K(DOTA-Gd)K(DOTA-Gd) - YPDHVQYTHY

のうちの 1 つである、前記医薬組成物。

【請求項 2】

コンジュゲートがアミノ酸配列VGVAPGに結合することができる、請求項 1 に記載の医薬

組成物。

【請求項3】

プラーカが心血管プラーカである、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項4】

心血管plaqueがアテローム硬化plaqueである、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

状態が急性心筋梗塞（AMI）、発作または大動脈瘤である、請求項3または4に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

コンジュゲートによるブラークイメージングを用いて、患者のための処置コースを決定し、患者を特定の療法のための患者クラスに配属し、ブラークの負荷を評価し、疾患の進行をモニターし、および／またはある療法に対する患者の応答を判定する、請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

イメージングプローブに連結したトロポエラスチン特異的結合剤を含むコンジュゲートを用いるマークイメージング方法に使用するための請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物であって、該コンジュゲートによるマークイメージングは患者がマークの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定するためのものであり、該方法は下記を含むものである、医薬組成物：

- (a) 患者に、コンジュゲートを含む組成物を投与し；
 - (b) コンジュゲートを患者の血管系のplaques中に存在するいずれかのトロポエラスチンに結合させ；
 - (c)イメージングプローブを検出してplaquesの存在を判定し；そして
 - (d) 心血管plaquesをコンジュゲートでイメージングすることにより、患者がplaquesの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定する。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

[0 0 0 1]

本発明は、ブラーク（斑）のイメージング（画像化）に関する材料および方法、より詳細には、ブラークの負荷および不安定性、疾患の進行、ならびに療法に対する応答を評価するために、ブラークをイメージングできる物質を用いて心血管ブラークをイメージングすることに関する。

【背景技術】

〔 0 0 0 2 〕

急性心筋梗塞（AMI）および発作（脳卒中）は、西洋諸国において依然として死亡および罹病の主因である。AMIは、主に不安定／易損性アテローム硬化plaqueの破裂または浸食により起きる。内皮機能障害、炎症、血管新生、外部リモデリング、および細胞外マトリックス組織崩壊を含めた複雑な一群の生物学的プロセスが、plaqueの進行および脱安定と関連している。同様に、大動脈瘤の発生および破裂は炎症およびマトリックス分解の結果であると考えられている。

【 0 0 0 3 】

破裂 / 浸食しやすいプラークを識別できることが望ましいので、プラークの負荷および不安定性、疾患の進行を評価し、療法に対する応答を評価することは、この領域における研究の主題であった。冠血管造影法、すなわち冠血管壁の間接的視覚化に限定された手法を用いる初期の研究により、疾患の程度、疾患の進行、および関連する心血管疾患死亡率の間の関係が確立された。血管壁を高い空間解像度でイメージングして正確なプラーク負荷の定量を可能にするために、血管内超音波 (intravascular ultrasound) (IVUS) および光学コヒーレンス断層法が開発された。しかし、これらの手法の侵襲性のため、大きな患者集団のスクリーニングまたは追跡調査は実施できない。疾患の負荷と進行は、有害な転帰に対する独立した予測因子として確立された。FDG-PETは、プラークのマ

クロファージ含量と関連があること、またIVUSにおけるエコー透過性（echolucency）、MRにおけるプラーク出血および脂質に富んだプラーク、ならびにマクロファージ特異的CT造影剤の取込みを含めた、易損性プラークのイメージング特徴と関連があることが示された。

【0004】

分子磁気共鳴イメージング（MRI）は非侵襲的手法であり、インビボでの生物学的マークの視覚化を可能にする。他の臨床用分子イメージング様式と比較して有意に高い空間解像度を達成できるので、それは比較的薄い動脈血管壁の評価に好適である。たとえばWO 2007/05491には、プラークのイメージングのためにヒドラジドコンジュゲートをMRI剤として使用することが開示されている。しかし、緩和度（relaxivity）の高い造影剤の設計において前進はなされたが、感度は依然として陽電子放射断層撮影法、単光子放射コンピューター断層撮影法および光学イメージングと比較した分子MRIに対する主な制限因子である。10

【0005】

動脈プラーク中のエラスチンおよびトロポエラスチンの存在は研究の主題であった。Krettek et al. (1)は、ヒトのアテロームおよび腹部大動脈瘤中に非罹患動脈と比較してトロポエラスチンが増加することを記載している。彼らは、マクロファージがトロポエラスチンの供給源の可能性があることを示している。Xu et al. (2)は、トロポエラスチン発現を泡沫細胞病変の発生と密接に関連したものとして記載している。Akima et al. (3)は、脂質に富んだプラークおよび破裂プラーク中のエラスチンmRNAのレベルは高いけれどもエラスチンのレベルは低いことを記載している。20

【0006】

トロポエラスチンおよびエラスチンの視覚化が種々の方法で試みられた；Kozel et al. (4)は色素で標識した抗体を利用して細胞内のエラスチンを視覚化し、Starcher et al. (5)はエラスチンではなくトロポエラスチン上のエピトープに対する抗体を記載している。WO 2011/005322 (6)は、エラスチンに富んだ組織をイメージングするための化合物を記載している。

【0007】

他のコンジュゲートを用いて血管傷害が調べられた。US 5972890 (7)には、血管傷害の部位に結合させるためにペプチド標識コンジュゲートを用いることが示唆されている。US 4877599 (8)には、ヒト-エラスチンに対する抗体をI-125にコンジュゲートさせたものをウサギに使用することが記載されている。30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO 2007/05491

【特許文献2】WO 2011/005322

【特許文献3】US 5972890

【特許文献4】US 4877599

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Krettek et al 'Elastogenesis in human arterial disease: A role for macrophages in disordered elastin synthesis' Arterioscl. Throm. Vas. 23 (2003) 582-587

【非特許文献2】Xu et al 'Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin' Arterioscl. Throm. Vas. 20 (2000) 2566-2572

【非特許文献3】Akima et al 'Soluble Elastin Decreases in the Progress of Atherosclerosis Formation in Human Aorta' Circ. J. 73 (2009) 2154-2162

【非特許文献4】Kozel et al 'Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix remodeling' J. Cell. Physiol. 210 (2003) 10-1740

【非特許文献5】Kozel et al 'Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix remodeling' J. Cell. Physiol. 210 (2003) 10-1750

lular matrix assembly using timer reporters' J. Cell. Physiol. 207 (2006) 87-96
【非特許文献 5】Starcher et al 'Antibody raised to AKAAKAAAKA sequence on tropoelastin recognizes tropoelastin but not mature crosslinked elastin: A new tool in metabolic and structural studies of elastogenesis' Connect. Tissue Res. 40 (1999) 273-282

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、当該技術分野では、plaques のイメージングのための、特に plaque が破裂 / 浸食しやすいかどうかを評価するための、さらに他の方法を提供することが依然として求められている。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

概して、本発明は、破裂または浸食のリスクをもつ易損性 plaque は安定な plaque と比較してトロポエラスチン含量が高く、トロポエラスチンに特異的に結合することができるイメージング剤を plaque のイメージングのために、たとえば plaque の負荷および不安定性、疾患の進行、ならびに / あるいは療法に対する応答の評価のために使用できるという知見に基づく。あるいは、またはさらに、不安定 plaque 中では安定な plaque と比較してリシルオキシダーゼ活性が低下することを示す本明細書に開示する結果に基づいて、本発明は不安定 plaque のマーカーとしてのリシルオキシダーゼの使用を含む。如何なる特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、リシルオキシダーゼはトロポエラスチンを架橋して成熟エラスチンを生成するのに関与する酵素であるため、これらの知見は関連している。したがって、本発明は、リシルオキシダーゼの存在、量または活性を検出するための新規なトロポエラスチン特異的造影剤および / またはイメージング剤を用いて不安定な破裂しやすい plaque の検出を改善するための手段を提供し、こうしてこのハイリスク患者集団においてより良好な誘導処置を行なうことができる。

20

【0012】

エラスチンは血管壁において重要な構造的役割を果たすが、生物学的シグナル伝達機能も備えている。幾つかの病的刺激がアテローム硬化症におけるエラスチン形成 (elastogenesis) を誘発して plaque の発生に際してエラスチン含量を顕著に増大させるのに関与している可能性がある。未熟な弾性線維は、炎症細胞を動員するためのアテローム形成刺激を生じる可能性がある。ヒトのアテローム硬化 plaque はそれらの相対エラスチン含量に基づいて潜在的に線維サブタイプとアテロームサブタイプに区別できることが指摘されているので、plaque 内エラスチン含量の量的变化のイメージングは単独で特に plaque の負荷を評価するための補足情報を与えることができる。

30

【0013】

したがって、第 1 観点において本発明は、トロポエラスチン特異的結合剤またはリシルオキシダーゼ特異的結合剤を含む plaque イメージング用コンジュゲートであって、結合剤がイメージングプローブに連結したものを作成する。

40

【0014】

さらに他の観点において、本発明は、トロポエラスチン特異的結合剤またはリシルオキシダーゼ特異的結合剤を含む、plaque のイメージング方法に使用するためのコンジュゲートであって、結合剤がイメージングプローブに連結したものを作成する。

【0015】

さらに他の観点において、本発明は、plaque のイメージングのための医薬の調製におけるコンジュゲートの使用であって、該コンジュゲートがトロポエラスチン特異的結合剤およびイメージングプローブを含むものを提供する。

【0016】

本発明は、心血管 plaque のイメージングに関するものであってもよい。場合により、本発明の観点のいずれか 1 つによれば、plaque は心血管 plaque であってもよい。場合

50

により、本発明の観点のいずれか1つによれば、プラーカはアテローム硬化性の心血管プラーカであってもよい。

【0017】

さらに他の観点において、本発明は、本発明のコンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。一般に、組成物は患者に静脈内投与するためのものであろう。

【0018】

さらに他の観点において、本発明は対象において心血管プラーカをイメージングする方法を提供し、この方法は下記を含む：

(a) 対象に、トロポエラスチン特異的結合剤およびイメージングプローブを含む心血管プラーカイメージング用コンジュゲートを含む組成物を投与し；
10

(b) イメージング剤を対象の血管系のプラーカ中に存在するいずれかのトロポエラスチンに結合させ；

(c) イメージングプローブを検出してプラーカの存在を判定する。

【0019】

したがって本発明の方法は、心血管プラーカ、たとえばアテローム硬化プラーカをコンジュゲートでイメージングすることにより、患者がプラーカの破裂または不安定性により起きる状態、たとえば急性心筋梗塞（AMI）、発作または大動脈瘤を発現する可能性を判定するために使用できる。さらに、あるいはその代りに、本発明の方法は、コンジュゲートによる心血管プラーカ、たとえばアテローム硬化プラーカのイメージングを、下記のために使用することをさらに含んでもよい：(i) 患者のための処置コースを決定する；および/または(ii) 患者を特定の療法のための患者クラスに配属する；および/または(iii) プラーカの負荷を評価する；(iv) 疾患の進行をモニターする；および/または(v) ある療法に対する患者の応答を判定する。これらの方法のいずれかの一部として、段階(c)はプラーカ中に存在するトロポエラスチンの定量を含むことができる。
20

【0020】

本発明の態様をここで添付の図面および例を参照して記載するが、これらは例示であって限定ではない。

【0021】

本明細書中で用いる“および/または”は、2つの特定した特徴または成分それぞれの具体的開示であって他方を含むものまたは含まないものであると解釈すべきである。たとえば“Aおよび/またはB”は、(i) A、(ii) B、および(iii) AとBの具体的開示であって、それを個別に本明細書に述べたと同様であると解釈すべきである。
30

【0022】

状況からそうではないことが指示されない限り、前記に述べた特徴の記載および定義は本発明のいずれか特定の観点または態様に限定されず、記載したすべての観点および態様に同等に適用される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、トロポエラスチンからのエラスチン生成を示す図である。

【図2】図2は、IHCによるウサギの安定プラーカおよび不安定プラーカにおけるトロポエラスチン線維の定量であり、安定プラーカと対比して不安定プラーカではトロポエラスチンのアップレギュレーションがみられることを示す。
40

【図3】図3は、ウサギの安定プラーカおよび易損性プラーカにおける総エラスチン（トロポエラスチンおよび成熟エラスチン）線維の定量であり、安定プラーカと比較して易損性プラーカは総エラスチン（トロポエラスチン+成熟エラスチン）含量が高いことを示す。

【図4】図4は、易損性プラーカではLOXがダウンレギュレートされていることを示す。

【図5】図5は、ペプチド配列VVGSPSAQDEASPLSがトロポエラスチン上のヘキサペプチドGVAPGを結合することを示す図である。
50

【図6】図6は、ガドリニウム標識(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLSによるApoE^{-/-}マウスモデルにおけるプラークのインビボイメージングであり、このコンジュゲートはプラーク負荷された腕頭動脈および大動脈弓に優先的に取り込まれるが、プラークを含まない頸動脈には取り込まれないことを示す。

【図7】図7は、ガドリニウム標識K-(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHYによるApoE^{-/-}マウスモデルにおけるインビボイメージングであり、このコンジュゲートはプラーク負荷された腕頭動脈および大動脈弓に優先的に取り込まれるが、プラークを含まない頸動脈には取り込まれないことを示す。

【図8】図8は、免疫組織化学的検査を示す。トロポエラスチン染色(褐色)により、罹患した腕頭動脈において新生内膜(白い矢印)および外膜(黒い矢印)にトロポエラスチンが存在するが、プラークを含まない腕頭動脈およびプラークが負荷された腕頭動脈の両方において中膜には全くないしほとんどトロポエラスチンが存在しないことが確認される。
10

【図9】図9は、K-(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHYの生体内分布であり、腎クリアランス、および腕頭動脈における優先的取込みを示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

トロポエラスチン特異的またはリシリオキシダーゼ特異的結合剤

トロポエラスチンはマトリックスタンパク質であり、それは合成されて血管壁の一部を形成する。未熟なトロポエラスチンの発現後、それは酵素リシリオキシダーゼ(LOX)により共有結合架橋して構造性の成熟エラスチンになり(図1)、これが血管壁に引張り強さを与える。したがって本発明は、デノボ合成されたトロポエラスチンと成熟した架橋エラスチンとを、特にインビボで識別できるコンジュゲートに関するものである；前者はプラークの不安定性および破裂のリスク増大と関連し、これがAMIおよび/または発作および/または大動脈瘤を生じる。ヒトのトロポエラスチン、リシリオキシダーゼおよびエラスチンの配列は、ウサギなどの動物モデルにおける対応するポリペプチドの配列と共に配列データベースにおいて入手できる(後記の配列セクションも参照されたい)。特異的結合ペプチドを設計し、あるいは抗体に基づく結合剤をスクリーニングするために、他の種に由来するトロポエラスチンを用いることもできる。たとえば同じコンジュゲートを動物モデルとヒト患者においてプラークのイメージングに使用するために、1種より多いトロポエラスチンに特異的に結合できるペプチドまたは抗体を設計することが有利な場合がある。
20

【0025】

場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドはトロポエラスチンを特異的に結合することができる。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドはエラスチンには実質的に結合しない。好ましい態様において、トロポエラスチン特異的結合剤は、インビボでトロポエラスチンを特異的に結合することができ、かつインビボでエラスチンには実質的に結合しない。
30

【0026】

場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、血管内の他の成分またはタンパク質と比較してトロポエラスチンに対して特異的である。好ましい態様において、トロポエラスチン特異的結合剤は、インビボで血管内の他の成分またはタンパク質と比較してトロポエラスチンに対して特異的である。
40

【0027】

一般に、トロポエラスチン特異的結合剤は、トロポエラスチンに特異的に結合することができるポリペプチドまたはペプチドであってもよく、あるいはトロポエラスチンに特異的に結合することができる抗体分子であってもよい。好ましい態様において、トロポエラスチン特異的結合剤は、インビボでトロポエラスチンに特異的に結合することができるポリペプチドまたはペプチドであってもよく、あるいはインビボでトロポエラスチンに特異
50

的に結合することができる抗体分子であってもよい。同様に、リシリ - オキシダーゼ特異的結合剤は、リシリオキシダーゼに特異的に結合することができるポリペプチドまたはペプチドであってもよく、あるいはリシリオキシダーゼに特異的に結合することができる抗体分子であってもよい。

【0028】

トロポエラスチン特異的結合ペプチドの例には、アミノ酸配列VVGSPSAQDEASPLS、EGFEPGまたはYPDHVQYTHYをもつペプチドが含まれる。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、配列VVGSPSAQDEASPLS、EGFEPGまたはYPDHVQYTHYからなる。当業者は、トロポエラスチンおよび / またはリシリオキシダーゼに結合することが知られているポリペプチドの既知のアミノ酸配列を利用し、交差反応を避ける必要性を考慮して、たとえばトロポエラスチン特異的結合剤の場合には特にインビオで成熟エラスチンに有意な程度に結合しないように、別のペプチド配列を容易に設計することができるであろう。実施例において、用いたペプチドは設計された後に Peptide Synthetics (Peptide Protein Research Ltd) により化学合成された。

【0029】

場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、アミノ酸配列VVGSPSAQDEASPLSからの少なくとも4、6、8、10、12または14個のアミノ酸の配列を含む。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、50個を超えない、30、20、18または16個を超えないアミノ酸の長さである。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、アミノ酸配列VVGSPSAQDEASPLSを含むか、あるいはそれからなる。

【0030】

場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、アミノ酸配列YPDHVQYTHYからの少なくとも4、6または8個のアミノ酸の配列を含む。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、50個を超えない、30、20、18、16、14、12または10個を超えないアミノ酸の長さである。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、アミノ酸配列YPDHVQYTHYを含むか、あるいはそれからなる。

【0031】

本発明において、トロポエラスチン特異的結合剤は、アミノ酸配列VGVAPGを特異的に結合することができるペプチドまたは抗体分子であってもよい。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合剤は、アミノ酸配列QDEAを含むペプチドであってもよい。場合により、本発明の観点のいずれか1つによれば、トロポエラスチン特異的結合ペプチドは、50個を超えない、30、20、18、16、14、12または10個を超えないアミノ酸の長さである。如何なる特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、トロポエラスチン特異的結合剤上のアミノ酸残基QDEAがトロポエラスチンのヘキサペプチドVGVAPGを結合すると考えられる（図5）。

【0032】

本発明において、トロポエラスチン特異的結合剤は、トロポエラスチンに特異的に結合することができるペプチドまたは抗体分子であってもよく、好ましくはエラスチンおよび / または血管系の他の成分に実質的に結合しない。好ましい態様において、トロポエラスチン特異的結合剤は、インビオでトロポエラスチンに特異的に結合することができ、かつ好ましくはエラスチンおよび / または血管系の他の成分に実質的に結合することができない、ペプチドまたは抗体分子であってもよい。トロポエラスチン特異的結合剤（たとえば、ペプチドまたは抗体分子）は、トロポエラスチンに対して50nM未満、40nM未満、30nM未満、20nM未満、10nM未満、または1nM未満の解離定数をもつことができる。これに対し、好ましくは、トロポエラスチン特異的結合剤（たとえば、抗トロ

10

20

30

40

50

ポエラスチン抗体またはペプチド)はエラスチンに対して $100 \mu\text{mol/L}$ を超える解離定数をもつことができる。たとえば、トロポエラスチン特異的結合剤(たとえば、抗トロポエラスチン抗体またはペプチド)は、インビボでのエラスチン(たとえば、哺乳動物、たとえばヒト対象中に存在するか、またはそれに由来するエラスチン)に対して $1, 10, 100$ または $200 \mu\text{mol/L}$ を超える解離定数をもつことができる。

【0033】

本発明において、リシリオキシダーゼ特異的結合剤が、リシリオキシダーゼに特異的に結合することができかつ血管系の他の成分には結合しないペプチドまたは抗体分子である場合、このペプチドまたはリシリオキシダーゼ抗体は、リシリオキシダーゼに対して 50nM 未満、 40nM 未満、 30nM 未満、 20nM 未満、 10nM 未満、または 1nM 未満の解離定数をもつことができる。
10

【0034】

トロポエラスチン特異的結合ペプチドまたは抗トロポエラスチン抗体分子の結合反応速度および親和性(平衡解離定数 K_d として表わす)は、たとえばBIAcore分析を用いる表面プラズモン共鳴などの標準法を用いて測定できる。

【0035】

本明細書に記載する抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシリオキシダーゼ抗体分子は、免疫グロブリンまたはそのフラグメントであってもよく、天然のもの、または部分もしくは完全合成により製造したもの、たとえば組換え分子であってもよい。抗トロポエラスチン抗体分子の一例は、Calbiochemから購入できる: Cat No. 324
20 756。
756。

【0036】

抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシリオキシダーゼ抗体分子には、抗体の抗原結合部位を含むいずれかのポリペプチドまたはタンパク質を含めることができ、これにはいずれかのイソ型またはサブクラスの Fab 、 Fab_2 、 Fab_3 、ディアボディー、トリアボディー、テトラボディー、ミニボディー、および単一ドメイン抗体、ならびに完全抗体が含まれる。抗体分子、ならびにそれらを構築および使用するための方法は、たとえば Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136 (2005)に記載されている。
。

【0037】

ある好ましい態様において、抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシリオキシダーゼ抗体分子は、完全抗体であってもよい。たとえば、IgG、IgA、IgEもしくはIgM、またはいずれかのイソ型サブクラス、特にIgG1およびIgG4。抗トロポエラスチン抗体分子はモノクローナル抗体であってもよい。
30

【0038】

抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシリオキシダーゼ抗体分子は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であってもよい。

【0039】

本明細書に記載する抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシリオキシダーゼ抗体分子は、夾雑物、たとえば他のポリペプチドおよび/または血清成分を結合することができる抗体を含まないという意味で、単離されていてもよい。モノクローナル抗体はある目的に好ましいが、ポリクローナル抗体も使用できる。
40

【0040】

抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシリオキシダーゼ抗体分子は、当該技術分野で標準的な手法を用いて得ることができる。抗体を产生する方法には、哺乳動物(たとえば、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジまたはサル)をタンパク質またはそのフラグメントで免疫化することが含まれる。抗体は、免疫化した動物から当該技術分野で周知の多様な手法のいずれかを用いて採取し、好ましくは目的抗原に対する抗体の結合を利用してスクリーニングができる。たとえば、ウェスタンプロット法または免疫沈降法を使用できる(Armitage et al., 1992, Nature 357: 80-82)。動物からの抗体およ
50

び／または抗体産生細胞の分離は、動物をと殺する段階を含む場合がある。

【0041】

ペプチドによる動物の免疫化の代替または補足として、あるタンパク質に対して特異的な抗体は、組換え製造した発現免疫グロブリン可変ドメインのライブラリーから、たとえばそれらの表面に機能性免疫グロブリン結合ドメインを提示するラムダバクテリオファージまたは纖維状バクテリオファージを用いて得ることができる；たとえば、W092/01047を参照。ライブラリーは、ナイーブなもの、すなわちいかなるタンパク質（またはフラグメント）によっても免疫化されたことがない生物から得た配列から構築したものであってもよく、あるいは目的抗原に曝露された生物から得た配列を用いて構築したものであってもよい。

10

【0042】

ある態様において、抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシルオキシダーゼ抗体分子を、いずれか好都合な手段、たとえば前記方法により調製し、次いでエラスチン（および／または血管壁の他の成分）と対比したトロポエラスチンへの差示結合についてスクリーニングすることができる。適切なスクリーニング方法は当該技術分野で周知であり、それらによりエラスチンなどの非トロポエラスチンタンパク質と対比してトロポエラスチンへの結合増大を示す抗体またはリシルオキシダーゼに結合することができる抗体を当業者が同定できる。

【0043】

調製および／または単離した後、抗トロポエラスチン抗体分子または抗リシルオキシダーゼ抗体分子の生物活性を、たとえば前記の結合実験により、あるいはイメージング剤としてのコンジュゲートの特性を判定できるようにコンジュゲートの製造に際して、試験することができる。

20

【0044】

抗体分子は普通は免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VH）および免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VL）を含む抗原結合ドメインを含むが、重鎖可変ドメイン（VH）のみを含む抗原結合ドメインもありうる（たとえば、ラクダまたはサメの抗体）。

【0045】

この用語には、抗体の結合ドメインを含むいずれかのポリペプチドまたはタンパク質も含まれる。抗原結合ドメインを含む抗体フラグメントは、たとえばFab、scFv、Fv、dAb、Fd；およびディアボディーである。モノクローナル抗体および他の抗体を採取すること、また組換えDNA技術の手法を用いて元の抗体の特異性を保持した他の抗体またはキメラ分子を作製することができる。そのような手法は、抗体の免疫グロブリン可変部または相補性決定領域（CDR）を、異なる免疫グロブリンの定常部に、または定常部プラス枠組み構造領域に導入するのを伴うことができる。たとえばEP 0 184 187 A、GB 2,188,638 AまたはEP 0 239 400 Aを参照。

30

【0046】

トロポエラスチン特異的抗体および抗リシルオキシダーゼ抗体分子は当該技術分野で既知であり、Calbiochem / Abcamなどの業者から市販されている。あるいは、当業者が前記に従って候補抗体を容易に調製およびスクリーニングすることができる。

40

【0047】

C：イメージングプローブ

本発明のコンジュゲートは、トロポエラスチン特異的結合剤のほかに、イメージング法、たとえばMRI、PETもしくはSPECTまたはその組合せにより検出できる、イメージングプローブを含む。イメージングプローブのタイプの例には、放射性核種、光学標識または常磁性標識が含まれる。本発明は、たとえばマルチモードイメージングの実施が可能になるように、コンジュゲートと連結または会合できるさらに他の標識プローブの使用も伴うことができる。光学プローブならびに放射性核種およびMRI造影剤の取込みが可能であることにより、診断および検出を増強する様式を組み合わせるきっかけが得られる；たとえば、PETまたはSPECTを用いる全身スキャンにより、全身レベルの疾

50

患位置を同定することができる。同様に、PETとMRイメージングの組合せにより、高感度(PET、SPECT)、信号の定量(PET)、および解剖学的解像(MR)、ならびに微小環境の測定(MRコントラスト増強)を得ることができる。

【0048】

本発明の好ましい一群のコンジュゲートは、トロポエラスチン特異的結合剤がガドリニウムなどのMRI活性原子に錯化しうる基に連結したものを含むMRI剤である。別のMRI信号素子は酸化鉄を含有することができる。さらに他の可能性は、NMRもしくはMRI標識としての¹⁹F、および/またはたとえばPETもしくはCTイメージングのための標識としての¹⁸Fの使用である。

【0049】

1態様において、MRI活性原子に錯化しうる基はDOTAを含む。ある態様において、MRI活性原子に錯化しうる基はDOTA-リシンである。

【0050】

本発明に従って使用される放射性核種プローブは、それらのプローブが用いられる用途に応じて広範な種々の放射性核種を使用できる。本発明のプローブの一部を形成しうる放射性核種の例には、テクネチウム、レニウム、銅、コバルト、ガリウム、イットリウム、ルテチウム、インジウム、ジルコニウム、カーボン、ヨウ素、フッ素、およびアスタチン同位体、たとえばTc-99m、Ga-67、In-111、I-123(SPECT)、Cu-64、Cu-60、Cu-61、Cu-62、Tc-94m、Ga-68、Co-55、F-18、C-11、I-124、Zr-89(PET)、Cu-67、Re-186、Re-188、Y-90、Lu-177、I-131(放射性核種療法)が含まれる。本発明は、放射性核種を単独で、または組み合わせて使用できる。一般に、テクネチウム同位体はイメージング目的に、レニウム同位体は療法目的に、また銅およびハロゲン同位体はイメージングと療法の両方に用いられる。

【0051】

光学プローブの例には、蛍光体、たとえばフルオレセイン、発光分子、および錯体、たとえばランタニド錯体が含まれる。

【0052】

リンカーおよびコンジュゲーション化学

ある態様において、コンジュゲートは、トロポエラスチン特異的結合剤とイメージングプローブを連結するためのリンカーまたは官能基を含むことができる。リンカーは短いペプチド配列であってもよく、あるいは化学物質リンカーであってもよい。ペプチドリンカー配列の使用は6~25個のアミノ酸の長さのものであり、より好ましくは9~16個のアミノ酸の長さが当該技術分野で知られている。リンカーは一般に結合剤およびイメージングプローブに連結するための反応性基、たとえば遊離システィン残基を含む。

【0053】

コンジュゲート

ある態様において、コンジュゲートは下記のうちのいずれかである：

(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS,

(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS-K(DOTA-Gd),

K(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS-K(DOTA-Gd),

K(DOTA-Gd)K(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS,

K(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS,

K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY-K(DOTA-Gd),

(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY-K(DOTA-Gd),

(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY,

K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHYまたは

K(DOTA-Gd)K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY。

【0054】

使用

10

20

30

40

50

1 観点において、本発明は、対象の心血管系中のトロポエラスチンのイメージング方法に使用するための、特にpla-queのイメージングのための、コンジュゲートを提供する。この方法は一般に下記の段階を伴う：

- (a) 対象に、トロポエラスチン特異的結合剤およびイメージングプローブを含む心血管pla-queイメージング用コンジュゲートを含む組成物を投与し；
- (b) イメージング剤を対象の血管系のpla-que中に存在するいずれかのトロポエラスチンに結合させ；
- (c) イメージングプローブを検出してpla-queの存在を判定する。

【0055】

pla-que中のトロポエラスチンと接触して結合させるために、一般に、前記コンジュゲートを含む組成物は対象に静脈内投与するためのものとなるであろう。結合が起きるのに適切な猶予後に、本明細書に記載するイメージング法を用いてイメージングプローブを検出することができる。検出段階の結果は、次いでpla-que中に存在するトロポエラスチンを定量するために使用でき、次いでpla-queの負荷および/またはpla-que破裂の可能性を評価するために、ならびに/あるいは疾患の進行および/または療法に対する応答をモニターするために使用できる。これの目的は、特にAMI、発作および/または大動脈瘤のリスクに関して対象の予後を判定すること、ならびに/あるいは対象の状態の改善を意図とした療法介入を決定する補助とすることであろう。

【0056】

前記コンジュゲートを用いるイメージングの主な手段はMRIを利用するが、これを他の核医学イメージング法、たとえば単光子放射断層撮影法(SPECT)、すなわち放射性核種から放射されるガンマ線を検出して試料または対象における放射性核種の分布の三次元イメージを作成するイメージング法、および陽電子放射断層撮影法(PET)、すなわち試料または対象に導入した陽電子放射型の放射性核種によって間接的に放射されるガンマ線の対を検出することにより三次元イメージを提供するイメージング法と併用できる。たとえば、SPECT試験は^{99m}Tcを用いて、またPET試験は^{144m}Tcを用いて実施できる。しかし、当業者には、本発明に利用できる他の適切なSPECTおよびPET放射性核種を承知しているであろう。一般に本発明は、イメージングプローブの適切な選択により、陽電子放射断層撮影法(PET)、単光子放射断層撮影法(SPECT)、光学イメージング(OI)および/または磁気共鳴イメージング(MRI)に利用できる。

【0057】

したがって、本発明のコンジュゲートは、マルチモードイメージングの方法、すなわち情報またはイメージが2つの異なる手法から得られるものに使用できる；2つの異なる手法を用いて検出できるイメージングプローブの検出によるもの、あるいは、生体系内でナノ粒子が局在化する部位に第2標識を付与することによるもの、最も簡便には第2標識を前記に詳細に説明したコンジュゲートと連結または会合させることによるもの。マルチモード試験は2つの様式で同時記録されて同時にイメージングを行なうことができ、あるいは2段階で行なう必要があるが、2つの手法を用いて得た空間情報を比較できるように一般に同一試料を利用する。マルチモードイメージングの例には、PET/CT、SPECT/CT、PET/MRおよびSPECT/MRが含まれる。

【0058】

たとえば、下記の例示プロトコルを本発明の方法によるイメージングに使用できる。冠動脈壁および大きな血管、たとえば大動脈における造影剤取込みを視覚化するためには、ナビゲーターゲーティッド、心電同期型、脂肪抑制T1-強調3Dグラディエントエコー反転回復法 ターゲティッドまたは全心臓シーケンス(navigator-gated, cardiac-triggered, fat-suppressed T1-weighted 3D gradient echo inversion recovery targeted or whole heart sequence) (3D IR TFEまたは3D IR SSFP)を使用できる。3D IR TFEシーケンスのイメージングパラメーターは、視野(field of view) = 320 × 320 mm、行列(matrix) = 256 × 256、取得平面内解像度(acquired in-plane resolution) = 1.25 × 1.25 mm、再構築切片厚さ(reconstruct

10

20

30

40

50

ed slice thickness) = 1.5 mm (取得 (acquired) : 3 mm)、取得ウインドウ (acquisition window) = 80 ~ 100 ms、反復時間 / エコー時間 (repetition time/echo time) = 5.8 ms / 1.9 ms、フリップ角 (flip angle) = 30°、始動サイクル数 (startup cycles) = 5、および切片数 (number of slices) = 20 を含むことができるが、全心臓およびSSFP プロトコルについては異なる場合がある。Look Look シーケンスを用いて、患者特異的な反転時間 (inversion time) (TI) をゼロ血液信号の血液に調整する。

【0059】

材料および方法

トロポエラスチン特異的結合剤

10

3種類の異なるペプチド (VVGSPSAQDEASPLS、EGFEPG および YPDHVQYTHY) をトロポエラスチン結合剤として選択し、ガドリニウムおよび PET / SPECT 標識のための DOT A - リシンとコンジュゲートさせた。

【0060】

実験設計

コンジュゲートのインビオおよびエクスピオ試験について本明細書に記載する原理実験の証明には、マウスモデルおよびウサギモデルを用いた。

【0061】

結合試験

20

トロポエラスチンおよび TNF - アルファでコートしたペトリ皿を用いる結合試験を実施して、結合剤の特異性を立証する。さらに、エラスチンおよびマクロファージの視覚化のために血管検体の透過型電子顕微鏡検査を実施し、一方で、ラーク負荷された血管壁試料におけるガドリニウム分布との共局在性判定 (colocalization) のために X 線スペクトルを取得する。

【0062】

組織学的検査

動物を MRI 直後に安樂死させる。その後、腕頭動脈および腹部大動脈を切除して 3 mm の断片に切断する。断片を、パラフィン包埋断片については 3 μm 切片、 OCT 包埋断片については 6 μm に切断する。断片を、次いで細胞浸潤についてヘマトキシリンおよびエオシン (H & E)、エラスチンについてミラーのエラスチカ - ワンギーソン染色 (Miller's elastica van Gieson) (EVG)、ならびにラークの形態およびコラーゲン沈着についてマッソンの三重染色法 (Masson's trichrome) およびピクロシリウスレッド (Picrosirius Red) で染色する。さらに、トロポエラスチン、TNF - アルファおよび LOX に対して特異的な抗体による免疫染色を実施する。検査する血管検体中の Gd のモル濃度を定量するために、質量分析 (MS) を適用する。

30

【0063】

ApoE マウスモデル

進行性アテローム硬化症のマウスモデルにおいて高脂肪食開始後 4、8 および 12 週目に、またアンギオテンシン II (Ang - II) 誘発による大動脈瘤形成のモデルにおいて Ang - II 放出ミニポンプ埋込み後 1、2、3 および 4 週目に、MRI を実施する。トロポエラスチンまたは TNF - アルファ結合性の造影剤 (contrast agent) (CA) のいずれかを投与した各時点で 10 匹のマウスをスキャンする；それぞれ合計が 60 匹および 80 匹のマウスになる。動物に各時点で造影剤の前と後に MRI セッションを受けさせ、その後、組織学的検査、免疫染色、電子分光法および質量分析による評価のためにと殺する。処置効果を立証するために、10 匹のマウスをスタチン類による 12 週間の治療後にトロポエラスチン結合性造影剤でスキャンする。トロポエラスチン合成における LOX の役割を立証するために、10 匹のマウスを LOX 阻害剤処置の開始後 12 週目にトロポエラスチン造影剤でスキャンする。

40

【0064】

ラーク破裂モデル

50

ニュージーランドシロウサギに高コレステロール食 (Special Diets Services) を 2 週間給餌し、次いで腹部大動脈のバルーン傷害を施す。その後、高脂肪食をさらに 6 週間続けた後、4 週間の普通食を与える。このプロトコルを用いたラークは、A H A I I ~ V I 型病変と比較して類似の特徴を発現することが示されている（石灰化病変の存在を除外する）。ヒスタミンおよびラッセルクサリヘビ蛇毒 (RVV) を用いてラーク破裂を誘発する前に、トロポエラスチン結合性 MR 造影剤を用いて MRI を実施する。ラークの破裂 / 浸食を誘発した後 48 時間に、管腔内血栓の存在を検出して血栓の位置と誘発前トロポエラスチン - Gd との相関性を求めるために MRI を反復する。合計 16 匹のウサギをスキャンして、ラーク破裂を伴うウサギまたは伴わないウサギは約 8 匹 (50%) となる。最終スキャンの直後に、動物を組織学的検査、免疫染色、質量分析および電子分光法による評価のためにと殺す。

【実施例】

【0065】

ウサギ大動脈断片を凍結保護し (30% ショ糖)、組織凍結媒体中に包埋し、-80 で保存した。一連の 10 μm 厚さの横断切片 (300 μm 長さに及ぶ) を 500 μm 間隔で採集した。切片を、ラークの全般的な形態検査のためのマッソンの三重染色法、成熟および未熟エラスチン線維の検出のためのワンギーソンのエラスチン染色、ならびにトロポエラスチン線維、LOX およびマクロファージの検出のための免疫組織化学的検査に用いた。破壊されたラークはマッソンの三重染色法により分類され、ヒトのラークについて定義されるように破裂したものと浸食されたものの両方を含んでいた。破壊されていないラークには血栓が覆っていないものを含めた。

【0066】

免疫組織化学的検査をアビジン - ピオチン - ペルオキシダーゼ法 (Vector Laboratories, No. PK-6102) により実施した。下記に対する抗ウサギポリクローナル抗体：トロポエラスチン (Calbiochem, # 324756)、LOX (IMGENEX, # IMG-6442A) およびマクロファージ (Dako, クローン RAM11, No. M0633) を用い、下記の段階を実施した：1) 切片を 10% ホルマリン中、室温で 20 分間インキュベートして、組織切片をスライドに付着させた；2) 切片をクエン酸系溶液 (10 mM クエン酸、0.05% Tween 20, pH 6.0) (Vector Laboratories, カリフォルニア州バーリングム, No. H-3300) 中、100 で 20 分間、加圧調理器を用いてインキュベートして、エピトープを回収した；3) 1% 過酸化水素中、室温で 10 分間インキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした；4) 10% ウマ血清中で 60 分間インキュベートして、抗血清の非特異的結合を低下させた；5) 一次抗体と共に室温で 2 時間インキュベートした。陰性対照切片を 10% ウマ血清のみと共にインキュベートした；6) ピオチニル化ウマ抗マウス免疫グロブリン G (希釈度 1:200) と共に室温で 1 時間インキュベートした；そして 7) 希釈度 1:50 のアビジン - ピオチニル化西洋わさびペルオキシダーゼ複合体 (Vectastain Elite, Vector Laboratories, No. PK-6102) と共に室温で 1 時間インキュベートした。免疫反応部位を希釈度 1:50 の 3,3-ジアミノベンジジン (DAB 基質色原体, Vector

Laboratories, No. SK-4100) と共に 3~5 分間インキュベートすることにより視覚化した。トリス緩衝化生理食塩水 (pH 7.4) を用いて各溶液を希釈し、かつ各段階の間で切片を 3 回洗浄した。最後に、組織切片をヘマトキシリソで対比染色した (1 分間)。

【0067】

未熟 (トロポ) エラスチンに結合すると思われる抗体、およびラーク破裂が制御されたウサギモデルを用いて、本発明者らは下記のことを見出した：

1. アテローム硬化症の進行中および易損性ラークにトロポエラスチン線維の沈着が増大する；

2. 初期段階でトロポエラスチン線維が内膜全体に散乱し、その後期にそれらの密度が

10

20

30

40

50

増大してそれらは外膜中にも見出される；

3．易損性plaque中のエラスチン含量の増大は、そのような病変のインビボ検出のための分子イメージングに利用できる；

4．場合により、トロポエラスチン線維はCD68陽性マクロファージと共に局在化すると思われ、これはマクロファージがエラスチンの供給源である可能性があることを指摘する；

5．しかし、マクロファージがエラスチン線維と共に局在化しない場合もあり、これは異なる局所機能性をもつマクロファージ亞集団の多様性がある可能性を指摘する。

【0068】

さらに他の実験でトロポエラスチン特異的結合ペプチドを用いるイメージングを検討した。10

【0069】

ペプチドVVGSPSAQDEASPLSおよびYPDHVQYTHYの潜在的開裂部位を調べた。主に消化器系中に存在する酵素のみがペプチドVVGSPSAQDEASPLSおよびYPDHVQYTHYを開裂することが見出された。これらの酵素はいずれも血液またはplaques中に報告されておらず、したがってペプチドVVGSPSAQDEASPLSまたはYPDHVQYTHYは血管壁/plaques特異的な標的トロポエラスチンに結合する前に開裂しないと思われる。

【0070】

タンパク質BLASTを実施して相同性をスクリーニングした。アミノ酸配列VVGSPSAQDEASPLSおよびYPDHVQYTHYKは、トロポエラスチンと相互作用すると記載されているタンパク質（それぞれ、エラスチン結合タンパク質（EBP）およびミクロフィブリル関連糖タンパク質-1（MAGP-1））中にのみ見出され、他のタンパク質中にはみられない。これらの結果は、これらの選択したペプチドが目的タンパク質であるトロポエラスチンに高特異的であることを示唆する。20

【0071】

ガドリニウム標識(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLSを注射した高脂肪食(HFD)給餌apoE^{-/-}マウスにおける12週間のインビボ実験は、plaques負荷された腕頭動脈(BCA)および大動脈弓に優先的に取り込まれるがplaquesを含まない頸動脈には取り込まれない好ましい生体内分布（図6）、ならびに造影剤注射の1時間後に既にイメージング可能となる迅速な腎クリアランスを示した。30

【0072】

HFD給餌apoE^{-/-}マウスにおけるガドリニウム標識K-(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHYを用いたインビボ実験は、plaques負荷された腕頭動脈および大動脈弓に取り込まれかつplaquesを含まない頸動脈には取り込まれないという有望な結果を示した（図7）。このペプチドは、迅速な腎クリアランスおよびBCAへの優先的取込みを伴う好ましい生体内分布も示した（図9）。

【0073】

免疫組織化学的検査は、罹患BCAの新生内膜および外膜にトロポエラスチンが存在すること、ならびにplaques負荷した（罹患）およびplaquesを含まない（非罹患）BCA血管壁の両方において中膜にはトロポエラスチンが存在しないことを証明した（図8）。40

【0074】

3Tにおける結合緩和度は20.88 mM⁻¹s⁻¹と測定された。

【0075】

本明細書に述べたすべての文献の全体を本明細書に援用する。

ある態様において、本発明は以下であってもよい。

[態様1] トロポエラスチン特異的結合剤およびイメージングプローブを含む、斑のイメージング方法に使用するためのコンジュゲートであって、該コンジュゲートによるplaquesのイメージングが、患者がplaquesの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定するために用いられる、コンジュゲート。

[態様2] イメージングプローブに連結したトロポエラスチン特異的結合剤を含む、プラ50

ークをイメージングするためのコンジュゲートであって、該コンジュゲートによるラークのイメージングが、患者がラークの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定するために用いられる、コンジュゲート。

[態様 3] ラークのイメージングのための医薬の調製におけるコンジュゲートの使用であって、該コンジュゲートがトロポエラスチン特異的結合剤およびイメージングプローブを含み、該コンジュゲートによるラークのイメージングが、患者がラークの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定するために用いられる、使用。

[態様 4] ラークが心血管ラークである、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 5] 心血管ラークがアテローム硬化ラークである、態様 4 に記載のコンジュゲートまたは使用。 10

[態様 6] 状態が急性心筋梗塞（AMI）、発作または大動脈瘤である、態様 4 または態様 5 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 7] コンジュゲートによるラークのイメージングが、患者のための処置コースを決定すること、患者を特定の療法のための患者クラスに配属すること、ラークの負荷を評価すること、疾患の進行をモニターすること、および / または療法に対する患者の応答を判定することのために用いられる、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 8] トロポエラスチン特異的結合剤がトロポエラスチンを特異的に結合することができる、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。 20

[態様 9] トロポエラスチン特異的結合剤がエラスチンに実質的に結合しない、態様 7 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 10] トロポエラスチン特異的結合剤がインビボでトロポエラスチンを特異的に結合することができ、かつインビボでエラスチンに実質的に結合しない、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 11] トロポエラスチン特異的結合剤が、血管内の他の成分またはタンパク質と比較してトロポエラスチンに対して特異的である、態様 4 ~ 6 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 12] トロポエラスチン特異的結合剤が、インビボで、血管内の他の成分またはタンパク質と比較してトロポエラスチンに対して特異的である、態様 4 ~ 6 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。 30

[態様 13] トロポエラスチン特異的結合剤が、ラーク中に存在するトロポエラスチンに特異的に結合することができるペプチド、抗体分子、タンパク質、アプタマーまたは小分子リガンドである、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 14] トロポエラスチン特異的結合剤がペプチドまたは抗体分子である、態様 13 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 15] ペプチドが、アミノ酸配列VVGSPSAQDEASPLSからの少なくとも 4 個のアミノ酸の配列を含む、態様 13 または態様 14 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 16] ペプチドがアミノ酸配列QDEAを含む、態様 13 ~ 15 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。 40

[態様 17] トロポエラスチン特異的結合分子がアミノ酸配列VGVAPGに結合することができる、態様 13 ~ 16 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 18] ペプチドが、アミノ酸配列YPDHVQYTHYからの少なくとも 4 個のアミノ酸の配列を含む、態様 13 または態様 14 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 19] ペプチドが、配列VVGSPSAQDEASPLS、EGFEPGまたはYPDHVQYTHYを有する、態様 13 または態様 14 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 20] ペプチドが 20 個のアミノ酸の長さを超えない、態様 13 ~ 19 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 21] ペプチドが、配列VVGSPSAQDEASPLS、EGFEPGまたはYPDHVQYTHYからなる、態様 13 または態様 14 に記載のコンジュゲートまたは使用。 50

[態様 22] トロポエラスチン特異的結合剤が、ヒト - エラスチンと比較してヒト - トロポエラスチンに対して特異的である、態様 8 ~ 21 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 23] さらに、トロポエラスチン特異的結合剤が、plaquesにより起きる状態の動物モデルにおいてエラスチンと比較してトロポエラスチンに対して特異的である、態様 8 ~ 21 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 24] コンジュゲートによるplaquesのイメージングが、plaques中に存在するリシリオキシダーゼ (LOX) の量または活性を判定するためにさらに用いられる、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 25] イメージングプローブが、MRI、SPECT または PET イメージングのためのものである、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。 10

[態様 26] イメージングプローブが、ガドリニウムを錯化することができる基に連結しているMRI 剤である、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 27] イメージングプローブが、ガドリニウムに基づくイメージングのためのDOTA - リシンである、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 28] イメージングプローブが、ガドリニウムに基づくイメージングのためのDOTA - リシン、または酸化鉄である、態様 1 ~ 25 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 29] イメージングプローブが、フッ素、テクネチウム、レニウム、銅、コバルト、ガリウム、イットリウム、ルテチウム、インジウム、ジルコニウム、カーボン、ヨウ素、フッ素またはアスタチン同位体である放射性核種を含む、態様 1 ~ 24 のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。 20

[態様 30] イメージングプローブが、蛍光特性または発光特性をもつ光学標識を含む、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 31] イメージングプローブが、MRI 造影剤として使用するための常磁性プローブを含む、前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 32] コンジュゲートが、

(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS、

(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS-K(DOTA-Gd)、

K(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS-K(DOTA-Gd)、

K(DOTA-Gd)K(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS、

K(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS、

K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY-K(DOTA-Gd)、

(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY-K(DOTA-Gd)、

(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY、

K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY または

K(DOTA-Gd)K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY

のうちの 1 つである、態様 13 または態様 14 に記載のコンジュゲートまたは使用。

[態様 33] コンジュゲートが、(DOTA-Gd)-VVGSPSAQDEASPLS、または K(DOTA-Gd)-YPDHVQYTHY である、態様 13 または態様 14 に記載のコンジュゲートまたは使用。 40

[態様 34] 前記態様のいずれか 1 に記載のコンジュゲートを含む組成物。

[態様 35] (a) 対象に、トロポエラスチン特異的結合剤およびイメージングプローブを含む心血管plaquesイメージング用コンジュゲートを含む態様 34 に記載の組成物を投与し；

(b) イメージング剤を対象の血管系のplaques中に存在するいずれかのトロポエラスチンに結合させ；

(c) イメージングプローブを検出してplaquesの存在を判定することを含む、対象において心血管plaquesをイメージングする方法。

[態様 36] 心血管plaquesをコンジュゲートでイメージングすることにより、患者がplaquesの破裂または不安定性により起きる状態を発現するリスクを判定することをさらに 50

含む、態様 3 5 に記載の方法。

[態様 3 7] 状態が急性心筋梗塞（ A M I ）、発作または大動脈瘤である、態様 3 5 に記載の方法。

[態様 3 8] コンジュゲートによる心血管プラーカのイメージングを、(i) 患者のための処置コースを決定する；および / または (i i) 患者を特定の療法のための患者クラスに配属する；および / または (i i i) プラーカの負荷を評価する；(i v) 疾患の進行をモニターする；および / または (v) 療法に対する患者の応答を判定するために使用することをさらに含む、態様 3 5 に記載の方法。

[態様 3 9] 工程 (c) が、プラーカ中に存在するトロポエラスチンを定量することを含む、態様 3 5 ~ 3 8 のいずれか 1 に記載の方法。 10

[態様 4 0] 組成物が対象に静脈内投与するためのものである、態様 3 5 ~ 3 9 のいずれか 1 に記載の方法。

[態様 4 1] 心血管プラーカがアテローム硬化プラーカである、態様 3 5 ~ 4 0 のいずれか 1 に記載の方法。

配列

1. トロポエラスチン特異的結合ペプチド

【 0 0 7 6 】

【 化 1 】

VVGSPSAQDEASPLS

20

EGFEPG

YPDHVQYTHY

【 0 0 7 7 】

2. ヒト - トロポエラスチン

【 0 0 7 8 】

【化2】

1 magltaaapr pgvllllsi lhpsrpggvp gaipggvpagg vfypgaglga
lgggalgpagg

61 kplkpvpvggl agaglgaglg afpavtfpga lvpvgvadaa aaykaakaga
glggvpgvggg

121 lgvsagavvp qpgagvkpgk vpgvglpgvy pggvlpgarf pgvgvlpvgvp
tgagvkpkap

181 gvggafagip gvgpfggpqp gpvlgyypika pklpggyglp yttgklypygy
gpggvagaag 10

241 kagyptgtgv gpqaaaaaaaaa kaaakfgaga agvlpvggga gvpvgvpgaaip
giggiagvgt

301 paaaaaaaaa akaakyaaa glvpggpgfg pgvvvgvpgag vpgvgvpgag
ipvvpgagip

361 gaavpgvvsp eaaakaaaka akygarpgvg vggiplyvgv aggfpfvgv
vggipgvgavv

421 pgvggvgvg vpgvgvispe aqaaaaakaa kygaagagvl gglvpgpqaa
vpgvpgtggv 20

481 pgvgtpaaaa akaaakaaqf glvpgvgvap gvgvapvgvg apvgvlapgv
gvapvgvgvap

541 gvgvapgigp ggvaakaaksa akvaakaqlr aaaglgagip glgvvgvgv
lgvgagvpgl

601 gvgagvpgfg agadegvrrs lspelregdp sssqhlpstp ssprvpgala
aakaakyaa

661 vpgvlggglga lggvgipggv vgagpaaaaa aakaaakaag fglvgaaglg
glgvvgglgvp 30

721 gvgglggipp aaaakaakyg aaglggvlgg agqfpplggva arpgfglspi
fpggaclgka

781 cgrkrk

【0079】

3. マウストロポエラスチン

【0080】

【化3】

1 magltavvpq pgvlilllin llhpaqpqggv pgavpgqlpg gvpqggvyyypg
agigglgggg

61 galgpqgkpp kpgagllgtf gagpgglgga gpgaglgafp agtfpgagal
vpggaagaaa

121 aykaaakaga glggvggvpg gvvgvgvpgg vvgvgvpqggv gvggvpqggvg
giggiggllgv

181 stgavvpqvg agigaggkpg kvpgvglpgv ypggvlpgtg arfpvgvlp
gvptgtgvka 10

241 kapggggafs gipgvgpfgg qqpgvp1gyp ikapk1pggy glpytngklp
yvgvagaggka

301 gyptgtgvgs qaaaaaakaa kygaggagvl pgvgggipg gagaipgigg
iagagtpaaa

361 aaakaaakaa kygaagg1vp gppgvrlpga gipgvggipg vggipgvggp
giggpgivgg

421 pgavspaaaa kaaakaakyg arggvgipty gvgaggfpfy gvgagaglgg
aspaaaaaaaaa 20

481 kaakygagga galgglvpga vpgalpgavp avpgaggvpg agtpaaaaaa
aaakaaakag

541 lpgvgggvpg gvgvggipgg vvgvgvpqggv gpqgvtgiga gpgglggags
paaaksaaka

601 aakaqyraaa glgagvpgfg agagvpgfga gagvpgfgag agvpgfgaga
gvpqfagagav

661 pgslaaskaa kygaagg1gg pgglggpggl ggpqglggag vpgrvagaap
paaaaaaaaaka 30

721 aakaqyglg gagglgagg1 gagglgagg1 gagglgagg1 gagglgagg1
gagggvpsaa

781 aakaakygaa glggvlgarf fpqggvaarp gfqslspiypg ggagg1gvpg
kppkpyggal

841 galgyqgggc fgkscgrkrk

— — — — —

【0081】

40

4. ヒトリシルオキシダーゼ

【0082】

【化4】

1 mrfawtvlll gplqlcalvh cappaagqqq ppreppaapg awrqqiqwen
ngqvfsllsl

61 gsqyqpqr rr dpgaaavpgaa nasaqqprtp illirdnrta aartrtagss
gvtagprprt

121 arh wfqagys tsrareagas raenqtapge vpalsnlrpp srvdgmvgdd
pynpykysdd

181 npyynydyty erprpggryr pgygtgyf qy glpdlvadpy yiqastyvqk
msmynlrcaa

241 eenclastay radvrdydhr vllrfpqrvk nqgtsdf lps rpryswewhs
chqhyhsmde

301 fshydlldan tqrrvaeghk asfcledtsc dygyhrrfac tahtqglspg
cydtygadid

361 cqwiditdvk pgnyilkvsv npsylvpesd ytnnnvvrcdi rytghhayas
gctispy

10

20

【0083】

5. マウスリシリオキシダーゼ

【0084】

【化5】

1 mrfawavlll gplqlcpll r capqtprepp aapgawrqti qwenngqvis
lls lgaqyqp

61 qrrrdpsata rrpdgdaasq prtpillrd nrtastrart pspsgvaagr
prpaarhwfq

121 agfspsgard gasrraanrt aspqppqlsn lrppshidrm vgddpynpyk
ysddnpyyny

181 ydtyerprpg srnrpgygtg yfqyglpd lv pdpyyi qast yvqkmsmynl
rcaaeencla

241 ssayradvrd ydhrvllrfp qr vknqgtsd flpsrprysw ewhschqhyh
smdefshydl

301 ldantqrrva eghkasfcle dtscdygyhr rfactahtqg lspgcydtya
adidcqwid i

30

40

361 tdvqpgnyil kvsvnpsylv pesdytnvv rcdiry tghh ayasgctisp
y

【0085】

6. 推定ウサギリシリオキシダーゼ

【0086】

【化6】

1 mlcswtvlll gplqlcalvc gapqaagqqq ppreppaapg awrqriqwen
ngqvfsllsl
 61 gaqyqpqr rr dagaaapgaq raagpqqrtp vlllrdnrta aasrprpagr
h wfqagyasp
 121 gardagasra gnrtaqgepp alsnlrpsh vdrmvgddpy npykysddnp
yyynydyter
 181 prpgsryrpg ygtgyfqtygl pdlvpdp yyi qastyvqkms mynlrcaaee
n classayra 10
 241 dvr dydhrvl lrfpqr vknq gtsdf lpsrp ryswe whsch qhyhs mdef s
hyd ll dantq
 301 rrvaeghkas fc ledt scdy gyhrrfacta htqgl spgcy dt yaadidc q
wid it dvq pg
 361 nyilkvsvnp sylv pesdyt nnvvrc diry tghhay asgc tisp

【0087】

20

参考文献

【0088】

【化7】

1. Krettek et al 'Elastogenesis in human arterial disease: A role for macrophages in disordered elastin synthesis' Arterioscl. Throm. Vas. 23 (2003) 582-587
2. Xu et al 'Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin' Arterioscl. Throm. Vas. 20 (2000) 2566-2572 30
3. Akima et al 'Soluble Elastin Decreases in the Progress of Atheroma Formation in Human Aorta' Circ. J. 73 (2009) 2154-2162
4. Kozel et al 'Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters' J. Cell. Physiol. 207 (2006) 87-96
5. Starcher et al 'Antibody raised to AKAAAKAAKA sequence on tropoelastin recognizes tropoelastin but not mature crosslinked elastin: A new tool in metabolic and structural studies of elastogenesis' Connect. Tissue Res. 40 (1999) 273-282 40
6. WO2011/005322
7. US5972890 A
8. US4877599 A

【図1】

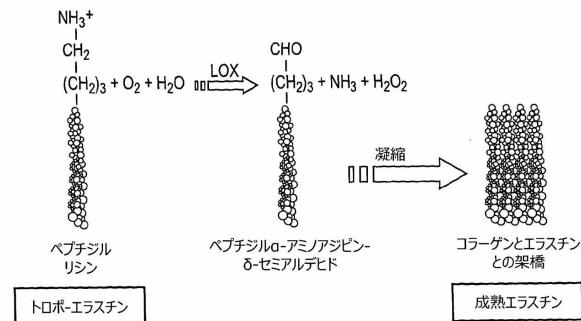


FIG. 1

【図2】

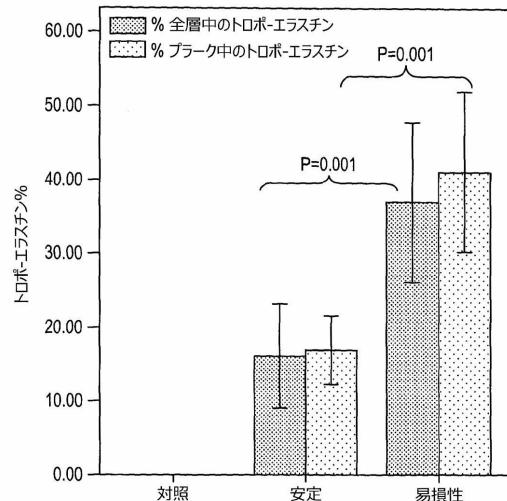


FIG. 2

【図3】

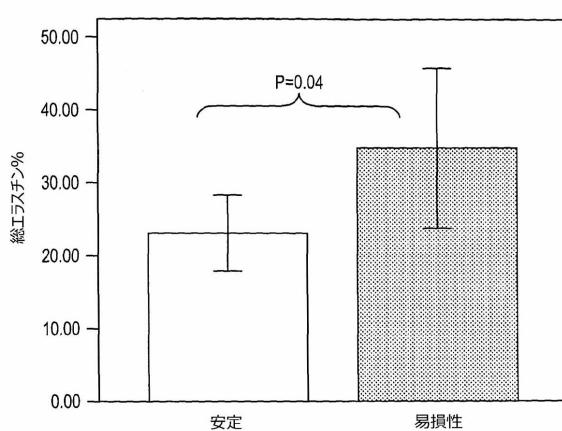


FIG. 3

【図4】

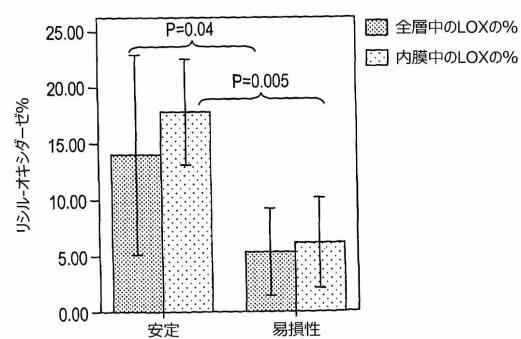
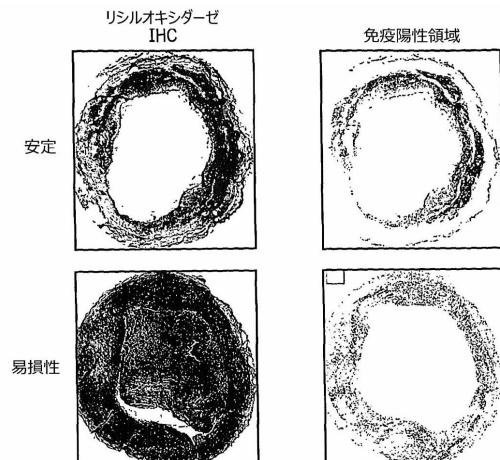


FIG. 4

【図5】

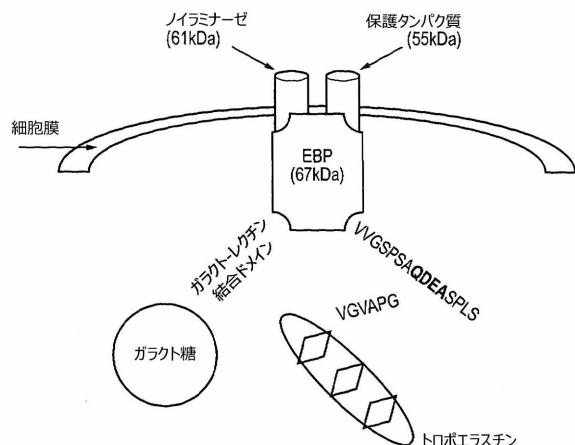


FIG. 5

【図6】

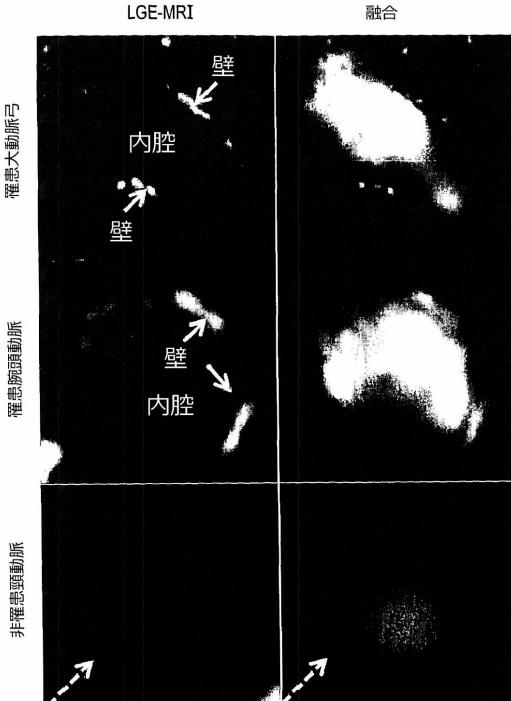


FIG. 6

【図7】

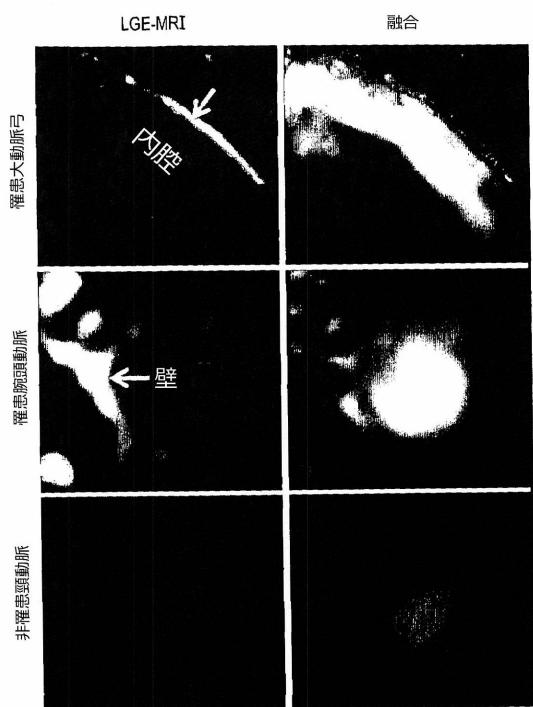


FIG. 7

【図8】

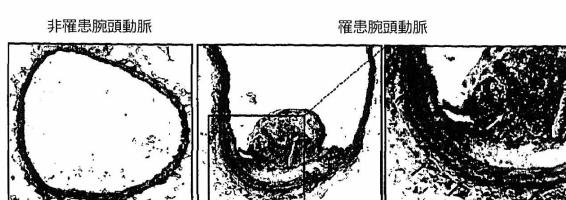


FIG. 8

【図9】

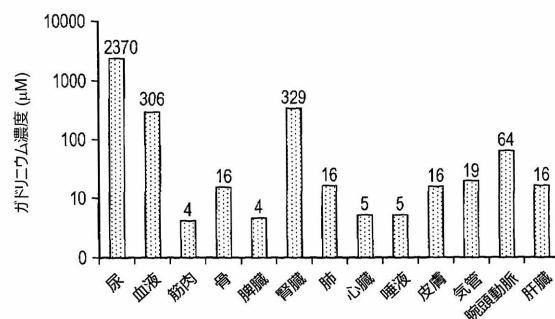


FIG. 9

フロントページの続き

(74)代理人 100163784

弁理士 武田 健志

(72)発明者 ボトナール, ルネ

イギリス国ロンドン エスイー1・7イーエイチ, セイント・トーマス・ホスピタル, ランベス・
ウイング, フォース・フロア, ザ・レイン・インスティテュート, ディヴィジョン・オブ・イメ
ージング・サイエンシズ, ケア・オブ キングス・カレッジ・ロンドン

(72)発明者 フィニカリドー, アルキスティス

イギリス国ロンドン エスイー1・7イーエイチ, セイント・トーマス・ホスピタル, ランベス・
ウイング, フォース・フロア, ザ・レイン・インスティテュート, ディヴィジョン・オブ・イメ
ージング・サイエンシズ, ケア・オブ キングス・カレッジ・ロンドン

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 特表2008-509921(JP, A)

国際公開第2010/079156(WO, A1)

国際公開第2009/063995(WO, A1)

特表2002-520421(JP, A)

特表昭63-503062(JP, A)

国際公開第2011/005322(WO, A2)

特表平03-505094(JP, A)

特表平05-507276(JP, A)

特表平01-501796(JP, A)

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2003年, Vol.23, No.4, p.582-587

J. Vasc. Surg., 2001年, Vol.33, No.3, p.614-620

Circ. J., 2009年, Vol.73, No.11, p.2154-2162

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 49 / 00 - 49 / 22

A 61 K 51 / 00 - 51 / 12

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Cplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)