

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5739089号

(P5739089)

(45) 発行日 平成27年6月24日 (2015. 6. 24)

(24) 登録日 平成27年5月1日 (2015. 5. 1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 Z N A N
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5

請求項の数 4 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2008-538001 (P2008-538001)	(73) 特許権者	508129218
(86) (22) 出願日	平成18年10月27日 (2006. 10. 27)		エルパス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2009-513668 (P2009-513668A)		L p a t h, I n c.
(43) 公表日	平成21年4月2日 (2009. 4. 2)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 - 1 4 0 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/042027		カリフォルニア州 サンディエゴ、ソレン
(87) 国際公開番号	W02007/053447		ト バレー ブルーバード、4 0 2 5 番
(87) 国際公開日	平成19年5月10日 (2007. 5. 10)	(74) 代理人	100109634
審査請求日	平成21年10月27日 (2009. 10. 27)		弁理士 舩谷 威志
(31) 優先権主張番号	11/261, 935	(74) 代理人	100129263
(32) 優先日	平成17年10月28日 (2005. 10. 28)		弁理士 中尾 洋之
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロジャー・エイ・サバディニ
前置審査			アメリカ合衆国 9 2 0 4 0 カリフォルニア
			州レイクサイド、デル・ソル・ロード 1 2
			5 0 9 番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維症、炎症性および新血管形成症状の処置および予防のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物の眼の線維症または瘢痕化を低下または予防するための、抗スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) モノクローナル抗体またはS1Pに結合可能なそのフラグメントを含む医薬組成物であって、ここで該モノクローナル抗体またはそのフラグメントは該S1Pの有効濃度を低下させることができる、医薬組成物。

【請求項 2】

動物の眼の線維症または瘢痕化を低下または予防するための、抗スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) モノクローナル抗体またはS1Pに結合可能なそのフラグメントを含む医薬組成物であって、ここで該モノクローナル抗体またはそのフラグメントは該S1Pの有効濃度を低下させることができ、

前記モノクローナル抗体またはそのフラグメントの各軽鎖は、相補性決定領域を有しており、当該相補性決定領域のアミノ酸配列は、ITTTDIDDDMN [配列番号 1]、EGNILRP [配列番号 2]、およびLQSDNLPFT [配列番号 3]からなり、

前記モノクローナル抗体またはそのフラグメントの各重鎖は、相補性決定領域を有しており、当該相補性決定領域のアミノ酸配列は、DHTIH [配列番号 4]、GGFYGSTIWFDF [配列番号 5]、およびAISPRHDITKYNEMFRG [配列番号 6]からなる、医薬組成物。

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、ヒト化モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項1又は2記載の医薬組成物。

10

20

【請求項4】

動物がヒトである、請求項1-3いずれか一項記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、下記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：米国仮特許出願番号XX/XXX,XXX [代理人書類番号LPT-3010-PV、標題「スフィンゴシン-1-リン酸塩を結合するための組成物および方法」、およびU.S仮特許出願番号XX/XXX,XXX [代理人書類番号 LPT-3020-PV、標題「眼球疾患の処置におけるスフィンゴシン-1-リン酸塩に対するヒト化抗体」、本出願と同時に提出した両出願；この出願の一部継続出願である2006年8月12日に提出した米国仮特許出願番号XX/XXX,XXX [代理人書類番号 LPT-3100-PV2]および2005年10月28日に提出した米国特許出願番号11/261,935。

10

【0002】

技術分野

本発明は、シグナル伝達分子としてヒトおよび／または動物疾患において役割を果たす生物活性脂質分子に反応性の免疫誘導成分を用いる眼球疾患のための処置方法に関する。本発明にしたがって検討されるシグナル伝達性生物活性脂質のある特定のグループはリゾリピドである。特に好ましいシグナル伝達性のリゾリピドは、スフィンゴシン-1-リン酸塩(S1P)および様々なリゾホスファチジン酸(LPA)である。シグナル伝達性のリゾリピドに対する抗体、およびその派生物および変形物は、他の治療薬および／または処置と単独でまたは組合せて、かかる抗体を含有する医薬組成物の送達により、眼球疾患または障害の処置および／または予防において使用され得る。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景I. はじめに

以下の記載には、本発明を理解する際に有用となり得る情報が包含される。あらゆるかかる情報が、本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かまたは特に本発明との関連であるという承認ではない。

30

【0004】

II. 従来技術

本発明は、異常な新血管形成、血管形成、異常な繊維成長、線維症および瘢痕化、炎症および免疫応答を低下または減退させる方法に関する。これらのプロセスは、個々にまたは同時に、多くの疾患および症状に関わる。これらの疾患または症状は、全身性であるか、または比較的局所的、例えば皮膚または眼であり得る。

【0005】

A. 眼球疾患および症状

40

病理学的または異常な血管形成/新血管形成、異常な再形成、線維症および瘢痕化および炎症は、網膜および眼球の虚血性疾患、例えば加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性網膜症(DR)との関連において、また未熟児網膜症(ROP) および他の発育障害に関連する網膜症において[Eichler et al. (2006)、Curr Pharm Des、vol 12: 2645-60]、さらに感染の結果および眼に対する機械的損傷[Ciulla et al. (2001)、Curr Opin Ophthalmol、vol 12: 442-9 および Dart et al (2003)、Eye、vol 17: 886-92]においてもおこる。

【0006】

病理学的な眼球血管形成は、多様な病態において盲目を引き起こす主な病因である。脈絡膜新血管形成(CNV)は、多くの眼球疾患においておこり、最も多いものは、AMDの滲出型または「ウェット」型である。高齢者が増えてきた結果として、AMDは、今日欧州では60

50

歳以上の患者における盲目を引き起こす有力かつ主な原因である。失明の蔓延はAMDにより起こるが、大部分は抗VEGFを基にした治療法であるが、ほんのいくつかの治療法しか、AMDの進行を遅延させること、さらに少数の者について失明を回復させることができない[Bylisma および Guymer (2005)、Clin Exp Optom, vol 88: 322-34、Gryziewicz (2005)、Adv Drug Deliv Rev, vol 57: 2092-8 および Liu and Regillo (2004)、Curr Opin Ophthalmol, vol 15: 221-6.]。それ故に、病理学的新血管形成についての新規処置を発見することは、非常に重要である。

【0007】

AMDは、異常な血管形成/新血管形成、異常な再形成、線維症および瘢痕化、および炎症に関係する眼球の症状を説明するのに解説目的でのみ使用され、その症状は、本明細書において開示および記載されたように他の眼球疾患および障害においても見出される。AMDは、年齢と関連した病理学的変化を包含する[Tezel, Bora and Kaplan (2004)、Trends Mol Med, vol 10: 417-20 および Zarbin (2004)、Arch Ophthalmol, 122: 598-614]。多数の理論が存在するが、AMDの正確な病因および発症はいまだ十分に理解されていない。加齢は、酸化損傷の蓄積、Bruch膜の増粘化およびドルーゼ形成と関係がある。酸化ストレスは、網膜色素上皮(RPE)細胞およびいくつかの症例においては脈絡毛細管枝に損傷をもたらす[Zarbin (2004)、Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614 および Gorin et al. (1999)、Mol Vis, vol 5: 29]。RPEへの損傷は、Bruch膜および脈絡膜内に慢性的な炎症性応答を誘起する傾向がある[Johnson et al. (2000)、Exp Eye Res, vol 70: 441-9]。この損傷および炎症は、CNVおよび萎縮を刺激することによって網膜損傷を助長させ、進行させる[Zarbin (2004)、Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614 および Witmer et al. (2003)、Prog Retin Eye Res, vol 22: 1-29]。CNVにより、創傷として認識されるような欠損および漏出血管(BV)となる[Kent and Sheridan (2003)、Mol Vis, vol 9: 747-55]。創傷治癒は、脈絡膜からおこり、Bruch膜およびRPEを通して網膜下空間に広がる。創傷治癒応答は、典型的な初期炎症応答、著しい血管新生応答および組織形成、その後の関係するエレメントの最終段階の成熟を特徴とする。創傷再構築は、光受容体とそのそばのRPEを不可逆的に傷つけることになり、これにより抗血管新生治療以上のものによりCNVを処置する必要性を正当化できる[La Cour, Kiilgaard and Nissen (2002)、Agin, vol 19: 101-3312]。

【0008】

CNV関連線維症、浮腫および炎症の結果としての正常な網膜および網膜下構造における変化は、個々にまたは累積的にAMD関連視力障害をもたらす[Tezel and Kaplan (2004)、Trends Mol Med, vol 10: 417-20 および Ambati et al. (2003)、Surv Ophthalmol, vol 48: 257-93]。滲出性AMDと関連のある多発性細胞とサイトカインとの相互作用は、有効な処置についての探索を非常に複雑にする。CNVおよび浮腫は、抗VEGF治療法により部分的には管理できるが、瘢痕形成および炎症を緩和し得る潜在的な処置について十分には解決されていない[Bylisma and Guymer (2005)、Clin Exp Optom, vol 88: 322-34 および Paulleikhoff (2005)、Retina, vol 25: 1065-84]。血管新生複合体がそのままである限り、抗VEGF剤により処置された患者における症例に見られるように、網膜下線維症および将来的な失明についての可能性が残る。

【0009】

抗VEGF-A治療は、滲出性AMDの処置において近年顕著な進歩を示す。しかしながら、VEGF-Aの165 アイソフォームを選択的に阻害する高親和性アプタマーであるPEGAPTANIBを用いるフェーズIIIのVISION治験では、平均的な患者は、視力を失い続け、非常に少ない割合の患者のみが視力を得たことを示している[Gragoudas et al. (2004)、N Engl J Med, vol 351: 2805-16]。抗体フラグメントRANIBIZUMABによるVEGF-A (pan-VEGF 阻害)の全てのアイソフォームの阻害によって、より優れた結果を得た[Brown et al. N Eng Med, 2006 355:1432-44、Rosenfeld et al. N Eng J Med 2006355:1419-31]。2年間のMARINA治験および1年間のANCHOR治験から、およそ40%の患者がある程度の視力回復を達成したことが示された。これらの結果は、滲出性AMDを処置するための主な進歩を提示するものであるが

、60%の患者は視力改善を示さないことも示した。さらに、これらの患者は、厳格に定義された組み入れ基準および除外基準を満たさなければならなかった。より大きな患者集団においての結果は、確実性が低いものであるかもしれない。

【0010】

CNVの進行における他のステップを標的とするさらなる治療薬および光受容体破壊を最終的にもたらすプロセスを開発するためには、依然として十分的確な必要性がある。第一に、脈絡膜のBVの成長は、全てのプロセスを調節するかまたは阻害する機会を提供するVEGFだけではない多くのメディエーター間での組織的な相互作用に関わる[Gragoudas et al. (2004)、N Engl J Med、vol 351: 2805-16]。第二に、滲出性AMDは血管および血管外成分を含む。血管成分は血管内皮細胞(EC)、EC前駆体および周皮細胞を含む。容量的に最大成分であるような血管外成分は、炎症性のグリアおよび網膜の色素上皮組織(RPE)細胞および線維芽細胞を含む。組織損傷は、いずれかの成分から生じ得る。病理学的過程のこれらの他の態様は、現在の抗VEGF処置では解決されない。AMDに関連した血管新生のカスケードの標的化のさらなる要素は、治療に対するより有効な方法および相乗的な方法を提供できる[Spaide RF (2006)、Am J Ophthalmol、vol 141: 149-156]。

【0011】

1. 眼球疾患における炎症

炎症、特にマクロファージおよび補体系[Klein et al. (2005)、Science、vol 308: 385-9 および Hageman et al. (2005)、Proc Natl Acad Sci U S A、vol 102: 7227-32]が滲出性AMDの発病において重要な役割を担うという証拠が増えている。外科的に切り出した脈絡膜新生血管膜の組織病理は、マクロファージが殆ど例外なく存在するということを示す[Grossniklaus et al. (1994)、Ophthalmology、vol 101: 1099-111 および Grossniklaus et al. (2002)、Mol Vis、vol 8: 119-26]。マクロファージは、細胞にダメージを与え、Bruchs膜を分解し得る酵素の分泌を含むだけでなく、さらに血管新生誘発性サイトカインを放出し得る酵素の分泌を含む複数の効果によって[Otani et al. (1999)、Ophthalmol Vis Sci、vol 40: 1912-20 および Amin、Puklin および Frank (1994)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 35: 3178-88]、CNVの形成および伝播を媒介する際の能動的な役割を果たし得るという証拠が増大している[Grossniklaus et al. (2003)、Mol Vis、vol 8: 119-26; Espinosa-Heidmann et al. (2003)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 44: 3586-92; Oh et al. (1999)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 40: 1891-8; Cousins et al. (2004)、Arch Ophthalmol、vol 122: 10138; Forrester (2003)、Nat Med、vol 9: 1350-1 および Tsutsumi et al. (2003)、J Leukoc Biol、vol 74: 25-32]。損傷部位で、マクロファージは活性化に関する脱顆粒などの微細形態学的症候を示す[Oh et al. (1999)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 40: 1891-8 および Trautmann et al. (2000)、J Pathol、vol 190: 100-6]。即ち、マクロファージ浸潤を脈絡膜血管新生複合体中に制限した分子は、CNV形成を制限するのを助け得ると信じられている。

【0012】

2. 眼球疾患における脈絡膜新血管形成および血管成熟

血管形成は、炎症性細胞に酸素および栄養素を送達し、崩壊物の除去を手助けするため、通常の創傷治癒の重要な構成要素である[Lingen (2001)、Arch Pathol Lab Med、vol 125: 67-71]。進行性の血管形成は、2つの異なるプロセスを含む: ステージI: 増殖し、管腔構造を形成する毛細血管の先端への近くの刺激への応答に対する血管ECの遊走; およびステージII: 血管ネットワークの剪定および血管系の最適化[Guo et al. (2003)、Am J Pathol、vol 162: 1083-93]。

【0013】

ステージI: 新血管形成。血管形成は殆どの場合創傷治癒を促進させる。しかしながら、制御されていない場合に新生血管は、一般的に不完全であって、漏出、大量出血および炎症を助長する。機能不全BVおよび漏出性BVを低下させることは、血管新生誘発性GFを標的化することによって、AMDの進行をある程度遅延できることを示している[Pauleikhoff (2005)、Retina、vol 25: 1065-84.14 および van Wijngaarden、Coster and Williams

(2005)、JAMA、vol 2931509-13]。

【0014】

ステージII：血管成熟および薬剤脱感作。Pan-VEGF 阻害は、実際のCNV病変が著しく複雑にならないように、網膜内および網膜下の浮腫の分解をもたらす抗透過性作用を介して有益な効果を主に発揮することが判っている[Presentation. at Angiogenesis 2006 Meeting. 2006. Bascom Palmer Eye Institute Miami, Florida]。著しいCNV退縮がないのは、部分的には周皮細胞被覆を理由とする新規に形成した血管の成熟の結果かもしれない。周皮細胞は、血管組織の発達と維持において重要な役割を担う。周皮細胞の存在は、抗VEGF剤に対する耐性を付与し、血管形成を阻害する能力を解決すると考えられている[Bergers および Song (2005)、Neuro-oncol、vol 7: 452-64; Yamagishi and Imaizumi (2005)、Int J Tissue React、vol 27: 125-35; Armulik、Abramsson and Betsholtz (2005)、Circ Res、vol 97: 512-23; Ishibashi et al. (1995)、Arch Ophthalmol、vol 113227-31]。周皮細胞動員に対する阻害効果を有する薬剤は、血管チャンネルアセンブリおよび脈絡膜の血管新生チャンネルの成熟を妨害し、それにより抗血管新生薬剤に対してその感受性を保持する。

10

【0015】

血管ネットワークの再構築は、栄養要求を満たすためのBV密度の調整を包含する[Gariano および Gardner (2005)、Nature、438: 960-6]。BV未成熟期間は、新規血管は機能するが周皮細胞被覆をまだ獲得していない期間に相当する[Benjamin、Hemo and Keshet (1998)、Development、125: 1591-8 および Gerhardt and Betsholtz (2003)、Cell Tissue Res、2003. 314: 15-23]。この遅延は、網膜または脈絡膜の栄養要求性による発達中の血管系を良好に微調整するための柔軟性の窓を提供する場合に重要である。

20

【0016】

生物活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸塩(S1P)、VEGF、PDGF、アンジオポイエチン(Ang)および他の増殖因子(GF)は、血管増殖を増大させ、新生血管の再構築を促進させるために平滑筋細胞(SMC)および周皮細胞を元々の血管に動員する[Allende および Proia (2002)、Biochim Biophys Acta、vol 582: 222-7; Gariano and Gardner (2005)、Nature、vol 438: 960-6; Grosskreutz et al. (1999)、Microvasc Res、vol 58: 128-36; Nishishita、および Lin (2004)、J Cell Biochem、vol 91: 584-93 および Erber et al. (2004)、FASEB J、vol 18: 338-40.32]。周皮細胞は、EC発芽時期にイン・シチュの間葉細胞前駆体の分化または動脈平滑筋細胞の遊走および脱分化から生じることが多いが、ECと密接に関連し、結集して、血管全体の成熟および生存をもたらす[Benjamin、Hemo および Keshet (1998)、Development、vol 125: 1591-8]。最近の研究では、S1PおよびS1P1レセプターが、細胞-細胞間の接着分子N-カドヘリンのトラフィックおよび活性化に関与することが示されている[Paik et al. (2004)、Genes Dev、vol 18: 2392-403]。N-カドヘリンは、安定な血管ベッドの発達を促進するEC、周皮細胞および壁細胞の間の相互作用に重要である[Gerhardt and Betsholtz (2003)、Cell Tissue、vol 314: 15-23]。S1P1遺伝子の広範囲の欠失により、胚発生時期のBV安定化に必要な発生期BVの異常な壁細胞の結集をもたらす[Allende and Proia (2002)、Biochim Biophys Acta、vol 1582: 222-7]。S1P1へのsiRNAの局所注射は、腫瘍の異種移植モデルにおいて血管安定化を抑制する[Chae et al. (2004)、J Clin Invest、vol 114: 1082-9]。トランスジェニックマウス試験から、VEGFおよびPDGF-Bが、新規BVの成熟および安定化を促進することが示された[Guo et al. (2003)、Am J Pathol、162: 1083-93 および Gariano and Gardner (2005)、Nature、vol 438: 960-6.50]。VEGFはAng-1(mRNAおよびタンパク質)を上方向調節する[Asahara et al. (1998)、Circ Res、vol 83233-40]。Ang-1は、周皮細胞を支える内皮周辺を回復および維持する際に主な役割を担う[Asahara et al. (1998)、Circ Res、vol 83233-40]。VEGFの眼球内注射は、EC網状組織の周皮細胞被覆範囲を促進した[Benjamin、Hemo and Keshet (1998)、Development、vol 125: 1591-8]。PDGF-B欠損マウスの胚は、微細血管周皮細胞を欠失しており、それが浮腫、微細動脈瘤および致命的な出血をもたらす[Lindahl et al. (1997)、Science、vol 277: 242-5]。マウス胎児の研究では、追加シグナルが血管ベッド

30

40

50

成熟の完全なVEGF-およびPDGF-刺激に必要とされることが示された。上記したS1Pのトランス-活性化を基にすると、このファクターはS1Pである可能性が考えられた[Erber et al. (2004)、FASEB J、vol 18: 338-40]。血管安定化および成熟は、柔軟性の損失およびVEGFに対する退行の欠如および他のGF離脱および抗血管新生療法に対する耐性と関連がある[Erber et al. (2004)、FASEB J、vol 18: 338-40 および Hughes. and Chan-Ling (2004)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 45: 2795-806]。血管新生阻害剤に対するBVの耐性は、まず成熟した血管を安定化させる周皮細胞、そして治療の際に未熟な血管に動員される周皮細胞により付与される[Erber et al. (2004)、FASEB J、vol 18: 338-40]。未熟なECが結集した後、該周皮細胞は、ECをプロアポトーシス薬剤から保護する代償的生存因子(Ang-1 および PDGF-B)を発現する。

10

【0017】

3. 浮腫および血管透過性

CNV膜は、その血管内内容物を周辺空間に漏出し、その結果網膜下出血、滲出物および体液蓄積をもたらす傾向のある有窓血管ECからなる[Gerhardt and Betsholtz (2003)、Cell Tissue、vol 14: 15-23]。長い間CNV組織それ自身が、また最近では網膜内新血管形成が、AMDに関連した視力低下に関与していると示唆されてきた。しかしながら、現在では血管透過性(VP)の増加により引き起こされる斑点浮腫およびその後の血液網膜関門(BRB)崩壊が、AMDに関連した失明および他の眼球疾患において重要な役割を担うと考えられている[Hughes and Chan-Ling (2004)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 45: 2795-806; Felinski and Antonetti (2005)、Curr Eye Res、vol 30: 949-57; Joussem et al. (2003)、FASEB J、vol 17: 76-8 および Strom et al. (2005)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 46: 3855-8]。

20

【0018】

4. 線維症、繊維成長および瘢痕形成

網膜下の線維症の形成により、光受容体への不可逆的な損傷および永久的な視力障害をもたらされる。血管新生複合体がそのままである限り、抗VEGF剤により処置された患者の症例に見られるように、網膜下線維症および将来的な失明についての可能性が残る。RANIBIZUMABのPRONTO試験の最新情報から、視力を失った患者は、網膜下線維症またはRPE裂傷のいずれかの結果として起きたということが発見された[Presentation. at Angiogenesis 2006 Meeting. 2006. Bascom Palmer Eye Institute Miami, Florida.]。線維芽細胞浸潤およびコラーゲン沈着の程度を減少できる薬剤は重要な価値があろう。

30

【0019】

線維芽細胞、特に筋線維芽細胞は、細胞損傷および炎症に対する瘢痕形成における応答の際の重要な細胞性要素である[Tomasek et al. (2002)、Nat Rev Mol Cell Biol、vol 3: 349-63 および Virag and Murry (2003)、Am J Pathol、vol 163: 2433-40]。筋線維芽細胞によるコラーゲン遺伝子発現は、再構築の顕著な特徴であり、また瘢痕形成に必要である[Sun and Weber (2000)、Cardiovasc Res、vol 46: 250-6 および Sun and Weber (1996)、J Mol Cell Cardiol、vol 28: 851-8]。S1Pは、線維芽細胞の遊走および増殖を活性し、一方でコラーゲン産生を増加させることによって創傷治癒を促進させる[Sun et al. (1994)、J Biol Chem、vol 269: 16512-7]。損傷細胞によって局所的に産生されたS1Pは、再構築および瘢痕形成と関連した不適応な創傷治癒に関与する可能性があった。即ち、S1P阻害剤は、少なくとも部分的に、異常な繊維成長または線維症を特徴とする疾患または症状において有用であると考えられる。本明細書において、「繊維成長」とは、線維芽細胞の過剰な活性または数として定義され、「線維症」とは、過剰または不適切なコラーゲン産生および瘢痕化、網膜剥離のようなかかる病変をもたらす生理学的組織構造の破壊および/またはマトリックスの不適当な退縮、または臓器機能不全を導くその他のプロセスをもたらす線維芽細胞の過剰な活性または数として定義される。

40

【0020】

B. 他の疾患または症状

生物活性脂質シグナル伝達脂質、例えば、S1PおよびLPAの役割は、眼球疾患および症状

50

に限定されない。新血管形成、血管形成、異常な繊維成長、線維症および瘢痕化、ならびに炎症および免疫応答を包含する多くのプロセスにおいて生体脂質シグナル伝達が関与するため、これらの生物活性脂質の抗体を基にした阻害剤は、1以上のこれらのプロセスと関連した多様な疾患および症状において有用であると信じられている。かかる疾患および症状は、全身(例えば、全身性強皮症)であるか、または1以上の特定の身体部分または臓器(例えば、皮膚、肺または眼)に局在し得る。

【0021】

C. 生物活性脂質シグナル伝達

脂質およびその誘導体は、細胞膜中のただ単なる構造要因あるいは β 酸化、解糖または他の代謝プロセスのためのエネルギー源としてではなく、現在医学研究についての重要な標的として認識されている。特に、シグナル伝達メディエーターとして特定の生物活性脂質の機能は、動物およびヒト疾患において重要である。原形質膜の大部分の脂質は専ら構造的役割を担うが、それらの少ない割合では細胞外の刺激を細胞中へ伝達することに関与する。「脂質シグナル伝達」とは、二次メッセンジャーとして細胞膜脂質を使用する様々な細胞性シグナル伝達経路に関わるあらゆるものを指し、また同様に脂質シグナル伝達分子がそれ自身の特異的レセプターと共に相互作用を導くことも指す。脂質シグナル伝達経路は、増殖因子から炎症性サイトカインにわたる多様な細胞外刺激因子によって活性化され、そして細胞の運命決定、例えばアポトーシス、分化および増殖を制御する。生物活性脂質シグナル伝達における研究は、より多くの生物活性脂質が同定され、その作用が特徴付けられるような極めて熱心な科学的な調査分野である。

【0022】

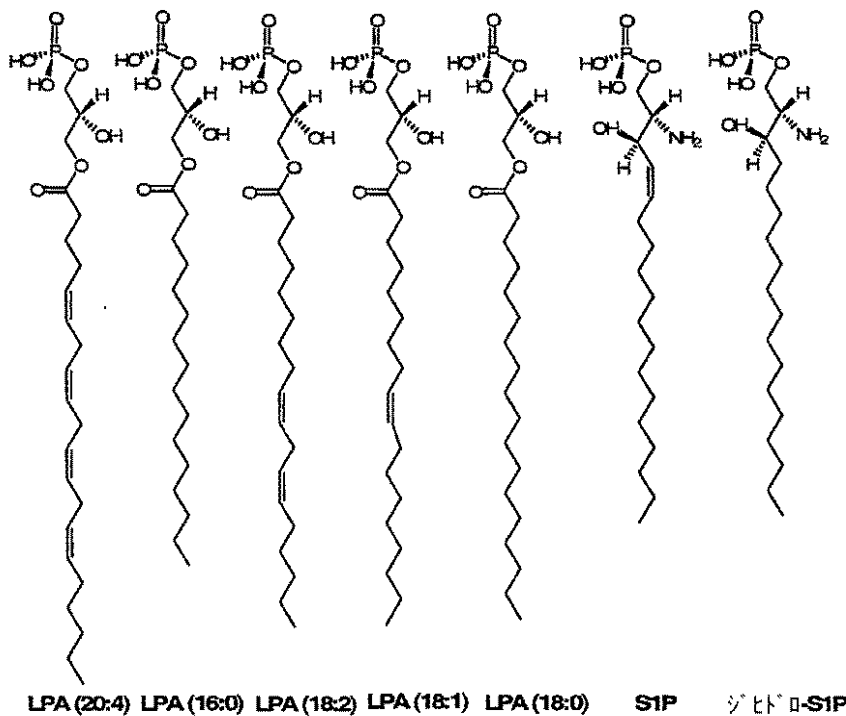
生物活性脂質の例示には、エイコサノイド(カンノビノイド、ロイコトリエン、プロスタグランジン、リポキシン、エポキシエイコサトリエン酸およびイソエイコサノイドを包含する)、非エイコサノイド、カンノビノイドメディエーター、リン脂質およびその誘導体[例えば、ホスファチジン酸(PA)およびホスファチジルグリセロール(PG)]、血小板活性化因子(PAF)およびカルジオリピン、さらにリゾリン脂質[例えば、リゾホスファチジルコリン(LPC)および多様なリゾホスファチジン酸(LPA)]が含まれる。生物活性シグナル伝達脂質メディエーターには、スフィンゴ脂質(例えば、スフィンゴミエリン、セラミド、セラミド-1-リン酸塩、スフィンゴシン、スフィンゴシルホスホリルコリン、スフィンガニン、スフィンガニン-1-リン酸塩(ジヒドロS1P)およびスフィンゴシン-1-リン酸塩も包含される。スフィンゴ脂質およびその誘導体とは、重要な細胞プロセスに対して多様な効果を有する細胞外および細胞内シグナル伝達分子の群を表す。生物活性脂質シグナル伝達のその他の例示には、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジイルイノシトール(PI)、ホスファチジルエタノールアミン(PEA)、ジアシルグリセリド(DG)、スルファチド、ガングリオシドおよびセレブロシドが包含される。

【0023】

D. リゾリピド

リゾリン脂質(LPL)は、リゾリピドとしても知られており、これは一本の炭化水素骨格およびリン酸塩基を含有する極性頭部基を含有する低分子量(通常、約500ダルトン未満)脂質である。いくつかのリゾリピドは、生物活性脂質シグナル伝達である。医学上重要な生物活性リゾリピドの2つの具体的な例は、LPA(グリセロールバックボーン)およびS1P(スフィンゴイド骨格)である。選択したLPA、S1P、およびジヒドロS1Pの構造を下記に示す。

【化 1】



【 0 0 2 4 】

LPAは、単分子構成要素ではなく、変化に富む長さおよび飽和度の脂肪酸を有する内生構造変形物の集合体である(Fujiwara et al (2005)、J Biol Chem、vol. 280: 35038-35050)。LPAの構造的骨格は、グリセロールを基にしたリン脂質、例えばホスファチジルコリン(PC)またはホスファチジン酸(PA)から得られる。リゾスフィンゴ脂質（例えばS1P）の場合には、セラミド骨格の脂肪酸は存在しない。S1P、ジヒドロS1P (DHS1P)およびスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)のバックボーン構造は、スフィンゴシンに基づいており、スフィンゴミエリンから得られる。

【 0 0 2 5 】

LPAおよびS1Pは、同じクラスの複数の膜貫通ドメインGタンパク質結合(GPCR)レセプターに結合することによって、多様な細胞性シグナル伝達経路を制御する(Chun J、Rosen H (2006)、Current Pharm Des、vol. 12: 161-171 および Moolenaar WH (1999)、Experimental cell Research、vol. 253230-238)。S1Pレセプターは、S1P₁、S1P₂、S1P₃、S1P₄およびS1P₅(以前はEDG-1、EDG-5/AGR16、EDG-3、EDG-6 およびEDG-8)として示され、LPAレセプターは、LPA₁、LPA₂、LPA₃(以前はEDG-2、EDG-4およびEDG-7)として示される。このファミリーのうち4つのLPAレセプターが、LPA(LPA₄)に対して同定されており、およびこれらのリゾリン脂質について他の推定レセプターもまた報告されている。

【 0 0 2 6 】

E. スフィンゴシン-1-リン酸塩

S1Pは、細胞増殖のメディエーターであって、生存経路の活性化を通じてアポトーシスから保護する(Maceyka et al. (2002)、BBA、vol 1585): 192-201 および Spiegel S. et al. (2003)、Nature、Reviews Molecular Cell Biology、vol 4: 397-407)。セラミド/スフィンゴシン(CER/SPH)レベルとS1Pとの間のバランスによって、細胞が死亡経路に向かうか、またはアポトーシスから保護されるかどうかを決定するレオスタット機構を提供するということが提案されてきた。レオスタット機構の重要な調節酵素は、死亡促進性の生物活性脂質シグナル伝達(CER/SPH)を増殖促進性S1Pに変更するのに働くスフィンゴシンキナーゼ(SPHK)である。S1Pには2通りの運命がある：S1Pは、S1Pリアーゼ、即ちS1Pをホスホエタノールアミンとヘキサデカノールを解裂させる酵素によって分解されるか、また

はあまり一般的ではないがS1PホスファターゼによってSPHに加水分解され得る。S1Pは、高レベルのSPHKを含有し、S1P分解のための酵素をもたない血小板中で非常に多く生成され、貯蔵される。血小板が活性化されるとS1Pが分泌される。さらに、その他の細胞タイプ、例えばマスト細胞はS1Pを分泌出来ると考えられる。分泌されると、S1Pは、担体タンパク質、例えば血清アルブミンおよびリポタンパク質上に高濃度で結合されると考えられる。S1Pは、報告された0.5-5uMの濃度範囲にて血漿中に高濃度で見出される。主に細胞外であるが、S1Pの細胞内作用もまた示唆されている(参照、例えば、Spiegel S、Kolesnick R (2002)、Leukemia、vol. 16: 1596-602; Suomalainen、et al (2005)、Am J Pathol、vol. 166: 77381)。

【0027】

細胞表面S1Pレセプターの広範な発現によって、S1Pは、増殖、付着、退縮、運動性、形態形成、分化および生存を包含する細胞性応答の異なる領域に影響できる。応答に関するこの領域は、細胞および組織系においてS1Pレセプターのオーバーラッピングまたは異なる発現パターンに依存するようである。さらに、S1Pと、血小板誘導性成長因子(PDGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、トランスフォーミング成長因子β(TGFβ)および塩基性線維芽細胞性成長因子(bFGF)を包含する成長因子シグナル伝達経路との間のクロストークが近年提示されてきた(参照、例えば、Baudhuin、et al (2004)、FASEB J、vol. 18: 341-3)。S1Pが関わる多様な細胞プロセスの制御は、ニューロンのシグナル伝達、血管トーン、創傷治癒、免疫性細胞トラフィッキング、再生、および特に心臓血管機能に対して特別な影響を示すため、これら系内でのS1Pの内生レベルの変化は、癌、心不全、眼球疾患および伝染性および自己免疫疾患を包含するいくつかの病態生理的症状をひき起こす有害な影響を持ち得る。我々は、AMDに関連したCNVを処理するための潜在的に有効な戦略は、生物学的に利用出来るS1Pの細胞外レベルを低下させることであると提案する。我々は、S1Pに特異的であるマウスモノクローナル抗体(SPHINGOMAB、抗体S1PmAb)を開発した。SPHINGOMABとは、生物活性シグナル伝達スフィンゴ脂質の標的に対して初めて成功裏に構築されたモノクローナル抗体を表す。SPHINGOMABは、細胞外液からS1Pを選択的に吸収する分子スポンジとして作用し、S1Pの有効濃度を下げる。SPHINGOMABは、生物学的マトリクス内でピコモルの親和性にてS1Pを選択的に結合して中和する。我々は、SPHINGOMABが、眼において線維芽細胞、周皮細胞および内皮、炎症性および免疫細胞から重要な成長因子および生存因子を枯渇させ、こうして光受容体および視力障害をもたらすAMDの複数の不適切なステップを標的とすることを提案した。脈絡膜の血管新生応答の複数成分を同時に標的とする治療法は、「単一標的」治療法よりもより強力な治療法であるという可能性を示す。

【0028】

本明細書で使用したように、「スフィンゴシン-1-リン酸塩」または「S1P」は、スフィンゴシン-1-リン酸塩 [スフィンゲネ-1-リン酸塩; D-エリスロ-スフィンゴシン-1-リン酸塩; スフィンゴ-4-エン-1-リン酸塩; (E,2S,3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-オクタデセ-4-エンオキシ] ホスホン酸; CAS 26993-30-6] およびその変形物、S1PおよびDHS1P(ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸塩 [スフィンガニン-1-リン酸塩; [(2S,3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-オクタデクオキシ] ホスホン酸; D-エリスロ-ジヒドロD-スフィンゴシン-1-リン酸塩; CAS 19794-97-9] およびスフィンゴシルホスホリルコリンを指す。S1PおよびLPAの「変形物」とは、本明細書で使用したとおり、親分子と類似して機能するか、または親分子と類似した機能と考えられるS1PおよびLPA各々のアナログおよび誘導体を包含する。

【0029】

証拠が増えるに従って、S1Pが滲出性AMDと関連のある不適切な網膜再構築の初期および後期ステージの両方に関与する可能性が示唆される。S1Pは、顕著な非VEGF依存性の血管新生誘導効果を有する。S1Pは、また、滲出性AMDの複数の不適切なプロセスに関わる、線維芽細胞、EC、周皮細胞および炎症性細胞を包含する複数の細胞タイプの遊走、増殖および生存を刺激する。S1Pは、滲出性AMDの発病原因と関わるVEGF、bFGF、PDGFおよび他の増殖因子(GF)の産生および活性化に関連がある。最終的に、S1Pは、本来の血管系の成熟、

10

20

30

40

50

即ち抗血管新生薬剤に対する感受性を消失させるプロセスを調節できる。S1Pの作用を阻害すれば、排他的な抗VEGF方法を超える有意な利点を提供し得るか、または視力障害と関連のあるAMDを最終的にもたらず複雑なプロセスおよび複数ステップを解決するためにそれらと相乗的に作用し得る滲出性AMDのための有効な治療処置となり得る。

【0030】

S1Pが炎症性事象の重要なメディエーターであるという証拠が増えている[Olivera and Rivera (2005)、J Immunol、. vol 174: 11538]。活性化された血小板、好中球、マクロファージおよびマスト細胞は、凝固および炎症事象後に、S1Pの豊富な起源として働く[Yatomi et al. (2000)、Blood、vol 96: 3431-8]。これらの細胞は炎症応答および組織損失の重要な成分であるため、S1Pは炎症性細胞機能の制御を介してこれらの事象を制御し得る[Tezel (2004)、Trends Mol Med、vol 10: 417-20]。マスト細胞から放出されたS1Pは、炎症に関する実験動物モデルにおける多くの応答に関与する[Jolly et al. (2004)、J Exp Med、.vol 199: 959-70 および Jolly et al. (2005)、Blood、vol 105: 4736-42]。S PHINGOMABを用いてS1Pを中和することにより、AMDと関連するCNVの眼球組織損傷を悪化させる有害な炎症性応答を制限する有効な新規手段を提供できる。

【0031】

証拠に関するいくつかの系列は、レセプターのS1PおよびS1Pの補体が血管新生の過程において主な調節的役割として機能できることを示唆する[Allende and Proia (2002)、Biochim Biophys Acta、. vol 1582: 222-7; Spiegel (1993)、J. lipid Med、.vol 8: 169-175 および Argraves et al. (2004)、J Biol Chem、vol 279: 50580-90]。第一に、S1Pは、初期BV形成に一致する多細胞構造の分化の誘導中に、血管新生の部位に対して、DNA合成および局所的な走化運動性および骨髄誘導性血管ECを刺激する[Lee et al. (1999)、Biochem Biophys Res Commun、vol 264: 743-325 および Annabi、et al (2003)、Exp Hematology、. vol 31: 640-649]。第二に、S1Pは、S1P₁およびS1P₃の両方を活性化することによって、血管ECのアセンブリおよび完全性およびS1P誘導性ECの粘着性接合アセンブリの形成および維持を刺激する[Paik et al. (2004)、Genes Dev、vol 18: 2392-403 および Lee et al. (1999)、Cell、vol 99: 301-12]。これらのS1Pレセプターに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、S1P誘導性血管ECアセンブリおよび細胞関門の完全性を減弱させる[English、et al. (1999)、J Hematother Stem Cell Res、vol 8: 627-34 および Lee et al. (2001)、Mol Cell、vol 8: 693704]。第三に、S1Pによって誘導された毛細管形成は、bFGFまたはVEGF以上により強力な血管新生誘導性刺激因子であることが示されてきた[Wang et al. (1999)、J. Biol. Chem.、vol 274: 35343-50 および Lee et al. (1999)、Biochem Biophys Res Commun、vol 264: 743-325]。最終的に、S1Pは、VEGF、EGF、PDGF、bFGFおよびIL-8との相乗効果を誘起し、インビボでの血管ネットワークの発達を促進する[Wang et al. (1999)、J Biol. Chem.、vol 274: 35343-50]。S1Pトランスは、EGFおよびVEGF2レセプターを活性化させ[Tanimoto、Jin and Berk (2002)、J Biol Chem、vol 277: 42997-3001]、VEGFはS1Pレセプターを上方調節する[Igarashi et al. (2003)、Proc Natl Acad Sci U S A、vol 100: 10664-9]ということが示されてきた。血管ECのVEGFによる処置は、S1P1発現の上方調節を顕著に誘導し、一酸化窒素合成酵素(eNOS)の内皮アイソフォームの活性化をもたらすS1P媒介シグナル伝達経路を増強する[Lee et al. (2001)、Mol Cell、vol 8: 693704 および Tanimoto、Jin and Berk (2002)、J Biol Chem、vol 277: 42997-3001 および Igarashi and Michel (2001)、J Biol Chem、vol 276: 36281-8]。eNOS活性は、アポトーシスの阻害、血小板凝集および血管形成の阻害を包含する様々な細胞性応答や重要な血管機能において、重要な役割を担う[Kwon et al. (2001)、J Biol Chem、vol 276: 10627-33; Huang (2003)、Curr Hypertens Rep、vol 5: 47380; Dantas、Igarashi Michel (2003)、Am J Physiol Heart Circ Physiol、vol 284: H2045-52; Rkitake et al. (2002)、Arterioscler Thromb Vasc Biol、vol 22: 08-114 および Kimura および Esumi (2003)、Acta Biochim Pol、vol 50: 49-59]。bFGFおよびS1P両方への暴露から生じる血管構造は、bFGF単独への暴露から生じた血管構造よりもさらに分化されており、S1PはbFGFおよびVEGFの完全な活性化に必要であり得ることを示唆する[Englis

h et al. (2000)、FASEB J、vol 14: 2255-65.]。

【0032】

従って、SPHINGOMABは、相乗的に血管新生誘導性GFを中和することによって異常なBV増殖およびCNVに関連した炎症性細胞からの代謝ストレスの中で過剰に産生された潜在的なS1Pを緩和できる。SPHINGOMABは、S1P誘導性のEC遊走/浸潤およびBV形成を阻害するだけでなく、S1Pに対するその効果によりbFGFおよびVEGF誘導性血管新生も中和する。SPHINGOMABは、S1Pを中和する能力により「単一標的」治療法を超える潜在的な利点を示しており、これはS1Pの多様な効果を介する複数のGFの中和をもたらす。

【0033】

SPHINGOMABによるS1Pの直接的な中和およびVEGFとPDGF-Bとの間接的な中和は、周皮細胞の動員、BV成熟を防止でき、抗血管新生薬剤に対する耐性の進行を遅延させ得た。周皮細胞の標的化により、抗血管新生薬剤に対する柔軟性を広げるかまたは増加するための取り組みにおいて、活性なCNV病変を示す患者を処置する際に魅力的な長期的アプローチが提示され、血管複合体の退縮を促進できた[Erber et al. (2004)、FASEB J、vol 18: 338-40]。

【0034】

S1Pは、皮質リングへのアクチンの組織化を助け、細胞内および細胞マトリックス付着の両方を強化する[McVerry and Garcia (2005)、Cell Signal、vol 17: 131-9 および McVerry and Garcia (2004)、J Cell Biochem、vol 92: 1075-85]。これらの構造変化は、血管透過性の低下と相関する[Hla (2004)、Semin Cell Dev Biol、vol 15: 513-20]。S1Pの機能を遮断することにより、腎臓、肺系および腫瘍における血管透過性を増加したことが示されてきた[LaMontagne et al. (2006)、Cancer Res、vol 66: 221-31; Sanchez et al. (2003)、J Biol Chem、vol 278: 47281-90 および Awad et al. (2006)、Am J Physiol Renal Physiol、vol 290: F1516-24]。しかしながら、様々な臓器系、例えば脳および眼におけるS1Pの透過性効果について知られていることはほとんどない。脳内、および同様に眼内の導管ECは、肺動脈ECよりも[Schnitzer et al. (1994)、Biochem Biophys Res Commun、vol 199: 11-19]、そして大部分の腎臓や腫瘍よりも体液や溶質物に対して、緊密で、透過性が低いバリアを形成する。示差バリア機能は、接着斑複合体の非常に大きな集団に起因する[Schnitzer et al. (1994)、Biochem Biophys Res Commun、vol 199: 11-19]。これらの差違から、眼球血管透過性におけるS1P誘導性変化は、影響が少ないかもしれない。

【0035】

VEGFおよびPDGFは、血液網膜関門(BRB)の完全性を解決できる:VEGFおよびPDGFのS1Pトランス-活性化を中和するSPHINGOMABの能力は、AMDに関連のある斑点浮腫を緩和する際の有効性を証明した[Sanchez et al. (2003)、J Biol Chem、vol 278: 47281-90; Saishin et al. (2003)、J Cell Physiol、vol 195: 241-8 および Viores et al. (2000)、Gen Pharmacol、vol 35: 233-9]。VEGFを過剰発現するトランスジェニックマウスは、AMDおよび糖尿病性網膜症に見られる症状と類似したCNVの領域でおこるBRB分解を示す[Viores et al. (2000)、Adv Exp Med Biol、vol 476: 129-38]。PDGFレセプターキナーゼの阻害剤は、BRBのプロスタグランジン誘導性分解を原因とする漏出を低下した[Lindahl et al. (1997)、Science、vol 277: 242-5]。最終的に、SPHINGOMABは、この出願の実施例において記載したようなマウスマトリゲルプラグモデルにおけるアッセイのとおり、インビボのbFGFおよびVEGFの影響を緩和する。

【0036】

S1Pおよび線維芽細胞増殖および細胞死からの保護：線維芽細胞は、DNA合成の増加によりS1P処置に応答する;スフィンゴシンキナーゼ1(sphK1)によりトランスフェクトされた線維芽細胞は、細胞増殖の増加を示す[Hammer et al. (2004)、J Cell Biochem、vol 91: 840-51]。いくつかの他の線維芽細胞タイプ(Swiss 3T3、肺および心臓)に対するS1Pの効果と同様に、S1Pは眼球線維芽細胞増殖(その後の分化)を刺激し得る。線維芽細胞は、S1Pの添加によってアポトーシスから直接的に保護され、そしてアポトーシスは、sphK1の阻害

10

20

30

40

50

剤によって増強される[Olivera et al. (1999)、J Cell Biol、vol 147: 545-58]。S1Pは、シトクロムCの放出およびその後のカスパーゼ活性化を阻止する[Olivera et al. (1999)、J Cell Biol、vol 147: 545-58 および Kang et al. (2004)、Cell Death Differ、vol 11: 1287-98]。sphK1は、Aktを上方調節し、これによってBcl-2 ファミリーメンバーを制御し[Limaye et al. (2005)、Blood、vol 105: 3169-77]、線維芽細胞をアポトーシスから守ることが確立される。

【0037】

S1Pおよび線維芽細胞遊走：S1Pは、Rhoを含むシグナル伝達系を活性化し、Rho/Rac/Cdc42系によって制御された収縮性アクチンフィラメントのアセンブリをもたらす、細胞遊走に対する実質的な効果をもたらす[Radeff-Huang et al. (2004)、J Cell Biochem、Vol 92: 949-66]。S1PによるRhoおよびRho GTPasesの活性化は、創傷への眼球線維芽細胞の遊走に

10

【0038】

S1Pおよび線維芽細胞コラーゲン発現：S1Pは、休止線維芽細胞の分化を促進し、瘢痕形成中に増強したコラーゲン発現を示す筋線維芽細胞を活性化させる[Urata et al. (2005)、Kobe J Med Sci、vol 51: 17-27]。瘢痕化区分への線維芽細胞の増殖および遊走と同時に、筋線維芽細胞は、オステオポンチンおよびフィブロネクチンを主に含む顆粒ネットワークに一時的に沈着する[Sun and Weber (2000)、Cardiovasc Res、vol 46: 250-6]。再構築が進行する場合に、一時的なマトリックスが吸着され、コラーゲンネットワークが確立した[Sun and Weber (2000)、Cardiovasc Res、vol 46: 250-6]。我々は、S1Pが筋線維芽細胞によりコラーゲン産生を促進することを示してきた。よく知られた繊維性メディエーターであるTGF β は、いくつかの繊維性誘導性タンパク質を上方調節し、線維芽細胞を筋線維芽細胞に変換し、S1Pの作用を介して潜在的な炎症性タンパク質発現を刺激することを示してきた[Squires et al. (2005)、J Mol Cell Cardiol、vol 39: 699-707 および Butt、Laurent and Bishop (1995)、Eur J Cell Biol、vol 68: 330-5]。筋線維芽細胞に対して線維芽細胞のTGF β 刺激性の分化に関係するシグナル伝達分子である、TIMP1の上方調節は、sphK1に対するsiRNAによって遮断される[Yamanaka et al J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):53994-4001]、これは、SPHINGOMABが、TGF β の繊維性誘導効果を緩和でき、さらにS1P自身の繊維形成効果を緩和できることを示唆している。S1Pの中和により不適切な痕形成を最小にすることは有効であり、また網膜下の線維症およびその後の光受容体損傷の程度を制限することによって、不可逆的な視力の損失を防ぎ得る。

20

30

【0039】

F. リゾホスファチジン酸(LPA)

LPAは、真核および原核細胞の両方においてリン脂質生合成の前駆体として昔から知られてきたが、LPAは、つい最近になって、活性化細胞、特に血小板によって迅速に産生および放出され、特異的細胞-表面レセプターに対して作用することにより標的細胞に影響を与えるシグナル伝達分子として明らかにされた(例えば、Moolenaar et al. (2004)、BioEssays、vol. 26: 870-881 および van Leewen et al. (2003)、Biochem Soc Trans、vol 31: 1209-1212)を参照されたい]。小胞体網状組織中でより複雑なリン脂質に合成およびプロセシングのほかに、LPAは、既に存在しているリン脂質の加水分解の後の細胞活性化によって生じ得る；例えば、sn-2 位置には、脱アシル化により脂肪酸残基は通常存在せず、sn-3 ヒドロキシルのみを脂肪酸へとエステル化した。さらに、LPAの産生において重要な酵素であるオートタキシン(lysoPLD/NPP2)は、様々な腫瘍タイプがオートタキシンを上方調節することから、おそらく腫瘍遺伝子の産物であろう(Brindley (2004)、J Cell Biochem、vol. 92: 900-12)。ヒト血漿および血清中のLPAの濃度が報告されており、感度の高いおよび特異的LC/MS方法を用いて行った決定を包含している(Baker et al. (2001)、Anal Biochem、vol 292: 287-295)。例えば、新規に調製したヒト血清は25°Cで1時間置くことができ、LPAアナログの16:0、18:1、18:2および20:4が優性な種類であって、LPA濃度は、おおよそ1.2Mであると見積もられた。同様に、新規に調製したヒト血漿は、25°Cで1時間置くことができ、18:1および18:2 LPAが優性な種類であって、LPA濃度は、おおよ

40

50

そ0.7Mであると見積もられた。

【0040】

LPAは、細胞増殖の誘導、細胞遊走および神経突起退縮の刺激、ギャップ結合閉鎖、さらに粘菌走化性を含む広範囲の生物応答に影響する(Goetzl. et al. (2002)、Scientific World Journal、vol 2: 324-338)。LPAの生物学的特性についての知識の本体は、より多くの細胞系がLPA応答性について試験されるにつれて増えてつづけている。例えば、細胞増殖および増殖を刺激することに加えて、LPAは、創傷修復および再生における重要な事象である細胞伸張および細胞表面フィブロネクチン結合を促進することが知られている(Moolenaar et al. (2004)、BioEssays、vol. 26: 870-881)。最近、抗アポトーシス活性もLPAに起因していると考えられており、ペルオキシソーム増殖レセプター γ が、LPAに対するレセプター/標的であると近年報告された(Simon et al. (2005)、J Biol Chem、vol 280: 14656-14662)。

10

【0041】

最近、我々は、いくつかのLPAに対するモノクローナル抗体を開発した。抗S1P抗体同様に、抗LPA抗体は、多様なLPAを中和でき、その生物学的および薬理作用を緩和できる。眼球疾患および症状に対する用途について、抗LPA抗体は、治療有効性に関して下記のプロセスに作用すると考えられる。

【0042】

CNVおよびBV成熟：オートタキシン、LPA産生に関与する分泌リゾホスホリパーゼDは、発達中の血管形成に重要である[van Meeteren et al. (2006)、Mol Cell Biol、vol 26: 5015-22]。さらに、不飽和LPAは、血管平滑筋細胞の脱分化の誘導に対する主な関与因子として同定された[Hayashi et al. (2001)、Circ Res、vol 89: 251-8]。

20

【0043】

浮腫および血管透過性：LPAは、マウスにおける血漿滲出およびヒスタミン放出を誘導する[Hashimoto et al. (2006)、J Pharmacol Sci、vol 100: 82-7]。

【0044】

炎症：LPAは、ヒト角膜上皮細胞中の炎症性メディエーターとして作用する[Zhang et al (2006)、Am J Physiol、June 7]。LPAは、角膜創傷治療にかかわり[Lilim K et al (1998)、Am. J. Physiol、vol 274: C1065-C1074]、水晶体組織でのROSの放出を刺激する[Rao et al. (2004)、Molecular Visions、vol 10: 112-121]。LPAはまた、ウサギ角膜においてHSV-1を再活性化できる[Martin et al. (1999)、Molecular Visions、vol 5: 36-42]。

30

【0045】

線維症および瘢痕形成：LPAは、皮膚線維芽細胞においてERK依存経路を介してタイプIコラーゲンmRNA安定性のTGF β 媒介性刺激を阻害する[Sato et al. (2004)、Matrix Biol、vol 23: 353-61]。さらに、LPAはコラーゲン遺伝子発現および線維芽細胞の増殖を刺激することにより、いくらか直接的な繊維形成効果を示す[Chen、et al. (2006) FEBS Lett. 580(19):4737-45]。

【0046】

3.定義

40

本発明を詳細に説明する前に、本明細書で使いたいいくつかの用語を定義する。これらの用語に加えて、その他の用語も、必要であれば、明細書の他の場所において定義される。本明細書に明確に定義されているものを除いて、本明細書で使った技術用語は、当業者に認識されるような意味をもつ。

【0047】

「免疫誘導成分」とは、あらゆるポリクローナルまたはモノクローナル抗体、または抗体フラグメント、変形物、または派生物を指す。

【0048】

「抗S1P抗体」または「S1Pに対して反応性である免疫誘導成分」とは、S1Pを結合するあらゆる抗体または抗体誘導分子。

50

【0049】

「抗LPA抗体」または「LPAに対して反応性である免疫誘導成分」とは、全てまたは1以上のLPAに結合するあらゆる抗体または抗体誘導分子を指す。

【0050】

「生物活性脂質」とは、脂質シグナル伝達分子を指す。一般的には、生物活性脂質は、そのシグナル伝達効果を発揮する場合に生物膜内には存在していない、つまり生物膜(例えば、細胞膜、細胞器官等の膜)においてある時期に存在し得るが、かかる脂質種が生物学的な膜と関連する場合には、それは「生物活性脂質」ではなく「構造脂質」分子の代わりである。生物活性脂質は、それらは細胞外および／または細胞内シグナル伝達を媒介するという点で、構造脂質(例えば、膜結合リン脂質)とは区別される、即ち、遊走、増殖、分泌、生存、および他のプロセスを調節することによって細胞の様々な型の機能を制御する際に関わる。インビボでの生物活性脂質は、それらが他の分子、例えばアルブミンおよびリポタンパク質などの血清タンパク質と複合体を形成するか、または「遊離」形態で、即ち他の分子種と複合体を形成せずに、細胞外液に見出される。細胞外メディエーターとして、いくつかの生物活性脂質は、膜結合イオンチャンネルまたはG-タンパク質結合レセプターを活性化させることによって細胞シグナル伝達を変化させるか、かわりに細胞機能または生存性における変化をもたらす複合体シグナル伝達系を活性化させる。細胞内メディエーターとして、生物活性脂質は、細胞内成分、例えば酵素およびイオンチャンネルと直接的に相互作用することによってその作用を発揮できる。代表的な実施例にはLPAおよびS1Pを包含する生物活性の脂質が含まれる。

10

20

【0051】

「治療薬」なる用語は、血管形成および／または新血管形成、例えばCNVおよびBV成熟；眼球疾患および症状の進行中の病状またはその一部と関連する浮腫、血管透過性および線維症、繊維成長および瘢痕化を緩和する薬剤を意味する。

【0052】

「組合せ治療」とは、提示した治療効果を達成するために少なくとも2つの異なる治療の供給を包含する治療計画を指す。例えば、組合せ治療は、2以上の化学的に異なる活性成分、例えば抗LPA抗体および抗S1P抗体の投与を包含し得る。あるいは、組合せ治療は、生物活性脂質に対して反応性である免疫誘導成分および1以上の他の化学治療薬の投与を包含し得る。あるいは、組合せ治療は、抗脂質抗体の投与と共に別の処置の送達、例えば放射線治療および／または手術を包含し得る。さらに、組合せ治療は、抗脂質抗体と共に、1以上の他の生物学的薬剤(例えば、抗VEGF、TGF β 、PDGFまたはbFGF薬剤)、化学治療薬の投与、および他の処置、例えば放射線照射および／または手術を包含する。2以上の化学的に異なる活性成分を用いる組合せ治療に関して、活性成分は、同一組成物の一部としてまたは様々な組成物として投与され得ると解される。別の組成物として投与された場合、異なる活性成分を含む組成物は、特別な背景の要件および担当医によって決定されるような、同一または異なる投薬計画を用いて、同一または異なる時間、同一または異なる経路にて投与され得る。同様に、1以上の抗脂質抗体種(例えば抗LPA抗体)を、単独または1以上の化学治療薬を組合せて、例えば放射線照射および／または手術の組み合わせで、薬剤を手術または放射線照射処置の前後に送達できる。

30

40

【0053】

「単剤治療」は、長期にわたり単回用量としての投与であれ、または複数回用量としての投与であっても、1つの治療上有効な化合物の送達を基にした投薬計画を指す。

【0054】

本発明に関する「特許性がある」組成物、過程、機械または製造品目は、分析される時点で特許性について、例えば新規性、進歩性等に関する全ての法定要件を満たすものを意味する。後の審査によって、1以上の請求項が、新規性、進歩性等を否定する1以上の実施態様を包含していることが明らかとなれば、その請求項は、「特許性がある」実施形態に対する規定により限定される、具体的には特許性がない実施態様を除外する。また、本明細書の請求項は、広範囲の合理的範囲を提供するための、またはその妥当性を保護するた

50

めの両方と解釈される。さらに、請求項は、特許性について1以上の法定要件が補正される場合に、または特許性についての特定の法定要件がこの出願が提出された時点から満たされるかどうかを評価するための標準的変更が提出されるか、または特許として発行する時点で1以上の従属項に関する有効性が疑問視される場合に、(1)その有効性を保護するように、および(2)様々な条件下で広範囲な合理的解釈を提供するように解釈されるべきである。

【0055】

「薬学的に許容される塩」なる用語は、本発明の薬剤および化合物の生物学的有効性および特性を保持し、生物学的またはそれ以外の望ましくないものではない塩を指す。多くの場合において、この発明の薬剤および化合物は、荷電した基の存在によって、例えば、荷電アミノおよび／またはカルボキシル基またはそれに類似した基の存在によって、酸および／または塩を形成できる。医薬的に許容し得る酸付加塩は、無機および有機酸から調製でき、一方で医薬的に許容し得る塩付加塩は、無機および有機塩から製造され得る。薬学的に許容される塩の参照のために(see Berge, et al. (1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19)。

【0056】

用語「分離した」、「精製した」、「単離した」などは、試料を保持している血管中に含有される1以上の試料成分が、血管中に存在する1以上の他の試料成分から物理的に除去されるかまたは除去されているか、希釈されるかまたは希釈されていることを意味する。分離または精製ステップ中に除去されるかまたは希釈され得る試料成分には、化学的反応産物、非反応化学物質、タンパク質、炭化水素、脂質および非結合分子を包含する。

【0057】

様々な文脈において本明細書中で使用される用語「種」とは、例えば特定の種の化学治療薬を意味する。各内容において、該用語は、化学的に互いに区別出来ない分子集団、特定の状況において示された性質の分子集団をさす。

【0058】

「特異的に会合する」および「特異的会合」などは、2分子の間の特異的な、ランダムでない相互作用を指し、この相互作用は、分子間の適切な化学的または分子相互作用を可能にする構造的に、疎水性/親水性、および／または静電形態の存在に依存する。

【0059】

明細書中で、「安定な」とは、分子が所望の目的または操作のために維持できる程度に十分に強い2つの分子間の相互作用(例えば、抗LPAまたは抗S1P抗体とその標的生物活性物質に対する結合)を指す。

【0060】

「対象」または「患者」は、本発明の分子によって処置が有効となり得る動物を指す。該動物は、本発明の組成物および／または方法によって処置され得る疾患または症状についてのリスクを有し得るか、または示すか存在すると考えられ得る。本発明に従って処理され得る動物は、哺乳動物、例えばウシ科、イヌ科、ウマ科、ネコ、ヒツジ科、ブタ類と共に脊椎動物を包含し、霊長類(ヒトおよび非ヒト霊長類を包含する)の動物が、特に好ましい例である。

【0061】

「治療上有効量」(または「有効量」)は、対象または患者に投与される場合に、有効な処置に十分な活性成分の量、例えば本発明の薬剤を指す。従って、本発明の組成物の治療上有効量を構成するものは、当業者には容易に決定され得る。眼球治療において、「治療上有効量」は、眼球疾患または症状、アポトーシスまたは他の細胞死経路の誘導、症候における臨床的改善、異常な新血管形成または炎症等における低下と関連した1以上の遺伝子の発現における増加または低下を包含する眼球疾患または症状の処置と関連する1以上のパラメーターにおける客観的に測定された変化を生み出すものである。もちろん、治療上有効量は、特定の対象および処理される症状、対象の体重および年齢、疾患症状の重症度、特別な化合物の選択、従うべき投薬計画、投与時期、投与様式等によって変化するも

のであって、これら全てのものは当業者によって容易に決定され得る。組合せ治療において、治療上有効量の特別な活性成分の構成成分のものは、単剤治療として投与される場合(即ち、活性成分として唯一、一つの化学的に実在するものを用いる治療の投薬計画)活性成分の治療上有効量を構成するものとは異なり得る。

【0062】

疾患または障害の「処置」または「処置すること」なる用語は、疾患または障害(即ち、進行しない臨床的症状を用いる)に対する予防または保護を包含する;疾患または障害を阻害する(即ち、臨床的症状の進行を拘束又は抑制すること;および/または疾患または障害を緩和する(即ち、臨床症状の退行をもたらす)。重宝されるものとして、根本的な誘導性イベントまたはイベントは、未知または潜伏している可能性があるので、疾患または障害を「予防する」および「抑制する」の間を常に区別出来るという訳ではない。従って、用語「予防」とは、「予防」および「抑制」の両方を含む「処置」のタイプを構成すると解される。用語「処置」には「予防」を包含する。

10

【0063】

「治療の投薬計画」なる用語は、化学療法薬剤、放射線治療、手術、遺伝子治療、DNAワクチンおよび治療、siRNA治療を包含するアンチセンスを基にした治療、抗血管新生の治療、免疫療法、骨髄移植、アプタマーおよび他の生物学的治療(例えば、抗体および抗変形物、レセプターデコイおよび他のタンパク質を基にした治療)を用いる、疾患または障害のあらゆる処置を意味する。

【0064】

20

発明の概要

本発明に従って、方法は、生物活性脂質がその副作用を誘発することを全体または部分的に抑制できる有効濃度を低下させるために、生物活性脂質に反応性の免疫誘導成分(例えば抗体)を含む医薬組成物の投与を介して眼球疾患または症状を処置するために提供される。いくつかの実施形態において、免疫誘導成分は、モノクローナル抗体またはそのフラグメント、変形物または派生物である。いくつかの実施形態において、免疫誘導成分は、リゾリピド、例えばS1PまたはLPAに反応性である。また、方法は、異常な繊維成長、線維症または瘢痕化を低下または予防;炎症;または異常な新血管形成;眼の外科的および外傷的創傷治療応答の調節;または眼球の免疫応答を軽減するために提供される。さらに提供されるものは、生物活性脂質の有効な眼球濃度または活性を低下させるための方法である。また、提供するものは、生物活性脂質に反応性である免疫誘導成分、例えばリゾリピドS1PまたはLPAを用いる強皮症の処理方法である。代表的な生物活性脂質には、スフィンゴ脂質およびその変形物、例えばスフィンゴシン-1-リン酸塩(S1P)、スフィンゴシン、スフィンゴシルホスホリルコリン、ジヒドロスフィンゴシンが包含される。他の生物活性なリゾリピドには、リゾホスファチジン酸(LPAs)およびその変形物が包含される。

30

【0065】

本発明の別の態様は、眼球投与のためのものを含み、担体および単離免疫誘導成分、例えば生物活性脂質に反応性のモノクローナル抗体または抗体フラグメント、変形物または派生物を含む医薬または動物用組成物に関する。好ましい担体は、特に組成物がヒトの治療用途を意図される場合に、医薬的に許容し得る担体を包含する。非ヒト治療の用途のためには(例えば、ペット、家畜用動物、魚または家禽の処置において)、動物用の許容し得る担体を用い得る。

40

【0066】

本発明の免疫誘導成分の投与経路の例示は、好ましくは治療用組成物の一部分として、全身性投与、非経口投与(例えば、静脈による注射を介して、筋肉内、または皮下経路)、経皮、皮内または経粘膜送達、眼球内または眼周囲の注射、粘膜または局所投与または吸入投与を包含する。

【0067】

本発明のこれらのおよび他の態様および実施形態は、下記の章により詳細に議論される。

50

【0068】

図面の簡単な説明

本特許出願は、カラーで作成した少なくとも1つの図を有する。カラー図面と共にこの特許出願の複写物は、必要な費用の要求および支払いによって提供される。

【0069】

図1: SPHINGOMABは、眼球病変におけるCNVおよび瘢痕形成を低下させる。マウスをSPHINGOMABまたはアイソタイプが一致した非特異的mAbにより処置した。CNV病変を、Bruchs膜の裂傷をレーザーにより誘導した。血管新生(A)についてはローダミン結合R. communisアグルチニンIによって、またはコラーゲン瘢痕形成(B)についてはMasson's Trichromeによって染色した各処置群からの病変に関するグラフおよび代表的画像を示す。図1aは、SPHINGOMABが、Bruch膜のレーザー誘導性裂傷後の14および28日目に脈絡膜の新血管形成を劇的に減弱させることを示す。図1bは、SPHINGOMABが、Bruchs膜のレーザー誘導性裂傷28日後にCNV病変形成と関連した線維症を有意に低下させることを示す。

10

【0070】

図2: S1Pは、HUVEC管形成および遊走の誘導により新血管形成を促進し、SPHINGOMABにより低下される。パネルA: 管形成を評価するためにHUVECのマクロファージをマトリゲル上に播種して、6hrsインキュベートした顕微鏡写真図。パネルB: HUVECをマトリゲル浸潤チャンバー内で1mM S1P ± SPHINGOMAB (1mg/ml)で6 hrs処理した。マトリゲル膜に遊走した細胞の数を、5つの独立した視野で計測した。

【0071】

20

図3: SPHINGOMABは、S1P-、VEGF-およびbFGF-誘導性新血管形成を中和する。A: マトリゲルプラグ±GFのセクションから代表的なFITC染色BV。B: S1PはEC浸潤を刺激する。C: 新血管形成の指標としてVEGFまたはbFGFで刺激したマトリゲルプラグからの相対的な蛍光の定量化。マウスをSPHINGOMABの1または25mg/kgを用いて全身的に処理した場合、S1P、VEGFおよびbFGFの効果が阻害された。

【0072】

図4: SPHINGOMABは、S1P-刺激した瘢痕形成を中和した。線維芽細胞を、血清枯渇させた後に、12-24時間、0、0.1、0.5または1 μ MのS1P +/- 1 μ g/mL SPHINGOMABで処置した。S1Pは、3H-チミジン導入(A)、スクラッチアッセイにおけるマウス心臓線維芽細胞遊走(B)、コラーゲン-GFPを発現するトランスジェニックマウスから単離した心臓線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現(相対的な蛍光)(C)によって測定したとおり、Swiss 3T3 線維芽細胞増殖を刺激し、そして低下した細胞増殖および高い α -SMA発現により測定したとおり筋線維芽細胞へのWI-38 細胞分化(D)を刺激した; SPHINGOMABはS1Pの効果の各々を中和した。SPHINGOMABは、永続的な心筋梗塞のマウスモデルにおいてインビボの周辺血管線維症を低下した(E)。

30

【0073】

図5: S1Pは、眼球上皮細胞および線維芽細胞の収縮性の瘢痕組織を産生する筋線維芽細胞への形質転換を促進する。いくつかのヒト眼球細胞系の筋線維芽細胞形質転換に対するS1Pの効果を試験した。S1Pは、ヒト網膜色素性上皮細胞(図5A)およびヒト結膜線維芽細胞(図5B)において α -平滑筋アクチン(α -SMA; 筋線維芽細胞マーカー)の産生を刺激することを見出された。これらのデータは、S1Pが収縮性の瘢痕組織産生筋線維芽細胞への眼球上皮細胞および線維芽細胞の形質転換を促進する因子の中の一つであることを初めて示すものである。ヒト結膜線維芽細胞においてプラスミノゲンアクチベーター阻害剤の発現(PAI-1)に対するS1Pの効果もまた試験した。高いPAI-1発現は、結合組織のタンパク質分解性分解における低下と関連しており、増加した瘢痕化を包含するいくつかの繊維性疾患と関連して上方調節される。図5Cに示したように、S1Pは用量依存様式においてPAI-1発現を刺激する。

40

【0074】

図6: SPHINGOMABは、インビボで免疫細胞の創傷浸潤を低下させた。マウスを、MIに供し、手術後48hrsで、食塩水または25mg/kgのSPHINGOMABで処理し、その後4日目に屠殺し

50

た。SPHINGOMABは、マクロファージ(A)およびマスト細胞(B)の創傷への浸潤を低下した。データを、食塩水処理した値の倍数低下として示した。

【0075】

図7：SPHINGOMABはS1Pに対して特異性が高い。競合ELISAを基にしたグラフは、他の生物活性の脂質と比較して、S1Pに対するSPHINGOMABの特異性を示す。SPHINGOMABは、スフィンゴシン(SPH)、S1Pまたはリゾホスファチジン酸(LPA)の即時代謝前駆体、S1Pと構造的および機能的に類似した重要な細胞外シグナル伝達分子に対して交差反応性を示さなかった。SPHINGOMABは、セラミド1-リン酸塩(C1P)、ジヒドロスフィンゴシン(DH-SPH)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)またはスフィンゴミエリン(SM)を包含する他の構造的に類似した脂質および代謝物を認識しなかった。SPHINGOMABは、ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸塩(DH-S1P)と交差反応し、低い程度でスフィンゴシルホリルコリン(SPC)と交差反応した。S1Pに対するSPHINGOMABの親和性(Kd)は<100pMであり、大部分の治療用抗体、特に他の分子スポンジよりも非常に高い。

【0076】

本発明の詳細な説明

1. 化合物

「免疫誘導成分」なる用語は、抗体(Ab)またはイムノグロブリン(Ig)を包含しており、免疫グロブリン遺伝子から得られ、免疫グロブリン遺伝子を基にするか、または免疫グロブリン遺伝子によってコードされた、ペプチド、ポリペプチド、または抗原またはエピトープを結合できるそのようなペプチドまたはポリペプチドのフラグメントのあらゆる形態を指す[例えばImmunobiology, 5th Edition, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik, (editors), Garland Publishing (2001)を参照されたい]。本発明において、該抗原は、生物活性脂質分子である。抗体分子またはイムノグロブリンは、おおよそ150kDaの分子量を有する大きな糖タンパク質分子であり、通常2つの異なる種類のポリペプチド鎖を含む。「重」鎖(H)と呼ばれる一つのポリペプチド鎖は、おおよそ50kDaである。「軽」鎖(L)と呼ばれる別のポリペプチドは、おおよそ25kDaである。各免疫グロブリン分子は、通常2つの重鎖および2つの軽鎖とからなる。この2つの重鎖は、ジスルフィド結合によって互いに結合しており、この数は様々な免疫グロブリンのアイソタイプの重鎖の間で変化する。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合される。あらゆる所定の天然抗体分子において、この2つの重鎖および2つの軽鎖は同じであって、2つの同じ抗原結合部位に内在しており、このため2価と言われる、即ち2つの同一分子と同時に結合する能力を有する。

【0077】

多くの脊椎動物種に対する抗体分子の「軽」鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列を基にした2つの明らかに異なるタイプの、カッパ(k)およびラムダ(l)の一つに指定される。軽鎖の2つのタイプの割合は種間で変化する。例として、平均的なk対lの比は、マウスでは20:1であり、ヒトでは2:1であって、ウシでは1:20である。

【0078】

多くの脊椎動物種に対する抗体分子の「重」鎖は、アイソタイプと呼ばれ、その定常ドメインのアミノ酸配列を基にした5つの明らかに異なるタイプに指定される。幾つかのアイソタイプは、いくつかのサブタイプを有する。免疫グロブリンのこの5つの主要なクラスは、免疫グロブリンM(IgM)、免疫グロブリンD(IgD)、免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンA(IgA)および免疫グロブリンE(IgE)である。IgGは、最も豊富なアイソタイプであり、いくつかのサブクラス(ヒトにおいてIgG1、2、3および4)を有する。Fcフラグメントおよびヒンジ領域は、様々なアイソタイプの抗体において異なる、即ちその機能特性を決定する。しかしながら、該ドメインの全体の編成はあらゆるアイソタイプと類似する。

【0079】

「可変領域」なる用語は、抗体分子またはそのフラグメントのN末端部分を示す。一般的には、4つの鎖の各々は、抗原結合部位に関与するそのアミノ末端部分における可変(V)領域および定常(C)領域を有し、これが該アイソタイプを決定する。該軽鎖は、多くの非

共有相互作用およびジスルフィド結合によって重鎖と結合され、重鎖および軽鎖のV領域が抗体分子の各アームにおいて対をなし、2つの同一抗原結合部位を作成する。いくつかのアミノ酸残基は、軽および重鎖可変ドメインの間のインターフェースを形成すると考えられてきた[参照、Kabat et al. (1991)、Sequences of Protein of Immunological Interest、Fifth Edition、National Institute of Health、Bethesda、Md. および Clothia et al. (1985)、J. Mol. Biol、vol 186: 651]。

【0080】

注目すべき可変性は、抗体の可変ドメインにわたって均一に分配されているわけではないが、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方において「相補性決定領域」(CDR)または「超可変領域」と呼ばれる3つのセグメント内に集まっている。可変ドメインのより高い保存部分は、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれる。本来の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々3つのCDRでつながった4つのFR領域を含む。各鎖中のCDRは、FR領域付近において共に保持されており、他鎖由来のCDRと共に抗体の抗原結合部位を形成する[参照、Kabat et al. (1991)、Sequences of Protein of Immunological Interest、Fifth Edition、National Institute of Health、Bethesda、Md.]。要約すると、6つのCDRは、抗原に対して抗体分子の結合特性に関与する。しかしながら、一つの可変ドメインであっても(または抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでいるFvの半分)は、抗原を認識し、結合する能力を有する[参照、Pluckthun (1994)、in The Pharmacology of Monoclonal Antibody、vol . 113、Rosenburg and Moore eds.、Springer-Verlag、New York、pp. 269-315]。

【0081】

「定常ドメイン」なる用語は、抗体の重鎖または軽鎖のC末端領域を指す。一般的に、該定常ドメインは、抗原に対する抗体分子の結合特性に直接的には関係がないが、多様なエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性における抗体との関与を示す。ここで「エフェクター機能」は、Fcドメインおよび免疫系のタンパク質との間の分子相互作用による免疫細胞の動員により媒介される、抗体の様々な生理学的効果(例えば、オプソニソン作用、細胞分解、マスト細胞、好塩基球および好酸球の脱顆粒、および他のプロセス)を示す。重鎖のアイソタイプは抗体の機能特性を決定する。その独特な機能特性は、軽鎖と会合しない重鎖のカルボキシ末端部分によって付与される。

【0082】

本明細書で使用したように、「抗体フラグメント」は、無傷抗体の抗原結合部位または可変領域を包含する無傷抗体の一部を指す。ここで、該部分は無傷抗体のFc領域の定常重鎖ドメイン(例えば、CH2、CH3およびCH4)を含まない可能性がある。あるいは、定常重鎖ドメインの部分(例えば、CH2、CH3およびCH4)は「抗体フラグメント」中に包含され得る。抗原-結合を保持する抗体フラグメントの例示は、Fab、Fab'、F(ab')₂、FdおよびFvフラグメント;ダイアボディ;トリアボディ;一本鎖抗体分子(sc-Fv);ミニボディ、ナノボディおよび抗体フラグメントから形成された多価特異的抗体、を包含する。例示として、Fabフラグメントは、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン(CH1)も含む。

【0083】

「変形物」なる用語は、少なくとも1つのアミノ酸残基または修飾による抗体の本来のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を指す。本来のまたは親のまたは野生型アミノ酸配列とは、自然界で見出された抗体のアミノ酸配列を指す。抗体分子の「変形物」に限定するものではないが、超可変またはCDR領域、Fc領域、Fab領域、CH₁ドメイン、CH₂ドメイン、CH₃ドメインおよびヒンジ領域を包含する軽鎖および/または重鎖の可変領域または定常領域内での変更も包含する。

【0084】

「特異的な」なる用語は、その標的エピトープへの抗体の選択的な結合を指す。抗体分子は、所望の抗原への抗体の結合と、非関連抗原またはアナログ抗原または抗原混合物への抗体の結合とを比較することによって、所定の条件下で、結合特異性について試験され得る。好ましくは、本発明の抗体は、非関連抗原またはさらに標的抗原のアナログと有意な結合をしない。ここで、「抗原」なる用語は、抗原と結合する抗体分子または免疫誘導

成分を認識し、結合される分子を指す。抗体に結合される抗原の特異的部分は「エピトープ」と呼ばれる。「ハプテン」は、大部分の環境下で、担体分子、例えば、タンパク質、ポリエチレングリコール(PEG)、コロイド状の金、シリコンビーズ、および類似物に結合した場合にのみ免疫応答を誘起できる(即ち、抗原として作用できる)低分子を指す。該担体は、またそれ自身では免疫応答を誘起しないものであり得る。

【0085】

「抗体」なる用語は、広い意味で用いられ、そしてモノクローナル、ポリクローナル、多重特異性(例えば、二重特異的、ここで各抗体のアームは様々なエピトープまたは同一または異なる抗原と反応性である)、ミニボディ、ヘテロ接合体、ダイアボディ、トリアボディ、キメラおよび合成の抗体を含み、さらに所望の結合性質および/または生物学的活性にて、抗原に特異的に結合する抗体フラグメントが含まれる。

10

【0086】

「モノクローナル抗体」(mAb)なる用語は、抗体、または実質的に相同な抗体の集団から得られた抗体類似集団を指し、そしてあらゆる特別な方法によって抗体の産生を必要とすると解釈すべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein (1975)、Nature, vol 256: 495-497により初めて記載されたハイブリドーマ方法または組換えDNA方法によって作成され得る。

【0087】

「キメラ」抗体(または免疫グロブリン)なる用語は、特定の種から得られたかまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体において、対応する配列と同一または相同な重鎖および/または軽鎖を含んでいる分子を指すが、一方で該鎖の残余分は、かかる抗体が所望の生物学的活性を示す限り、別の種から得られたかまたは他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、さらに抗体のフラグメントにおいて対応する配列と同一または相同である分子を指す[Cabilly et al. (1984)、*infra*; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851]。

20

【0088】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト(例えば、マウス)抗体、さらにヒト抗体からの配列を含有する抗体の形態を指す。ヒト化抗体には、その結合および/または生物学的活性を顕著に変化させない同一または異なる種からの保存的アミノ酸置換または非天然残基も包含できる。かかる抗体は、非ヒトイムノグロブリンから得た最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分に関して、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、非ヒト種(ドナー抗体)、例えば、所望の特性を有するマウス、ラット、ラクダ、ウシ、ヤギまたはウサギのCDR由来の残基によって置き換えられたヒトイムノグロブリン(レシピエント抗体)である。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または重要なCDRまたはフレームワーク配列中のいずれにおいても見出されない残基を含み得る。これらの修飾物をさらに純化し、抗体再現性を最大にするように作成される。すなわち、一般的には、ヒト化抗体は、少なくとも1つおよび一態様において2つの可変ドメインの全てを含み、ここで可変ドメインの全てまたは超可変ループの全ては、非ヒト免疫グロブリンのものと一致しており、FR領域の全てまたは実質的に全てのものは、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、所望により、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、またはヒト免疫グロブリンのものも含む[参照、例えば、Cabilly et al., U.S. Pat. No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent No. 0,125,023 B1; Boss et al., U.S. Pat. No. 4,816,397; Boss et al., European Patent No. 0,120,694 B1; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., European Patent No. 0,194,276 B1; Winter, U.S. Pat. No. 5,225,539; Winter, European Patent No. 0,239,400 B1; Padlan, E. A. et al., European Patent Application No. 0,519,596 A1; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol 86:10029-10033)]。

30

40

【0089】

「二重特異性抗体」なる用語は、少なくとも2つの様々なエピトープに対する結合特異性を有する抗体またはモノクローナル抗体を指し得る。一実施形態において、エピトープ

50

は、同じ抗原からのものである。他の実施形態において、該エピトープは、2つの様々な抗原由来のものである。二重特異性抗体を作成するための方法は、当業者にはよく知られている。例えば、二重特異性抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現を用いて組換え的に産生され得る。あるいは、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製できる。二重特異性抗体は、二重特異性抗体フラグメントを包含する。

【0090】

「ヘテロ接合抗体」なる用語は、2つ共有結合した抗体を指し得る。かかる抗体は、架橋剤を用いることを含む合成タンパク質化学において既知の方法を用いて調製できる。本明細書で使用したように、「接合」なる用語は、1以上の抗体フラグメントの共有結合または1以上のポリマー分子への結合部分によって形成した分子を指す。

10

【0091】

「生物学的に活性な」なる用語は、所望のエピトープを結合出来、いくつかの方法で生物学的効果を発揮する抗体または抗体フラグメントを指す。生物学的効果には、これらに限定するわけではないが、増殖シグナルの変調、抗アポトーシスシグナルの変調、アポトーシスシグナルの変調、エフェクター機能カスケードの変調、および他のリガンドの相互作用の変調が包含される。

【0092】

「組換えDNA」なる用語は、ヒトによって設計され、構築され、修飾された核酸およびそれらから発現した遺伝子産物を指す。「組換え体」ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術によって産生された、例えば所望のポリペプチドまたはタンパク質をコードする外来のDNA構築体によって形質転換した細胞から産生された、ポリペプチドまたはタンパク質である。「合成」ポリペプチドまたはタンパク質は、化学合成によって調製されたものである。

20

【0093】

「発現カセット」なる用語は、かかる配列と共生できる宿主中で構造遺伝子の発現に影響できるヌクレオチド分子を指す(即ち、タンパク質のコード配列、例えば本発明の抗体)。発現カセットは、少なくともポリペプチドコード配列、および所望により、他の配列、例えば転写終結シグナルと機能的に結合したプロモーターを包含する。発現を行い得る際に必要または助けとなるさらなる調節要因、例えば、エンハンサーもまた使用され得る。即ち、発現カセットは、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、組換え「ネイキッドDNA」ベクターおよび類似物のあらゆる形態物を包含する。

30

【0094】

2. 出願

本発明は、1以上の望ましくない生物活性の脂質、またはその前駆体または代謝物の活性または濃度を変更させる1以上の治療薬を用いる眼球疾患および症状を処置または予防する組成物および方法について書かれる。本発明の治療方法および組成物は、有効濃度を変更すること、即ち、特定の望ましくない生物活性の脂質の、絶対的、相対的、効果的および/または利用可能な濃度および/または活性を変化させることによって作用する。生物活性脂質の有効濃度を低下させることは、標的脂質または下流効果を包含するその望ましくない効果を「中和する」と言うことができる。ここで、「望ましくない」とは、疾患過程における例えばシグナル伝達分子としてのその関与を理由とする望まれない生物活性脂質、または過剰に存在する場合に疾患に関与する生物活性脂質の望ましくない量を指す。

40

【0095】

あらゆる特定の理論に縛られずに、脂質、例えば、S1Pおよび/またはLPA、および/またはその代謝物または下流エフェクターの不適切な濃度は、多様な眼球疾患および障害の進行を引き起こすかまたは進行に関与し得ると考えられる。それ自体、組成物および方法は、特定の標的脂質、例えばS1Pおよび/またはLPAのインビボの有効濃度を低下させることによって、これらの眼球疾患および障害を処置するために使用され得る。特に、本発明の組成物および方法は、少なくとも部分的には、異常な新血管形成、血管形成、繊維成長

50

、線維症、瘢痕化、炎症および免疫応答を特徴とする眼球疾患を処理する際に有用であると考えられる。

【0096】

本発明に従って処理され得る眼球疾患のいくつかのクラスの例示を後記する。当然のことながら、多くの疾患および症状は、少なくとも部分的には、複数の病理学的プロセス(例えば、病理学的新血管形成および瘢痕化の両方)を特徴とし、および本明細書で提供される分類は記述的利便性を目的とするものであって、本発明を制限するものではない。

【0097】

網膜上および／または網膜下の膜形成を特徴とする病理学的新血管形成および疾患と関連した虚血性網膜症

虚血性網膜症(IR)は、危険にさらされた網膜の血流を特徴とする障害の多様な群である。IRの例示には、糖尿病性網膜症(DR)、未熟児網膜症(ROP)、鎌状細胞網膜症および網膜血管閉塞性疾患が包含される。これらの障害の全ては、最終的に眼球内の大量出血、網膜上膜形成および牽引性網膜剥離をもたらす得る病理学的新血管形成の増殖により駆動されるVEGFと関連づけられる。突発性網膜上膜(ERM)は、マクラパッカーまたはセロファン網膜症とも呼ばれ、網膜構造の変形へと二次的な視力低下を引き起こし得る。これらの膜は、外科的に除去されても再発することもあり、時に網膜虚血に関連することもある。VEGFおよびそのレセプターはERMに局在している。増殖性糖尿病網膜症、増殖性硝子体網膜症およびマクラパッカーと関連のある膜内のVEGFの存在により、このサイトカインが、血管形成において虚血性網膜疾患においておよび増殖性硝子体網膜障害における膜増殖において、重要な役割を担うことをさらに示唆する。さらにVEGFレセプター、VEGFR1およびVEGFR2は、ERMの細胞でも同定される。これらのデータは、VEGFが血管の進行および血管ERMに関与し得るオートクリンおよび／またはパラクリン刺激因子であり得るということを示す。PDGFおよびそのレセプター[Robbins et al. (1994)、Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663]について、増殖性網膜疾患に罹っている眼球において説明されている[Cassidy et al. (1998)、Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85 および Freyberger et al. (2000)、Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108: 106-109]。これらの知見は、PDGFリガンドおよびレセプターは、様々な起源の増殖性網膜の膜中に広く分布していることを示唆し、PDGFによるオートクリンおよびパラクリン刺激はERM発病に関与し得ることを示唆している。トランスフォーミング成長因子β (TGF-β)は、TGF染色および免疫活性によって示されたように、ERMの形成と関係があることを示している[Pournaras et al. (1998)、Klin Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358]。さらに、TGF-βレセプターIIは、糖尿病性のERMおよびPVR膜の筋線維芽細胞で発現された。これらの結果は、網膜およびERMにおける複数の細胞タイプ中で産生されたTGF-βは、PVR、糖尿病性および二次的ERMの処置のための魅力的な標的であることを示唆する。インターロイキン-6 (IL-6)は、増殖性糖尿病性網膜症(PDR)においてヒト硝子体中で増加したということが報告されてきた[La Heij et al. (2002)、Am J Ophthalmol, 134: 367-375]、そして、いくつかの試験では、試験した糖尿病性ERの100%がIL-6タンパク質を発現した[Yamamoto et al. (2001) Am J Ophthalmol, vol 132: 369-377]。

【0098】

塩基性線維芽細胞性成長因子(bFGF)の外來の投与は、内皮増殖およびVEGF発現を誘導することが知られてきた[Stavri et al. (1995)、Circulation, vol 92: 11-14]。これらの知見と一致して、bFGF濃度は、PDRに罹患した患者からの硝子体サンプル内で増加した[Sivalingam et al. (1990)、Arch Ophthalmol, vol 108: 869-872 および Boulton et al. (1997)、Br J Ophthalmol, vol 81: 228-233]。bFGFは、ERMの形成にも関与しており、試験した10のPDR膜の内8つの膜においてbFGFを示した[Hueber et al. (1996)、Int. Ophthalmol, vol 20: 345-350]。さらに、これらの研究者は、対応するレセプター、FGFR1についての陽性染色を見出した。bFGFについての免疫反応性は、非血管突発性ERMにおいても示されている。これらの結果は、血管および血管ERMの両方の形成においてbFGFが関わる[Harada et al. (2006)、Prog in Retinal and Eye Res, vol 25: 149-164]。上昇

したbFGFは、ROPに罹患患者の血清中で検出されてきた(Becerril et al. (2005)、Ophthalmology, vol 112, 2238]。

【0099】

S1Pの既知の様々な作用、およびVEGF、bFGF、PDGF、TGF- β およびIL-6とその相互作用から、S1Pのその効果または産生を、拘束し、中和し、阻害する薬剤は、虚血性網膜症および血管または血管ERM形成を特徴とする後眼部疾患において病理学的網膜新血管形成の抑制時に効果的であると考えられる。少なくとも部分的に、異常な新血管形成または血管形成を特徴とする他の眼球症状には、加齢黄斑変性症、角膜移植片拒絶反応、血管新生緑内障、コンタクトレンズの過剰装着、単純ヘルペス、ヘルペス帯状疱疹および原虫感染症を含む角膜の感染症、翼状片、伝染性のブドウ膜炎、慢性網膜剥離、レーザー損傷、鎌状細胞網膜症、血管閉塞疾患、脈絡膜の新血管形成、網膜血管腫増殖、および突発性ポリープ状脈絡膜の血管障害を包含する。

10

【0100】

増殖性硝子体網膜症(PVR)

PVRは、自然発生の裂孔原性網膜剥離後および外傷性網膜剥離後に観察される。それは、網膜剥離手術の失敗が主な原因である。後部の硝子体表面および硝子体基体上での網膜両側上の細胞膜の増殖および縮小を特徴とする。眼におけるこの過剰な瘢痕組織は、牽引性網膜剥離の進行をもたらす得る、そのため増殖性硝子体網膜症(PVR)の予防または阻害に関する処置は、網膜剥離の管理に関する論理的方針である。病理組織学的にPVRは、過剰なコラーゲン産生、縮小および細胞増殖を特徴とする[Michels、Retinal Detachment 2nd Edition. Wilkinsin CP、Rice TA Eds、Complicated types of Retinal Detachment、pp 641-771、Mosby St Louis 1997]。PVR膜において同定した細胞型は、主に網膜色素上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージおよび血管内皮細胞を包含する[Jerdan JA et al. (1989)、Ophthalmology、vol 96: 801-10 および Vidinova et al. (2005)、Klin Monatsbl Augenheilkd; vol 222:568-571]。この過剰な瘢痕化反応の病態生理から、血小板誘導性成長因子(PDGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF) β 、塩基性線維芽細胞性成長因子(bFGF)、インターロイキン-6 (IL)-6 およびインターロイキン-8 (IL)-8を包含する多くのサイトカインによって媒介されることが明らかにされた[Naginani et al. (2005)、J Cell Physiol、vol 203: 35-43; La Heij et al (2002)、Am J Ophthalmol、134: 367-75; Planck et al. (1992)、Curr Eye Res; vol 11: 1031-9; Canataroglu et al. (2005) Ocul Immunol Inflamm; vol 13: 375-81 および Andrews et al. (1999) Ophthalmol Vis Sci; vol 40: 2683-9]。これらのサイトカインの阻害は、タイミング良く与えられれば、PVRの進行を防止するかまたはその重症度を制限するのを助け得る[Akiyama et al (2006)、J Cell Physiol、vol 207:407-12 および Zheng Y et al (2003)、Jpn J Ophthalmol、vol 47:158-65]。

20

30

【0101】

スフィンゴシン-1-リン酸塩(S1P)は、薬理作用を有する生物活性なリゾリピドである。前血管新生性、炎症促進性(マクロファージおよびマスト細胞の動員を刺激する)および前繊維性(瘢痕形成を刺激する)である。S1Pは、一般的に細胞を刺激して、増殖させ、遊走させ、そして抗アポトーシスである。S1Pは、多くのサイトカインおよび増殖因子とのその相互作用を介してこれらの生物学的に様々な機能を達成する。モノクローナル抗体(SPHINGOMAB)を介するS1Pの阻害は、血管内皮成長因子(VEGF)、bFGF、IL-6 および IL-8 の機能を遮断することを示されている[Visentin B et al. (2006)、Cancer Cell、vol 9: 1-14]。S1PのS1P₁レセプターへの結合はPDGF産生も増加させ得る;それ故に、S1Pを結合する薬剤はPDGF産生も低下させると期待されている[Milstien and Spiegel (2006)、Cancer Cell、vol 9:148-150]。下記例示に示したように、本明細書中にて、インビトロでのS1Pは、ヒトRPE細胞を、PVRで見られるタイプと類似した筋線維芽細胞様の表現型に変換することを示している。PVRにおいて見られる最終的に過剰な瘢痕化をもたらす病態生理およびこれらと同じ重要なメディエーターに対するS1Pの既知の効果から、S1Pの効果または産生を拘束し、中和し、または阻害する薬剤は、PVRの進行および眼に対するその深

40

50

刻な損傷影響を取り除くか、または最小にする点で有効であると考えられる。

【0102】

ブドウ膜炎

ブドウ膜炎は、眼の眼球血管膜の炎症性不全である。それは、眼の前部(前方)または後部(後方)または両方に影響し得る。それは、病因においては突発性または伝染性であって、視力を脅かす可能性がある。突発性ブドウ膜炎は、前房中で上昇したCD4+発現と関連づけられてきた[Calder et al. (1999)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 40: 2019-24]。このデータから、ブドウ膜炎の発病においてTリンパ球およびその化学誘引物質IP-10の病理学的役割も示唆されている[Abu El-Asrar (2004)、Am J Ophthalmol、vol 138: 401-11]。急性前部ブドウ膜炎におけるその他のケモカインには、マクロファージ炎症タンパク質、単球化学誘引物質タンパク質-1およびIL-8が包含される。これらのサイトカインは、急性前部ブドウ膜炎における白血球動員においておそらく重要な役割を担う[Verma et al. (1997)、Curr Eye Res; vol 16; 1202-8]。S1Pシグナル伝達カスケードの著しい効果および様々な効果から、生物活性脂質の有効濃度を低下させるSPHINGOMABおよびその他の免疫成分は、ブドウ膜炎との関連のある眼球内炎症を低下または調節する有効な方法として働くであろうと考えられる。

10

【0103】

屈折矯正手術

角膜の創傷治癒応答は、屈折矯正方法に対して特に関連がある、それは安全性および効力の主な決定因子であるためである。これらの方法は、近眼、遠視および乱視の処置のために行われる。イン・シチュのレーザー角膜曲率形成術(LASIK)および光屈折性の角膜切除(PRK)は最も一般的な屈折矯正方法であるが、その他の方法が合併症を克服するために試みとして開発されてきた。これらの合併症は、とりわけ過剰矯正、矯正不足、退行および間質角膜混濁を包含する。多くの一般的な合併症は、治療応答に関連があり、手術に対する生物学的応答におけるその基礎を示す。角膜の生物学における最大の挑戦の一つは、線維化というよりもむしろ再生による組織修復を促進することである。再生と繊維化の間の選択は線維芽細胞活性化の制御にあると考えられる[Stramer et al (2003)、Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 44: 4237-4246 および Fini (1999) Prog Retin Eye Res、vol 18: 529-551]。筋線維芽細胞と呼ばれる細胞は、手術または損傷後1-2週間で上皮間質に出現し得る。おそらく、筋線維芽細胞は、TGF- β の影響下にあるケラチノサイト(keratocytes)から得られる[Jester et al (2003) Exp Eye Res、vol 77: 581-592]。角膜のかすみおよび間質瘢痕化は、角膜透明性の低下を特徴とし、線維芽細胞および筋線維芽細胞生成と関連され得る。インシチュおよびインビトロ試験は、TGF- β およびPDGFが、筋線維芽細胞分化を刺激する際に重要であることを示唆している[Folger et al. (2001)、Invest Ophthalmol Vis Sci; 42: 2534-2541]。かすみとは、特定の環境下でLASIK後の中心の接合部を意味し得る。これらは、広範囲の表層角膜炎、ドーナツ形状のフラップおよび界面での上皮破片の保持を包含する。これらの各々は、上皮細胞から活性化したケラチノサイトへのTGF- β のアクセス増加と関連するようである[Netto et al. (2005)、Cornea、vol 24: 509-522]。退行は、高度な上皮-間質創傷治癒の相互作用、例えば角膜の線維芽細胞および/または筋線維芽細胞による増殖因子を調節する上皮組織の産生増加を理由とすることが多い[Netto et al. (2005)、Cornea、vol 24: 509-522]。局所的な抗TGF- β 抗体を有するレセプターに結合するTGF- β の阻害は、PRKにより誘導されるかすみを減少させることが示されている[Jester et al. (1997)、Cornea、vol 16: 177-187]。繊維形成過程に対する抗生物活性脂質抗体およびTGF- β の既知の効果から、我々はいくつかの屈折矯正手術による合併症、例えば、かすみ、間質瘢痕化および退行を処置する際の助けとなると考える。

20

30

40

【0104】

緑内障手術の調節

緑内障は、古典的には高い眼球内圧により、視神経への損傷をもたし、最終的には視界および/または視力の低下を引き起こす疾患であると考えられてきた。緑内障の他の形態

50

には、視神経損傷が通常圧の周囲環境で生じ得るか、または「正常眼圧の緑内障」と呼ばれるものがある。多くの患者に対して治療薬はその疾患を制御出来るが、緑内障濾過手術が必要であるその他の患者に対しては、眼内で外科的に瘻孔を創作することによって、体液を排出できる。これは、線維柱帯切除術、医療装置の移植または外科的介入の他の方法を介して達成され得る。緑内障濾過手術は、創傷治癒過程が線維芽細胞および最終的な瘢痕化の増殖を特徴とするために役に立たない。抗代謝物、例えば5-フルオロウラシルおよびマイトマイシンCはその後の瘢痕化を減少させ得る；しかし、これらの薬剤の長期間使用を続行しても、外科的失敗が依然として深刻な臨床的課題であることを示している[Mutsch and Grehn (2000)、Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; vol 238: 884-91 および Fontana et al. (2006)、Ophthalmology、vol 113: 930-936]。ヒトのTenonカプセル線維芽細胞の試験から、それらがbFGFおよびPDGFおよびTGF- β を合成する能力を示すこと、そしてこれらの増殖因子がこの方法の失敗の一因となる緑内障濾過手術後の組織修復過程に関わることを示している[Trpathi et al. (1996)、Exp Eye Res、vol 63: 339-46]。浸潤後の創傷応答において、これらの増殖因子に関連のあるさらなる試験により[Denk et al. (2003)、Curr Eye Res; vol 27: 35-44]、PDGFの様々なアイソフォームが緑内障濾過手術後のTenonカプセル線維芽細胞の増殖の主な刺激因子であり、一方でTGF- β は、Tenonカプセル線維芽細胞の筋線維芽細胞への変容に重要であるということを結論づけている。我々は、S1Pが、ヒトTenonカプセル/結膜の線維芽細胞に存在すること、そしてS1Pが創傷治癒応答において非常に高く発現するというを示す。S1Pは、複数の線維芽細胞の細胞タイプおよび筋線維芽細胞表現型への形質転換およびコラーゲン産生の繊維化促進機能も刺激する。S1Pの特異的な多様な作用およびbFGF、PDGFおよびTGF- β とのその既知の相互作用により、S1Pまたはおそらく他の生物活性脂質（例えばLPA）の効果または産生を拘束し、中和し、阻害する薬剤は、緑内障手術の失敗をもたらす創傷治癒および／または繊維化応答を調整するのに効果的であって、そして成功する外科的成果を強める有効な治療方法であろうと考えられる。薬剤は、例えば硝子体内または結膜下の注射または局所的注射を介して投与され得ることが想定される。

【0105】

角膜移植

角膜移植(penetrating keratoplasty(PK))は、ヒトにおいて最も成功している組織移植方法である。米国では毎年47,000例の角膜移植が行われるが、角膜の同種移植片拒絶（反応）は、依然として角膜移植片の失敗の主な原因である[Ing JJ et al. (1998)、Ophthalmology、vol 105: 1855-1865]。現在、我々は、免疫抑制および免疫制御が有望な方法であり得るが、同種移植片拒絶反応を回避するのに十分な力を持っていない。最近、CD4(+)T細胞が角膜の同種移植片の拒絶反応の際にヘルパー細胞ではなくエフェクター細胞として直接的に機能することが発見された[Hegde S et al. (2005)、Transplant、vol 79: 23-31]。マウスの試験では、拒絶を受けている角膜の間質において好中球、マクロファージおよびマスト細胞の数の増加が示された。マクロファージは、主要な浸潤細胞タイプ、続くT-細胞、マスト細胞および好中球のタイプであった。リスクの高い角膜移植における初期のケモカインの発現は、IL-8（マクロファージ炎症タンパク質-2）および単球走化性タンパク質-1（MCP-1）のマウスホモログであった[Yamagami S et al. (2005)、Mol Vis、vol 11、632-40]。

【0106】

FTY720 (FTY)は、リンパ球トラフィックを変更させることによって作用する新規の免疫抑制剤である；周辺血液リンパ球減少およびおよびリンパ節においてリンパ球数増加をもたらす。FTYは、リンパ球で発現したいくつかのS1Pレセプターに結合することによって、その免疫調節効果を媒介する[Bohler T et al. (2005)、Transplantation、vol 79: 492-5]。該剤を経口的に投与し、一回の経口用量により周辺リンパ球数を30-70%まで低下させた。FTYは、CD8(+)細胞よりも多い、T-細胞サブセット、CD4(+)細胞を低下した[Bohler et al. (2004)、Nephrol Dial Transplant、vol 19: 702-13]。FTY処理マウスは、経口投与した場合に、同所角膜移植片生着期間に関する有意な延長を示した[Zhang et al.

(2003)、Transplantation、vol 76: 1511-3]。FTY経口処置は、角膜の異種移植のラット-対-マウスモデルにおける拒絶を顕著に遅延させ、その重症度を低下させた[Sedlakova et al. (2005)、Transplantation、vol 79、297-303]。同種移植片拒絶反応の既知の発病およびS1Pシグナル伝達の効果を調節することにより角膜移植片生着期間を改善できることを示唆するデータと組み合わせることにより、生物活性脂質の有効濃度を低下させる免疫部分、例えばSPHINGOMABは、免疫学的症状、例えば同種移植片拒絶反応の処置において、例えば免疫応答を軽減する処置に有用であり得る、即ち、PK後に角膜移植片生着期間を改善するようであることが考えられる。該薬剤は、全身投与に加えて、局所投与、例えば局所的な眼周囲を介してまたは眼球内送達が可能であり得るさらなる利点を示し得る。

【0107】

炎症または免疫成分を有する他の眼球疾患には、慢性硝子体炎、感染症、単純単純ヘルペス、ヘルペス帯状疱疹および原生動物感染症、および眼球ヒストプラズマ症が包含される。

【0108】

瘢痕化を特徴とする前方セグメント疾患

また、生物活性脂質を標的化する抗体を用いる処置は、眼の前方部分の瘢痕化を特徴とするいくつかの症状が有効であると考えられた。これらは後記のものを包含する：

【0109】

外傷

眼の前方構造としての角膜は、物理的外傷をもたらし得る空気中のゴミから鈍い外傷にわたり様々な危険にさらされる。角膜および眼の前方表面は、手術外傷、および化学的、例えば酸およびアルカリによる傷に関する他の形態にもさらされ得る。創傷のこれらのタイプの結果は壊滅的であり得、角膜および結膜の瘢痕化シンプルフエラ (symblephera) 形成をもたらすことも多い。さらに角膜の新血管形成が結果として起こりうる。好中球は、ロイコトリエンのその放出を蓄積させ、そしてインターロイキン-1およびインターロイキン-6の存在は、角膜に浸潤する炎症性細胞の一連の波を動員するように働き[Sotozono et al. (1997)、Curr Eye Res、vol 19: 670-676]、角膜組織および角膜溶解のさらなる損傷および分解をもたらすタンパク質分解酵素を放出する。さらに角膜および結膜の線維芽細胞が活性となり、侵入してコラーゲン沈着および線維症をもたらす。過剰な炎症および瘢痕化の副作用はTGF- β によって促進される[Saika S et al. (2006)、Am J Pathol vol 168、1848-60]。この過程は角膜の透明性の損失および視力低下をもたらす。低下した好中球浸潤および低下した線維症を含む炎症の低下は、アルカリ焼けした角膜のマウスモデルにおいて迅速かつより完全な治癒をもたらした[Ueno et al. (2005)、Ophthalmol Vis Sci、vol 46: 4097-106]。

【0110】

眼球瘢痕性類天疱瘡(OCP)

OCPは、結膜に主に影響する慢性瘢痕性(瘢痕を形成する)自己免疫疾患である。該疾患は常に進行性であり、予後は非常に悪い。その最終ステージにおいて、結膜の瘢痕化および関連した角膜症は両眼の失明をもたらす。組織学的に結膜は、粘膜下の瘢痕化および慢性的な炎症を示す、ここでマスト細胞の関与は驚く程大きい[Yao L et al. (2003)、Ocul Immunol Inflamm、vol 11: 211-222]。自己抗原は自己抗体の形成をもたらす。自己抗原に対する自己抗体の結合は、Tリンパ球浸潤によるイベントの複雑な一連の動きにおいて開始し、CD4(ヘルパー)細胞はCD8(抑制因子)細胞よりも遙かに数が多い。マクロファージおよびマスト細胞の浸潤、さらに炎症促進性および前繊維性サイトカインの放出も、結果としておこる。サイトカイン誘導性の結膜線維芽細胞の増殖および活性化は、上皮下の線維症の結果として(参照、下記明細書の実施例)おこる。この試験から、OCP罹患患者における結膜線維症におけるTGF- β およびIL-1の役割が示された[Razzaque MS et al. (2004)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 45: 1174-81]。

【0111】

スティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)および中毒性表皮壊死剥離症(TEN)

10

20

30

40

50

SJSおよびTENは、生命を脅かす治療薬に対する副作用である。これらの2つに関連した症状は、重度であり、眼球および眼瞼結膜、瞼および角膜の病理学的変化を包含する。薬剤および感染症が最も一般的な誘発因子である。慢性的な眼の知見には、瘢痕化、瞼球癒着形成、および開始炎症性の過程の結果として結膜の瘢痕形成が包含される。これは、眼瞼内反形成、睫毛乱生症および涙液層の不安定化をもたらす。眼球表面の分解は、角膜の瘢痕化、新血管形成、および重症な例では角質化をもたらす。OCPのように、結膜上皮下の線維化がおこる。薬剤または感染に対する活発な自己免疫リンパ球応答は、SJS/TENの進行中に働くと考えられる[Harilaos et al. (2005)、Erythema Multiforme、Stevens Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis, in Cornea 2nd edition. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia]。SJSにおける浸潤性細胞集団は、マクロファージ、CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を包含する。この細胞集団は、化学損傷に見られるものと類似している[Kawasaki et al. (2000)、J Ophthalmol、vol 84: 119 1-3]。

10

【0112】

翼状片

臨床的翼状片は、眼瞼間の割れ目に存在する肉厚な血管の密集体からおこる。翼状片本体は、肉厚な線維性血管の密集体である。活性な翼状片は、著しい血管充血および累進的増殖を特徴とする。それらは、この眼球に強固に付着する。進行した症例では、翼状片は、角膜上に侵入して、視軸内で角膜の透明性の損失または通常ではない乱視、その後の視力障害を引き起こし得る。臨床的症状としては、患者は、異質な身体感覚、過剰な涙およびばやけた視力を経験し得る。組織病理的には、固有質の上皮下結合組織のヒアルイン化、増加した線維芽細胞数および増加したマスト細胞数を示す[Butrus et al. (1995)、Am J Ophthalmol、vol 119: 236-237]。翼状片の管理は問題をのこす。多くは、外科的切除が行われるが再発率は高い(Krag et al. (1992)、Acta Ophthalmol、vol 70: 530]。翼状片の再発率を下げるために、多様な薬理アジュバンド、例えばマイトマイシン-Cおよびダウノルビシンなどが用いられている。これらは有用であり得るが、長期データは限られており、それらは胸膜薄層化および角膜溶解に関わる。DoughertyらおよびLeeら[Dougherty et al. (1996)、Cornea、vol 15: 537-540 および Lee et al. (2001)、Cornea、vol 20: 238-42]は、VEGFが翼状片の進行中に重要な役割を担い、翼状片の上皮組織においてVEGFおよび一酸化窒素を同定できたことを初めて示した。これらの研究者は、VEGFは、他のサイトカインと同様に、翼状片の特徴的な増殖中に線維性血管に関与するという仮説をたてた。初回のおよび再発の翼状片の両方において、塩基性FGFおよびTGF- β 1の存在が示されており[Kira et al. (1998)、Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol、vol 236: 702-8]、そして発表された形態学および免疫組織学化学的証拠は、血管形成が翼状片形成における役割を担い得るという概念をさらに支持するものであった[Marcovich et al (2002)、Curr Eye Res、vol 25:17-22]。他の試験は、翼状片発達に関連し得るメディエーターとしてIL-6およびIL-8、さらにVEGFと関連がある[Di Girolamo et al. (2006)、Invest Ophthalmol Vis Sci、vol 47: 2430-7]。翼状片形成および増殖に対する有効な薬剤は、外科的介入の必要性を低減させるか、または再発率を減少させ得る。

20

30

【0113】

繊維成長、線維症または瘢痕化成分を有する他の眼球疾患および症状は、AMD、糖尿病性網膜症、未熟児の網膜症、鎌状細胞網膜症、虚血性網膜症、網膜血管閉塞性疾患およびコンタクトレンズ過剰装着を包含する。

40

【0114】

まとめると、過剰な瘢痕化は、多くの眼球および非眼球疾患および症状の病態生理に関する根本的な要素である。生物活性脂質様のS1PおよびLPAがこの過程および抗体関連処置において、これらの剤の濃度を減少させるように機能することは、該処置を受ける患者に対して治療的利益をもたらす。一実施形態において、生物活性脂質の阻害剤、特にS1Pおよび/またはLPAに対するモノクローナル抗体は、外科的および外傷性創傷治療応答を調節する際に有用であると考えられる。

50

【0115】

強皮症の処置のための抗S1Pおよび抗LPA抗体

本発明の組成物および方法は、少なくとも部分的には異常な新血管形成、血管形成、繊維成長、線維症、癭痕化、炎症および免疫応答を特徴とする障害および疾患を処置するために有用である。一つのかかる疾患が強皮症であって、これは全身性硬化症としても示される。

【0116】

強皮症は、皮膚の癭痕化または増粘化を引き起こし、時には、肺、心臓、および／または腎臓を包含する他の身体区分にも関する自己免疫疾患である。強皮症は、身体中の皮膚および臓器において、結果として機能低下と共に増粘化および関連区分の硬化をもたらし得る癭痕組織(線維症)の形成を特徴とする。今日、強皮症財団によればアメリカ人は約300,000人が強皮症を有する。罹患している3分の1またはそれ以下の者は広範囲の疾患を有し、残る3分の2の患者は主に皮膚疾患を示す。該疾患は肺に作用して癭痕化をもたらす場合に、この肺が機能すべきようにはもはや拡張できないために、呼吸が制限されるようになり得る。呼吸の能力を測定するために、医師は強制肺活量(FVC)を評価する装置を用いる。予測値の50パーセント未満のFVCを有する人々において、強皮症に関連した肺疾患由来の10年間の死亡率は約42パーセントである。死亡率が非常に高い一つの理由は、現在利用出来る効果的処置がない点である。

【0117】

この出願の実施例において記載したとおりに、S1PおよびLPAが、線維芽細胞活性化、増殖および不適切な癭痕化および再構築と関連する線維芽細胞の活性増加をもたらし得る繊維誘発性増殖因子であることを示す証拠が存在する。さらに、皮膚および線維芽細胞の他のタイプにおける活性においてS1PおよびLPAについて働き得ることを示した。例えば、LPAがマウス皮膚線維芽細胞の遊走を刺激し(Hama, et al., J Biol Chem. 2004 Apr 23;279(17):17634-9)、そしてヒト皮膚線維芽細胞はいくつかのS1Pレセプターサブタイプを発現する(Zhang, et al., Blood, 1999 May 1;93(9):2984-90)ことが示されてきた。線維芽細胞活性に対するS1Pの多くの直接的な効果に加えて、S1Pは線維芽細胞の活性に対する多くの潜在的な間接的効果も示し得る。例えば、S1Pは、他の十分知られた前繊維性因子、例えばTGF- β および血小板由来成長因子(PDGF)の作用を促進し得る。TGF- β は、線維症の最も広範に研究されかつ認識される因子の一つである(Desmouliere, et al., J Cell Biol 122: 103111, 1993)。TGF- β は、SphK1発現および活性を上方調節して、メタロプロテイナーゼ1 (TIMP-1)の組織阻害剤、ECM分解を阻害するタンパク質の発現増加を(Yamanaka, et al., J Biol Chem 279: 53994-54001, 2004)。TIMP-1の発現増加は、心不全患者における間質性線維症および拡張機能不全と関連がある(Heymans, et al., Am J Pathol 166: 15-25, 2005)。結果として、S1PはTGF- β の発現を刺激し、TGF- β を放出する(Norata, et al., Circulation 111: 2805-2811, 2005)。S1P および PDGFの間のクロストークの明確な証拠もある。S1Pは、直接PDGFの発現を刺激する(Usui, et al., J Biol Chem 279: 12300-12311, 2004)。さらに、S1P₁レセプターおよびPDGFレセプターは互いに結合し、その会合は多様な細胞タイプの増殖および遊走に関与する下流シグナル伝達経路のPDGF活性化に必要である(Long, et al., Prostaglandins Other Lipid Mediat 80: 74-80, 2006; Baudhuin et al., Faseb J 18: 341-343, 2004)。そのようなものとして、線維症に対するTGF- β およびPDGFの効果は、部分的に、S1Pシグナル伝達経路を伴うクロストークが理由であり得る。そのようなものとして、本発明の組成物および方法は、特定の標的脂質、例えばS1Pおよび／またはLPAの有効なインビボ濃度を低下させることにより、特に強皮症を処理するために使用し得る。

【0118】

全身性の強皮症は、PDGFレセプターに対する刺激性自己抗体によって悪化し得ると考えられ(Baroni, et al., N Engl J Med. 2006 v354(25):2667-76)、そしてPDGFレセプターがTGF- β への応答における強皮症線維芽細胞において上方調節され得る(Yamakage, et al., J Exp Med. 1992 May 1;175(5):1227-34)。S1P、PDGFおよびTGF- β のシグナル伝達系

における実質的なクロストークのため、S1P生物活性を抗S1P薬剤により遮断すること(例えば、抗S1P mAb)により、PDGFおよびTGF- β の硬化促進硬化を間接的に緩和できた。さらに、かかる抗S1P薬剤による処置は、皮膚に対するS1Pの直接的な効果および疾患進行に関与する線維芽細胞の他の形態を緩和することによって、強皮症患者のためになり得た。

【0119】

3. 投与方法

疾患および症状、例えば上記に示した例についての処置は、様々な製剤および装置を用いる様々な経路によって行われ得る。適切な医薬的に許容し得る希釈剤、担体および賦形剤は、当業者にはよく知られている。任意の特定の処置法のために投与されるべき量は容易に決定できると当業者には理解される。適切な量は、10g/用量～10g/用量の範囲内、好ましくは10mg/用量～1g/用量の範囲内にあると考えられる。

10

【0120】

薬剤物質は、当業者には既知の技術により、全身、皮下、皮内、経粘膜、吸入および局所投与により投与され得るが、これらに限定するものではない。この粘膜は、身体内腔をつなぐ上皮組織を指す。例えば、粘膜は、口、食道、胃、腸および肛門を含む消化管;鼻腔、気管、気管支および肺を含む気道;および性器を包含する。この明細書の目的としては、粘膜には、眼の外表面、即ち角膜および結膜を包含する。局所投与(全身性投与とは反対として)は、この方法は、潜在的な全身性副作用を制限できるが、治療効果も依然として認められるため有利であり得る。

20

【0121】

本発明において使用された医薬組成物は、これらに限定するわけではないが、溶液、エマルジョン、およびリポソーム含有製剤を包含する。これらの組成物は、これらに限定するわけではないが、前もって作成された液体、自己乳化固体および自己乳化半固体を包含する多様な成分から調製され得る。

【0122】

本発明において使用された医薬製剤を、医薬産業ではよく知られている従来技術に従って調製できる。かかる技術は、医薬担体または賦形剤と共に活性成分を会合させるステップを包含する。好ましい担体は、特に該組成物がヒトにおいて使用する治療を意図される場合に、医薬的に許容し得るものを包含する。非ヒト治療用途のために(例えば、愛玩動物、家畜、魚または家禽の処置において)、獣医学用担体も用い得る。一般的には、該製剤は、活性成分を液体担体または正確に分割される固体担体または両方と、均一かつ密接に会合へ導くことによって調製され、次いで必要であれば生成物を成形し得る。

30

【0123】

本発明の組成物は、多くの可能な用量形態、例えば、錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、座薬および浣腸剤の何れかに製剤され得るが、これらに限定するものではない。本発明の組成物は、水性、非水性または混合媒体中の懸濁液として製剤され得る。水性懸濁液は、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールおよび/またはデキストランを包含する懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含有し得る。該懸濁液はまた安定剤を含有できる。

【0124】

一実施形態において、該医薬組成物は、泡状物として製剤および使用され得る。医薬形態は、例えば、これらに限定しないが、エマルジョン、ミクロエマルジョン、クリーム、ゼリーおよびリポソームを包含する製剤である。

40

【0125】

基本的には天然と同様に、これらの製剤は成分および最終生成物の粘度は変化する。かかる組成物および製剤の調製に対するノウハウは、医薬および製剤分野の技術者には一般的に知られており、本発明の組成物の製剤に適用できる。

【0126】

一実施形態において、免疫誘導成分は、例えば、局所用点滴剤または軟膏、眼周囲の注射を介して、前房または硝子体中へ体腔内的に、埋め込まれた徐放性剤を介して、または

50

注射により全身性的にまたは経口投与を介して、眼に送達され得る。使用される抗体の量は当業者によって容易に決定できる。

【0127】

眼への治療剤を送達する伝統的な方法は、局所用途、全身性投与後の眼への再分散または直接的な眼球内/眼周囲の注射を包含する[Sultana et al. (2006), Current Drug Delivery, vol 3207-217; Ghate and Edelhauser (2006), Expert Opinion, vol 3275-287 and Kaur and Kanwar (2002), Drug Develop Industrial Pharmacy, vol 28: 473-493]。抗S1P、抗LPAまたは他の抗生物活性脂質抗体治療法は、これらのいずれかの方法と共に使用できるようなのであるが、全ての方法は利点および欠点がある程度認識されている。局所点滴剤は便利であるが、用いた薬剤の5%未満を、眼の前方部分、さらに眼球の後方部分に該用10量のさらにより少量の分画へと送達する鼻涙排液により主に洗い流される。点滴剤に加え、スプレーは、局所投与のための別の様式を許容する。3つめの様式は、製剤と眼球表面との接触時間を長くするために使用され得る眼の軟膏またはエマルジョンである、しかし、不鮮明な視力および瞼のもつれが問題となり得る。眼球疾患を処置するための治療剤の全身性投与は、全身を薬剤の毒性に暴露する可能性があるため、このような局所的方法は依然として好ましい方法である。

【0128】

眼の後方区分の処置は医学上重要である。この理由は、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、後部ブドウ膜炎および緑内障が米国および他の先進国で失明の主な原因であるためである[Myles et al. (2005), Adv Drug Deliv Rev; 57: 206379]。後方部分への薬剤送達20の最も有効な様式は、扁平部を介する硝子体内の注射である。しかしながら、直接的注射は、該送達を有効にするには熟練した医療従事者を必要とし、多くの患者において処置を制限する懸念がおきる。眼周囲の注射は、即ち結膜下、眼球裏、眼球周辺および後部テノン嚢下注射を包含する方法は、いくらか硝子体内の注射よりも侵入性が低い。反復性のおよび長期の硝子体内注射は、合併症、例えば硝子体出血、網膜剥離または眼内炎を引き起こし得る。

【0129】

抗生物活性脂質抗体処置は、より新しい眼球送達系の一つを用いて行われてもよく[Sultana et al. (2006), Current Drug Delivery, vol 3207-217 および Ghate and Edelhauser (2006), Expert Opinion, vol 3275-287]、これには徐放または制御された放出系を30包含する、例えば(a)眼球挿入体(可溶性、浸食性、非浸食性またはヒドロゲルを基にした)、角膜保護物、例えば眼に対する薬剤の制御した送達を提供するコラーゲンを基にした包帯およびコンタクトレンズ、(b)眼内でゲル形態に変換される点滴剤として投与の簡易性を提供し、これにより眼内の薬剤のある程度の徐放効果を提供するインシチュのゲル化系、(c)標的化送達、生体適合性および視力のぼやけがない利点を提供する小胞系、例えばリポソーム、ニノソーム(niosomes)/ディスコム(discomes)等、(d)眼内での良好な保持を提供する粘膜付着系、(e)プロドラッグ、(f)浸透エンハンサー、(g)凍結乾燥した担体系、(h)微粒子、(i)サブミクロンエマルジョン、(j)イオントフォレーシス、(k)デンドリマー、(l)生体付着性のミクロスフェアを包含するミクロスフェア、(m)ナノスフェアおよび他のナノ粒子、(n)コラソーム(collasomes)および(o)相加的またはより40相乗的な、有価な効果を提供するために1以上の上記した系を組み合わせる薬剤送達系を包含する。これらの方法の大部分は、眼の前方セグメントを標的とし、前方セグメント疾患を標的とするのに有効であり得る。しかしながら、比較的低分子量の脂質は眼内での脂質の十分な移動を許容するようであるので、1以上のこれらの方法は眼の後方領域中の生物活性脂質の濃度に影響する依然として有用なものであり得る。さらに、低分子量の抗体変形物、例えばFabフラグメントが製造されれば、眼の前方領域に導入された抗体は、眼の至るところに遊走することができる可能性がある。後方セグメントに対する徐放性薬剤送達系は、例えば認可されたものや、開発中のもの(文献を参照されたい、上掲)も用いることができる。

【0130】

10

20

30

40

50

先に記載したように、後部網膜、脈絡膜および黄斑疾患の処置は、医学上非常に重要である。これに関して、経強膜的イオントフォレーシス[Eljarrat-Binstock and Domb (2006)、Control Release、110: 479-89]は、重要な前進であり、眼の後方セグメントに抗体を送達する効果的な方法を提供し得る。

【0131】

また、治療の性能を改良するために製剤化した抗体に添加され得る様々な賦形剤は、この治療をより便利にするか、または製剤化した抗体がその意図し、認可された目的のためにのみ使用されることを明らかに確実にする。賦形剤の例示には、pHを制御する化学物質、抗菌薬、抗体効力の失効を防ぐための保存剤、眼球使用専用の製剤を同定するための染料、製剤中の抗体の濃度を増加させる可溶化剤、浸透エンハンサー、および浸透圧および/または粘度を調節するための薬剤の使用が包含される。例えばプロテアーゼの阻害剤は、抗体の半減期を伸ばすために添加され得る。一実施形態において、抗体は、眼にとって適切なpHのリン酸塩緩衝食塩水を含む溶液を硝子体内注射によって眼に送達される。

10

【0132】

抗体は、化学的に修飾され、先に上記した製剤または装置の一つにおいて投与されるプロドラッグを与える。次いで、抗体の活性形態は、内生の酵素の作用によって放出される。この出願で考慮されるべき可能な眼球酵素は、様々なシトクロムp450、アルデヒドレダクターゼ、ケトンレダクターゼ、エステラーゼまたはN-アセチルグルコサミダーゼである。他抗体に対する化学修飾は、その分子量を増加させ、結果として眼における抗体の滞留時間を増加させる。かかる化学修飾の例はペグ化であって[Harris and Chess (2003)、Nat Rev Agent Discov; 2: 214-21]、官能基、例えばジスルフィド [Shaunak et al. (2006)、Nat Chem Biol ; 2:312-3]またはチオール [Doherty et al. (2005)、Bioconj Chem ; 16: 1291-8]に対して一般的または特異的であり得る方法である。

20

【0133】

実施例

本発明は、下記の詳細な実施例について引用文献によってさらに説明される。これらの実施例は本発明の範囲を制限すると考えるべきではない。

【0134】

下記に記載したデータについて、インビトロ試験を3回行い、これを少なくとも3回繰り返す、インビボ試験を少なくとも5匹のマウスで行った。全ての試験において、統計学的分析を、スチューデントT検定またはGraphPad softwareを用いるANOVAを用いて行った。利用可能である場合、データを $p \leq 0.05$ を示す*と共に、平均±SEMとして示した。

30

【0135】

実施例1. SPHINGOMABは、CNVのマウスモデルにおいてCNVおよび瘢痕形成を有意に低下した

メス C57BL6/J マウスを、Bruch膜のレーザー誘導性の裂傷に供し、生理食塩水 (2 μ l) で希釈したSphingomabまたはアイソタイプが一致した非特異的(NS)抗体 (0.5 μ g) を投与した。レーザー裂傷14および28日後にマウスを屠殺した。

【0136】

CNV病変を誘導するために、眼用トロピカミド(0.5%)およびフェニレフリン(2.5%)を用いて瞳孔を広げた。カバースリップをこの眼上においた。50 μ mのスポットサイズで100 m secパルスで150 mWにて送達させるように設定したスリットランプを連結させたOculight GL 532 nm (Iridex Corporation、Mountain View、CA)を使用して、9、12および3時の相対位置で、視神経円板からおおよそ50 μ mに位置する右眼の3象限においてBruch膜の裂傷を為した。左眼は、全症例におけるコントロールとして提供した。集簇した蒸気泡または病変と関連のないあらゆる病変を分析から排除した。

40

【0137】

CNV病変サイズを測定するために、強膜-脈絡膜RPE複合体の脈絡膜のフラットマウント (flatmounts) を調製し、血管系について染色した(R. コマジーアグルチニンI; 赤)および周皮細胞(CD140b; 緑)。デジタル画像を、RGB Spot 高性能デジタルカメラを用いて落射

50

蛍光のZeiss Axioplan 2およびレーザースキャニング共焦点顕微鏡(BioRad MRC 1024、BioRad Corporation、Temecula、CA)を用いて捕捉した。容量分析のために、z系の捕捉を用いて、z系病変全体の領域の合計をzの厚み(4 μ m)に乗じて、病変体積を得た。

【0138】

コラーゲン沈着を評価するために、強膜-脈絡膜RPE複合体をマッソン・トリクロームにて染色した。強膜-脈絡膜RPE複合体を、パラフィンに埋抱して、次いで厚さ6ミクロンの連続断片とした。病変あたりおおよそ30セクションを評価した。コラーゲン沈着の容量に関する定量をCNV病変容量について説明したとおりに同じ手法で計算した。

【0139】

捕捉したデジタル画像を、ImageJ softwareを用いて形態計量的に評価した(Research Services Branch、National Institutes of Health、Bethesda、MD)。図1Aは、SPHINGOMABが、Bruch膜のレーザー誘導性の裂傷14および28日後の脈絡膜の新血管形成を劇的に低減させたことを示す。図1Bは、SPHINGOMABが、Bruch膜のレーザー誘導性の裂傷28日後にCNV病変形成と関連のある線維症を低下させることを示す。

【0140】

実施例2. SPHINGOMABは、内皮細胞遊走および管形成の阻害を包含する複数のメカニズムにより新血管形成を阻害する

S1Pは、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)の遊走を促進し、マトリゲルおよび他のアッセイにおいてはインビトロでのデノボBV形成を促進する[112]；SPHINGOMABはS1Pのこれらの効果を中和できる。実験は、Visentin et al. (Cancer Cell 2006 Mar;9(3):225-38)に記載のとおり実施した。図2Aにおけるデータは、GFが低下したマトリゲル上に播種したHUVECがS1Pの存在下に複数の毛細管様構造を形成し、そしてS1Pの非存在下またはSPHINGOMABおよびS1Pとの同時のインキュベーションした場合には、毛細管様構造を形成できなかったということを示唆する。図2Bのデータから、0.1-1 μ MのS1Pは、非処理HUVEC、またはマトリゲル化学浸潤アッセイにおいてSPHINGOMABと同時にインキュベーションしたHUVECよりも2-2.5倍のHUVEC遊走を刺激するという強力な能力が示される。併せると、これらの試験は、SPHINGOMABが、ECに対するS1Pの前血管新生効果を効果的に緩和できることを示す。

【0141】

実施例3. SPHINGOMABは、インビボのS1P、VEGFおよびbFGFの影響を緩和する複数のメカニズムを介して新血管形成を阻害する

インビボの試験に基づく、S1Pが皮下に埋めたマトリゲルプラグ[54]へ内皮毛細血管成長を増加させることを示しており、我々は、SPHINGOMABがインビボで新規のBV形成を減少させ得ると考えた。これを調べるために、我々は、新血管形成のためにインビボのマトリゲルプラグアッセイを用いた。一組の実験において、マトリゲルに、1 μ M S1P、0.5 μ g/mL bFGFまたは1 μ g/mL VEGFのいずれかを加え、次いでマウスにI.P.注射した(n=4)。10日後にマウスをヘパリン化し、増殖性のBVを形成する血管ECによって発現した細胞接着因子に結合する蛍光性レクチンであるイソレクチンB4-FITCと共に注射した。プラグを切り出して、OCT中で凍結させ、断面化し、FITC染色したBVについて観察した。図3Aにおけるデータは、bFGFまたはVEGFを含有するプラグと比較して、S1Pを含有するプラグ中では、FITC染色したBVの膨大な量により証明されるように、S1PはbFGFまたはVEGFよりもインビボの新血管形成のより強力な刺激因子であることを示唆する[Lee, et al., (1999)、Biochem Biophys Res Commun, vol 264: 743-50]。

【0142】

次いで、プラグのセクションを、EC浸潤の評価のためにヘモトキシリンとエオシンを用いて染色した(図3B)。ECの浸潤は、新血管形成における重要過程である。S1Pを含有するプラグは、マトリゲルのみのプラグと比較して、3倍のEC浸潤の増加を示した。他の細胞型、例えば免疫細胞も染色され得ることを認められたが、細胞浸潤はECであると仮定される。SPHINGOMABを48時間ごとに(プラグ埋め込み一日前に始めた)全身投与したマウスは、S1Pをマトリゲルプラグに添加した場合であっても、低下したEC浸潤の量を示した。これらの結果は、SPHINGOMABがインビボでEC浸潤を阻害する能力を示す。

【0143】

血液および周辺組織由来の内生S1Pは、血管新生誘導性刺激を用いて創傷を提供できる。創傷中の内生S1Pを減少させるSPHINGOMABの能力を調べた。最適に刺激したプラグ(0.5 μ g/mL bFGFまたは10mg/mL VEGFを加えたマトリゲル)をマウスに埋め込んだ。マウスは、マトリゲル埋め込み1日前に開始して48時間ごとに、25mg/kg SPHINGOMABまたは食塩水のi.p.注射を受容した。各処置群(マトリゲル、マトリゲル+GFまたはマトリゲル+GFとSPHINGOMAB投与)は、最小6匹のマウスから構成される。10日後にマウスをヘパリンで処理し、イソレクチンB4-FITCを用いて注射し、該プラグを切り出し、OCT凍結培地中に組み入れて、断面化した。微小血管密度を、図3Cに示したようにレクチン-FITC染色した血管によって定性的に評価した。BV染色はコントロール(非処理)プラグでは散在していたが、bFGFまたはVEGFを含有するプラグは血管新生に関する有意な証拠を示した。SPHINGOMABで処理したマウス由来のプラグは、食塩水処理したマウス由来のbFGFまたはVEGFプラグと比較してBV形成における有意な低下を示した。染色した血管の定量化により、食塩水処理した動物と比べて、それぞれSPHINGOMABで処置した動物由来のVEGFまたはbFGF含有プラグの新血管形成において、5~8.5倍の低下を明らかとなった(図3C)。この評価は、さらに、内生の血清および組織のS1Pが、微小血管新生を増強する能力、さらにSPHINGOMABが内生S1Pの血管新生誘発効果を中和する能力を示す。

10

【0144】

実施例 4. SPHINGOMABはインビボの瘢痕形成を阻害する

S1Pは、線維芽細胞の遊走、増殖およびコラーゲン産生を活性することによって創傷治癒への大いに貢献する；SPHINGOMABはこれらの効果を中和する。複数の型の線維芽細胞を使用するいくつかの試験から、創傷治癒を促進するS1Pの能力が確認された：1)S1Pは、標準方法を用いて³H-チミジン取り込みによって測定したようにSwiss-3T3 線維芽細胞の増殖を増加させた(図4A)；2)S1Pは、標準的なスクラッチ創傷治癒アッセイにおいて心臓の線維芽細胞の遊走を促進した(図4B)；3)S1Pは、免疫蛍光顕微鏡検査法により示されたように、コラーゲン1a GFPレポーターを持つトランスジェニックマウスから単離した心臓線維芽細胞によってコラーゲン発現を促進した(図4C)；および 4)免疫プロット分析を用いて、筋線維芽細胞マーカータンパク質である、 α -平滑筋アクチンの発現増加によって示したとおり、S1P誘導性のWI-38 肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への、瘢痕再構築において活性である細胞への分化を誘導する(図4D)。これらのアッセイの各々において、SPHINGOMABは、S1Pのものを中和した。眼球線維芽細胞が、S1PおよびSPHINGOMABと同様に応答するであろうと予測される。瘢痕再構築およびその後の不適切な繊維状組織形成を包含する心血管疾患およびAMDの血管新生病変と間の類似性が注目されてきた；[Vine et al. (2005)、Ophthalmology, . vol 112: 2076-80 および Seddon and Chen (2004)、Int Ophthalmol Clin, . vol 44: 17-39]；即ち、SPHINGOMABは心血管系において効果が示されてきたものと同様に眼球新血管形成および瘢痕化に対する効力を有することが考えられる。Ipathでの試験は、マウスにおいて左下降冠動脈の結紮による永続的心筋梗塞(MI)後の心臓瘢痕形成を減少させるSPHINGOMABの効力を評価した。25mg/kg SPHINGOMABまたは食塩水の全身投与を手術48時間後に開始した。48時間での抗体投与は、通常の修復性の瘢痕形成が初期再構築段階中に起こり、MI直後に有利なS1P刺激性の血管形成が可能ないように選択された。梗塞二週間後にマウスを屠殺し、線維症を、心臓組織のマッソン・トリクローム染色によって評価した。SPHINGOMAB処置を受けた動物は、ほぼ完全に血管周辺の線維症の停止を示した(図4E)。あらゆる非特異的創傷治癒胃応答のためのコントロールとして、シャム動物は冠動脈結紮なしで開胸手術を受けた。

20

30

40

【0145】

実施例5：S1Pは、眼球上皮細胞および線維芽細胞の収縮性、瘢痕組織産生筋線維芽細胞への変換を促進する

病理学的組織線維症(瘢痕形成)は、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、未熟児の網膜症、増殖性硝子体網膜症および緑内障手術の影響を含む多くの眼球疾患における、重要な関与因子である。

50

【0146】

多くのこれらの障害において、循環する増殖因子およびケモカインは、通常の眼球細胞の、「筋線維芽細胞」と呼ばれてきた繊維収縮性の瘢痕組織産生細胞への形質転換を促進する。通常、筋線維芽細胞は、創傷治癒応答後の損傷の一部として組織修復に参与する。しかしながら、筋線維芽細胞の数および機能の変化は、肝臓、皮膚、肺、腎臓、心臓および眼における病理学的瘢痕組織形成を特徴とする疾患に関係がある。眼において、筋線維芽細胞表現型に対する網膜色素上皮(RPE)細胞の形質転換は、網膜剥離およびその後の視力障害の原因となる繊維収縮性膜の形成に関連する。さらに、眼球の線維芽細胞に関する筋線維芽細胞形質転換は、その後の視力障害に至る眼損傷後の異常な瘢痕組織産生をもたらし得る。筋線維芽細胞形成を促進する眼内の多くの循環性タンパク質因子が同定されてきたが、リゾリピド、例えばこの過程においてS1Pの役割に関しては全く知られていない。それ故に、我々は、いくつかのヒト眼球細胞系の筋線維芽細胞形質転換に対するS1Pの効果を試験した。図5に示したとおり、S1Pは、ヒト網膜色素上皮細胞(図5A)およびヒト結膜線維芽細胞(図5B)において α -平滑筋アクチン(α -SMA;筋線維芽細胞マーカー)の産生を刺激する。これらのデータは、S1Pが、眼球上皮細胞および線維芽細胞の、網膜剥離、眼球線維症およびその後の視力障害に参与し得る収縮性瘢痕組織産生筋線維芽細胞への形質転換を促進する化学物質因子が循環する環境内に存在するということを初めて示すものである。

10

【0147】

これらの実験において、S1Pの α -SMA発現を促進する能力は、濃度依存様式において網膜色素上皮細胞および結膜線維芽細胞の間で異なる。提示したように、 α -SMA 発現における有意な増加は、上皮細胞において0.001 μ M濃度にて観察され、その後10 μ M濃度で基底レベルにまで低下したことが観察された。対照的に、 α -SMA 発現における有意な増加が、結膜線維芽細胞中で10 μ M濃度でのみ観察された。この相違は、線維芽細胞と比較して、上皮細胞における高いS1Pレセプター発現から生じると考えられた。我々は、S1Pレセプターの発現レベルの増加を理由として、網膜色素上皮細胞は、低濃度でのS1Pに対してより感受性が高くなるようであると仮説をたてた。対照的に、高いS1Pレベルでの該レセプターは、感作されるかまたはおそらく取り込まれ、S1Pによる刺激低下をもたらす。

20

【0148】

コラーゲンは、身体内の全ての組織をサポートし、瘢痕組織の主要成分の一つである一次構造タンパク質の一つである。非病理学的環境において、組織内の全コラーゲン含量は、線維芽細胞によるコラーゲン産生および特定の酵素による分解の間のバランスによって維持される。瘢痕組織のレベル増加を含む多くの障害は、部分的に、瘢痕形成を必要とするコラーゲンの分解を阻害する生理学および分子プロセスをもたらす。我々は、瘢痕組織形成を促進するS1Pの能力は、コラーゲン分解を阻害するその能力に起因し、これによって臓器内の瘢痕組織の正味の増加をもたらすという仮説をたてた。そのため、我々は、ヒト結膜線維芽細胞においてプラスミノゲンアクチベーター阻害剤の発現(PAI-1)に対するS1Pの結果を試験した。高いPAI-1発現は、結合組織のタンパク質分解の低下と関連し、瘢痕化の増加を包含するいくつかの繊維性疾患と関連して上方調節される。図5Cに示したように、S1Pは用量依存様式でPAI-1発現を刺激する。これらのデータは、その分解を阻害するタンパク質の発現を刺激することによって瘢痕組織形成を促進し得ることを示唆しており、複数の機能的経路を通じてS1P機能が眼球疾患に関連した病理学的瘢痕化を促進および維持することを示唆するものである。

30

40

【0149】

実施例6：SPHINGOMABは、炎症性および免疫性細胞浸潤を阻害する

炎症は、再構築過程における一次応答である[7]。死細胞の食作用のために損傷領域へのマクロファージおよび好中球の遊走を刺激するサイトカイン発現の上方調節をもたらす、炎症性応答をさらに上方調節する[Jordan et al.(1999)、Cardiovasc Res, vol 43:60-78]ことは、虚血および細胞性損傷の両方により開始される。マスト細胞は、炎症性応答の重要な細胞性メディエーターである。マスト細胞由来のS1Pは、炎症の実験動物モデル

50

において見られる多くの副作用に関与している[Jolly et al (2004)、J Exp Med, . vol 199: 959-70 および Jolly et al (2005)、Blood, . vol 105: 4736-42]。

【0150】

CNVおよびCVDにおける免疫性および炎症性応答の類似性に基づいて、創傷中への免疫性細胞浸潤を緩和するためのSPHINGOMABの効力を、AMD中のこれらの損傷を緩和する際のSPHINGOMAB潜在的効果の指標としてマウス梗塞モデルにおいて評価した[Vine et al. (2005)、Ophthalmology, . vol 112: 2076-80 および Seddon and Chen (2004)、Int Ophthalmol Clin, . vol 44: 17-39]。MI後4日目に、それぞれMAC-1およびMCG35抗体を用いて、その危険性のある領域においてマクロファージおよびマスト細胞浸潤を評価した。SPHINGOMABは、炎症性マクロファージ(図6A)およびマスト細胞(図6B)の密度を劇的に軽減して、SPHINGOMABがAMD中の免疫性および炎症性損傷を中和し得ることを示唆する。

10

【0151】

実施例 7: SPHINGOMABはS1Pに対する特異性が高い

競合ELISAは、他の生物活性脂質と比較した、SPHINGOMABのS1Pに対する特異性を示す。SPHINGOMABは、S1Pまたはリゾホスファチジン酸(LPA)の即時代謝性前駆体である構造的および機能的にS1Pと類似している重要な細胞外シグナル伝達分子であるスフィンゴシン(SPH)との交差反応性がないことを示した。SPHINGOMABは、セラミド1-リン酸塩(C1P)、ジヒドロスフィンゴシン(DH-SPH)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、またはスフィンゴミエリン(SM)を包含する他の構造的に類似した脂質および代謝物を認識しなかった。SPHINGOMABは、ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸塩 (DH-S1P)と交差反応し、それほどではないがスフィンゴシルホリルコリン(SPC)と交差反応した(図7)。

20

【0152】

実施例8: 抗LPAmAbsの作成

これらの実験の全体にわたる目的は、LPA関連疾患、特に過剰な線維症を包含できるこれらの疾患の処置のために抗体を基にした治療を開発するために、LPAに特異的なmAbsを生成および作成することである。例えば、LPAは、コラーゲン遺伝子発現および線維芽細胞の増殖を刺激することによって、いくらかの直接的な繊維形成効果を示し得る [Chen, et al. (2006) FEBS Lett. 580(19):4737-45]。従って、抗LPAmAbは、過剰な線維芽細胞活性を特徴とする線維症および疾患の処置において有用であり得る。これらの疾患は、これらに限定するわけではないが、多様な眼球疾患、心臓再構築および心不全および強皮症を包含する。生物活性脂質であるLPAに対する抗体は、インビトロアッセイおよびインビボアッセイの両方において、治療および診断用途において有用性が高い良好な能力を示した。

30

【0153】

LPAに対するモノクローナル抗体(mAbs)を生成するために、80匹のマウスを、リゾホスファチジン酸(LPA、1-アシル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-リン酸塩)の派生物を用いて免疫化した。抗LPA抗体の存在を、免疫化したマウスの血清を免疫化後に3つの時点でELISAにより分析することによって決定した。免疫応答は、抗体応答時および到達レベル時の両時点で個々のマウス間で大きく変化した。全体的に、少なくともマウスの半数において有意な免疫学的応答(力価>125,000)を観察した。最も高い抗体力価を有する5匹のマウスをハイブリドーマ細胞系の開発を開始するために選択した。これらの5つの融合物から生成した2000をこえるハイブリドーマ細胞の一次スクリーニング後、29の抗LPAスクリーニングハイブリドーマ細胞系の全てがLPAへの結合を示した。これらのクローンのうち、24つをさらにサブクローニングし、ELISAアッセイのパネルにおいて特徴づけた。陽性を維持した14のクローンから、6つのクローンをさらなる特徴分析のために選択した。mAbのアイソタイプは、大部分の抗体に対してIgG1であった。

40

【0154】

一次スクリーニングにおいて、全てのmAbsを、12:0のLPAおよびS1Pに対するその結合特性について比較した。26 mAbs以外、5つのクローンはS1Pと交差反応した。12:0および18:

50

0のLPAに対する優れた結合を有する8つの抗LPAmAbsを、その特異性および結合特性についてさらに特徴分析した。

【0155】

6つの個々の細胞系由来のmAbsを、一連のアナログを用いる競合ELISAによりその特異性について、およびインビトロアッセイ(表1)のパネルにおけるその効力について完全に特徴付けた。大部分のmAbsは、LPAアイソフォームに対する特異性を示した。該抗体親和性は、ピコモル範囲にあると推測された。動物モデルにおけるさらなる試験により、これらのmAbsがLPA関連疾患についての治療に有望な基礎を提供できるかどうかを決定する。

【0156】

表面プラズモン共鳴を用いて、親和性および速度論を、6つのmAbs(表2)について測定した。全ての6つのmAbsは、類似の K_D 値(0.34~38 pMの範囲)および類似の速度論的なパラメーターにてLPAを結合した。多くのこれらの相互作用について、 k_d を、非常に遅く解離した複合体としてフィッティングプログラムにおいて $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ で固定した。また、表1は、高い濃度にてELISAプレートのウェルに結合した18:0および12:0のLPAと、これらの6つのmAbsの結合を示す。50%の有効濃度(EC_{50})および最大結合(MB)を示すmAb濃度を、被覆抗原として18:0および12:0のLPAを用いて決定した。 EC_{50} 値は、概ね18:0のLPAに対するよりもさらに低かった。mAb B3が、他のmAbsと比較して、12:0のLPAに対するよりも18:0のLPAに対してより高い結合選択性を示したことに注目する。

【0157】

抗LPA mAbsの特異性を、LPA変形物および関連生体脂質、例えば、ジステロイル-ホスファチジン酸、リゾホスファチジルコリン、S1P、セラミドおよびセラミド1-リン酸塩の組み合わせに対する結合を決定することによって評価した。 IC_{50} 、および様々なLPA-関連化合物に対する6つの選択したmAbs+2つのさらなるmAbs(504B58-3F8 および 504B104)の交差反応性を表3にまとめた。全てのmAbsは、12:0(ラウロイル)、14:0(ミリストイル)、16:0(パルミトイル)、18:1(オレオイル)、18:2(リノレオイル)および20:4(アラキドノイル)のLPA(表3)の間を識別したが、一方で、それらのものには、ジステロイルPAおよびLPC、すなわちLPAの即時代謝性前駆体に対する交差反応性を示すものはなかった。さらに、他の試験した脂質、例えばS1P、セラミドおよびセラミド1-リン酸塩の阻害効果は、無視できた。これらの知見は、抗LPAmAbsがリゾホスファチジン酸に対する抗体の高い特異性を示す前駆体脂質を包含するかかる構造的に類似する脂質を認識しなかったことを明確に示す。 EC_{50} についての順位は、不飽和脂質については $18:2 > 18:1 > 20:4$ であり、飽和脂質については $14:0 > 16:0 > 18:0$ であった。

【0158】

大変興味深いことに、18:1 LPAとの競合により6つのmAbsについての様々な挙動が明らかとなった。6つのmAbsのなかで、504B3は、最も低い IC_{50} (結合の50% 阻害)を示した。固定した18:1LPAへの mAb 504B3の直接的な結合は、添加した18:1のLPAの存在下で287 nMの IC_{50} 値にて効果的に遮断された。驚くべきことに、 IC_{50} 値はLPAへの結合に対するその各 K_d 値に近似していた。この IC_{50} 値は、その K_d (nM 範囲)に対して pM 範囲)よりも少なくとも100倍高かった。5つのmAbsは、競合アッセイにおいて示したように、18:1のLPAに対する特異性を示した。18:1のLPAは、固定した18:1のLPAに結合した mAb 63と競合しなかったが、ピコモル範囲内の K_d 値にてLPAを結合した。従って、全ての6つのmAbsがLPAに対して類似した親和性にて結合したが、6つのmAbsのうち5つは18:1のLPAに対して効果的および特異的な結合を示した。

【0159】

表1. 直接的な結合速度論

mAbsの増加量(40 ng/100 μ l 反応混合物)を、被覆抗原として12:0のLPAまたは18:0のLPA(0.1 μ M)への結合について試験した。

EC_{50} : 最高結合の50%を与える有効な抗体濃度。

MB: 最大の結合(OD450として表示)。

【0160】

【表 1】

	LPA-C12							
	B3	B7	B58	B58-3F8	B104	D22-1	A63-1	B3A6-1
HMC (nM)	2.420	0.413	0.554	0.463	0.559	1.307	0.280	0.344
Max (OD450)	0.809	1.395	1.352	1.404	1.402	0.449	1.269	1.316
	LPA-C18							
	B3	B7	B58	B58-3F8	B104	D22-1	A63-1	B3A6-1
HMC (nM)	1.067	0.274	0.245	0.187	0.313	0.176	0.298	0.469
Max (OD450)	1.264	0.973	0.847	1.000	1.016	0.353	1.302	1.027

10

【0161】

表2. 抗LPAマウスmAbsの結合親和性

LPAを、150の共鳴単位を範囲とする密度でセンサーチップに固定した。各mAbの希釈物を固定化したLPAに通過させ、速度定数を会合/解離段階の非線形回帰によって得た。誤差を、2回行い少なくとも3回の測定値を用いて、標準偏差として示した。みかけの親和性を $K_D = k_a/k_d$ によって決定した。

【0162】

 k_a = 会合速度定数、 $M^{-1}s^{-1}$ k_d = 解離速度定数、 s^{-1}

20

【表 2】

抗体分子	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
<u>A63</u>	$4.4 \pm 1.0 \times 10^5$	1×10^{-6}	2.3 ± 0.5
<u>B3</u>	$7.0 \pm 1.5 \times 10^5$	1×10^{-6}	1.4 ± 0.3
<u>B7</u>	$6.2 \pm 0.1 \times 10^5$	1×10^{-6}	1.6 ± 0.1
<u>D22</u>	$3.0 \pm 0.9 \times 10^4$	1×10^{-6}	33 ± 10
<u>B3A6</u>	$1.2 \pm 0.9 \times 10^6$	$1.9 \pm 0.4 \times 10^{-5}$	16 ± 1.2
<u>B58</u>	$2.9 \pm 1.6 \times 10^6$	1×10^{-6}	0.34 ± 0.019

30

【0163】

表3: LPA結合および活性の競合

【0164】

18:0のLPAを、ELISAプレートで捕捉した。各競合剤の脂質(10 μM まで)をBSA(1 mg/ml)-PBSで連続希釈し、次いでmAbs (3 nM)とインキュベーションした。その後、混合物を、LP A被覆ウェルに移して、結合抗体の量を二次抗体を用いて測定した。データを、最大シグナル(A_{450})に標準化してパーセント阻害として示した。アッセイをパラメーター分析につき3回行った。

40

【0165】

【表 3】

	14:0 LPA		16:0 LPA		18:1 LPA		18:2 LPA		20:4 LPA	
	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI
	uM	%	uM	%	uM	%	uM	%	uM	%
504B3	0.02	72.3	0.05	70.3	0.287	83	0.064	72.5	0.02	67.1
504B7	0.105	61.3	0.483	62.9	>2.0	100	1.487	100	0.161	67
504B58	0.179	66.7	3.061	>100	1.606	72.8	1.278	94.6	0.22	63.6
504B58-3F8	0.26	63.9	5.698	>100	1.5	79.3	1.240	92.6	0.304	79.8
504B104	0.32	23.1	1.557	26.5	28.648	>100	1.591	36	0.32	20.1
504D22-1	0.164	34.9	0.543	31	1.489	47.7	0.331	31.4	0.164	29.5
504A63-1	1.147	31.9	5.994	45.7	---	---	---	---	0.119	14.5
504B3A6-1	0.108	59.9	1.151	81.1	1.897	87.6	---	---	0.131	44.9

【0166】

IC₅₀：最大阻害濃度の半分

MI：最大阻害結合(阻害剤の非存在下での結合%)

---:弱い阻害のために評価できない

【0167】

材料および方法

生体脂質試薬:

全ての生体脂質を、HPLCおよび質量スペクトル分析法によって実体を確認したAvanti Polar Lipids から購入した。LPA誘導体を化学部門(Sandiego State University)にて合成した。全ての他の試薬を特記しなければFisherから購入した。

【0168】

DLPC: 1-パルミトイル-2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

【0169】

DASA: 1,2-ジステロイル- sn -グリセロ-3-リン酸塩;

14:0 LPA: 1-ミリストイル-2-ヒドロキシ- sn -グリセロ-3-リン酸塩

16:0 LPA: 1-パルミトイル-2-ヒドロキシ- sn -グリセロ-3-リン酸塩

18:0 LPA: 1-ステアロイル-2-ヒドロキシ- sn -グリセロ-3-リン酸塩

18:1 LPA: 1-オレオイル-2-ヒドロキシ- sn -グリセロ-3-リン酸塩

18:2 LPA: 1-リノレオイル-2-ヒドロキシ- sn -グリセロ-3-リン酸塩

20:4 LPA: 1-アラキドノイル-2-ヒドロキシ- sn -グリセロ-3-リン酸塩

S1P: D-エリスロ-スフィンゴシン-1-リン酸塩

【0170】

定量的ELISA:

マイクロタイター ELISA プレート(Costar, Cat No. 3361)を、37°C1時間、1M炭酸緩衝液 (pH 9.5)で希釈したウサギ抗マウスIgG、F(ab')₂ フラグメント特異的抗体(Jackson、315-005-047)を被覆した。プレートを、PBSで洗浄し、1時間37°CでPBS/BSA/Tween-20でブロッキングした。最初のインキュベーションについて、非特異的マウスIgG またはヒトIgG、全分子(校正曲線のために使用した)および測定されるべきサンプルの希釈物を、ウェルに添加した。プレートを洗浄し、1:40,000希釈したウェルあたり100 μlのHRP結合ヤギ抗マウス(H+L)と共に、1hr37°Cでインキュベートした(Jackson、cat No 115-035-146)。洗浄後、酵素反応をテトラメチルベンジジンにより検出し(Sigma、cat No T0440)、1M H₂SO₄を添加することによって停止した。光学密度(OD)を、Thermo Multiskan EXを使用して450 nmで測定した。生データを分析のためにGraphPad softwareに移した。

【0171】

直接的なELISA:

マイクロタイターELISAプレート(Costar、Cat No. 3361)を、37°Cで1時間、1M 炭酸緩衝液(pH 9.5)で希釈したLPA-BSAで被覆した。プレートをPBS(137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.1 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4)で洗浄し、PBS/BSA/Tween-20にて1時間室温でまたは終夜4°Cでブロッキングした。試験されるべきサンプルを0.4 µg/mL、0.2 µg/mL、0.1 µg/mL、0.05 µg/mL、0.0125 µg/mLおよび0 µg/mLおよび100 µlで希釈し、各ウェルに添加した。プレートを洗浄し、ウェルあたり100 µlのHRP結合ヤギ抗マウス(1:20,000希釈)(Jackson、cat No 115-035-003)と共に1時間室温でインキュベートした。洗浄後、酵素反応を、テトラメチルベンジジン(Sigma、cat No T0440)を用いて検出し、1 M H₂SO₄を加えて停止させた。光学密度(OD)を、Thermo Multiskan EXを用いて450nmで測定した。生データを、分析のためにGraphPad softwareにうつした。

10

【0172】

競合アッセイ:

mAbsの特異性を、ELISAアッセイで試験した。マイクロタイターELISAプレート (Costar、Cat No. 3361)を、37°Cで1時間1M 炭酸緩衝液(pH 9.5)で希釈した18:0 LPA-BSAで被覆した。プレートをPBS(137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.1 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4)で洗浄し、PBS/BSA/Tween-20にて1時間37°Cまたは終夜室温でブロッキングした。最初のインキュベーションについては、0.4 µg/mL 抗LPA mAbおよび設定した量(14:0、16:0、18:0、18:1、18:2 および 20:4)のLPA、DSPA、18:1 LPC (リゾホスファチジルコリン)、S1P、セラミドおよびセラミド1-リン酸塩を、ELISAプレートのウェルに添加し、37°Cで1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、1:50,000で希釈したウェルあたり100 µlのHRP結合ヤギ抗マウス(1:20,000希釈)(Jackson、cat No 115-035-003)またはHRP結合ヤギ抗ヒト(H+L) diluted (Jackson、cat No109-035-003)を、37°Cで1時間インキュベートした。洗浄後、酵素反応を、テトラメチルベンジジンを用いて検出し、1 M H₂SO₄を加えて停止させた。光学密度(OD)を、Thermo Multiskan EXを用いて450nmで測定した。生データを、分析のためにGraphPad softwareにうつした。

20

【0173】

抗体精製:

モノクローナル抗体を、0.5 mL/分でタンパク質 A/G カラム (Pierce、Cat.No 53133)に通して培養上清から精製した。移動相は、1X Pierce IgG 結合緩衝液(Cat.No 21001)および0.1 M グリシン (pH 2.7) (Pierce、Elution Buffer、Cat.No21004)を含有した。0.1 M グリシン中の抗体回収物を、pHを中和するために1Mのリン酸塩緩衝液 (pH 8.0)を用いて10% (v/v)で希釈した。IgG₁回収物をまとめて、1X PBS (Pierce Slide-A-Lyzer Cassette、3,500 MWCO、Cat.No 66382)に対して徹底的に透析した。溶出物を、1h、2,500 rcfで遠心分離により、Centricon YM-3(10,000 MWCO Amicon Cat.No 4203)を用いて濃縮した。抗体濃度を、標準として市販の骨髓腫IgG₁ストック溶液を用いて上記したように定量的なELISAによって決定した。mAbsの重鎖タイプをモノクローナル抗体アイソタイプキット(Sigma、ISO-2)を用いるELISAによって決定した。

30

【0174】

実施例 9: ヒト化抗S1Pモノクローナル抗体-SPHINGOMAB

40

この実施例は、特に好ましいヒト化モノクローナル抗体、特にS1Pと反応性のあるヒト化モノクローナル抗体を説明する。LT1009と呼ぶ抗体の構築、合成、精製および試験を、その全目的についてその完全性において、共有している、同時出願中の、現在提出されたU.S特許出願仮出願番号____/____,____ [attorney docket no. LPT-3010-PV、標題「スフィンゴシン-1-リン酸塩を結合するための組成物および方法」]において説明しており、出典明示により本明細書に組み込む。マウス抗S1P抗体と比較した場合、これらからLT1009を得た、このヒト化形態は、ピコモル範囲でS1P結合親和性、さらに優れた安定性およびインビボでの効力を示す。

【0175】

天然抗体のように、LT1009は、各抗体分子を含む2つの軽鎖ポリペプチドの各々および2

50

つの重鎖ポリペプチドの各々において、3つの相補性決定領域(各々「CDR」)を包含する。これらの6つのCDRの各々についてのアミノ酸配列を、下記に示す(「VL」は、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を示し、一方「VH」は免疫グロブリン重鎖の可変領域を示す):

CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [配列番号 1]

CDR2 VL: EGNILRP [配列番号 2]

CDR3 VL: LQSDNLPFT [配列番号 3]

CDR1 VH: DHTIH [配列番号 4]

CDR3 VH: GGFYGSTIWFDF [配列番号 5]

CDR2 VH: AISPRHDITKYNEFRG [配列番号 6]

【0176】

10

LT1009の重鎖および軽鎖ポリペプチドについてのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、下記に列挙した:

LT1009 HC ヌクレオチド配列[配列番号7]:

```

1  aagcttgccg ccacatgga atggagctgg gtgttctgt tctttctgtc
51  cgtgaccaca ggctgcatt ctgaggtgca gctgggagcag tctggagcag
101 aggtgaaaaa gcccgaggag tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga
151 tacatcttta tcgaccatac tattcactgg atgcgccaga tgcccgggca
201 aggcctggag tggatggggg ctatttctcc cagacatgat attactaaat
251 acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc
301 agcaccgcct acttgcaagt gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat
351 gtatttctgt gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc
451 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac
501 agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
551 tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gctgacacac cttcccggtc
601 gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
651 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
701 ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga
751 gggaggggtgt ctgctggaag ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcac
801 ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc
851 ttcacccgga ggctctgcc cgcccactc atgctcaggg agagggtctt
901 ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc
951 caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc
1001 catatccggg aggaccctgc ccctgaccta agccccccc aaaggccaaa
1051 ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctctccagc attccagtaa
1101 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca
1151 tgccaccgtg gccaggttaa gccagccag gcctcgccct ccagctcaag
1201 gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg
1251 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
1301 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga
1351 tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa
1401 gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa
1451 tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
1501 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
1551 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat
1601 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga
1651 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc
1701 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
1751 cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa
1801 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc

```

20

30

40

50

1851 ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc gacggctcct
 1901 tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
 1951 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
 2001 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag
 【0177】

LT1009 HC アミノ酸配列 [配列番号8]:

1 mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
 51 htihwmrmp qgglewmgai sprhditkyn emfrgqvttis adkssstayl
 101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdw gggtmvtvss astkgpsvfp
 151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv htfpavlqss
 201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
 251 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr
 301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpapi ektiskakgq
 351 prepqvtytlp psreemtknq vsltclvkgy ypsdiavewe sngqpennyk
 401 ttpvldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls
 451 lspgk

10

【0178】

LT1009 LC スクレオチド配列 [配列番号9]:

1 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
 51 gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgaag cagtctccat
 101 ccttctgtc tgcattgtga ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
 151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa
 201 agccccctaa ctcctgatct ccgaaggcaa tattcttcgt cctgggggtcc
 251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
 301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactgtt tgcagagtga
 351 taacttacca ttcactttcg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta
 401 cgggtggctg accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg
 451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
 501 agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact
 551 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
 601 agcagcaccg tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
 651 cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct
 701 tcaacagggg agagtgttag

20

30

【0179】

LT1009 LC アミノ酸配列 [配列番号10]:

1 msvptqvlgl lllwltldarc ettvtqpspf lsasvgrvtt itcitttdid
 51 ddmnwfqep gkapklise gnrlrpgvps rfsssgygtf ftltisklqp
 101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta
 151 svvcllnnfy preakvqwk dnalqsgnsq esvteqdsd styslsstlt
 201 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksf nrgc

40

【図面の簡単な説明】

【0180】

【図1】図1: SPHINGOMABは、眼球病変におけるCNVおよび癬痕形成を低下させる。マウスをSPHINGOMABまたはアイソタイプが一致した非特異的mAbにより処置した。CNV病変を、Bruchs膜の裂傷をレーザーにより誘導した。血管新生(A)についてはローダミン結合R. communisアグルチニンIによって、またはコラーゲン癬痕形成(B)についてはMasson's Trichromeによって染色した各処置群からの病変に関するグラフおよび代表的画像を示す。図1aは、SPHINGOMABが、Bruch膜のレーザー誘導性裂傷後の14および28日目に脈絡膜の新血管形成を劇的に減弱させることを示す。図1bは、SPHINGOMABが、Bruch膜のレーザー誘導性裂傷28日後にCNV病変形成と関連した線維症を有意に低下させることを示す。

50

【図2】図2：S1Pは、HUVEC管形成および遊走の誘導により新血管形成を促進し、SPHINGOMABにより低下される。パネルA:管形成を評価するためにHUVECのマクロファージをマトリゲル上に播種して、6hrsインキュベートした顕微鏡写真図。パネルB:HUVECをマトリゲル浸潤チャンバー内で1mM S1P ± SPHINGOMAB (1mg/ml)で6 hrs処理した。マトリゲル膜に遊走した細胞の数を、5つの独立した視野で計測した。

【図3】図3：SPHINGOMABは、S1P-、VEGF-およびbFGF-誘導性新血管形成を中和する。A:マトリゲルプラグ±GFのセクションから代表的なFITC染色BV。B:S1PはEC浸潤を刺激する。C:新血管形成の指標としてVEGFまたはbFGFで刺激したマトリゲルプラグからの相対的な蛍光の定量化。マウスをSPHINGOMABの1または25mg/kgを用いて全身的に処理した場合、S1P、VEGFおよびbFGFの効果が阻害された。

10

【図4】図4：SPHINGOMABは、S1P-刺激した瘢痕形成を中和した。線維芽細胞を、血清枯渴させた後に、12-24時間、0、0.1、0.5または1 μ MのS1P +/- 1 μ g/mL SPHINGOMABで処置した。S1Pは、3H-チミジン導入(A)、スクラッチアッセイにおけるマウス心臓線維芽細胞遊走(B)、コラーゲン-GFPを発現するトランスジェニックマウスから単離した心臓線維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現(相対的な蛍光)(C)によって測定したとおり、Swiss 3T3 線維芽細胞増殖を刺激し、そして低下した細胞増殖および高い α -SMA発現により測定したとおり筋線維芽細胞へのWI-38 細胞分化(D)を刺激した；SPHINGOMABはS1Pの効果の各々を中和した。SPHINGOMABは、永続的な心筋梗塞のマウスモデルにおいてインビボの周辺血管線維症を低下した(E)。

【図5】図5：S1Pは、眼球上皮細胞および線維芽細胞の収縮性の瘢痕組織を産生する筋線維芽細胞への形質転換を促進する。いくつかのヒト眼球細胞系の筋線維芽細胞形質転換に対するS1Pの効果を試験した。S1Pは、ヒト網膜色素性上皮細胞(図5A)およびヒト結膜線維芽細胞(図5B)において α -平滑筋アクチン(α -SMA; 筋線維芽細胞マーカー)の産生を刺激することを見出された。これらのデータは、S1Pが収縮性の瘢痕組織産生筋線維芽細胞への眼球上皮細胞および線維芽細胞の形質転換を促進する因子の中の一つであることを初めて示すものである。ヒト結膜線維芽細胞においてプラスミノゲンアクチベーター阻害剤の発現(PAI-1)に対するS1Pの効果もまた試験した。高いPAI-1発現は、結合組織のタンパク質分解性分解における低下と相関しており、増加した瘢痕化を包含するいくつかの繊維性疾患と関連して上方調節される。図5Cに示したように、S1Pは用量依存様式においてPAI-1発現を刺激する。

20

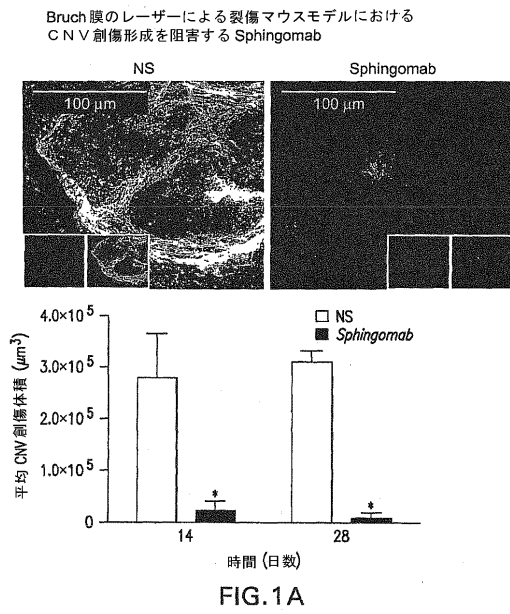
30

【図6】図6：SPHINGOMABは、インビボで免疫細胞の創傷浸潤を低下させた。マウスを、MIに供し、手術後48hrsで、食塩水または25mg/kgのSPHINGOMABで処理し、その後4日目に屠殺した。SPHINGOMABは、マクロファージ(A)およびマスト細胞(B)の創傷への浸潤を低下した。データを、食塩水処理した値の倍数低下として示した。

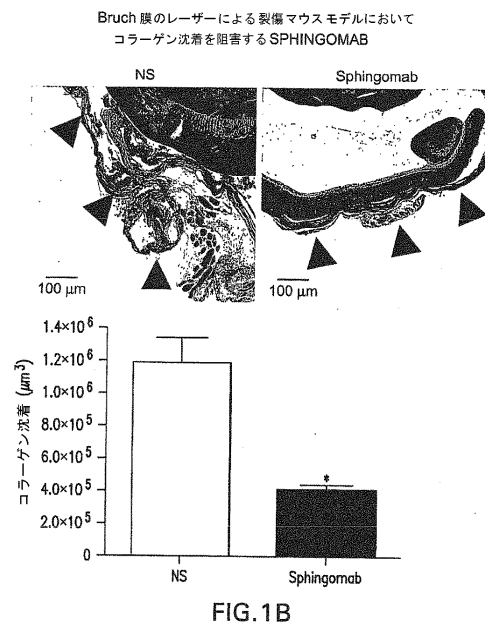
【図7】図7：SPHINGOMABはS1Pに対して特異性が高い。競合ELISAを基にしたグラフは、他の生物活性の脂質と比較して、S1Pに対するSPHINGOMABの特異性を示す。SPHINGOMABは、スフィンゴシン(SPH)、S1Pまたはリゾホスファチジン酸(LPA)の即時代謝前駆体、S1Pと構造的および機能的に類似した重要な細胞外シグナル伝達分子に対して交差反応性を示さなかった。SPHINGOMABは、セラミド1-リン酸塩(C1P)、ジヒドロスフィンゴシン(DH-SPH)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)またはスフィンゴミエリン(SM)を包含する他の構造的に類似した脂質および代謝物を認識しなかった。SPHINGOMABは、ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸塩(DH-S1P)と交差反応し、低い程度でスフィンゴシルホリルコリン(SPC)と交差反応した。S1Pに対するSPHINGOMABの親和性(Kd)は<100pMであり、大部分の治療用抗体、特に他の分子スポンジよりも非常に高い。

40

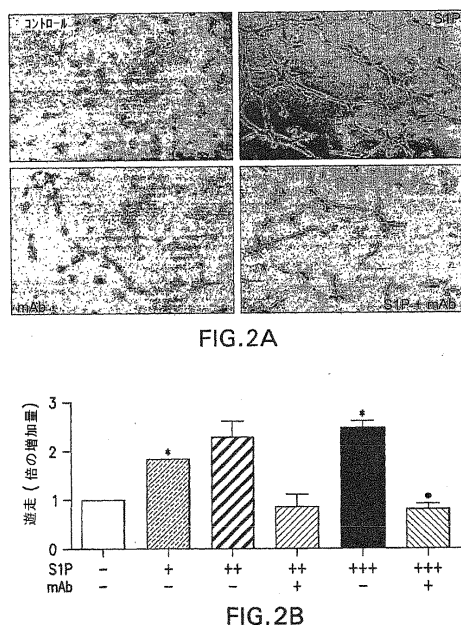
【図 1 - 1】



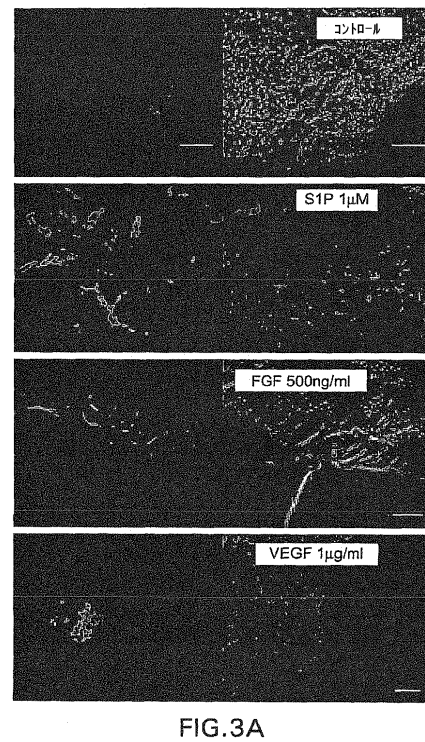
【図 1 - 2】



【図 2】



【図 3 - 1】



【図 3 - 2】

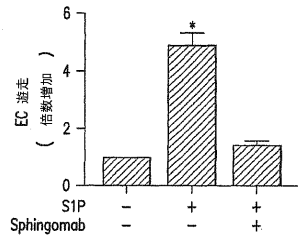


FIG.3B

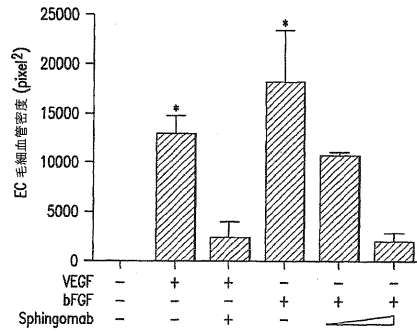


FIG.3C

【図 4 - 1】

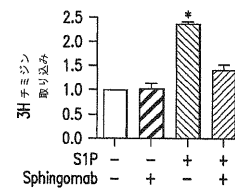


FIG.4A

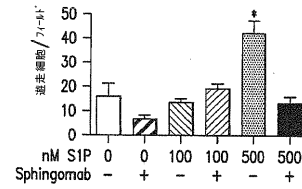


FIG.4B

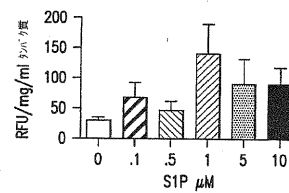


FIG.4C

【図 4 - 2】

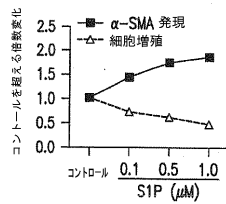


FIG.4D

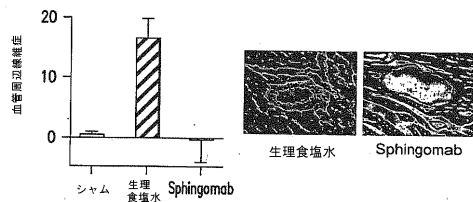


FIG.4E

【図 5】

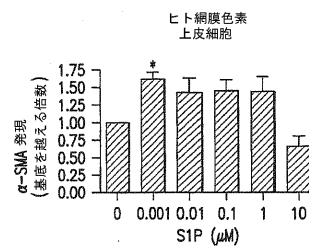


FIG.5A

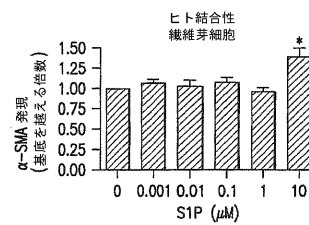


FIG.5B

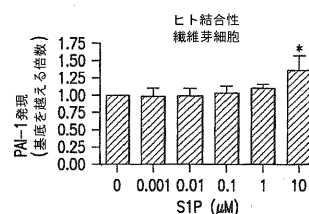


FIG.5C

【図 6】

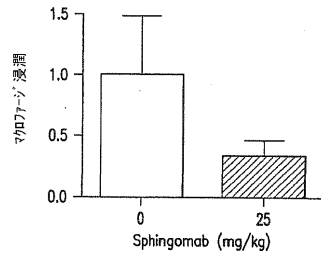


FIG.6A

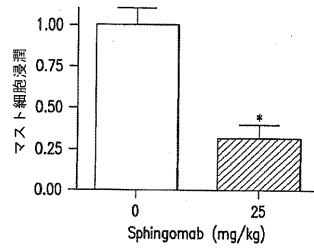


FIG.6B

【図 7】

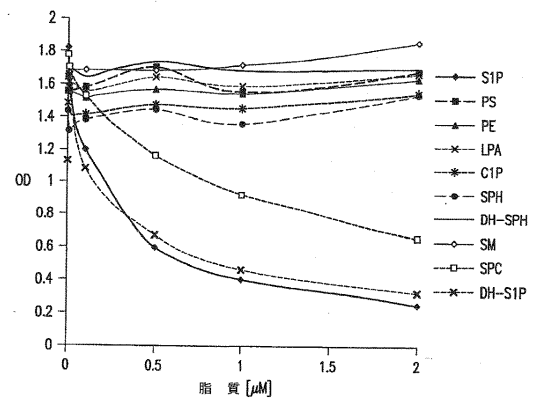


FIG.7

【配列表】

0005739089000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ウィリアム・エイ・ガーランド
アメリカ合衆国92672カリフォルニア州サン・クレメント、ピア・コリブリ310番
- (72)発明者 グレン・エル・ストラー
アメリカ合衆国11576ニューヨーク州ロズリン、ザ・サーペンティーン88番

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 米国特許第06098631 (US, A)
特表2008-518946 (JP, A)
米国特許出願公開第2003/0027304 (US, A1)
米国特許出願公開第2003/0026799 (US, A1)
国際公開第02/017899 (WO, A1)
特開2002-243737 (JP, A)
米国特許第06858383 (US, B1)
米国特許出願公開第2006/0171946 (US, A1)
Biochim. Biophys. Acta, 2002, Vol.1582, pp.168-174
THORESON, W.B., et al., Lysophosphatidic Acid Receptor Signaling in Mammalian Retinal Pigment Epithelial Cells, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002年 7月, Vol.43, No.7, p.2450-2461
LEBRUN-JULIEN, F., et al., Lysophosphatidic Acid Receptor Type-1 (LPA1) Expression in Normal and Glaucomatous Adult Rat Retina, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005年, Vol.46, E-Abstract 1319
ANLINKER, B., et al., Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001年 5月14日, Vol.279, No.20, p.20555-20558
PYNE, S., et al., Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells, Biochem. J., 2000年, Vol.349, p.385-402
SVETLOV, S.I., et al., EDG receptors and hepatic pathophysiology of LPA and S1P: EDG-ology of liver injury, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 2002年, Vol.1582, p.251-256
VISENTIN, CANCER CELL, 2006年 3月, V9, P225-238

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 39/00~39/44
A61P 1/00~43/00
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)