

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4982377号
(P4982377)

(45) 発行日 平成24年7月25日 (2012. 7. 25)

(24) 登録日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
 A 6 1 P 27/02 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 Y
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 3 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-539258 (P2007-539258)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月28日 (2005. 10. 28)
 (65) 公表番号 特表2008-518946 (P2008-518946A)
 (43) 公表日 平成20年6月5日 (2008. 6. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/039303
 (87) 国際公開番号 W02006/078336
 (87) 国際公開日 平成18年7月27日 (2006. 7. 27)
 審査請求日 平成19年8月10日 (2007. 8. 10)
 (31) 優先権主張番号 60/623, 197
 (32) 優先日 平成16年10月28日 (2004. 10. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC 306D326. 1#26

(73) 特許権者 508129218
 エルパス・インコーポレイテッド
 L p a t h, I n c.
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 - 1 4 0 4
 カリフォルニア州 サンディエゴ、ソレン
 ト バレー ブルーバード、4 0 2 5 番
 (74) 代理人 100109634
 弁理士 舩谷 威志
 (72) 発明者 サバディーニ、ロジャー エー.
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 2 0
 4 0, レイクサイド、デル ソル ロード
 1 2 5 0 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過剰増殖性疾患の治療及び予防のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スフィンゴシンー1-ホスフェート (S 1 P) に関連し、癌、癌転移、腫瘍、異常血管新生、及び加齢性黄斑変性症からなる群から選択される過剰増殖性疾患の治療用の医薬組成物であって、抗 S 1 P モノクローナル抗体を治療有効量含む、前記医薬組成物。

【請求項 2】

前記抗 S 1 P モノクローナル抗体は、A . T . C . C . 3 0 6 D 3 2 6 . 1 # 2 6 として寄託された細胞に由来する細胞によって産生されたものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記医薬組成物が、ヒト、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ及びブタからなる群から選択される哺乳動物の治療用の医薬組成物である、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、以下の特許関連文書をそれぞれその全てにおいて、優先権、利益を主張し、全ての目的のために引用文献により組み込む：2004年10月28日付けで出願された米国特許仮出願第60/623,197号；2000年12月22日付けで出願された米国特許仮出願第60/257,926号；2001年12月21日付けで出願された米国

特許出願第10/028,156号（現在、米国特許第6,881,546号）：及び、2004年4月7日付けで出願された米国特許出願第10/820,582号（この出願は一部継続出願である）。

【0002】

政府資金拠出

本発明は、SBIR認可番号NIH/NCI R43 CA1 10298-01及びNIH/NCI R43 CA1 10298-02により、少なくとも一部の資金が供給された。その結果として、米国政府は、ここで特定の権利を有し得る。

【0003】

技術分野

本発明は、一般的に過剰増殖性疾病及び疾患、特に癌及び過剰な新血管新生により特徴付けられる他の病理の処置及び／又は予防の分野に関する。これらの有用な結果は、薬剤、並びにスフィンゴ脂質及びその代謝物の産生及び／又は生物学的活性を妨げる薬剤を含む組成物の使用により達成される。

【背景技術】

【0004】

1. イントロダクション

以下の記載は、本発明を理解する際に有用であり得る情報を含む。それは任意のこのような情報が、ここで特許請求する発明に対する先行技術、又はそれに関連すること、或いは具体的に又は暗黙に引用する任意の刊行物が先行技術であるという承認ではない。

【0005】

2. 背景

様々な組織及び器官の細胞が、異常なパターンの成長、増殖、移動、シグナル伝達、老化、及び死を示す、多くの既知の過剰増殖性疾病が存在する。多くの処置がいくつかのこれらの処置に対処するために開発されてきたが、多くは未だ存在する技術で処置することができず、他の場合において、処置が利用可能である場合では、それらはしばしば最適未満であり、ほとんど治癒的でない。

【0006】

癌は、おそらく、ほとんどの広く認識されたクラスの過剰増殖性疾病を代表する。癌は、壊滅的なクラスの疾病であり、それと共に、それらは心臓血管疾患に次いで2番目の致死率を有する。多くの癌は、分子レベルにおいて完全には理解されていない。その結果、癌は、米国政府及び製薬企業両方に対する、研究及び開発計画の主な焦点である。その結果は、前例のないR&Dの努力、及び癌との闘いにおいて助けとなる多くの価値ある治療剤の製造であった。

【0007】

残念なことに、莫大な量の癌研究は、癌により引き起こされる顕著なダメージを克服するのに十分ではなかった。未だ、毎年診断される癌の新規のケースは百万を超え、アメリカ合衆国だけでも死亡は50万を超える。これは、癌のための新規の治療を開発するために莫大な努力がなされても、この疾病に対抗する効果的な治療剤が未だ手に入らないということの劇的な証明である。

【0008】

癌は、第一に、これらのタイプの治療、手術、放射線、及び化学療法の1つ又は組み合わせにより処置される。手術は、疾病組織のバルク（bulk）除去を伴う。手術が、特定部位、例えば胸、結腸及び皮膚に位置する腫瘍の除去において時々効果的であるが、他の領域、例えば骨格に位置する腫瘍の処置、或いは播種性腫瘍状態の処置に用いることができない。放射線治療は、死を引き起こす電離放射線への生きた組織の曝露を伴い、曝露した細胞を傷つける。放射線治療の副作用は、急性且つ一時的であり、他は不可逆的であり得る。化学療法は、細胞複製又は細胞代謝の崩壊を伴う。

【0009】

更なる侮辱は、現在の治療剤は通常、毒性及び深刻な副作用の形態において、患者にと

10

20

30

40

50

って顕著な欠点を伴うことである。そこで、多くのグループは近年、癌との闘いに対抗するための新規のアプローチを見つけ始めた。これらの新規のいわゆる「革新的治療」としては、遺伝子治療及び治療タンパク質、例えばモノクローナル抗体が挙げられる。

【0010】

癌の処置のために臨床において用いられた最初のモノクローナルは、1997年に売り出されたリツキサン（リツキシマブ）であり、治療剤としての生体特異的モノクローナル抗体の利用を実証した。これにより、驚くことではないが、癌に対して処方されている6つを含む、16の他のモノクローナル抗体が、臨床における使用のために承認された。これらの製品の成功、並びに小分子と比較してモノクローナル抗体を開発する費用及び時間の減少は、モノクローナル抗体を小分子の背後で二番目に大きい薬物候補のカテゴリーとした。更に、小分子治療と比較して優れた特異性は、有効性及び毒性の両方の観点において際立って有利であることが証明された。癌のみに関して、現在、新規の癌抗体治療の開発に参与する50以上の企業による、270以上の工業抗体R&Dプロジェクトが存在する。結果として、モノクローナル抗体が、癌の処置における主なプレーヤーとなる体勢が整い、それらは癌治療市場の増大したシェアを獲得することが推測される。

10

【0011】

腫瘍の成長及び生存を促進する細胞外メディエーターの同定は、癌の罹患率及び死亡率を減少させるであろう治療的介入を開発する際に重要な段階である。以下で説明するように、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）（スフィンゴ脂質シグナル伝達カスケードの重要な要素）が、多面的な腫瘍形成成長因子であると考えられている。S1Pは、細胞増殖、細胞生存、及び転移を刺激することにより、腫瘍成長を促進する。内皮細胞が腫瘍内で新規の血管を形成する際に、S1Pは、内皮細胞の移動及び生存を援助することにより、腫瘍成長を促進する。総合すると、S1Pは、癌の進行に寄与して、増殖、血管新生促進、及び抗アポトーシスの一連のイベントを開始する。従って、インビボでのS1Pレベルを調節、特に減少させる治療は、癌の処置において効果的であるだろう。

20

【発明の開示】

【0012】

3. 定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明との関連において用いられるいくつかの用語を定義する。これらの用語に加えて、他のものは、必要に応じて明細書中の他のところで定義する。本明細書中で別段明確に定義しない限り、本明細書中で用いる当業界の用語は、それらの当業界で認識されている意味を有する。

30

【0013】

「抗S1P分子」は、S1P活性、特に増殖する又は増殖することのできる細胞でのS1P活性を妨げる任意の分子を指す。このような分子の代表例としては、抗S1P抗体、S1Pと特異的に相互作用することができる抗S1P抗体のフラグメント、及び第一の結合部分及び第二の結合部分を含んでなる薬剤（ここで、結合部分の1つはS1Pと特異的に反応する）が挙げられる。

【0014】

「化学療法剤」という用語は、抗癌及び抗過剰増殖剤を意味する。簡単に言えば、「化学療法剤」は、細胞及び組織を破壊することが意図された化学物質を指す。このような薬剤としては、(1) DNA損傷剤及びDNA合成を阻害する薬剤：アントラサイクリン（ドキソルビシン、ドノルビシン（donorubicin）、エピルビシン）、アルキル化剤（シクロホスファミド、マイトマイシンC、ケミカルマスタード（chemical mustard））、白金誘導体（シスプラチン、カルボプラチン、シスジアンミンジクロロ白金）、テロメラゼ及びトポイソメラーゼ阻害剤（カンプトサル）、(2) チューブリン-脱重合剤：タキソイド（パクリタキセル、ドセタキセル、BAY 59-8862）、(3) 代謝拮抗剤：フッ化ピリミジン（5-FU、カペシタビン、5-DFUR、ゲムシタビン）、プロテオソーム阻害剤（ベルケード）、メトトレキサート、(4) 抗血管新生剤（アバスチン、サリドマイド）、血管破壊剤（フラボノイド/フラボン、D

40

50

MXAA)、コンブレタスタチン誘導体(CA4DP、ZD6126、AVE8062A)、(5)生物製剤、例えば抗体(ハーセプチン、アバスタチン、パノレクス(Panorex)、リツキシリン(Rituxin)、ゼバリン、ミトタルグ(Mylotarg)、キャンパス、ベクザー、エルビツクス(Erbibux))、及び(6)内分泌療法:アロマターゼ阻害剤(4-ヒドロアンドロステノジオン(hydroandrostendione)、エキセメスタン、アミノグルテヒミド(aminoglutehimide)、アナストルゾール(anastrozole)、レトゾール(letozole))、抗エストロゲン(タモキシフェン、トレミフェン(Toremifene)、ラオキシフェン(Raioxifene)、ファスロデックス)、ステロイド、例えばデキサメタゾン、(7)免疫調節剤:サイトカイン、例えばIFN-ベータ及びIL2)、インテグリンに対する阻害剤、他の接着タンパク質及びマトリクスメタロプロテイナーゼ)、(8)ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、(9)シグナル伝達の阻害剤、例えばグリーベックのようなチロシンキナーゼの阻害剤、(10)熱ショックタンパク質の阻害剤、(11)レチノイド、例えば全てのトランスレチノイン酸、及び(12)成長因子受容体又は成長因子それ自体の阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0015】

化学療法剤の1つのクラスは、アルキル化剤である。「アルキル化剤」は、DNAを化学的に変化させ、その機能を破壊する化学療法化合物を指す。いくつかのアルキル化剤はDNAをアルキル化し、他のものは二重鎖DNA分子の同一鎖、又は相補鎖上のヌクレオチド間の架橋の形成をもたらす。一方、更に他のものはDNA鎖間の塩基対ミスマッチをもたらす。例示的なアルキル化剤としては、ベンダムスチン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、ダカルバジン、ヘキサメチルメラミン、イホスファミド、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、ミトタン、マイトマイシン、ピポプロマン、プロカルバジン、ストレプトゾシン、チオテパ、及びトリエチレンメラミンが挙げられる。別のクラスの化学療法剤は、代謝拮抗剤である。「代謝拮抗剤」は、生体分子、例えばDNAの合成に必要なもの(例えば、ヌクレオシド及びヌクレオチド)の合成を妨げる化学療法剤を指す。代謝拮抗剤の例としては、カベシタビン、クロロデオキシアデノシン、シタラビン(及びその活性化形態、ara-CMP)、シトシンアラビノシド、ダカバジン(dacabazine)、フロクスウリジン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ペントスタチン、トリメトトレキサート、及び6-チオグアニンが挙げられる。「抗有糸分裂」化学療法剤は、典型的には微小管形成の崩壊により、有糸分裂を妨げる化学療法剤を指す。抗有糸分裂化合物の例としては、ナベルビン、パクリタキセル、タキソテール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、及びビノレルビンが挙げられる。「挿入剤」は、二重鎖DNA分子中の隣接塩基対間に自身を挿入し、DNA構造を破壊し、DNA複製、遺伝子転写、及び/又はDNA結合タンパク質のDNAへの結合を妨げる化学療法剤を指す。

20

30

【0016】

「併用治療」という用語は、示唆された治療効果を達成するための少なくとも2つの異なる治療法の提供を伴う治療計画を指す。例えば、併用治療は、2つ以上の化学的に異なる活性成分、例えば早く作用する化学療法剤と抗S1P抗体の投与を含み得る。或いは、併用治療は、抗S1P分子(例えば、抗S1P抗体)及び/又は1つ以上の化学療法剤の投与を、単独で、或いは放射線治療及び/又は手術の供給と共に含み得る。2つ以上の化学的に異なる活性成分の投与との関連において、活性成分は同一の組成物の一部として、又は異なる組成物として投与することができる。別の組成物として投与する場合、異なる活性成分を含んでなる組成物は、同時又は異なる時間に、同一又は異なる経路により、同一の又は異なる投与計画を用いて、全ては特定の状況が必要とするように、担当医による決定によって、投与することができる。同様に、単独の又は化学療法剤との共同における1つ以上の抗S1P分子種を、例えば放射線及び/又は手術と組み合わせる場合、薬物は手術又は放射線処置の前又は後に供給することができる。

40

50

【0017】

「過剰増殖性疾患」という用語は、制御されない増殖細胞、例えば器官及び組織の成長で癌及び良性腫瘍を引き起こす制御されない成長（これに限定されない）と関連した疾病及び疾患を指す。内皮細胞に関連した過剰増殖性疾患は、血管新生の疾病、例えば血管腫、子宮内膜症、肥満、加齢性黄斑変性症及び様々な網膜症、並びにEC及びアテローム性動脈硬化の処置におけるステント挿入の結果として再狭窄を引き起こす平滑筋細胞の増殖をもたらし得る。線維芽細胞に関連する過剰増殖性疾患（すなわち、線維形成）としては、過剰な瘢痕の疾患（すなわち、線維症）、例えば加齢性黄斑変性症、心臓リモデリング及び心筋梗塞に関連した障害、例えば手術又は損傷、ケロイド、及び線維腫及びステント挿入の結果として一般的に発生する過剰な創傷治癒が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0018】

本発明との関連において、「液体組成物」は、製造業者から最終消費者（例えば、医師又は看護師）に提供される際に充填された形態及び完成した形態において、固体とは反対の液体又は溶液であるものを指す。本明細書中では、「固体」は、液体又は溶液でない組成物を指す。例えば、固体としては、凍結乾燥、フリーズドライ、沈殿、及び類似の手順により調製される、乾燥した組成物を指す。

【0019】

「単剤治療」は、単回投与であれ又は長期にわたる複数回投与として投与するのであれ、1つの治療上効果的な化合物の供給をベースとした処置計画を指す。

20

【0020】

「新形成」は、異常且つ制御されない細胞成長を指す。「新生物」又は腫瘍は、細胞成長の異常で、制御されなく、崩壊した増殖であり、一般的に癌と呼ばれる。新生物は、良性又は悪性であり得る。新生物は、それが破壊的増殖性、浸潤性、及び転移の特性を有する場合は、悪性又は癌性である。浸潤性は、周囲の組織の浸潤又は破壊、典型的には、組織の境界を規定する基底膜を突破し、それによりしばしば体内の循環系に入ることによる新生物の局所的な広がりを指す。転移は、典型的には、リンパ管又は血管による腫瘍細胞の伝播を指す。転移は、漿膜腔、又はくも膜下若しくは他の空間を通した直接的な拡張による主要細胞の移動も指す。転移の過程を通して、体の他の領域への腫瘍細胞の移動は、初期の出現の部位から離れた領域において新生物を確立する。

30

【0021】

本発明の「特許性のある」組成物、方法、機械、又は製品は、分析が実施される時に、対象が全ての法定の特許性の要件を満たすことを意味する。例えば、新規性、非自明性などに関して、後の調査により、1つ以上の特許請求の範囲が新規性、非自明性などを否定するであろう1つ以上の実施態様を包含することが明らかになった場合、定義により「特許性のある」実施態様に限定した特許請求の範囲は、具体的に特許性のない実施態様を排除する。また、本明細書に添付した特許請求の範囲は、最も広い妥当な範囲を提供し、並びにそれらの妥当性を維持すると解釈される。更に、特許性に関する1つ以上の法定要件が訂正され、或いは本願が出願又は発行される時から、添付した1つ以上の特許請求の範囲の妥当性が問題とされる時まで、特許性に関する特定の法定要件を満たすかどうかを評価するための基準が変化する場合には、特許請求の範囲は、（1）それらの妥当性を維持し、（2）その状況下において最も広い妥当な解釈を提供するように解釈されるべきである。

40

【0022】

「医薬として許容される塩」という用語は、本発明の薬剤及び化合物の生物学的有効性及び特性を保持し、生物学的に又は非生物学的に所望されなくはない塩を指す。多くの場合において、本発明の薬剤及び化合物は、荷電した基、例えば荷電アミノ基及び／又はカルボキシル基又はそれらに類似した基の存在により、酸性塩及び／又は塩基性塩を形成することができる。医薬として許容される酸付加塩は、無機酸及び有機酸から調製することができ、一方医薬として許容される塩基付加塩は、無機塩基及び有機塩基から調製するこ

50

とができる。医薬として許容される塩の概説に関しては、Berge, et al. ((1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1)を参照のこと。

【0023】

「多数」は、1超を意味する。

【0024】

「分離した」、「精製した」、「単離した」などの用語は、試料保持容器中に含まれた試料の1つ以上の成分が、容器中に存在する1つ以上の他の試料成分から物理的に除去され、或いはその存在下で希釈される、又はされたことを意味する。分離又は精製段階で除去又は希釈され得る試料成分としては、化学反応生成物、未反応化学物質、タンパク質、炭水化物、脂質、及び非結合分子が挙げられる。

10

【0025】

「種」という用語は、本明細書において、様々な文脈（例えば化学療法剤の特定の種）において用いられる。それぞれの文脈において、この用語は、特定の文脈において言及される種類の化学的に区別できない集団を指す。

【0026】

「具体的に関連した」、「具体的な関連」などは、2つの分子間の具体的なランダムでない相互作用を指す。この相互作用は、分子間の適切な化学的又は分子的相互作用を可能にする、構造的、疎水性／親水性の、及び／又は静電的な特徴に依存する。

【0027】

本明細書において、「安定」は、分子が所望の目的又は操作に対して保持されることができ、十分に安定な2つの分子間の相互作用（例えば、ペプチド及びTLR分子）を指す。例えば、ペプチドとTLR分子の間の「安定」な相互作用は、所望の効果を達成するのに十分な間、ペプチドがTLR分子と結合し、それを保持するものを指す。

20

【0028】

「対象」又は「患者」は、本発明の分子によりもたらされ得る処置が必要な動物を指す。本発明により処置することができる動物としては、脊椎動物が挙げられ、哺乳動物、例えばウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、及び霊長類（例えば、ヒト及び人間以外の霊長類）が特に好ましい例である。

【0029】

「治療有効量」（又は「有効量」）は、処置が必要な対象に投与する場合に、処置の効果をもたらすのに十分な活性成分、例えば本発明の薬剤の量を指す。従って、治療有効量の本発明の組成物を構成するものは、当業者により容易に決定され得る。癌治療との関連において、「治療有効量」は、癌細胞の生存又は代謝に関連する1つ以上のパラメーターにおいて客観的に測定される変化を生み出すもの、例えば特定の癌に関連する1つ以上の遺伝子の発現における増加又は減少、腫瘍組織量、癌細胞溶解、生物学的試料（例えば、生検及び体液、例えば全血、血漿、血清、尿などのアリコート）中の1つ以上の癌細胞死マーカーの検出、誘導アポトーシスの誘導又は他の細胞死経路などを指す。当然、治療有効量は、処置する具体的な対象及び状態、対象の重量及び年齢、疾病状態の重度、選択した具体的な化合物、後の投与計画、投与のタイミング、投与の方法などに依存して変化するだろう。それらの全ては、当業者により容易に決定され得る。併用治療との関連において、治療有効量の具体的な活性成分を構成するものが、単剤治療（すなわち、活性成分として唯一の化学構成要素を用いる治療計画）として投与される場合の治療有効量の活性成分を構成するものとは異なり得ることが理解されるだろう。

30

40

【0030】

「処置」又は「処置すること」という用語は、疾病又は疾患の任意の処置を意味し、例えば疾病又は疾患からの予防又は保護（すなわち、臨床症状が発現しないようにする）；疾病又は疾患の阻害（すなわち、臨床症状の発現を阻害又は抑制する）；及び／又は疾病又は疾患の緩和（すなわち、臨床症状の逆行をもたらす）である。理解されるように、最終的な誘導性の事象は未知又は潜在的であり得るので、疾病又は疾患の「予防」と「抑制」を区別することが常に可能というわけではない。従って、「予防（prophylax

50

i s)」という用語は、「予防」及び「抑制」の両方を包含するタイプの「処置」を構成すると理解される。従って、「保護」という用語は、「予防」を含む。

【0031】

「治療計画」という用語は、化学療法剤、細胞毒性薬、放射線治療、手術、遺伝子治療、DNAワクチン、DNA治療、siRNA治療、抗血管新生治療、免疫療法、骨髄移植、アプタマー（apamer）及び他の生物製剤、例えば抗体及び抗体変異体、おとり受容体及び他のタンパク質をベースとした治療を用いた、疾病又は疾患の任意の処置を意味する。

【0032】

Merck Manual（第14版、p. 1206）によると、癌は、「独特の特徴（正常な制御の欠損）が、制御されない成長、分化の欠如、局部組織に浸潤し転移する能力をもたらす、細胞悪性腫瘍」である。同様に、NIHの国立癌研究所（<http://cancer.gov/>を参照のこと）は、「異常細胞が制御されずに分裂する疾病に関する用語。癌細胞は、周辺の組織に浸潤することができ、血流及びリンパ系から体の他の部分へ広がることができる。」と、癌を定義する。癌細胞はまた、自然な細胞死を回避し、血管新生としてとして知られている方法によりそれら自身の血液供給の形成を刺激する。NCIは、血管新生を、「血管の形成。腫瘍血管新生は、周囲組織から固形腫瘍への血管の成長である。これは、腫瘍による化学物質の放出により引き起こされる。」と、定義する。炎症は、NIHにより、「紅化、膨張、疼痛、及び負傷又は疾病により影響を受ける組織を保護することを意図した特定の領域における熱の感覚の応答」と定義される。

【0033】

発明の概要

本発明の1つの側面は、過剰増殖性疾患を処置するための方法に関する。これらの方法は、S1Pに関連する過剰増殖性疾患に罹患したことが知られている又はその疑いのある哺乳動物（例えば、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ、又はブタ、特にヒト）に、好ましくは医薬として又は獣医学的に許容される担体（意図した適用が必要とし得る）中に、S1P活性を妨げる薬剤を含んでなる治療有効量の組成物を投与することを含んでなる。S1Pに関連する過剰増殖性疾患としては、新形成、内皮細胞の増殖に関連する疾患、及び線維形成に関連する疾患が挙げられる。ほとんどの場合、新形成は癌であろう。内皮細胞の増殖に関連した典型的な疾患は、血管新生依存性疾患、例えば固形腫瘍により引き起こされる癌、血液腫瘍、及び加齢性黄斑変性症である。線維形成に関連する疾患としては、異常心臓リモデリングに関連するもの、例えば心不全が挙げられる。

【0034】

好ましい実施態様において、S1P活性を妨げる薬剤は、S1Pと特異的に反応する抗体である。他の実施態様において、薬剤は、第一の結合部分及び第二の結合部分を含んでなり、第一の結合部分はS1Pと特異的に反応し、第二の結合部分はS1P以外の第二の分子と特異的に反応する。いくつかの実施態様において、薬剤は、第一の結合部分及び第二の結合部分を含んでなり、第一の結合部分は、スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質代謝物である第一の分子と特異的に反応し、第二の結合部分は、第一の分子とは異なる分子種である第二の分子と特異的に反応する。代表例は、二重特異性抗体が挙げられる。第一の部分が抗体であるものにおいて、結合部分は抗体であることもできる。好ましい実施態様において、第一及び第二の部分はリンカー部分と結合し、1つの又は異なる化学的性質による第一及び第二の結合部分の結合のための、2～100、或いは1000の価数を有し得る。

【0035】

このような薬剤は、多数の第一の結合部分、多数の第二の結合部分、又は多数の第一の結合部分と多数の第二の結合部分を含んでなることができる。第一の結合部分の第二の結合部分に対する比率は、約1000：1～約1：1000の範囲であることができるが、好ましくは、その比率は約1：1である。この比率は、好ましくは、価数に関して測定する。

【0036】

本発明の組成物は、第一の薬剤及び第二の薬剤を含んでなることもできる。ここで、第一の薬剤は、スフィンゴ脂質及びスフィンゴ脂質代謝物からなる群から選択される第一の分子と特異的に反応する第一の結合部分を含んで成り、第二の薬剤は、第一の分子とは異なる分子種である第二の分子と特異的に反応する第二の結合部分を含んでなる。第一及び／又は第二の薬剤は、抗体であることができる。第一の薬剤の第二の薬剤に対する好ましい比率は約1：1であるが、その比率は約1，000：1～1：1，000の範囲であることができる。

【0037】

好ましい実施態様において、S1P活性を妨げる薬剤を含んでなる組成物は、単剤治療として投与し、他の好ましい実施態様においては、S1P活性を妨げる薬剤を含んでなる組成物は、併用治療の一部として投与する。好ましい併用治療は、S1P活性を妨げる薬剤を含んでなる組成物の投与に加えて、化学療法剤の投与、放射線治療、手術、及び任意の前記のものの組み合わせからなる群から選択される第二の治療計画を与えることを含む。

10

【0038】

本発明の別の側面は、本発明の組成物を含む、又は本発明の方法を実施するためのキットに関する。

【0039】

本発明の別の目的は、第一の結合部分及び第二の結合部分を含んでなる薬剤に関する。本明細書において、「結合部分」は、所望の標的分析物に特異的に結合する任意の分子である。第一の結合部分は、スフィンゴ脂質及びスフィンゴ脂質代謝物からなる群から選択される第一の分子と特異的に反応する。第二の結合部分は、第一の分子とは異なる分子種である第二の分子と特異的に反応する。第一及び第二の結合部分の好ましい例としては、抗体（例えば、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化抗体及びヒト化遺伝子組み換え動物由来の抗体）、抗体フラグメント、一本鎖抗体、並びにT細胞受容体及び受容体フラグメントが挙げられる。

20

【0040】

いくつかの実施態様において、薬剤は、多数の第一の結合部分を含んでなる。別の場合では、それは、多数の第二の結合部分を含んでなる。更に別の場合では、それは多数の第一及び第二の結合部分を含んでなる。いくつかの実施態様において、第一の結合部分の第二の結合部分に対する比率は、約1000：1～約1：1000である。好ましい第一の結合部分の第二の結合部分に対する比率は、約1：1である。好ましくは、第一及び／又は第二の結合部分が1つ以上の価数、すなわちそれらの意図した標的分子に結合するための部位を有し得るように、このような比率は価数に関して測定される。いくつかの実施態様において、薬剤は二重特異性抗体、すなわち抗体の2つの抗原結合ドメインの1つが抗原の1つのエピトープに結合し、一方抗体の他の抗原結合ドメインは異なるエピトープ種に結合する抗体である。2つの抗原結合ドメインにより結合した異なるエピトープは、同一の抗原、又は異なる抗原からであることができる。他の実施態様において、薬剤は、多数の抗体フラグメント、一本鎖抗体、及び／又は少なくとも2つの異なる標的分析物に結合するT細胞受容体及び／又は受容体フラグメントを含んでなる。

30

40

【0041】

本発明の薬剤は、第一及び第二の結合部分が、直接的に又はリンカー部分により結合したものを含む。或いは、第一及び第二の結合部分は、小胞、例えばリポソーム中への組み込みにより結合することができる。それらはデンドリマーの使用により結合することもできる。このデンドリマーは、適切な化学的性質を利用する、所望の分子の付加のための多数の反応部位、例えば第一及び／又は第二の結合部分を有する。

【0042】

関連する側面において、本発明は、薬剤及び担体を含んでなる組成物に関する。これらの組成物は、任意の適切な容器中にパッケージすることができ、それらは更に、好ましく

50

は使用のための指示を有するパッケージ内に組み込むことができる。

【0043】

本発明の別の側面は、第一の薬剤及び第二の薬剤を含んでなる組成物に関する。ここで、第一の薬剤は、スフィンゴ脂質及びスフィンゴ脂質代謝物からなる群から選択される第一の分子と特異的に反応する第一の結合部分を含んでなり、第二の薬剤は、第一の分子とは異なる分子種である第二の分子と特異的に反応する第二の結合部分を含んでなる。

【0044】

本発明の更に別の側面は、過剰増殖性疾患、例えば癌を処置又は予防する方法に関する。典型的には、これらの方法は、過剰増殖性疾患に罹患した対象に、有効量の本発明の各薬剤（又は、多数の異なる薬剤種）及び細胞毒性薬を投与することに関連する。細胞毒性薬としては、化学療法薬が挙げられる。

10

【0045】

関連する側面は、過剰増殖性疾患の処置又は予防のための治療計画の毒性を軽減する方法に関する。このような方法は、過剰増殖性疾患に罹患する対象に、有効量の本発明の薬剤（又は、多数の異なる薬剤種）を、過剰増殖性疾患を処置又は予防することを意図した治療計画の投与の前、間、又は後に投与することを含んでなる。

【0046】

本発明の更に別の側面は、過剰増殖性疾患に罹患する対象に、本発明の薬剤（又は、多数の異なる薬剤種）を、対象の生存の可能性を強化するための過剰増殖性疾患を処置又は予防することを意図した治療計画の投与の前、間、又は後に投与することにより、過剰増殖性疾患のために処置した対象の生存の可能性を強化する方法に関する。

20

【0047】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の図面、詳細な説明、及び添付した特許請求の範囲から明らかとなるだろう。

【0048】

本出願は、カラーで作成した少なくとも1つの図を含む。カラーの図面を含む本出願のコピーは、必要な費用の要求及び支払いにより供給されるだろう。

【0049】

当業者が認識するように、以下の詳細な説明は、本発明の特定の好ましい実施態様を記載し、従ってこれは単なる代表であり、本発明の現実の範囲を表していない。本発明を詳細に説明する前に、本発明が説明する特定の側面及び実施態様は変わり得るので、それらに限定されないことが理解される。本明細書中で用いられる専門用語は、説明する特定の実施態様のみを目的としており、添付した特許請求の範囲により規定される本発明の範囲を制限することを意図していないことも理解されるべきである。

30

【0050】

詳細な説明

本発明は、抗S1P分子、特に抗S1P抗体が、S1P活性に関連する過剰増殖性疾患の処置に用いることができるという驚くべき発見に基づく。更に、特許可能なクラスの抗S1P分子、すなわち第一の結合部分及び第二の結合部分（それらの部分の1つがS1Pに結合する）を含んでなる薬剤についても説明する。

40

【0051】

1. イントロダクション

A. スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質は、細胞シグナル伝達及び調節分子としても働く細胞膜の一次構造要素である。図1は、生体活性脂質メディエーター、セラミド（CER）、スフィンゴシン（SPH）、及びスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）を含む、スフィンゴ脂質シグナル伝達カスケードを示す。これらのメディエーターは、全ての哺乳動物細胞の原形質膜に存在するスフィンゴミエリンに由来する。

【0052】

スフィンゴミエリナーゼ（nSMase）の中性型は、スフィンゴ脂質シグナル伝達経

50

路の重要な初期の要素である（図1）。腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）は、nSMase、CER産生、及び癌細胞株を含む多くの細胞タイプにおけるアポトーシスの周知のアクチベーターであり、そしてnSMaseの活性化はTNF α 誘導アポトーシスに重要であることが示され、それにより創薬の標的とされた。

【0053】

スフィンゴ脂質シグナル伝達分子（S1P）は、スフィンゴシンキナーゼ（SPHK）の作用により、SPHから産生される。このキナーゼの2つのアイソフォーム（SPHK1及びSPHK2）が同定された。CER及びSPHは一般的にアポトーシスに関連するが、典型的にはS1Pは細胞増殖及び生存経路の活性化の細胞外メディエーターとして考えられている。S1Pは、S1P/LPA受容体ファミリーに属する、以前はEdg受容体として知られていた一連のGタンパク質共役受容体（GPCR）に対するリガンドとして作用することができる；しかしながら、S1Pの細胞内作用も示唆されてきた。更に、CER/SPHレベルとS1Pの間のバランスが細胞が死の経路に送り込まれたのか或いはS1Pによるアポトーシスから保護されたのかを判断するレオスタット（rheostat）メカニズムを提供する。

【0054】

レオスタットメカニズムの重要な調節酵素はSPHKであり、その役割は、死を促進するスフィンゴ脂質（CER/SPH）の成長を促進するS1Pに変換することである。SPHKを安定的に形質転換したNIH-3T3線維芽細胞は、S1P産生の増大に伴う細胞増殖の促進を示し、SPHK過剰発現体（expresser）は接触阻止を回避することができる（一般的に形質転換細胞により示される特性）ことが示された。従って、S1Pは、選択されたヒト癌細胞株の転移能を強化し得る。更に、SPHK形質転換体は、NOD/SCIDマウスに皮下注入した場合に、腫瘍を作り出すことができる。SPHKは多くの固形腫瘍、例えば胸、結腸、肺、卵巣、胃、子宮、腎臓、及び直腸の固形腫瘍中で著しく過剰発現している。SPHKの小分子阻害剤（S1Pレベルも低減する）を用いた処理により、いくつかのヒト腫瘍由来の細胞株においてアポトーシスが誘導され得ることが示されてきた。また、遺伝毒性薬及び他の抗腫瘍薬は、それらの作用メカニズムの一部としてSPHKをダウンレギュレートする。同様に、siRNAによるSPHKのダウンレギュレーションは、アポトーシスに対するメラノーマ細胞の抵抗性を減少させることができ、一方、Bcl-2発現の強化の保護効果は、SPHKの発現の増大に起因すると考えられてきた。更に、FTY70の抗腫瘍効果は、S1P受容体のダウンレギュレーションに起因すると考えられており、これは受容体レベルにおけるS1P作用の妨害が、例えばS1P受容体結合を妨げる抗体の使用により、抗腫瘍治療においても有益であり得ることを示唆してきた。まとめると、これらの知見は、S1Pが腫瘍細胞自身により産生され得る成長因子であり、S1Pの濃度の低下が成長因子の回収において見られるアポトーシスを引き起こし得ることを実証する。

【0055】

B. 癌治療のための有効な標的としてのS1P

1つの癌治療戦略は、単独で、或いは従来の抗癌処置、例えば化学療法剤、例えばアントラサイクリンの投与と組み合わせて、生物学的に利用可能な細胞外の腫瘍プロモーター（S1P）のレベルを低減することである。この目的のために、S1Pに特異的なモノクローナル抗体（mAb）が開発された。これは、血清からS1Pを選択的に吸着し、細胞外のS1Pを中和するための分子スポンジ（sponge）として作用する。S1Pは血管新生促進性であることが示されてきたので、この抗体の有効性に対する付加された利益は、成長する腫瘍の血液供給を飢えさせる抗体の能力に由来し得る。従って、別のスフィンゴ脂質をベースとした抗腫瘍戦略は、S1Pレベルを減少させる戦略と合わせたCER及びSPH産生の既知のアクチベーター（ドキソルビシン、ドキソルビシン、放射線治療）を組み合わせることに関連する。

【0056】

スフィンゴ脂質代謝経路の重要な酵素、例えばSPHKを標的とするスフィンゴ脂質を

ベースとした抗癌戦略が提案されてきたが、S 1 Pそれ自体は強調されてこなかった。その主な理由は、これ及び関連標的を攻撃することが困難であるからである。本明細書で説明するように、生理学的範囲においてS 1 Pを認識し、分子結合によりS 1 Pを中和する能力のあるS 1 Pに対して高度に特異的なモノクローナル抗体が生成された。この抗体（及びその誘導体）の使用は、成長する腫瘍細胞から、重要な成長及び生存因子を奪うだろう。更に、このような抗体をベースとした癌治療の使用は、従来の癌処置、例えば手術、放射線治療、及び／又は細胞毒性抗癌剤の投与と組み合わせて用いた場合にも効果的であり得る。抗体をベースとした併用治療は、化学療法剤の毒性副作用を最小にしながら、細胞をアポトーシスに対して感作することにより化学療法剤の有効性を向上させることができるが、抗体単独の投与も疾病の進行を遅延するのに有効であり得る。実際に、ヒト癌のマウスモデル及び同種移植マウスモデルにおいて腫瘍成長を遅延させる抗S 1 P mAbの能力は、ヒト及び動物腫瘍の両方の処置における抗S 1 P抗体アプローチの利用を実証する。更に、いくつかのヒト癌のタイプ（例えば、卵巣、胸、肺、及びメラノーマ）が異種移植モデルにおいて処置され得るという発見は、抗S 1 P抗体アプローチが1つの癌細胞又は組織タイプに限定されないことを実証する。

10

【0057】

C. スフィンゴ脂質及び血管新生

血管新生は、存在する血管から新規の血管が形成される過程である。固形及び循環腫瘍に関連する血管新生は、腫瘍形成の重要な要素であると考えられており、今日では腫瘍成長が新血管新生（neovascularization）に依存するという見解は、科学的に十分に受け入れられている。

20

【0058】

S 1 Pは、ヒト静脈内皮細胞（HUV EC）のDNA合成及び走化運動性を刺激すると同時に、早期の血管形成に必須の多細胞構造の分化を誘導する。S 1 Pは、骨髓由来の内皮細胞前駆体の新血管新生部位への移動も促進し、S 1 P受容体を過剰発現する細胞は抗血管新生剤（サリドマイド及びNeovastat）に対して抵抗性を有する。従って、S 1 P、特にS 1 受容体は、血管新生及び新血管新生に必要である。最終的に、S 1 Pと他の血管新生成長因子、他の血管新生促進成長因子、例えばVEGF、EGF、PDGF、bFGF及びIL-8の間では、クロストークが起こる。例えば、S 1 PはEGF及びVEGF 2受容体をトランス活性化し、VEGFはS 1 P受容体の発現をアップレギュレートする（Igarashi, Erwin et al. 2003）。

30

【0059】

理解されるように、血管新生の臨床的制御は、癌及び他の血管新生依存性疾病、例えば加齢性黄斑変性症（AMD）及び子宮内膜症の処置のための重要な要素である。腫瘍血管新生に関連する血管内皮細胞が癌細胞のように容易に突然変異しないので、抗血管新生治療も特に魅力的である；結果として、血管内皮細胞は、癌細胞よりも、長期治療に対して抵抗性を得ることはあまりなく、それらは有用な治療標的となる。

【0060】

S 1 Pが腫瘍血管新生において重要であり得る潜在的に重要な血管新生促進成長因子であることを示唆する様々な証拠が存在する。例えば：抗S 1 P抗体は、S 1 Pにより誘導した管形成、血管内皮細胞の移動、及びHUV ECを用いた様々なインビトロ試験における細胞死からの保護を中和することができる；増加したレベルのS 1 Pを発現する乳腺癌MCF-7細胞の、ヌードマウスの乳房脂肪パッド（pad）への注入が、コントロール細胞を用いた場合より、大きく且つより多い血管新生依存性腫瘍の増大をもたらす；抗S 1 P抗体が、同所マウスメラノーマ同種移植モデルにおいて、腫瘍に関連する血管新生を劇的に減少させることができる；S 1 Pがマウスに移植したマトリゲルプラグへの新規の毛細血管成長を増大させ、この効果は抗S 1 P抗体の全身投与により中和され得る；抗S 1 P抗体のインビボ投与は、マウスのマトリゲルプラグ試験において、血管新生成長因子により誘導した血管新生（例えば、bFGF及びVEGFにより）を完全に中和することができる；S 1 Pは、インビトロ及びインビボの腫瘍細胞からのbFGF及びVEGFの放

40

50

出を刺激し、この効果は抗 S 1 P 抗体により無効にされ得る；S 1 P は、多くの異なるタイプの癌細胞、例えば多形性膠芽腫細胞のインビトロの運動性及び浸潤を促進する；及び、抗 S 1 P 抗体は、A M D の動物モデルに関連する新血管新生を顕著に減少させる。

【0061】

血管新生依存性腫瘍における S 1 P の重要性により、S 1 P は癌処置の優れた標的となる。実際に、細胞外 S 1 P の抗体中和は、腫瘍成長のサポートに必要とされる栄養及び酸素の同時不足による血管形成の阻害の結果として、哺乳動物、例えば人間における癌進行の顕著な低下をもたらすことができる。従って、抗 S 1 P 抗体は、いくつかの作用メカニズムを有する。例えば、(1) 腫瘍細胞成長における直接的な効果；(2) 血管内皮細胞における間接的な抗血管新生効果；及び(3) 他の血管新生成長因子の放出及び作用を妨げる間接的な抗血管新生効果。従って、抗 S 1 P 抗体は、抗血管新生治療薬に加えて、抗転移治療薬としても働く。それらは、A M D に関連する血管新生と共に生じる、S 1 P 活性に関連する他の過剰増殖性疾患、例えば異常な内皮細胞増殖の処置においても有用であるだろう。

【0062】

D. S 1 P 線維形成及び瘢痕

i. S 1 P、線維芽細胞及びリモデリング過程

心臓線維芽細胞、特に筋線維芽細胞は、細胞死及び心筋梗塞(M I)の炎症に応答した瘢痕形成における重要な細胞要素である。筋線維芽細胞のコラーゲン遺伝子発現は、リモデリングの特徴であり、瘢痕形成に必要である。その他の活性に加えて、S 1 P は、血小板を活性化し、血管新生を刺激し、そして平滑筋の機能を促進することに加えて、線維芽細胞の移動及び増殖を活性化することにより、創傷治癒に対して著しく寄与する炎症メディエーターでもある。従って、損傷した筋線維芽細胞により局所的に産生されるであろう S 1 P は、特に心臓の筋線維芽細胞を活性化することにより、心臓リモデリング及び心不全に関連する不適応な損傷治癒に部分的に関与し得る。

【0063】

S 1 P に対して3つの一般的な応答が存在する：細胞死からの保護；増殖の刺激；及び移動応答の促進。従って、S 1 P の活性又は特定の疾患、細胞系との関与は、この目的のためのこの種の適応試験により評価することができる。線維芽細胞が、創傷治癒を促進する3つの全ての方法において、S 1 P に応答するという証拠が存在する。例えば、以下の実施例の部分におけるいくつかの実施例において、S 1 P が、心臓筋線維芽細胞活性（増殖、移動、及びコラーゲン遺伝子発現）を促進することによりリモデリングに寄与することを実証する証拠が存在する。

【0064】

i i. S 1 P と細胞死からの保護

多くの細胞タイプの場合、線維芽細胞は S 1 P の添加により直接的にアポトーシスから保護され、アポトーシスは S P H K の阻害剤により強化され、そして S 1 P はシトクロム C の放出及びこれに伴うカスパーゼの活性化をブロックする。更に、S P H K 1 を形質転換した線維芽細胞は、アポトーシスからの保護を示し、この効果は、S P H K 1 の原形質膜への移行に依存し得る。S P H K 1 が A k t をアップレギュレートし、それにより B c l - 2 ファミリーのメンバーを制御し、アポトーシスから保護する。また、S 1 P₃ は、マウス胚線維芽細胞(M E F)における A k t のリン酸化に必要である。また、S P H K のアップレギュレーション及び結果として生じる S 1 P レベルの増加は、心臓線維芽細胞をアポトーシスから保護する。

【0065】

セラミド(S 1 P の上流の代謝物)は、死誘導性のミトコンドリアのタンパク質の転写の増大と同時にミトコンドリアの膜電位を減少させる。レオスタットメカニズムにより、S 1 P は逆の効果を有し、心臓筋線維芽細胞(すなわち、完全に分化した心臓の線維芽細胞)をアポトーシスから保護することができる。実際に、S 1 P は、保護メカニズムとして、自食作用さえも活性化することができる。これらの効果は、S 1 P 抗体(又は、S 1

Pに結合し隔離するように作用する他の分子)を中和することにより無効にされ得る。

【0066】

i i i. S1Pは、線維芽細胞の増殖、分化を誘導し、コラーゲン遺伝子の発現を促進する

線維芽細胞が増大するDNA合成によりS1P処理に応答し、SPHK1を形質転換した線維芽細胞が細胞増殖の増大を示すことが実証されてきた。非心臓線維芽細胞における効果と同様に、S1Pは心臓線維芽細胞増殖(及び、その後の分化)を刺激すると考えられている。この効果はリモデリングの間に生じ、S1Pの不応答な行為(この場合、瘢痕形成)を説明する別のメカニズムであり、特にS1Pは多くの細胞タイプにおいて増殖を刺激するので、培養心臓線維芽細胞におけるS1P依存性DNA合成をもたらす(以下の実施例14を参照のこと)。

10

【0067】

線維芽細胞、例えば心臓筋線維芽細胞の顕著な特質は、コラーゲンを発現し瘢痕を形成させる能力である。TGF β がコラーゲンの産生をアップレギュレートし、リモデリングする心臓において線維化を促進することは周知である。TGF β は、特異的に心臓線維芽細胞において、いくつかの繊維化促進タンパク質をアップレギュレートし、線維芽細胞を筋線維芽細胞に変換し、炎症性タンパク質の発現を刺激することが示されてきた。興味深いことに、TGF β は、SPHKのmRNA、タンパク質、及びS1Pレベルに関連した活性を増大させ、TGF β によるTIMP1のアップレギュレーションは、SPHK及びTIMP1のためのsiRNAによりブロックされる。TIMP1は、一般的に、線維芽細胞から筋線維芽細胞に移行する細胞で発現する。また、TGF β で刺激された筋線維芽細胞への移行は、FAKの構成的なリン酸化を必要とする。FAKはS1P₁によるシグナル伝達により制御される。従って、TGF β によるシグナル伝達は、S1Pと密接に関連する。増殖性線維芽細胞が高いレベルのコラーゲンの発現を有さず、一方非増殖性線維芽細胞が刺激されて筋線維芽細胞へと移行し、大量のアルファ平滑筋アクチン(α SMA)を発現し得ることも証明されてきた。

20

【0068】

i v. S1Pは線維芽細胞において移動を誘導する

移動は、梗塞領域の心臓線維芽細胞の浸潤に必要である。S1Pは、他の細胞タイプにおける移動の著しい刺激によってこの過程に関係しているようであり、それにより繊維化に寄与し得る。繊維化の減少は瘢痕形成を減少させ、心臓組織との関連においては、心筋梗塞(MI)後の心臓機能の改善を可能にする。しかし、MI期直後において、心臓破裂を防止するために、いくつかの瘢痕形成が必要であることを認識することで、特に梗塞領域の周囲、また梗塞領域自体において心臓破裂の危険性が低くなった後に瘢痕形成を制限し始めることが望ましいだろう。

30

【0069】

S1Pがシグナル伝達系、特にRhoを活性化し、その結果生じる遺伝子発現が細胞移動における実質的な効果と一致することも実証されてきた。S1P₁がマイトジェン及び線維芽細胞の生存効果に必要であると同時に、S1P₁の発現は細胞移動の促進に関連する。

40

【0070】

収縮アクチン/ミオシンフィラメントの会合は、Rho/Rac/Cdc42系により制御され、3つの全てのRho GTPaseの活性化は、細胞移動が生じるのに必要である。移動を生じさせるためには、3つの全てのRho GTPaseが発現される必要があるが、それらの発現の局在性は、それらの別々の活性の調整に対して変わるはずである。例えば、Rac及びCdc42は、アクチン重合を通して、葉状仮足及び糸状足突起の形成に関与する。重要なことに、Rho、Rac及びCdc42は、S1Pで刺激した細胞移動に関与する。S1P₂、S1P₃及びS1P₄は、G₁₃への結合によりRhoを活性化する。従って、S1PによるこれらのRho GTPaseの活性化は、急性MIによりできた創傷に応答した心臓線維芽細胞の移動に関与すると信じられている。

50

【0071】

以下の実施例部分における実施例は、S1Pが線維芽細胞及び炎症細胞の表面のS1P受容体の相補体（complement）に結合できないようにして、炎症及び癬痕を減少させるために、特異的で感受性の高い抗S1P抗体が分子スポンジとして作用し、S1Pを選択的に吸着し及び中和することができることの強力な証拠を提供する。従って、抗TNF α 抗体及び受容体デコイ（Embr el、Remi cade）がTNF α を中和し、或いはmAbスポンジ（Avast in）が血管新生促進成長因子、血管内皮成長因子（VEGF）を中和するのと同じ方法で、効果的な細胞外濃度のS1Pは、そのような分子スポンジにより低下するだろう。

【0072】

治療的利益のための結合スフィンゴ脂質

本発明の方法及び組成物は、単剤治療又は併用治療に基づくものであっても、これらの治療が、相対濃度、絶対濃度、又は利用可能な濃度の、一定の疾病又は疾患に関連するスフィンゴ脂質を変えることができることを示すために、「スフィンゴ脂質をベースとした」と言われる。疾病及び疾患に関連するスフィンゴ脂質、特に過剰増殖性疾患に関連するスフィンゴ脂質の例としては、セラミド（CER）、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）、及びスフィンゴシン（SPH）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

患者における過剰増殖疾患に関連するスフィンゴ脂質の量を制御するための1つの方法は、1つ以上のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質代謝物に結合する組成物を調製することによる。このような結合をもたらす抗体又は他の化合物は、例えば、組織及び細胞外液、例えば血液中の1つ以上の遊離のスフィンゴ脂質種のレベルを減少させる治療「スポンジ」として用いることができる。「スポンジ」により、スフィンゴ脂質結合分子（すなわち、抗スフィンゴ脂質分子）、特にS1P結合分子（すなわち、抗S1P分子）が、特異的に標的スフィンゴ脂質と相互作用することが意味される。また（或いは）、スフィンゴ脂質の細胞受容体に結合する抗体及び他の化合物は、スフィンゴ脂質の受容体への結合を競合し及び／又は妨げるのに用いることができる。

【0074】

A. スフィンゴ脂質に結合する抗体

本発明の1つの側面は、過剰増殖性疾患、特にS1Pに関連する過剰増殖性疾患に対する治療を提供するために、患者に供給することができるスフィンゴ脂質、特にS1Pに結合する抗体に関する。このような方法は、非限定的な例により、（1）有効濃度の具体的なスフィンゴ脂質又は代謝物（例えば、S1P）を調節することができ、（2）スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質代謝物の細胞受容体への結合を立体的に阻害し、或いはそのような受容体への結合に利用可能なスフィンゴ脂質の濃度を低下させることができ；（3）スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質代謝物の酵素的変換を立体的に阻害することができ；或いは（4）スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質代謝物をインビボ又はエクシボにおける血液から除去することができる。好ましい実施態様においては、このような抗体は、併用治療の一部として用いられ、一方、他の実施態様においては、それ（又は、1つ以上のその抗原結合ドメイン）は、抗スフィンゴ脂質部分のものと異なる分子種に結合或いは特異的に相互作用する他の部分を含む薬剤に組み込まれる。

【0075】

「抗体」という用語は、免疫原性応答のインビトロ又はインビボにおける発生により得られる免疫グロブリン分子を包含することが意図されており、ポリクローナル、単一特異的、及びモノクローナル抗体、並びにT細胞受容体、及びそれらのフラグメント及び誘導体を含む。「免疫原性応答」は、抗原の1つ以上のエピトープを対象にする抗体の産生をもたらすものである。「エピトープ」は、分子中の単一の抗原決定基である。

【0076】

ポリクローナル抗体は、多くのエピトープを有する抗原（しばしば、タンパク質又はポリペプチド）に対する免疫原性応答において産生され、従って一般的に抗原内の異なるエ

10

20

30

40

50

ピトープを対象とする異なる抗体の集団を含む。ポリクローナル抗体を産生するための方法は、当業界で周知である（例えば、Cooper et al, Section II I of Chapter 11 in: Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York, 1992, ページ11-37から11-41を参照のこと）。

【0077】

単一特異的な抗体は、いくつかの単離したタンパク質（そのタンパク質が得られたものから単離）のエピトープに対応する短い（典型的には、5～20アミノ酸）免疫原性ポリペプチドに対する液性応答において産生される。多数の単一特異的抗体としては、少なくとも1つ、好ましくはたった1つのエピトープを含むタンパク質の特異的部分、すなわちアミノ酸配列を対象とする様々な異なる抗体が挙げられる。単一特異的抗体を産生するための方法は、当業界で周知である（例えば、Id., ページ11-42から11-46を参照のこと）。

【0078】

モノクローナル抗体は、抗原の単一の特異的な抗原のエピトープを認識する特異的抗体である。モノクローナル抗体分子の集団において、各抗体分子は、集団において他と全く一致している。モノクローナル抗体を単離するために、特定のモノクローナル抗体を発現、提示、及び／又は分泌するクローン細胞株を同定する。このクローン細胞株は、所望のモノクローナル抗体を産生するのに用いることができる。クローナル細胞株及びそれにより発現されるモノクローナル抗体を調整する方法は、当業界で知られている（例えば、Fuller et al, Section II of Chapter II in: Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York, 1992, ページ11-22から11-11-36を参照のこと）。

【0079】

T細胞受容体（TCR）は、抗体に遺伝学的及び構造的に関連した異なるクラスのタンパク質である。TCRタンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、抗体の分子構造に類似した分子構造を有する。抗体と同様に、TCRは特異的なリガンドを特異的に認識（すなわち、特異的に結合）する。TCRの複合体はT細胞上に提示され、T細胞の分化及び活性化に関連した分子イベントを引き起こす目的で特異的な抗原に結合する。抗体と同様に、TCRは特定の抗原を認識する。しかし、リガンドを結合するTCRタンパク質の部分の正確な構造、及びその構造に関連するアミノ酸配列の相違により、タンパク質をコードする遺伝子が再配列及び変異により多様化するメカニズムも異なる。

【0080】

抗体フラグメント及び誘導体は、抗体及びT細胞受容体から得られ、「親」抗体又はTCRにより認識されるリガンドを特異的に認識する能力を保持するタンパク質である。好ましいフラグメントとしては、Fabフラグメント（すなわち、抗原結合ドメインを含み、ジスルフィド結合により架橋された軽鎖及び重鎖の一部を含んでなる抗体フラグメント）；Fab'（ヒンジ領域によりFabと追加の部分の重鎖を含んでなる単一の抗原結合ドメインを含む抗体フラグメント）；F(ab')₂（重鎖のヒンジ領域における鎖間ジスルフィド結合により結合した2つの分子；Fab'分子は同一又は異なるエピトープを対象とすることができる）；及び、二重特異性Fab（ドメインに結合する2つの抗原を有するFab分子、それらはそれぞれ異なるエピトープを対象とすることができる）を挙げることができる。

【0081】

一本鎖抗体（scFv）は、10～25のアミノ酸により互いに結合した抗体の一本の軽鎖及び重鎖の可変抗原結合決定領域を含んでなる。米国特許番号5,260,203；5,869,620；5,455,030；5,518,889；5,534,621；

10

20

30

40

50

4, 946, 778; 6, 025, 165; 及び 6, 027, 725。

【0082】

一本鎖抗体の複合体も本発明の範囲であり、ジスルフィド結合Fv、又はdsFv（ジスルフィド結合により結合した抗体の一本の軽鎖及び重鎖の可変抗原結合決定領域）；二重特異性sFv（2つの抗原結合ドメインを有するscFv又はdsFv、それらはそれぞれ異なるエピトープを対象とすることができる）；二特異性抗体（第一のscFvのVHドメインが第二のscFvのVLドメインと会合し、第一のscFvのVLドメインが第二のscFvのVHドメインと会合する際に形成される二量化scFv；二特異性抗体の2つの抗原結合領域は、同一の又は異なるエピトープを対象とすることができる）；及び、三特異性抗体（二特異性抗体と類似の方法において形成される三量化sFv、そこでは3つの抗原結合ドメインは単一の複合体中に作られる；3つの抗原結合ドメインは、同一の又は異なるエピトープを対象とすることができる）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0083】

「抗体」という用語は、遺伝子組み換え抗体及び／又は組み換えDNA技術により産生された抗体及び「ヒト化」抗体も含む。ヒト化抗体は、アミノ酸配列、グリコシル化パターンなどに関して、ヒト以上となるように、遺伝子操作及び／又はインビトロでの処理により修飾し、抗体を投与することを意図している動物における抗体又は抗体フラグメントの抗原性を減少させた。

20

【0084】

B. 好ましい抗S1Pモノクローナル抗体

好ましい二重特異性モノクローナル抗S1P抗体（抗S1PmAb）が開発され、A. T. C. C及び指定アクセッション番号306D326. 1#26により寄託された。この抗体は、治療分子スポンジとして用いて、S1Pを選択的に吸着し、それによりS1P活性に関連した過剰増殖性疾患を処置する目的で、効果的なインビボの細胞外S1P濃度を低下させることができる。これは、腫瘍容積及び転移能の減少、並びに成長する腫瘍に供給し得る新規の血管形成の同時遮断をもたらすことができる。この抗体（及び、同等の活性を有する分子）は、S1Pにより影響を受ける他の過剰増殖性疾患、例えば加齢性黄斑変性症、線維形成に関連する疾患、及び多くの癌において生じる望まれない内皮細胞増殖を処置するのに用いることもできる。更に、アポトーシスから細胞を保護するS1Pの能力は、薬剤、例えば抗体により無効にされ、それにより標準的なアポトーシス促進化学療法剤の有効性を増大させる。

30

【0085】

3. 医薬組成物

本発明の別の側面は、組成物、例えば医薬組成物及び／又は生物学的組成物（これらに限定されない）まで引き込む。本発明によると、「組成物」は、少なくとも1つの担体、好ましくは生理学的に許容される担体、及び1つ以上の本発明の治療剤を含んでなる混合物を指す。「担体」という用語は、治療剤の細胞又は組織への取り込みを阻害又は妨げない化学化合物を規定する。担体は、典型的には、活性成分を適切な剤形（例えば、丸剤、カプセル、ゲル、フィルム、錠剤、微粒子（例えば、ミクロスフェア）、溶液など）へと製剤化又は配合することを可能にする不活性物質である。「生理学的に許容される担体」は、化合物の生物活性及び特性を抑制（減少、阻害、又は妨害）しない生理学的条件下での使用に適した担体である。例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）は、生物の細胞又は組織への多くの有機化合物の取り込みを容易にする担体である。好ましくは、担体は、生理学的に許容される担体、好ましくは医薬として又は獣医学的に許容される担体であり、その中に治療剤を置く。「医薬組成物」は、担体が医薬として許容される担体である組成物を指し、一方、「獣医用組成物」は、担体が獣医学的に許容される担体であるものである。「医薬として許容される担体」又は「獣医学的に許容される担体」という用語は、生物学的に又はその他の点で所望されなくはない任意の媒体又は物質を含む、すなわち担体は、任意の所望されない生物学的効果を引き起こさずに、或いは生物の複合体又は任

40

50

意の成分と有害な様式で相互作用せずに、治療剤、治療組成物又は治療化合物と共に生物に投与することができる。医薬として許容される試薬の例は、The United States Pharmacopeia, The National Formulary, United States Pharmacopeia, Convention, Inc., Rockville, Md. 1990において提供され、それにより本明細書の引用文献により本願に組み込まれる。

【0086】

本発明の組成物は、更に、他の化学成分、例えば希釈剤及び賦形剤を含んでなることができる。「希釈剤」は、溶媒、好ましくは水溶性溶媒に希釈した化学物質であり、それは溶媒中での治療剤の溶解を容易にし、治療剤又は1つ以上の成分の生物活性形態を安定化するのにも役立つ。緩衝化溶液中に溶解した塩を、当業界の希釈剤として用いる。例えば、好ましい希釈剤は1つ以上の異なる塩を含む緩衝化溶液である。好ましい緩衝化溶液は、リン酸緩衝生理食塩水（特に、医薬投与を意図した組成物と併せて）であり、それはヒトの血液の塩条件を模倣する。緩衝塩は低濃度の溶液のpHを制御することができるので、緩衝化希釈剤は治療剤の生物活性をほとんど変化させない。

【0087】

「賦形剤」は、適切な特性、例えば適切な稠度を与え、又は薬剤を形成するために組成物に添加することができる任意のおおよそ不活性な物質である。適切な賦形剤及び担体としては、特に、充填剤、例えば砂糖、例えばラクトース、スクロース、マンニトール、又はソルビトールセルロース調製物、例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、アガー、ペクチン、キサンタンガム、グアーガム、ローカストビーンガム、ヒアルロン酸、カゼインジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカント・ゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルーセルロース、ポリアクリル酸塩、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、及び／又はポリビニルピロリドン（PVP）が挙げられる。必要であれば、崩壊剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、アガー、又はアルギン酸又はその塩、例えばアルギン酸ナトリウムも含むことができる。他の適切な賦形剤及び担体としては、ヒドロゲル、ゲル化性（gelable）親水コロイド、及びキトサンが挙げられる。

【0088】

本発明の組成物は、任意の適切な方法で製剤化することができる。治療剤は、担体中に、均一（均質）又は不均一（不均質）に分散することができる。適切な製剤としては、乾燥製剤及び液体製剤が挙げられる。乾燥製剤としては、フリーズドライ及び凍結乾燥粉末が挙げられる。それらは、洞又は肺へのエアロゾルの供給、或いは投与前の適切な希釈剤中での再構成が後に続く長期の保存に特に適している。他の好ましい乾燥製剤としては、本発明の組成物を経口投与に適した錠剤又は丸剤形態に圧縮し、又は持続放出製剤に配合したものが挙げられる。組成物が経口投与を意図しているが、治療剤が腸の上皮に供給される場合、製剤を保護し、そこに含まれる治療剤の早期放出を防ぐために、製剤を腸溶コーティングで封入するのが好ましい。当業者が認識するように、本発明の組成物を、任意の適切な剤形中に置くことができる。丸剤及び錠剤は、いくつかのこのような剤形の代表である。組成物は、例えば圧縮、浸漬、パン（pan）コーティング、スプレードライなどにより、任意の適切なカプセル又は他のコーティング物質中に封入することもできる。適切なカプセル、ゼラチン及びデンプンから作られたものを含む。同様に、このようなカプセルは、1つ以上の追加の物質、例えば必要であれば腸溶コーティングでコーティングすることができる。液体製剤としては、水性製剤、ゲル、及びエマルジョンが挙げられる。

【0089】

滅菌溶液又は懸濁液である液体医薬組成物は、例えば筋肉内、髄腔内、硬膜外、腹腔内又は皮下注射により用いることができる。滅菌溶液は、静脈内に投与することもできる。活性成分は、滅菌水、生理食塩水、又は他の適切な滅菌注入媒体を用いて、投与時に溶解又は懸濁することのできる滅菌固体組成物として調製することができる。担体は、必要で

不活性な結合剤、懸濁化剤、潤滑剤、着香料（flavorant）、甘味料、保存料、色素及びコーティングを含むことが意図されている。

【0090】

本発明の組成物を、特定の所望の生物学的結果（治療効果又は保護効果（例えば、予防接種）を挙げることができる）を達成するために薬剤として投与する場合に、本発明の治療剤を適切な医薬用担体と組み合わせることが必要であり得ることを、当業者は認識するだろう。医薬用担体の選択及び治療剤又は保護剤としての治療剤の調製は、意図した使用及び投与の様式に依存するだろう。適切な製剤及び治療剤の投与方法としては、経口、肺、鼻、口腔、眼球（ocular）、皮膚、直腸、又は腔内供給のためのものが挙げられる。

10

【0091】

本発明の組成物を、特定の所望の生物学的結果（治療効果又は保護効果（例えば、予防接種）を挙げることができる）を達成するために薬剤として投与する場合に、本発明の治療剤を適切な医薬用担体と組み合わせることが必要であり得ることを、当業者は認識するだろう。医薬用担体の選択及び治療剤又は保護剤としての治療剤の調製は、意図した使用及び投与の様式に依存するだろう。適切な製剤及び治療剤の投与方法としては、経口、肺、鼻、口腔、眼球（ocular）、皮膚、直腸、又は腔内供給のためのものが挙げられる。

【0092】

本発明の組成物を、特定の所望の生物学的結果（治療効果又は保護効果（例えば、予防接種）を挙げることができる）を達成するために薬剤として投与する場合に、本発明の治療剤を適切な医薬用担体と組み合わせることが必要であり得ることを、当業者は認識するだろう。医薬用担体の選択及び治療剤又は保護剤としての治療剤の調製は、意図した使用及び投与の様式に依存するだろう。適切な製剤及び治療剤の投与方法としては、経口、肺、鼻、口腔、眼球（ocular）、皮膚、直腸、又は腔内供給のためのものが挙げられる。

20

【0093】

本発明の医薬組成物は、固体、液体、エマルジョン、分散、ミセル、リポソームなどの形態で用いることができる。ここで、得られた組成物は、活性成分として、腸内又は非経口適用に適した有機担体若しくは賦形剤又は無機担体若しくは賦形剤との混合において、1つ以上の本発明の化合物を含む。活性成分は、例えば通常の無毒性の医薬として許容される担体と共に、錠剤、丸剤、カプセル、坐剤、溶液、エマルジョン、懸濁液、及び使用に適した任意の他の形態用に、配合することができる。用いることができる担体としては、固体、半固体、又は液体形態の、グルコース、ラクトース、マンノース、アラビアゴム、ゼラチン、マンニトール、デンプン糊、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイドシリカ、ジャガイモデンプン、尿素、中鎖脂肪酸トリグリセリド、デキストラン、及び調製物の製造における使用に適した他の担体が挙げられる。更に、補助剤、安定剤、増粘剤及び着色剤及び香料を用いることができる。

30

【0094】

本発明の治療キットは、1つ以上の追加の要素、例えば本発明の組成物の貯蔵のためのバイアル又は他の容器、使用のための説明書、及び包装材料と共に、本発明の試薬を含んでなる。

40

【実施例】

【0095】

以下の実施例は、本発明の特定の側面を説明し、本発明を実施する際に当業者を助けるために提供される。これらの実施例は、いずれかの方法において本発明の範囲を制限するものであるとは決して考えられるべきではない。

【0096】

この実施例部分における実施例は、ヒト及び動物腫瘍の動物モデルにおける薬物動態及び毒性学の研究からの好ましい結果を実証する。多数の腫瘍細胞株、例えばHeLa細胞

40

(ヒト子宮頸部腺癌)、U-87 (ヒト脳グリア芽細胞腫)、U266 (ヒト多発性骨髄腫)、A549 (ヒト肺)、U937 (ヒト組織球性 (h i s t o c y t i c) リンパ腫)、MCF-7 (ヒト乳腺腺癌)、SKOV3 (ヒト卵巣癌)、OVCAR3 (ヒト卵巣癌)、MDAMB231 (ヒト乳癌)、MDAMB468 (ヒト乳癌)、H929 (ヒト骨髄腫)、RPMI-8226 (ヒト多発性骨髄腫)、U937 (ヒトリンパ腫)、SKBR-3 (ヒト乳癌)、及びHT-29 (ヒト結腸直腸腺癌) 細胞 (これらに限定されない) のS1P応答性についても記載する。これらの腫瘍細胞株は、広範な組織学的サブタイプ、遺伝子異常、並びにS1Pを産生し代謝する受容体及び酵素を示す。これは、細胞増殖、運動性、浸潤、アポトーシス、及び選ばれたグループに関しては血管新生因子の産生を含む。多くの腫瘍細胞株が、代表的な化学療法剤であるドキソルビシン及びパクリタキセルにより誘導されるアポトーシスを逃れる能力においてもS1P応答性であることも実証される。

10

【0097】

S1Pで誘導したアポトーシスからの保護も、抗S1P剤、抗S1PmAbの存在下で無効にされ得る。転移癌の重要な特徴は、腫瘍細胞が接触阻害を逃れ、元の組織から移動することができるということである。S1Pの転移能を阻害する抗S1PmAbの能力のように、多数の腫瘍細胞株における細胞浸潤を誘導するS1Pの潜在的な能力も報告されている。限定された数の細胞タイプにおいて、S1Pは既に実質的な基礎レベルを超えて細胞増殖を促進する。重要なことには、インビボでの異種移植試験は、抗S1PmAbが、様々なヒト癌細胞及び1つのマウスメラノーマ細胞株 (B16-F10) が与えられたマウスにおける腫瘍容積を減少させることも実証する。

20

【0098】

S1Pは、インビトロ及びインビボ両方におけるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC) の移動により、血管新生を促進することが示されてきた。以下に記載する試験は、S1Pが、インビトロ及びインビボでの毛細血管様細管の形成を刺激することを確認する。更に、この工程は、抗S1PmAbにより阻害され得る。例えば、インビボでのマトリゲルブラグ試験は、抗S1PmAbが抗血管新生であることを明らかにする。これは、HUV ECを用いてインビトロで確認された。従って、S1PがHUV ECをドキソルビシン及びパクリタキセル誘導アポトーシスから保護するだけでなく、HUV ECの移動及び血管形成をも刺激することが示された。更に、B16-F10同種移植モデルを用いて、インビボでの腫瘍血管新生を減少させる抗S1PmAbの能力を実証する実施例が示される。全てのこれらの効果は、抗S1PmAbにより軽減される。

30

【0099】

腫瘍細胞それ自体により産生されるS1Pに加えて、血清は、この重要な腫瘍化因子の豊富な源である。抗S1P剤、例えば抗S1PmAbは、血清だけでなく固形腫瘍の近辺にも存在するS1Pを中和することができる。

【0100】

実施例は、いくつかの腫瘍由来のヒト細胞株における腫瘍化成長因子としてのS1Pの多面的な効果を説明するために示され、これは我々の抗S1PmAbが様々な癌のタイプにおいて首尾よく用いることができることを示唆する。更に、示すデータは、マウス由来の腫瘍は抗S1PmAbで処置することができることを実証し、抗体の獣医学的適用を示唆する。

40

【0101】

実施例1

抗S1PmAbは単独で腫瘍進行を軽減する

抗S1Pモノクローナル抗体 (mAb) の抗腫瘍効果を、2つの同所乳癌モデル及び1つの卵巣癌モデルにおいて評価した。標準的プロトコルを用いて、ヌード (Ncr Nu/Nu) マウスの乳房脂肪パッドにMDAMB231ヒト腫瘍細胞を注入することにより、腫瘍を発達させた。10日後、固形腫瘍が形成した時に ($\sim 100 \text{ mm}^3$)、抗S1PmAb又は賦形剤単独の腹腔内処置を開始した。抗S1PmAbを、 25 mg/kg で

50

、腹腔内（i. p.）に、一日おきに、生理食塩水中において投与した。試験期間においては、一日おきに処置を行った。腫瘍容積も、一日おきに測定し記録した。腫瘍が、I A C U C基準により規定されるように、その最大の大きさ（約1.5 cm³）に到達した時に、試験を終わりにし、その動物を屠殺した。微小血管の変化の免疫組織化学的評価のために、腫瘍を取り、測定し、そして処理した。

【0102】

図3は、抗S1PmAbの、長期間の腫瘍容積の減少における有効性を実証する。抗S1PmAbの腫瘍容積を減少させる能力は、腫瘍が約400 mm³に達した後にのみ明らかである。この時点では、コントロール動物からの腫瘍は成長し続け、一方抗S1Pで処理した動物からの腫瘍は保護成長が止まる。試験の終わりでは、固体で処理した動物で腫瘍容積が60%（ANOVAによりp<0.001）減少する。コントロール処理動物からの腫瘍と比較して、抗S1PmAbは、最終的な腫瘍重量を平均40%まで顕著に減少させる。

10

【0103】

同等な同所乳房脂肪パッドモデル（図4）における、MDA MB 468ヒト乳癌細胞を用いても、好ましいインビボでの有効性が得られた。このモデルにおいては、抗体処理動物に関して、40%の平均腫瘍容積の減少が観察された。抗S1PmAbで処理した動物の腫瘍の大きさの減少は、血管新生及び腫瘍形成因子（IL-8）の減少した血清レベルに関連していた。従って、試験したいずれの異種移植モデルにおいても、抗S1P抗体は腫瘍成長を顕著に阻害した。

20

【0104】

実施例2

抗S1PmAbは、インビボで腫瘍血管新生を阻害する

S1Pの血管新生促進効果を中和する抗S1PmAbの能力を調べるために、インビボでのマトリゲルプラグ試験を用いた。この試験はマトリゲル（マウス腫瘍から得た基底膜を含む腫瘍残留物の独自に開発した混合物）を用いた腫瘍血管新生のための十分確立された動物モデルである。マトリゲルを動物に皮下（s. c.）注入すると、それは「プラグ」を形成する。血管新生因子を添加すると、プラグは血管内皮細胞により浸潤され、それは毛細血管様血管を形成する。マトリゲルは、単独で或いは血管促進化合物として、組み換え成長因子（rGF）、例えばFGF又はVEGFと混合して調製し、その後6週齢のC57Bl/6N雌性マウスの背中に皮下注入することができる。血管及び周辺組織からの内因性S1Pは、更なる血管新生促進刺激と共にプラグを供給し得る。抗体のインビボでの性能特性に基づいて（以下を参照のこと）、抗S1PmAbによるマウスの処理は、利用可能な血清及び組織のS1Pのレベルを減少させ、結果としてプラグに対して利用可能な内因性S1Pの濃度を減少させる。これらの実験においては、最適に刺激したプラグ（タンパク質成長因子と内因性S1Pを添加）における血管新生を減少させる抗体の能力を試験した。hGFを含むマトリゲルを受けたマウスの1つのグループは、マトリゲル移植の1日前から開始して48時間ごとに、抗S1PmAbの腹腔内（i. p.）注入も受けた。各処理グループ（マトリゲル、マトリゲルとhGF、又はmAb処理に伴うマトリゲルとhGF）は、最少6匹のマウスからなる。10日後に、マウスをヘパリン処理し、蛍光性レクチン、イソレクチンB4-FITC（これは、血管内皮細胞により発現される接着分子と結合する）を注入した。その後、プラグを切除した。プラグの外観検査により、コントロール（マトリゲルのみ）プラグは無色であり、一方、hGFを含むプラグは赤く、血のような外観により示されるように明らかに血管新生を受けていたことが明らかになった。hGFを含む抗S1PmAbで処理した動物からのプラグは無色であり、これは微小血管新生の阻害を示唆した。その後、プラグをOCT寒剤（freezing medium）中に埋め込み、区分化した。図5に示すように、微小血管密度を、レクチン-FITCで染色した血管により定性的に評価した。血管染色は、コントロール（未処理）プラグにおいては散在的であり、一方、hGFを含むプラグは血管新生の有意な証拠を実証した（パネルCの中央の写真）。抗S1PmAbにより処理したマウスからのプラグ

30

40

50

は、未処理マウス（mAbなし）からのhGfプラグと比較して血管形成における顕著な減少を実証した。染色された血管の定量化により、未処理動物と比較して、抗体で処理した動物からのプラグを含むhGFの新血管新生における11倍の減少が明らかにされた（図5）。この評価は、内因性血清及び組織S1Pの微小血管新生を促進する能力、並びに抗S1PmAbのインビボでの内因性S1Pの血管新生促進効果を中和する能力を実証する。

【0105】

これらの結果は、インビボでの抗S1PmAbの抗血管新生効果、及び細胞毒性化学療法剤の恩恵を受けずに腫瘍進行を軽減させる抗S1PmAbの劇的な効果を実証する。特定の論理に拘束されることを望むわけではないが、このデータは、抗S1PmAbの抗腫瘍形成効果が、腫瘍進行を通常促進するS1Pの血管新生効果の軽減に起因し得ることを明らかにする。従って、1つ以上の他の細胞毒性薬と併用した抗S1P剤の付加的な効果から、いくつかの効果的な癌処置がもたらされるだろう。併用処置の付加的な抗腫瘍効果を実証するインビトロ及びインビボでの結果を以下に示す。

【0106】

実施例3

インビボでの薬物動態及び毒性学

インビボでの試験を開始する前に、抗S1PmAbの毒性学的及び薬物動態特性をマウスにおいて決定した。抗体の半減期を測定して、抗S1PmAbの適当な血中濃度を保持するのにどのようにして最適に動物に投与するかを決定した。25mg/kgの抗S1PmAbをマウスの静脈内（i.v.）に投与し、指定した時点で出血させた。ビオチン標識抗S1PmAbを用いた競合的ELISAを用いて、抗体のボーラス投与後20分から120時間の間のマウスの血液中に保持されている抗体の濃度を決定した。図6は、このmAbの血清半減期が約20～25時間であることを実証する。静脈注入に加えて、腹腔内（i.p.）注入により抗S1PmAbをマウスにボーラス投与した。20分後に、95%以上の抗体が血流中に現れた。総合すると、これらのデータは、マウスは腹腔内又は静脈内のいずれかにより、抗S1PmAbを効果的に投与されることができるとを示す。

【0107】

S1Pの多面的な性質により、抗S1PmAbを用いた処置の結果としての全身性のS1Pの減少によりもたらされ得る生理学的機能への潜在的な副作用を調べた。尾静脈注入により、連続して数日間、1、3、10、30又は50mg/kgの抗S1PmAb又は賦形剤（PBS）でマウスを処理した。抗体の長い半減期により、投与計画の模擬実験は、動物が7日間にわたって2倍の量の抗体を蓄積したことを示した。最後の処理の24時間後に、マウスを屠殺し、体液を回収し、そして器官を得た。最も高用量においてでさえも、全ての化学的及びCBCパネル分析は、正常な範囲内であった。更に、有資格の獣医病理学者による組織病理学検査は、任意の処置グループにおいて、マウスの肝臓、腎臓、心臓、肺、又は脾臓における損傷又は他の病理学的変化を明らかにしなかった。試験期間を通して、全ての処理群のマウスは、似た量の食料及び水を消費し、コントロール群と比べて違ったように活動しなかった。体重及び活動レベルも正常であった。従って、50mg/kgを含む試験した全ての用量において、抗体は十分許容されるようである。

【0108】

試験的な薬物動態及び毒性試験からの情報は、動物有効性試験において動物にどのように投与するかに関する見識を提供する。3日おきに10mg/kgの抗S1PmAbを投与する模擬実験は、かなり長期間蓄積しないマウスにおける抗体の一定の存在を実証する（図6）。

【0109】

実施例4

抗体の特徴

抗体の1つの重要な性能特性は、その抗原に対する特異性である。すなわちそれはその

10

20

30

40

50

意図した標的と特異的に反応する。図7は、ゴールドスタンダード (gold-standard) S1P試料 (Avanti Polar Lipidsから得、HPLC及び質量分析により確認した)、並びにいくつかの他のリゾ脂質 (lysolipid) コントロールに対して試験した、抗S1PmAbを用いた競合的ELISAを示す。重要なことには、抗体は、スフィンゴ脂質 (SPH) (S1Pの直接的な代謝前駆体) に対して交差反応を示さなかった。更に、抗S1PmAbは、リゾリン酸 (lysophosphatic acid) (LPA) 又はスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を認識しなかった。LPA及びSPCは双方ともS1Pに構造的に類似している。

【0110】

優れた治療抗体の別の重要な性能特性は、それが生理学的範囲において標的 (すなわち、S1P) を認識することができることである。血清S1Pを測定するための工業標準的HPLC技術を用いた試験は、正常な血清S1Pレベルが400~700 pmol/mLの範囲内であり、一方、顕著な冠動脈疾患を有する患者がより高い血清S1Pレベル (900~2,500 pmol/mLの範囲内) を示すことを明らかにした。データは、卵巣患者の腹水が、血清S1Pレベルに近い大量のS1Pを含むことを示す。図7は、これらの実施例で用いた抗S1PmAbの動的 (dynamic) 範囲を実証し、この抗体が正常及び臨床的に適切なS1P濃度のいずれにおいてもS1Pを認識することができることを示す。結果的に、抗S1PmAbが、感受性が高く且つ特異的 (すなわち、それが意図した標的と「特異的に反応」する) である動的範囲を有する。正常なボランティアからのヒト血清S1PmAbの工業標準的HPLC測定と、抗S1PmAbを用いたELISAを基礎とした測定との間の比較は、2つの方法の間の優れた一致を示し、それによりS1P測定のための正確なプラットフォーム (platform) としてのELISAの使用の有効性を立証した。

【0111】

抗体の更なる重要な特性は、インビボの環境におけるリガンドを認識する能力である。従って、抗S1PmAbのヒト及びマウス血清からのS1Pを選択的に吸着する能力を、放射能分析及び質量分析法の両方を用いるインビトロアッセイにおいて試験した。このmAbは、PBS及びマウスに添加した³H-S1Pを、それぞれ88%及び77%まで効率的に吸着することができる。コントロール (PBS) と比較した場合に、マウスの血清中の同じようなレベルの³H-S1Pを吸着するmAbの能力の相違は、内因性S1P (これは、マウスの血清中で高い濃度で存在する) にも結合するmAbに起因する可能性が最も高い。これらのデータは、血清とインビボでの有効性実験において実施したインビトロでの細胞バイオアッセイと一致し、これはこのmAbが血清中でS1Pを効果的に中和することができることを実証する。

【0112】

総合すると、これらの結果は、特異的且つ感受性の高いS1Pに対する生体特異的モノクローナル抗体の開発の成功を実証する。従って、このmAb、及びS1Pと特異的に反応することができる他の薬剤は、血清からのS1Pを効率的且つ選択的に吸着する分子「スポンジ」又は「シンク (sink)」として治療上用いることができ、それによりインビボでの細胞外液中の有効濃度を減少させることができる。更に、抗S1PmAb (及び類似の試薬) は、生物試料 (例えば、組織試料 (例えば、生検からの)) 又は体液 (例えば、血液、腹水、血清、リンパ液、唾液、尿、脳脊髄液など) 中のS1P (又は、他の標的分析物) のレベルを検出 (定量的に、半定量的に、又は定性的に) するための試験において検出試薬として用いることができる。バイオマーカーとしてのS1Pの評価は、組織S1P受容体レベル及びSPHKのレベルのゲノムプロファイリングと併用して、腫瘍成長に対するS1Pへの依存により患者を階層化することができる。このような試験は、患者の血清、腹水、又は腫瘍生検物質のS1P含量を測定 (好ましくは、ゲノム分析と組にして) する「テラノスティック (theranostic)」プラットフォームに応用し、それにより、どの患者が、その後実現される治療における治療薬として考案される検出試薬を用いる治療処置により利益を享受するかを予測することを可能にする。

【0113】

実施例5

S1Pの血管新生促進特性（上記を参照のこと）に加えて、腫瘍成長を促進するS1Pの作用が、細胞増殖を直接的に促進し、アポトーシス促進化学療法剤から細胞を保護する分子の能力に起因することが実証された。臨床的に適切なレベルの化学療法剤（パクリタキセル（タキソール）及びドキシソルビシン（（アンドリアマイシン）Andriamycin））に曝露した際に、アポトーシスターミナルエフェクター（カスパーゼ3）のアップレギュレーション及び活性化を妨げるS1Pの能力を、いくつかの腫瘍細胞株において試験した。図8は、これらの化学療法剤によりもたらされるアポトーシスから、A549、HT-29、U266BL、及びHeLa細胞を保護するS1Pの能力を実証する。図8は、パクリタキセル及びドキシソルビシンが、10%の血清を含む培地における処理の48時間後にカスパーゼ3の活性化を50~1000%まで強く誘導したことを示す。S1Pの生理学的レベルに類似した条件を促進することを目的として、10%の血清に追加のS1P（100nM）を加え、その後細胞を細胞毒性剤で処理した。10%の血清で処理した細胞と比較して、追加の外因性S1Pを供給した細胞は、パクリタキセル及びドキシソルビシンで誘導したアポトーシスから保護された。これは、添加したスフィンゴ脂質の存在下で見られるカスパーゼ活性の顕著な（ $p < 0.001$ ）減少により実証された。重要なことには、このmAbは、化学療法剤の存在下におけるS1Pの保護効果を軽減するのに効果的であった。添加したS1Pの不在下においても、パクリタキセル及びドキシソルビシンで誘導したカスパーゼ活性は抗S1PmAbにより強化され（それぞれ、25%及び50~200%の増加）、これは内因性S1Pの保護的抗アポトーシス効果が、血清中に存在するS1Pの選択的な抗体吸着により排除されたことを示唆する。血清がかなりの内因性S1Pを有することを考慮すると、添加したS1Pの不在下における抗体の有効性は（3番目の組のバー（bar））、血清中のS1Pの内因性レベルがドキシソルビシン又はパクリタキセルで誘導した細胞死に対する保護をもたらすのに十分であったことを示す。

【0114】

抗S1PmAbの特異性は、構造的に類似した生体活性脂質メディエーター及びモノクローナル抗体にマッチした非特異的なアイソタイプを用いたコントロール実験において実証された。A549、HT-29及びU266BL細胞株を用いる実験において、LPAはカスパーゼの活性化を減少させなかった。更に、非特異的なモノクローナル抗体はS1P応答を中和せず、これによりS1P効果の軽減における抗S1PmAbの特異性を示された。

【0115】

類似のデータは、U266BL、MCF-7、及びHT-29細胞におけるS1Pの抗アポトーシス効果を実証した。しかし、全ての腫瘍細胞株がS1Pに対して応答するわけではない。例えば、マウスメラノーマB16-F10、ヒトリンパ腫U937、及びヒト卵巣MDA-MB2774腫瘍細胞は、ドキシソルビシン又はパクリタキセルで誘導した細胞死からそれらの細胞タイプを保護する脂質メディエーターの能力を評価した場合に、S1Pに応答しなかった。更に、抗S1PmAbは、化学療法剤の潜在的殺能力を増大させず、これによりS1Pがこれらの腫瘍細胞株において発揮する効果の喪失が実証された。

【0116】

実施例6

抗S1PmAbは、腫瘍促進サイトカイン及びVEGFの放出を阻害する

動物モデルにおいて、インターロイキン6及び8の発現は、卵巣癌細胞の増大した腫瘍形成、腹水形成、血管新生、及び浸潤性に関連する。卵巣癌患者においては、IL-6の血清レベルは、いくつかの大きさで上昇する。総合すると、これらの研究は、IL-6が重要なモジュレーターであるか、或いは少なくとも卵巣癌の進行の指標であることを示す。これらの理由により、抗S1Pモノクローナル抗体が、卵巣癌の進行を軽減する抗体の能力の指標としてのIL-6産生を減少させることができるかを調べることを決定した。これらの試験に関しては、10μMのS1Pが卵巣癌細胞からのIL-6の放出を刺激す

ることができることを実証した。S 1 Pで処理した又はしない卵巣癌OVCAR 3細胞の培養上清を回収し、ELISAを用いて細胞馴化培地へのIL-6の放出を分析した。図9が実証するように、S 1 Pは、未処理細胞と比較して、平均275%までIL-6の発現を増大させた。抗S 1 P mAbで前処理した細胞に関しては、IL-6の発現は顕著に減少した。このmAbの量を増大させると(0.01~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、用量依存的なIL-6の発現の喪失がもたらされた。いくつかの腫瘍細胞系統を用いて、2つの他の新血管新生因子(IL-8及びVEGF)を用いると、同様の顕著な結果が得られた。これらのデータは、成長因子の放出の妨害が、抗S 1 P剤の付加的な効果であることを示す。

【0117】

実施例7

抗S 1 P mAbは、S 1 Pで刺激した癌細胞増殖の増大を減少させる

図10は、 ^3H -チミジン取り込み試験により、選択されたヒト由来の腫瘍細胞株、例えばA549、HT-29、MCF-7及びHela細胞の増殖を増大させるS 1 Pの能力を実証する。これらの癌細胞株のそれぞれにおける未処理コントロール細胞と比較した場合に、100 nMのS 1 Pで処理した細胞においてDNA合成が顕著($p < 0.05$)に増大した。腫瘍由来の細胞は、通常高い基礎レベルの増殖を有するが、S 1 Pはほとんどの腫瘍細胞株において増殖を増大させるようである。重要なことには、S 1 Pにより刺激されたDNA合成の増大は、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗S 1 P mAbの添加により軽減された。クリスタル・バイオレット染色を用いて、OVCAR 3、MDA、MB 273、及びMDA MB 468腫瘍細胞株により同様のデータが得られた。

【0118】

実施例8

抗S 1 P mAbは、S 1 Pで刺激した腫瘍細胞の転移能の増大を減少させる

転移癌の重要な特徴は、腫瘍細胞が移動し組織を浸潤する能力を獲得することである。S 1 Pは、インビトロでの細胞浸潤試験を用いて、乳癌、多形性膠芽腫、及びメラノーマ細胞における転移能を促進することが示された。抗S 1 Pモノクローナル抗体が、S 1 Pで介在される細胞移動を妨げることができるかを評価することを決定した。腫瘍細胞におけるS 1 Pの走化性効果を評価するために、化学浸潤(chemoinvasion)試験において一般的に用いられるインビトロでのマトリゲル細胞浸潤試験を用いた。図11に示すように、ヒト血清中に見出されるレベルのS 1 Pによる処理は、マトリゲルマトリクスを通してA549、HT-29及びMCF-7細胞の浸潤における増大を誘導した。未処理コントロール細胞と比較して、1 μM のS 1 Pにより、細胞移動において6~9倍の増大が得られた。モノクローナル抗S 1 P抗体の添加は、腫瘍細胞浸潤をコントロールレベルまで減少させた。4つのコントロール実験は、これらの結果の特異性を実証した。第一に、A549細胞をLPAと共にインキュベートすることにより、細胞移動への効果はなく、これによりこの細胞株へのS 1 Pの特異的な効果が実証された。第二に、非特異的マウスIgGの添加は、S 1 Pで誘導した細胞移動を阻害しなかった。第三に、抗S 1 P mAbの濃度を1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ への滴定は、全てのS 1 Pを効果的に中和する抗体の能力を減少させた。第四に、B16-F10細胞(以前にS 1 Pに対して非応答であることを決定した; 実施例5を参照のこと)は、S 1 Pとのインキュベーションにより移動しなかった。

【0119】

実施例9

抗S 1 P mAbが腫瘍血管新生を妨げることのインビトロにおける実証

新血管新生の過程は、腫瘍の生存及び成長に不可欠である。新血管新生は、成長する腫瘍の中又は隣接した内皮細胞の浸潤、血管形成、及び生存に依存する。この一連の実験は、管形成、移動、及び化学療法剤に対抗した生存の観点から、新血管新生を刺激するS 1 Pの腫瘍促進能力の評価について記載する。

【0120】

S 1 Pは、マトリゲル及び他の類似の試験を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVE

10

20

30

40

50

C)の移動及びインビトロでの新たな血管形成を促進することが示された。ヒト臍帯から単離したH U V E Cは、重要な成長因子と共に調製した場合、管状毛細血管様構造を形成する。V E G F及びF G Fのような重要なタンパク質成長因子に対する抗体は、血管形成及び腫瘍成長を中和するが、一方、スフィンゴ脂質成長因子に対する中和抗体の抗血管新生効果は以前調べられていなかった。図1 2 Aは、成長因子を減少させたマトリゲルに播いたH U V E Cが、生理学的に適切な血清／血漿濃度のS 1 P (4 0 0 ~ 7 0 0 p m o l / m L)の存在下で、多数の毛細血管様構造を形成したことを実証する。H U V E Cは、S 1 Pの不在下で毛細血管様構造を形成しなかった。更に、S 1 Pに対するモノクローナル抗体は、典型的な毛細血管様構造の形成を実質的に減少させた。

【0 1 2 1】

10

内皮細胞の腫瘍の部位に移動する能力は、血管新生の間の重要な過程でもある。上記のマトリゲル化学浸潤試験においてH U V E C移動を刺激する生理学的濃度のS 1 Pの能力を見出した。図1 2 Bは、未処理H U V E Cよりも2 ~ 2. 5 倍H U V E Cの移動を刺激する、0. 1 ~ 1 μ MのS 1 Pの潜在的能力を実証する。重要なことには、移動のこの刺激は、抗S 1 Pモノクローナル抗体の添加により完全に中和された。

【0 1 2 2】

また、血管新生を受け、成長する腫瘍細胞に供給する内皮細胞の能力は、化学療法剤により誘導される細胞死を回避する細胞の能力に依存する。図1 2 のパネルC及びDは、カスパーゼ3の活性化により試験されるように、細胞死からH U V E Cを強く保護するS 1 Pの能力を実証する。細胞を死から保護するS 1 Pの能力は、抗S 1 P m A bとのインキュベーションにより無効にされた。更に、上記の試験と同様に、抗S 1 P m A bは、ドキソルビシン及びパクリタキセルにより誘導されるカスパーゼ3の活性化を促進した。これらの実験は、2 0 %の血清の存在下で実施され、血清中の内因性S 1 Pの化学療法剤により誘導される細胞死からH U V E Cを保護する能力を実証する。

20

【0 1 2 3】

これらの試験は、S 1 Pが、新たな血管成長に影響を与え、細胞毒性薬から血管内皮細胞を保護することができる有力な血管新生促進成長因子であることを確認する。これらの結果は、抗S 1 P剤が、いくつかの機構、例えば化学療法により誘導される内皮細胞の細胞死を促進するものにより、抗血管新生効果を発揮することができることを実証する。更に、このような薬剤は、標準的な化学療法剤と併用して、臨床において血管新生を軽減し、癌の進行を遅らせることができる。要約すると、これらの結果は、S 1 Pが、腫瘍細胞増殖、浸潤(すなわち、転移能)、新血管新生、及びアポトーシスからの保護に著しい効果を有する多面的な腫瘍形成成長因子であることを実証する。更に、S 1 Pは、アポトーシス化学療法に対してほとんどの細胞タイプを保護する。細胞増殖がS 1 Pにより顕著に刺激されたとしても、他のパラメーターへのS 1 Pの効果は非常に劇的であり、試験したほとんどの細胞タイプに一樣に適用可能である。S 1 Pの血管新生促進効果は劇的であり、抗S 1 P剤、例えば本明細書中に記載する抗S 1 Pモノクローナル抗体は、全てのこれらの効果を妨げる。更に、この結果は、薬剤、例えば抗S 1 Pモノクローナル抗体が他の血管新生促進成長因子の産生を妨げることを実証し、腫瘍進行を停止させる我々の抗S 1 P m A bのための付加的な治療機構を提供する。

30

40

【0 1 2 4】

腫瘍の微小血管新生を妨害し、腫瘍成長(容積及び重量)を阻害する抗S 1 P剤の有効性が実証された。様々な固形及び循環腫瘍タイプから得たいくつかの細胞株のスクリーン(s c r e e n)からの優良なデータは、抗S 1 P剤(例えば、抗体)が、多くの癌のタイプ、特に血管新生に依存するものの処置において有用であり得ることを示す。本明細書中に記載する抗S 1 Pモノクローナル抗体などの薬剤の好ましいi n v i v oでの薬物動態及び毒性プロファイルは、抗S 1 P剤がヒトにおいて薬物として使用可能(d r u g a b l e)であるようであることを更に実証する。

【0 1 2 5】

実施例1 0

50

抗 S 1 P m A b はインビボでの同種モデルにおいて腫瘍血管新生を妨げる

成長する腫瘍は、血管成長に依存する。著しい毒性を有さずにこの過程を阻害し得る薬剤は、有力な新規の抗腫瘍治療剤として役立ち得る。抗 V E G F 抗体治療剤（アバスタチン）は結腸癌のための臨床的使用に対して最近承認されたが、アバスタチンは肺癌及び乳癌の臨床試験において効果的であるとは証明されなかった。従って、腫瘍血管新生を阻害する更なるアプローチが未だ必要とされている。実施例 9 に示すように、1 つのこのようなアプローチは、S 1 P の血管新生促進効果を妨げることである。抗 S 1 P m A b は、S 1 P により誘導される内皮細胞の移動、毛細血管成長、及びインビトロでの細胞の生存を強く阻害することが示された。抗 S 1 P m A b は、血管新生のインビボでのマウスのマトリゲルプラグモデルにおいて、新たな血管形成を促進する S 1 P の能力を中和することも示された。従って、2 つのインビボでのマウスモデルにおいて腫瘍の微小血管形成を減少する抗 S 1 P の有効性について調べた。S 1 P が血管新生を促進又は強化することが示されたので、抗 S 1 P m A b が新たな血管形成を抑制し、腫瘍成長を妨げることが予想された。

【0126】

実施例 5 及び 8 に記載したインビトロでの試験に基づいて、マウスメラノーマ腫瘍由来の細胞株 B 1 6 - F 1 0 が S 1 P の直接的な効果に対して非応答性であることが分かった。S 1 P は、他のほとんどの腫瘍細胞におけるように、これらの細胞において増殖、浸潤、又は細胞死からの保護を誘導しなかった。従って、B 1 6 - F 1 0 腫瘍における抗 S 1 P m A b の任意の抗腫瘍効果は、S 1 P により誘導された腫瘍成長の阻害からではなく、S 1 P により促進された腫瘍に関連する血管新生の阻害から生じるであろうと仮定された。従って、成長する腫瘍における新血管新生の阻害は、腫瘍進行を顕著に遅らせるだろう。従って、マウスにおける B 1 6 - F 1 0 細胞の同所異種移植片の配置後に、抗 S 1 P m A b のメラノーマ腫瘍成長を妨げる能力を調べるために試験を行った。

【0127】

このモデルにおいて、マウスの右側面に B 1 6 - F 1 0 細胞を移植することにより、4 週齢の雌性 C 5 7 B 1 / J 6 マウス（メラノーマ細胞を最初に単離した系統）において腫瘍を発達させた。腫瘍は 100 mm^3 の容積まで確立させた（キャリパー測定により決定した）。腫瘍が所望の容積に達し始めたら、マウスを処理群（ $n = 6 \sim 8$ ）へとコンピューターによりランダム化した。75～150 mm^3 の腫瘍を有するマウスを、処置のために選択した。この容積範囲から外れた腫瘍を有する全ての動物は、この試験に含めなかった。その後、選択したマウスに、抗 S 1 P m A b（25 mg / kg ）、アイソタイプ適合非特異的 m A b（25 mg / kg ；植物病原菌に対する）、又は生理食塩水を 3 日ごとに腹腔内に注入した。全ての処理は、二重盲式であった。腫瘍容積を、2 人で毎日独立に測定し、平均化した。腫瘍容積が最大の大きさ（I A C U C 基準により約 1.8 cm^3 ）に達し始めたら、全ての動物を屠殺した。最終的な腫瘍容積及び重量を記録した。全てのデータの分析後のみ、試験は非盲検であった。

【0128】

図 13 A は、生理食塩水又は非特異的 m A b で処理した動物と比較して、抗 S 1 P m A b で処理したマウスからの腫瘍の容積は、時間とともに 60 % 減少したことを実証する。図 13 B は、腫瘍の新血管新生の減少により生じる腫瘍進行の阻害を確認する。腫瘍進行の減少は、抗 S 1 P m A b の抗血管新生効果に直接的に関連していると考えられる。更に、これらのマウスは免疫力が低下しておらず、これはスフィンゴ脂質の作用の妨害が正常な動物における腫瘍の進行を減少させることができることを示唆している。更に、この試験は、マウス由来の腫瘍が抗 S 1 P 抗体で処理することができることを実証し、この抗体が特にコンパニオン・アニマル及び家畜における癌処置を目的とした獣医学的適用にも有用であるだろうことを示唆する。

【0129】

実施例 11

化学療法剤との併用における抗 S 1 P m A b は腫瘍進行を減少させる

実施例 1 が抗 S 1 P m A b を単独で投与した場合に、それが腫瘍細胞を減少させるのに

有効であることを実証する一方で、効果的なインビボ濃度の S 1 P に結合し減少させる薬剤を、1 つ以上の化学療法剤と併用して、又は手術及び放射線治療などの処置の補助として与えた場合に、ヒト癌の処置はより上手いきき、或いはより多くのタイプの癌の処置に適用することができる。実際に、かなり大きい腫瘍を有するマウス（例えば、700～800 mm³；MDA MB 231 乳癌細胞を移植することにより確立した）を、抗 S 1 P m A b（一日おきに 25 mg / k g）単独、又は 20 mg / k g のボラス投与における一回投与のタキソール（パクリタキセル）と併用して処理した場合に、この組み合わせは、抗体処理マウスがほぼ更なる成長を示さない相乗効果を実証した。図 1 4 を参照のこと。更に、化学療法処置への S 1 P 結合剤の付加が、マウスの生存率を劇的に改善した。図 1 4 を参照のこと。

10

【0130】

実施例 1 2

単独で投与した抗 S 1 P m A b は、確立したヒト卵巣腫瘍を除去する

実施例 1 及び 1 2 は、抗 S 1 P m A b が単独又は細胞毒性薬と併用して投与された場合に腫瘍の大きさを減少させるのに有効であることを実証し、一方、この実施例は適切なヒト腫瘍タイプを用いて、確立した腫瘍の除去を実証する、すなわち治癒がもたらされ得ることを実証する。

【0131】

図 1 5 は、抗 S 1 P m A b が、ヌードマウスにおける確立した同所 S K O V 3 ヒト卵巣腫瘍を除去するのに有効であったことを実証する。このモデルにおいて、腫瘍は処理の開始前の 2 週間で確立した。M R I 分析は、全ての生理食塩水コントロールマウスが腹腔全体に大きな腫瘍を含み、これらのマウスが観察可能な量の腹水液体を蓄積することを明らかにした。反対に、3 日ごとに 25 mg / k g の抗 S 1 P m A b を腹腔内で処理した 5 匹の動物のうち 3 匹において、腫瘍又は腹水は、M R I 分析又は終了後の腹腔の解剖において検出されなかった。抗 S 1 P m A b で処理した 5 匹の動物のうち 2 匹のみが検出可能な腫瘍を有していた；有意に、これらの腫瘍は、生理食塩水で処理した動物の腫瘍より 68 % 小さかった（2300 mg に対して 750 mg）（* p < 0.05）。更に、抗 S 1 P m A b で処理し、腫瘍を有さない動物は、腹部の周りに大量の皮下脂肪を有しておらず、抗体処理動物により示される正常な体重及び全体的な健康を確認した。

20

【0132】

実施例 1 3

血管新生及び加齢性黄斑変性症

この実施例に記載された実験の目的は、抗 S 1 P m A b が腫瘍血管新生以外のモデルにおける血管新生を減少させることができるかを決定することである。これらの試験のために、加齢性黄斑変性症（AMD）の確立された動物モデルを用いた（すなわち、細隙灯を使用したレーザー燃焼を用いた B r u c h 膜の破裂による脈絡膜新血管新生（C N V））。

30

【0133】

AMD の視力障害は、瘢痕（すわわち、線維症、線維形成）及び新血管新生の両方の結果である。S 1 P は血管新新生促進性であるので、前の実施例に記載した実験で用いた抗 S 1 P m A b が、内皮細胞（E C）の生存、移動、及び増殖を減少させることにより血管新生を阻害し；線維芽細胞の生存、移動、及び増殖を減少させることにより瘢痕形成を阻害し；そして、S 1 P と血管新生化合物、例えば V E G F、b F G F、インターロイキン、及び AMD の間制御されない血管新生に寄与する成長因子との間のクロストークを阻害するだろうと考えられた。従って、AMD における E C のような細胞の制御されない増殖は、過剰増殖性細胞疾患と考えることができる。

40

【0134】

ここでは、処理は、抗 S 1 P m A b 又は非特異的アイソタイプ適合マウス m A b のいずれかの硝子体内（I V R）注入からなる。I V R 注入は、0.5 u g の抗 S 1 P m A b を 2 u L 又は等体積の賦形剤に希釈したものからなる。I V R 注入は、レーザー燃焼の 1 日

50

前から開始して7日ごとに投与し、試験の期間続けた。I V R注入の直前に、I Pに供給するケタミン／キシレンによりマウスを麻酔した。麻酔下で、しばしば動物の目を通常の生理食塩水により湿らせた。32ゲージの注射針を用いて、それぞれの動物の右目にゆっくりとI V R注入を行った。全てのI V R注入に対して、保湿ワセリン含有の標準的な抗生物質により目を覆った。マウスの瞳孔を10分間フェニレフリン／アトロピンで拡張させ、その後レーザー燃焼を誘導する前に5分間ケタミン／キシレン（5：1）で麻酔した。レーザー用のレンズとして働く透明な眼科用媒体と共に、カバースリップを目の表面上（下側）に置いた。光を目の中に照らし、視神経及び神経網膜を見えるようにした。その後細いレーザーを網膜の裏に焦点を合わせ、目の裏に垂直にセットした。3つの燃焼を、血管の間（血管を避ける）の視神経から離れて、1つの光ディスク（視神経の大きさ）に置いた。レーザーの設定は以下の通りであった：100msの期間、250mWの強度、及び50ミクロンの直径。レーザー燃焼は神経網膜を移動し、RPE層の色素に焦点を合わせ、Bruch膜の破裂を引き起こした。燃焼の直後、流体のポケットが燃焼の周りに形成し、燃焼の場所に印を付けた。このポケットは、燃焼の熱から広がる流体から生じた。このポケットは結果的に消滅したが、小さな燃焼スポットは依然として観察することができた。動物を、それらが麻酔から完全に回復するまで観察した。

10

【0135】

Bruch膜の破裂の2週間後に、動物を屠殺し、それらの目を集め、パラホルムアルデヒドの中に一晩置いた。その後、目をPBS中で洗い、RPE－脈絡膜－強膜複合体を神経網膜から単離した。その後、この複合体（～200ミクロンの厚さ）を、トリトンX-100と抗グルタミン（glutamine）－ローダミン抗体を含むPBS中で一晩インキュベートした。その後、この複合体を評価のために洗い、平らにのせた。共焦点顕微鏡によるZ線イメージングを用いて、4ミクロンの断面を複合体の上から下まで撮影する（～50個のイメージ）。中心の瘢痕／血管新生領域（～複合体の中央）の輪郭を手動で描き、イメージを蛍光のバックグラウンドレベルに対して独立に分析した。バックグラウンドの蛍光を、各イメージの輪郭を描いた領域から引き、その後各領域の相対的な蛍光を分析した。その後、全体の蛍光を計算した。各動物（3つの燃焼を伴う）は、1のnであった。

20

【0136】

図16が示すように、アイソタイプ適合非特異的モノクローナル抗体のI V R注入と比較して、抗S1PmAbは、I V R注入により投与した場合、CNV損傷形成を有意（ $p < 0.05$ ）に減少させた（～50%の減少）。

30

【0137】

実施例14

線維形成

線維芽細胞に関連する過剰増殖性疾患（すなわち、線維形成）としては、過剰な瘢痕の疾患（すなわち、線維症）、例えば加齢性黄斑変性症（AMD）、心臓リモデリング、及び心筋梗塞に関連する不全症、手術又は損傷の結果として一般的に生じるような過剰創傷治癒、ケロイド、及び線維腫が挙げられるが、これらに限定されない。この実施例14は、S1Pが、インビトロ及びインビボにおける線維芽細胞の増殖、移動、及びコラーゲン遺伝子発現の有力なアクチベーターであり、抗S1PmAbがS1Pにより介在される線維芽細胞活性の効果を減少させるのに効果的であることを実証する。更に、この抗体は、心臓モデルにおいて瘢痕形成を軽減することが示された。

40

【0138】

培養した線維芽細胞を用いたインビトロでの研究は、S1Pの、線維芽細胞の増殖（図17）、移動（図18）、及びコラーゲン遺伝子発現（図19）を活性化する有力な能力について実証する。これらの実験において、抗S1PmAbは、S1Pにより介在される効果を軽減し、線維芽細胞活性の減少をもたらした。

【0139】

線維芽細胞により介在される瘢痕形成の有益な効果を実証するために、2週間のテイク

50

ダウン (take down) に続く開胸術の間にマウスに永続的な冠状動脈結紮を与えることにより、心不全のインビボモデルを作り出した (図 20)。これらの試験においては、梗塞の 48 時間後に抗 S1PmAb (25 mg/kg) を腹腔内に投与し、その後試験の終了まで 3 日ごとに投与した。梗塞の誘導後 48 時間を選択したのは、いくつかの瘢痕形成がこの期間に有益であり、S1P の血管新生も梗塞直後に現れるが、その後必ずしも必要とされないであろうと考えられたからであった。更に、一般的にリモデリング過程から生じる著しい不適応な線維症により、過剰な瘢痕形成が 48 時間後の期間に逆効果であるだろうと考えられた。図 21 は、抗 S1PmAb で処理した梗塞マウスの生存率の増大を示し、不適応な心臓線維症の軽減が改善された生存をもたらし得ることを実証する。

【0140】

本明細書中で開示し特許請求する全ての組成物、品物、及び方法は、本開示の観点において過剰な実験をせずに作り実施することができる。本発明の組成物、品物、及び方法は、好ましい実施態様の観点から記載されているが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく組成物、品物、及び方法に変化を適用することができることは、当業者にとって明らかであるだろう。当業者に明らかな全てのこのような変化及び同等物は、現在存在し又は後に開発されるかに関わらず、添付した特許請求の範囲により規定される本発明の精神及び範囲内であると考えられる。

【0141】

明細書中で言及されている全ての特許、特許出願、及び刊行物は、本発明が関連する当業者のレベルを示す。全ての特許、特許出願、及び刊行物は、全ての目的のために、そしてそれぞれの刊行物が、任意の及び全ての目的のためにその全てが引用文献により組み込まれることが具体的且つ個々に示されているのと同じ程度に、それらの全てが引用文献により本明細書中に組み込まれる。

【0142】

本明細書で適切に例証的に記載された発明は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素の不在下で実施することができる。従って、例えば、本明細書中のそれぞれの場合において、「を含んでなる」、「から本質的になる」、及び「からなる」という用語はいずれも、他の 2 つの用語のいずれかと置き換えることができる。用いた用語及び表現は、限定ではなく説明の用語として用いられ、このような用語及び表現の使用において、示し記載した特徴又はその部分の任意の同等物を排除する意図は存在せず、特許請求する本発明の範囲内で様々な変更が可能であることが認識される。従って、本発明が好ましい実施態様及び選択的な特徴により具体的に開示されたが、本明細書に開示した概念の変更及び変化は当業者により行われることができ、このような変更及び変化は添付した特許請求の範囲により規定した本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0143】

【図 1】図 1 は、スフィンゴミエリナーゼシグナル伝達カスケードの要素を示す説明図である。

【図 2】図 2 は、過剰増殖性疾患、例えば癌のためのスフィンゴ脂質をベースとした処置に関するいくつかの介入点を示す図である。説明するように、ほとんどの介入点はタンパク質標的、典型的にはスフィンゴ脂質シグナル伝達経路における酵素であり、その最も顕著なものは SK である。抗 S1P 抗体により代表される、抗 S1P 分子スポンジアプローチは、S1P を失活させることを可能にし、それによりその腫瘍形成促進 (pro-tumorigenic) 作用を阻害する。抗体アプローチの利点は、低い毒性、長い半減期、及びその標的に対する治療抗体の特異性である。

【図 3】図 3 は、抗 S1PmAb が MDA-MB-231 乳癌の進行を遅れさせることを示すグラフである。コントロール及び抗 S1PmAb で処理した動物からの同所腫瘍の容積を示す。差込は、最終腫瘍容積を表す (* $p < 0.01$)。

【図 4】図 4 は、抗 S1PmAb が MDA-MB-468 乳癌の進行を遅らせることを示すグラフである。コントロール及び抗 S1PmAb で処理した動物からの同所腫瘍の容積を

10

20

30

40

50

示す。差込は、最終腫瘍容積を表す ($*p < 0.01$)。

【図5】図5は、S1P及び他の成長因子が、インビボにおいて移植されたマトリゲルプラグの微小血管新生を刺激し、効果が抗S1PmAbにより強く阻害され得ることを示唆するデータを示す。パネルA：血管新生の指標としての、10日後のマトリゲルプラグからの相対的蛍光の定量化。パネルB：細胞浸潤を決定するための、マトリゲルプラグ低温切開片のH&E染色。値は、コントロールと比べた増加の倍数として表す。パネルC：イソレクチン-FITCで染色したマトリゲルプラグの低温切開片は、hGFを含むプラグの微小血管新生及び25mg/kgの抗S1PmAbで処理したマウスからのhGFを含むプラグ中の血管の減少を実証する。有意性を決定するために、T-検定を用いた。コントロール対hGF又はS1Pに関しては $*p < 0.01$ ；hGF又はS1P対S1P又はS1P+mAbに関しては $**p < 0.01$ 。

10

【図6】図6は、マウスにおける特定の抗S1PmAbの半減期が26時間であることを証明する2つのグラフ、A及びBを示す。パネルA。マウスを、25mg/kgの抗S1PmAbのボラス投与で処理した。指定された時点での血清中のmAbの濃度を、競合的ELISAを用いて測定した。2つの区画の計算を用いて、抗体の半減期を26時間であると決定した。この実験は、各時点での複製マウスを用いて、3回繰り返した。パネルB。8日間3日ごとに投与した、10mg/kgの抗S1PmAbの投与の刺激。

【図7】図7は、抗S1PmAbが特異的でS1Pに対して感受性が高く、構造的に類似の生体活性脂質を認識しないことを実証する2つのグラフ、A及びBを示す。パネルAは、プレート上でS1Pに結合したmAbに対して競合するS1P、SHP、LPA又はSPCを用いた競合的ELISAの結果を示す。遊離S1Pのみが結合に関して競合することができ、これは抗S1PmAbの特異性を実証する。パネルBは、抗S1PmAbの感受性を実証する競合的ELISAの結果を示す。抗S1PmAbは、5nMのS1Pの違いを検出することができる。

20

【図8】図8は、処置計画に対して腫瘍容積の増加をプロットした3つの棒グラフを示す。これらのデータは、S1Pが化学療法剤の存在下での死から多くの腫瘍細胞を特異的に保護するが、この保護効果がこれらの実験で用いられる抗S1PmAbにより無効にされ得ることを示す。細胞を、500nMのパクリタキセル(Tax)又は1μMのドキソルビシン(Dox)及び+/−100nMのS1P及び抗S1PmAb(1μg/mL)で48時間処理した。細胞死は、活性化カスパーゼ3の検出により試験した。全てのデータは、少なくとも3つの独立の実験の平均±SEMである。 $p < 0.01$ 、NT対Doxに関しては $*$ 、Dox対Dox+mAbに関しては $**$ 、Dox対Dox+S1Pに関しては $*$ 、Dox+S1P対Dox+S1P+mAbに関しては $****$ 。

30

【図9】図9は、OVCA R3細胞からのIL-6のS1P誘導発現が、抗S1PmAb(0~10μg/mL)及び+/−10μMのS1Pにより軽減されることを示すヒストグラムを示す。S1Pは、IL-6の放出を誘導し、そのmAbにより無効にされる。

【図10】図10は、S1Pが腫瘍細胞増殖を刺激することを実証するデータを示し、この活性は抗S1Pモノクローナル抗体により抑えられ得る。細胞を、100nMのS1P及び1μg/mLの抗S1PmAbの存在下又は不在下でインキュベートした。このグラフは、48時間後の3[H]-チミジンの組み込みにより決定される、増加比率(コントロールを超えた)を示す。データセットは、3重で実施した3回の実験の平均±SEMである。ステューデントT-検定は、 $p < 0.001$ を示す。NT対S1Pに関しては $*$ 、S1P対S1P+mAbに関しては $**$ 。

40

【図11】図11は、S1Pがマトリゲルの腫瘍細胞浸潤を刺激するが、この活性は抗S1Pモノクローナル抗体により軽減され得ることを実証するデータを示す。細胞を、1μMのS1Pを用いて、また抗S1PmAb(1μg/mL)を用いて又は用いずに、マトリゲルチャンバー中で20~22時間処理した。マトリゲル膜に移動した細胞の数を、5つの領域でカウントした。データは、3つの独立した実験の平均±SEMである。グループ間のT-検定を用いた統計的有意性は、以下の通りである： $p < 0.01$ 、NT対S1Pに関しては $*$ 、S1P対S1P+mAbに関しては◆。

50

【図12】図12は、S1PがHUV EC管形成の誘導、移動、及び死からの保護により新血管新生を促進することを実証するデータを示し、この活性は抗S1PmAbにより減少され得る。パネルA：マトリゲル上に播かれ、管形成を評価するために6時間インキュベートしたHUV ECの代表的な顕微鏡写真。パネルB：HUV ECを、マトリゲル浸潤チャンパー中において、6時間1 μ MのS1P+/-抗S1PmAb (1 μ g/ml)で処理した。マトリゲル膜に移動した細胞の数を、5つの領域においてカウントした。パネルC及びD：HUV ECを、50 nMのパクリタキセル (Tax) 又は1 μ Mのドキソルビシン (Dox) 及び+/-S1P (1 μ M) 及び抗S1PmAb (1 μ g/mL)を用いて、24時間処理した。細胞死を、活性化カスパーゼ3の検出により試験した。全てのデータセットは、3重で実施した3つの独立の実験の平均 $\pm$ SEMである。パネルB~D 10
に関しては、T-検定を用いた有意性は少なくとも $p < 0.01$ であった。NT対S1P又はDox/Tax対Dox/Tax+S1Pに関しては*、S1P対S1P+mAb又はDox/Tax+S1P対Dox/Tax+S1P+mAbに関しては◆。

【図13】図13は、抗S1PmAbが腫瘍血管新生を顕著に減少することを示す。マウスメラノーマ (B16-F10) 腫瘍を、C57BL/J6マウスで同所的に定着させた。時間経過における平均腫瘍容積 (A) と最終的な腫瘍容積 (B) を示す。処理は、抗S1PmAb (n=8)、非特異的mAb (n=7)、又は生理食塩水 (n=6) からなる。データは、平均 $\pm$ SEMである。統計的有意性を、ANOVAにより決定した。パネルBは、切除した腫瘍のイソレクチン-B5染色に基づいた腫瘍血管新生の定量化を示す。 20

【図14】図14は、抗S1PmAb単独 (25 mg/kg 腹腔内 一日おき) 又は20 mg/kgのタキソール (プラキシタキセル (plaxitaxel)) のボラス投与との組み合わせで処理したMDA MB 231細胞に関するデータを図示する。

【図15】図15は、ヒト卵巣SLOV3腫瘍に関する実験からのデータを提供する。腫瘍は、抗S1PmAbを用いた処理により減少した。パネルA：コントロール及び抗体で処理したマウスの最終腫瘍重量。データは、5つの未処理コントロール及び5つのmAb処理マウスの平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.01$ 。パネルB~C。代表的なコントロール (B) 及びmAbで処理したマウス (C) の腹腔のMRIイメージも提供する。コントロールマウスのイメージは、大きな腫瘍及び腹水を明らかにした。このmAbで処理したマウスは、腫瘍がなく、腹水も欠いていた。5つのmAbで処理したマウスのうち3つにおいて、そのようであった。 30

【図16】図16は、抗S1PmAb (スフィンゴマブ (sphingomab)) 又はアイソタイプ適合マウスIgG₁カッパマウス抗体のいずれかを硝子体内注入した後に、レーザーで焼くことにより誘導したCNV損傷の容積を示す。

【図17】図17は、線維芽細胞増殖のS1Pにより介在された刺激を示す。原発性マウス心臓線維芽細胞を、5 μ MのS1Pで24時間処理した。細胞の生存能力を、3H-チミジンの組み込みを用いて測定し、増殖を評価した。差込は、Rho及び細胞増殖における他のシグナル伝達要素及び線維芽細胞のS1Pへの移動応答の推定の役割を示す。

【図18】図18は、S1Pが心臓線維芽細胞における移動を増大させ、その効果は抗S1P抗体により無効にされ得ることを示す。500 nMは、最も良好な移動応答を導き、2倍超の移動の増大をもたらす。*** $p < 0.01$ 。 40

【図19】図19は、S1Pが単離した線維芽細胞においてコラーゲンの発現を誘導することを示す。最上部のパネルは、コラーゲンプロモーターにより駆動するGFP発現の代表的な写真である。グラフは、3つの別々の実験から定量した蛍光 (FU=平均蛍光単位/mgタンパク質) をプロットする。

【図20】図20は、抗S1PmAbが、永続的梗塞を所与し、2週間後に屠殺したマウスの心臓における線維化を減少させ得ることをグラフにより示す。

【図21】図21は、永続的な心筋梗塞を受け、賦形剤コントロール (レッドライン) 又は25 mg/kgのいずれかを用いて、3日おきに、腹腔内に処理したマウスのカプラン・マイヤープロットを示す。 50

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 43/00 1 7 1

(72)発明者 カバリ, アミー エル.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 1 7, サンディエゴ, ノガタック アベニュー 3 0 1 1
(72)発明者 ガーランド, ウィリアム
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 6 7 2, サンクレメンテ, ビア コリブリ 3 1 0

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特表2002-519329 (JP, A)
特開平09-176083 (JP, A)
特表2003-532423 (JP, A)
Nat Rev Cancer, 2004年 8月, 4(8), p.604-16.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 39/395
A61P 27/02
A61P 35/00
A61P 43/00
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)