

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2013-533286****(P2013-533286A)**(43) 公表日 **平成25年8月22日 (2013. 8. 22)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 25/04 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 25/04	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 31/133 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/133	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/426 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/426	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-521879 (P2013-521879)	(71) 出願人	509039013
(86) (22) 出願日	平成23年7月25日 (2011. 7. 25)		セントルイス ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成25年3月12日 (2013. 3. 12)		アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 3 1 0 3
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/045236		セントルイス ノース グランド ブル
(87) 国際公開番号	W02012/015758		バード 2 2 1
(87) 国際公開日	平成24年2月2日 (2012. 2. 2)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/369, 504		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成22年7月30日 (2010. 7. 30)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 疼痛を治療する方法

## (57) 【要約】

本発明は、S1P生物活性を抑制または阻止する薬剤を投与することによって、神経因性疼痛および炎症性疼痛を含む疼痛障害を治療するための方法、ならびにオピエート鎮痛剤の使用により誘発される侵害受容性耐性を減少させるまたは排除するための方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、S1P受容体アンタゴニスト、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される薬物の有効量を個体に投与する段階を含む、個体における神経因性疼痛を治療する方法。

**【請求項 2】**

前記神経因性疼痛が化学療法誘発性である、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

前記化学療法が、タキサン、白金化合物、ビンカルカロイド、プロテアソーム阻害剤、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される薬物の投与を含む、請求項2記載の方法。

10

**【請求項 4】**

前記薬物が、パクリタキセル、オキサリプラチン、ボルテゾミブ、ビンクリスチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項3記載の方法。

**【請求項 5】**

前記S1P受容体アゴニストがS1P1のアゴニストである、請求項1記載の方法。

**【請求項 6】**

前記S1P受容体アゴニストが、フィンゴリモド、BAF312、ボネシモド、ONO-4641、CS-0777、KRP-203、PF-991、W146、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

20

**【請求項 7】**

前記スフィンゴシンキナーゼアンタゴニストが、メチルスフィンゴシン、N,N-ジメチルスフィンゴシン、トリメチルスフィンゴシン、D,L-スレオ-ジヒドロスフィンゴシン、およびHDLからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

**【請求項 8】**

前記S1Pアンタゴニストが抗S1P抗体である、請求項1記載の方法。

**【請求項 9】**

前記抗体が、SEQ ID NO:1によって同定される配列を有する重鎖を含む、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

前記抗体が、SEQ ID NO:2によって同定される配列を有する軽鎖を含む、請求項8記載の方法。

30

**【請求項 11】**

スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、S1P受容体アンタゴニスト、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される薬物の有効量を個体に投与する段階を含む、個体における疼痛過敏症を治療する方法。

**【請求項 12】**

前記疼痛過敏症がオピエート誘発性である、請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

前記疼痛過敏症がモルヒネによって誘発される、請求項12記載の方法。

40

**【請求項 14】**

前記S1P受容体アゴニストがS1P1のアゴニストである、請求項11記載の方法。

**【請求項 15】**

前記S1P受容体アゴニストが、フィンゴリモド、BAF312、ボネシモド、ONO-4641、CS-0777、KRP-203、PF-991、およびW146からなる群より選択される、請求項11記載の方法。

**【請求項 16】**

前記S1Pアンタゴニストが抗S1P抗体である、請求項11記載の方法。

**【請求項 17】**

前記抗体が、SEQ ID NO:1によって同定される配列を有する重鎖を含む、請求項16記載の方法。

50

## 【請求項 18】

前記抗体が、SEQ ID NO:2によって同定される配列を有する軽鎖を含む、請求項16記載の方法。

## 【請求項 19】

スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、S1P受容体アンタゴニスト、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される薬物の有効量を個体に投与する段階を含む、個体における抗侵害受容性耐性を治療する方法。

## 【請求項 20】

前記抗侵害受容性耐性がオピエート誘発性である、請求項19記載の方法。

## 【請求項 21】

前記抗侵害受容性耐性がモルヒネによって誘発される、請求項20記載の方法。

## 【請求項 22】

前記S1P受容体アゴニストがS1P1のアゴニストである、請求項19記載の方法。

## 【請求項 23】

前記S1P受容体アゴニストが、フィンゴリモド、BAF312、ACT-128800、ONO-4641、CS-0777、KRP-203、PF-991、W146、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項19記載の方法。

## 【請求項 24】

前記S1Pアンタゴニストが抗S1P抗体である、請求項19記載の方法。

## 【請求項 25】

前記抗体が、SEQ ID NO:1によって同定される配列を有する重鎖を含む、請求項24記載の方法。

## 【請求項 26】

前記抗体が、SEQ ID NO:2によって同定される配列を有する軽鎖を含む、請求項24記載の方法。

## 【請求項 27】

スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、S1P受容体アンタゴニスト、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される薬物の有効量を個体に投与する段階を含む、個体における炎症性疼痛を治療する方法。

## 【請求項 28】

前記個体が炎症性疾患に罹患している、請求項27記載の方法。

## 【請求項 29】

前記炎症性疾患が関節リウマチである、請求項28記載の方法。

## 【請求項 30】

前記S1PアゴニストがS1P1のアゴニストである、請求項27記載の方法。

## 【請求項 31】

前記S1P受容体アゴニストが、フィンゴリモド、BAF312、ボネシモド、ONO-4641、CS-0777、KRP-203、PF-991、W146、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項27記載の方法。

## 【請求項 32】

前記S1Pアンタゴニストが抗S1P抗体である、請求項27記載の方法。

## 【請求項 33】

前記抗体が、SEQ ID NO:1によって同定される配列を有する重鎖を含む、請求項32記載の方法。

## 【請求項 34】

前記抗体が、SEQ ID NO:2によって同定される配列を有する軽鎖を含む、請求項32記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

10

20

30

40

50

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、米国立衛生研究所助成金第R01 DA024074号および第R21 DA023056号の下で、政府の支援を受けてなされたものである。連邦政府は、本発明において一定の権利を有する。

#### 【0002】

電子的に提出された情報の参照による組み込み

本開示の一部である配列表は、本発明のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を含む配列SEQを含む。配列表の内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0003】

分野

本発明は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つを用いて疼痛を治療する方法に関する。本発明はさらに、癌および化学療法誘発性の疼痛を含む神経因性疼痛、急性および慢性炎症性疼痛、ならびにオピエート誘発性の過敏症(痛覚過敏および異痛症)および抗侵害受容性耐性の発生の治療および予防における、フィンゴリモド、BAF312、ボネシモド、ONO-4641、CS-0777、KRP-203、PF-991、およびW146などのS1P受容体アゴニスト、ならびに抗体などのS1P受容体アンタゴニストの使用に関する。スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニストを含むキットもまた提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

序論

米国および海外における深刻な健康問題は、疼痛の不適切な治療である。全アメリカ人の3分の1は何らかの形態の慢性疼痛に苦しんでおり、これらの人々の3分の1は、現在の薬物療法に対して抵抗性の疼痛を有する。疼痛の経済的影響は、毎年およそ一千億ドルにも匹敵するほど大きい(Renfrey et al., 2003)。慢性的なオピエート療法による鎮痛作用の低下(すなわち、痛覚過敏および耐性)が、用量の増大および苦痛を伴う副作用を招くことを理由の一つとして、重篤な疼痛症候群は患者の生活の質を低下させる。したがって、耐性も、許容できない副作用も生じることなく、慢性疼痛のための反復投与中にオピエートの有効性を維持するための新たなアプローチに大きな関心が寄せられている。

#### 【0005】

モルヒネに代表されるオピエート/麻薬性鎮痛剤は、急性および慢性の重篤な疼痛の最も効果的な治療である。しかしながら、それらの臨床的有用性は、同等の疼痛緩和を達成するために用量増大を必要とする鎮痛耐性の発生によって妨げられる場合が多い(Foley, 1995)。この複雑な病態生理学的サイクルは、結果として生じる過鎮静、身体活動の低下、便秘、呼吸抑制、耽溺の高い可能性、およびその他の副作用のために、これらの患者の生活の質に対する重大な障害となる(Foley, 1995)。細胞応答性における適応性変化が耐性に寄与すると提唱されている(Taylor and Fleming, 2001)。動物(Mao et al., 1995)およびヒト(Amer et al., 1988)でのインビボの証拠を伴う別の仮説は、オピオイド受容体の慢性刺激が、感覚閾値を下げる抗オピオイド系の活性化を誘発し、それによって触覚刺激および侵害熱刺激に対する過敏症をもたらすというものである(Simonnet and Rivat, 2003)。この仮説の当然の結果として、このようなオピオイド誘発性過敏症は、オピオイドアゴニストの正味の鎮静効果を逆説的に減少させる(Ossipov et al., 2003; Simonnet and Rivat, 2003)。

#### 【0006】

強力な炎症促進性でかつアポトーシス促進性のスフィンゴ脂質であるセラミド(Hannun and Obeid, 2008)は、スフィンゴミエリナーゼ(SMase)によるスフィンゴミエリン(SM)の酵素的加水分解(「SM経路」)によって、ならびにセリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT)およびセラミド合成酵素(CS)によるデノボ合成(「デノボ経路」)から生成される(De Igado et al., 2006)。モルヒネ誘発性耐性の発生は、脊髄におけるセラミドの形成増加

10

20

30

40

50

と関連しており、その生合成の阻害により抗侵害受容性耐性の発生が阻止された(Bryant et al., 2009; Ndengele et al., 2009)。ひとたび生成されると、セラミドの定常状態利用能は、セラミドをスフィンゴシン(SP)に変換するセラミダーゼによってさらに調節され、SPは次にスフィンゴシンキナーゼ1および2(Melendez, 2008; Takabe et al., 2008)によって、セラミド代謝経路におけるGPCRシグナル伝達最終産物であるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)に変換される(Melendez, 2008; Takabe et al., 2008)。ひとたび生成されると、S1Pは細胞外に拡散して、ニューロンおよびグリア細胞を含むCNSのいくつかの細胞上に見出されるGPCR共役S1P受容体(今日までに5種類が同定され、それぞれS1P<sub>[1~5]</sub>として知られており、またS1P<sub>R[1~5]</sub>としても知られている)に作用する(Taha et al., 2004; Melendez, 2008; Takabe et al., 2008)。

10

#### 【0007】

抗S1P抗体は、癌治療として開発された。そのリガンドと結合している抗S1Pモノクローナル抗体の結晶構造は、タンパク質データバンクNo. 3I9Gとして提供されている。米国特許出願第20070148168号; 米国特許第6,881,546号および第6,858,383号; ならびに米国特許出願第10/029,372号もまた参照されたく、これらはそれぞれその全体が参照により組み入れられる。Lpath, Inc.によって開発されたSPHINGOMAB(商標)、マウスモノクローナル抗体(mAb)は、癌の治療において有効であることが示されている。一連のヒト化抗S1Pモノクローナル抗体が開発され、米国特許第7,829,674号として現在発行されている米国特許出願第60/854,971号および第11/924,890号、ならびに対応するPCT特許出願第PCT/US2007/082647号に記載されており、これらの出願はそれぞれその全体が参照により組み入れられる。このようなヒト化抗体の特に有効な例はLT1009(Sonepcizumab(商標)、Lpath, Californiaとして市販されている)と称され、この抗体は癌の治療においてSPHINGOMAB(商標)よりも優れた活性を示した。

20

#### 【0008】

製剤化送達、薬物動態、および乱用の可能性を改善するためのオピオイドアゴニストの改変に関しては進展したが、神経因性疼痛、炎症性疼痛、および痛覚過敏の発生の予防においてはほとんど進展が見られていない。よって、そのような状態を治療する新たな薬剤および方法の重大な必要性が存在する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

当業者は、以下に記載される図面が説明のみを目的としていることを理解するであろう。図面は、本教示の範囲を限定することを決して意図するものではない。

30

【図1】図1Aおよび図1Bは、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および耐性が、スフィンゴシンキナーゼの活性化に由来するセラミドおよびS1Pの増加と関連していることを示す。7日間にわたって生理食塩水の慢性s.c.注入を受けたラット(Veh-Sal、n=5、または白色バー)と比較して、同じ時間枠にわたるモルヒネの注入(Veh-Mor、n=5、または灰色バー)は、(A、C)浸透圧ミニポンプの埋め込み前(t=0時間)の足逃避潜時と比較した、3日目および6日目における足逃避潜時(s)の有意な減少によって明らかな熱痛覚過敏の発生、ならびに(B、D)抗侵害受容性耐性の発生をもたらした。BおよびDに示される結果は、6日目に得られた行動測定によるものである。これらの事象は、後角組織におけるセラミド(赤色、E、F)およびS1P(G、H)の形成増加と関連していた。DMS(0.3 μM/日/6日間、n=5、または黒色バー)またはSK-I(0.3 μM/日/6日間、n=5、またはハッシュバー)とのモルヒネの同時投与により、痛覚過敏(A)、耐性(B)、およびS1P(G、H)の発生が阻止された。6日目におけるDMS(0.03~0.3 μM/日/6日間、n=5、または黒色バー)またはSK-I(0.3~0.3 μM/日/6日間、n=5、またはハッシュバー)の用量反応曲線を、痛覚過敏に関してCに、耐性に関してDに、およびS1Pに関してHに示す。(EおよびF)に示される顕微鏡写真は、3匹の異なる動物から6日目に採取した後角(L4~L6)の表層の少なくとも3つの像の代表的なものである。結果は、n=動物5匹についての平均値±SEMとして表しており、ダネットの事後検定を伴うANOVAによって解析し、Veh-Mor対Veh-Salについて\*P<0.001; t=0時間に対して§P<0.01または§§P<0.001; および薬物-Mor対Veh-Morについて†P<0.01または††P<

40

50

0.001である。

【図2】セラミドの、ニューロンとではなく活性化グリア細胞との共局在を示す。(A~C) Veh-Salラットおよび(D~F)Veh-Morラットからの固定凍結脊髄切片を、セラミド(赤色)について、および(A、D)アストロサイト(GFAP+、緑色)、(B、E)ミクログリア(Iba1 +、緑色)、または(C、F)ニューロン(NeuN+、緑色)について染色した。これらの重ね合わせ像において、セラミドはVeh-Sal動物由来の脊髄では低いかまたは存在せず、Veh-Mor動物由来の脊髄では実質的に増加していた。さらに、セラミドレベルは、(D)アストロサイトおよび(E)ミクログリアと共局在したが(黄色)、(F)ニューロンとは共局在しなかった。免疫血清および免疫IgGと同じ濃度の標準ウサギ血清(セラミドに対する)または標準マウスIgG(GFAP、Iba1、およびNeuNに対する)を用いた陰性対照は、低レベルのバックグラウンド蛍光しか示さなかった。顕微鏡写真は、異なる日に行った3匹の異なる動物に由来する後角(L4~L6)の表層の少なくとも3つの像の代表的なものである。

10

【図3】セラミド生合成の阻害剤による治療操作によって、痛覚過敏および抗侵害受容性耐性が阻止されることを示す。モルヒネ誘発性の熱痛覚過敏(B)、抗侵害受容性耐性(C)の発生、および後角組織における関連するS1Pレベルの上昇(A)は、デノボ経路の阻害剤(Myrr、0.3  $\mu$ M/日/6日間; FB1、1  $\mu$ M/日/6日間)、およびスフィンゴミエリン経路の阻害剤(D609、1  $\mu$ M/日/6日間)の髄腔内送達によって弱められる。結果は、n = 動物5匹についての平均値  $\pm$  SEMとして表してあり、ダネットの事後検定を伴うANOVAによって解析し、Veh-Mor対Veh-Salについて $^*P < 0.001$ 、および薬物-Mor対Veh-Morについて $^*P < 0.001$ である。

【図4】DMSが、グリア細胞活性化および脊髄のサイトカイン産生増加を阻止することを示す。Veh-Salと比較して、耐性の発生(Veh-Mor)は、それぞれGFAP(A、A1)およびIba1(B、B1)タンパク質発現の増加によって明らかなアストロサイトおよびミクログリア細胞の有意な活性化、ならびに後角組織におけるTNF- $\alpha$  (C)、IL-1 $\beta$  (D)、およびIL-6(E)レベルの形成増加と関連していた。DMS(0.3  $\mu$ M/日/6日間)とのモルヒネの同時投与により、グリア細胞活性化(A、A1、B、B1)およびサイトカイン形成の増加(C~E)が妨げられた。ラット5匹のゲルについての複合濃度測定解析は、A1およびB1に示されるように、アクチンに対する%の平均値  $\pm$  SEMとして表してある。結果は、n = 動物5匹についての平均値  $\pm$  SEMとして表してあり、ダネットの事後検定を伴うANOVAによって解析し、Veh-Mor対Veh-Salについて $^*P < 0.001$ 、およびDMS-Mor対Veh-Morについて $^*P < 0.01$ または $^{**}P < 0.001$ である。

20

30

【図5】DMSが、脊髄における翻訳後タンパク質ニトロ化を阻止することを示す。Veh-Salと比較して、耐性の発生(Veh-Mor)は、免疫組織化学(B、矢印を参照されたい)によって検出される有意なタンパク質ニトロ化、特にグルタミン酸輸送体(GLT-1、D、D1)およびGS(E、E1)の有意なニトロ化と関連していた。これらの事象は、DMS(0.3  $\mu$ M/日/6日間)とのモルヒネの同時投与によって弱められた(DおよびE)。DおよびEに示されるゲルは、n = ラット5匹からのゲルの代表的なものである。ラット5匹のニトロ化タンパク質のゲルについての複合濃度測定解析は、D1およびE1に示されるように、アクチンに対する%の平均値  $\pm$  SEMとして表してあり、ダネットの事後検定を伴うANOVAによって解析し、Veh-Mor対Veh-Salについて $^*P < 0.001$ 、およびDMS-Mor対Veh-Morについて $^*P < 0.001$ である。顕微鏡写真は、異なる日に行った異なる動物からの少なくとも5つの代表的なものであり、耐性中にNTに染まる解剖学的部位である後角(L4~L6)の表層(Muscoli et al., 2007)から得ている。

40

【図6】提唱される作業仮説を示す。モルヒネの慢性投与はセラミド代謝経路を活性化し、スフィンゴシンキナーゼ(SphK)1および2の活性化に際して、グリア細胞におけるS1Pの形成増加をもたらす。その細胞外放出に続いて、S1Pはグリア細胞上のS1P受容体(まだ同定されていない)と結合し、一連の事象を開始させ、炎症誘発性サイトカインの産生強化、ならびにグルタミン酸輸送体(GT)およびグルタミン合成酵素(GS)のペルオキシ亜硝酸(PN)媒介性ニトロ化に至る。グリアTLR4の活性化は、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生におけるモルヒネの慢性投与とセラミド代謝経路の活性化との関連性を提供し得る。

50

【図7】セラミドの標的化が、パクリタキセル誘発性の機械的異痛症の発生を阻止することを示す。

【図8】脊髄におけるセラミドの標的化が、パクリタキセル誘発性の機械的異痛症の発生、および炎症誘発性サイトカインの産生増加を阻止することを示す。

【図9】対照、タキソール、タキソールおよび薬物(上列、中列、下列)を示す。セラミド(左欄 赤色)、アストロサイト(中欄 緑色)、重ね合わせ像(右欄)。

【図10】S1P1受容体アンタゴニストW146が、パクリタキセル誘発性の神経因性疼痛を逆転させることを示す。16日目にW146をi.p投与し、60分後に行動試験を行った。

【図11】S1Pが、S1P1受容体を介して末梢感作および痛覚過敏を誘発することを示す。S1Pの足底内注射の15分前にS1P1アンタゴニストW146の足底内注射を施したところ、熱痛覚過敏の発生が阻止された。Vehに対して $^*P < 0.05$ 、S1Pに対して $^+P < 0.001$ 。

【図12】カラゲナン誘発性の熱痛覚過敏の発生に及ぼすSK-I(スフィンゴシンキナーゼ阻害剤)の効果を示す。カラゲナンの足底内注射(1%、 )は熱痛覚過敏の時間依存的発生をもたらし、これは、250 ng( )、500 ng( )、または1000 ng( )で投与した足底内SK-Iにより用量依存的様式で弱められた。結果は、ラット5匹についての平均値 $\pm$ SEMとして表しており、ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置反復測定ANOVAによって解析し、カラゲナンに対して $^{***}P < 0.001$ である。

【図13】スフィンゴシンキナーゼ阻害剤SK-Iが、カラゲナン誘発性炎症を阻止することを示す。薬物は、カラゲナンの15分前に足底内注射によって投与した。

【図14】S1P1受容体アンタゴニストW146が、カラゲナン誘発性の痛覚過敏を阻止することを示す。

【図15】セラミド代謝経路の阻害剤による、モルヒネ誘発性の抗侵害受容性耐性の阻害を示す。7日間にわたって生理食塩水の慢性s.c注入を受けたラット(Veh-Sal、 $n = 5$ 、 )と比較して、同じ時間枠にわたるモルヒネの注入(Veh-Mor、 $n = 5$ 、 )は、(A)急性モルヒネ前の対応するベースライン( $n = 5$ 、Veh-Sal、 ; Veh-Mor、 ; DMS、 ; およびSK-I、 )を超える、3日目および6日目におけるテールフリック潜時の増加の阻害によって明らかな抗侵害受容性耐性の発生をもたらした ; この事象は、DMS(0.3  $\mu$ M/日/6日間、 $n = 5$ 、 )またはSK-I(0.3  $\mu$ M/日/6日間、 $n = 5$ 、 )とのモルヒネの同時投与により、時間と共に阻止された。Bの結果は、DMS(黒色バー)およびSK-I(ハッシュバー)による、ピーク耐性時(6日目)における耐性(対応するベースライン値、縞模様バーに対するVeh-Mor、灰色バー対Veh-Sal、白色バー)の用量依存的阻害を示し、Cの結果は、対応するベースライン値(縞模様バー)に対する、デノボ経路の阻害剤(Myf、0.3  $\mu$ M/日/6日間 ; FB1、1  $\mu$ M/日/6日間、黒色バー)およびスフィンゴミエリン経路の阻害剤(D609、1  $\mu$ M/日/6日間 黒色バー)による、6日目における耐性の阻害を示す。結果は、テールフリック潜時の $n =$ 動物5匹についての平均値 $\pm$ SEMとして表しており、ダネットの事後検定を伴うANOVAによって解析し、Veh-Mor対Veh-Salについて $^*P < 0.001$ 、 $t = 0$ 時間に対して $^{\S}P < 0.001$ 、および時間を一致させた薬物-Mor対Veh-Morについて $^+P < 0.001$ である。

【図16】セラミドで染まった全脊髄のモンタージュ写真を示す。Veh-Salラット(A)およびVeh-Morラット(B)の腰部(L4~L6)からの固定凍結脊髄切片を、セラミド(赤色)について染色した。Veh-Sal動物(A)と比較して、Veh-Mor動物(B)の脊髄の表層では、セラミド免疫蛍光の有意な増加が認められた。標準ウサギ血清を用いた陰性対照は、低レベルのバックグラウンド蛍光しかなく、いずれも陰性であった(表示せず)。顕微鏡写真は、異なる日に行った3匹の異なる動物の少なくとも3つの像の代表的なものである。

【図17】セラミドの活性化アストロサイトとの共局在を示す。Veh-Salラット(A~C)およびVeh-Morラット(D~F)からの固定凍結脊髄切片を、セラミド(赤色、A、D)またはアストロサイト(GFAP+、緑色、B、E)について染色した。Veh-Sal動物と比較して、Veh-Morラットでは、セラミドおよびGFAP免疫蛍光が増加した(Aに対してDおよびBに対してEを比較されたい)。さらに、CおよびFにおける重ね合わせ像において見られるように、Veh-Mor動物において、セラミドレベルはアストロサイトと共局在した(黄色)。免疫血清および免疫IgGと同じ濃度の標準ウサギ血清(セラミドに対する)または標準マウスIgG(GFAPに対する)

を用いた陰性対照は、低レベルのバックグラウンド蛍光しか示さなかった。顕微鏡写真は、異なる日に行った3匹の異なる動物に由来する後角(L4~L6)の表層の少なくとも3つの像の代表的なものである。

【図18】セラミドの活性化ミクログリアとの共局在を示す。Veh-Salラット(A~C)およびVeh-Morラット(D~F)からの固定凍結脊髄切片を、セラミド(赤色、A、D)またはミクログリア細胞(Iba1+、緑色、 $\mu$ M/日/6日間)について染色した。Veh-Sal動物と比較して、Veh-Morラットでは、セラミドおよびIba1免疫蛍光が増加した(Aに対してDおよびBに対してEを比較されたい)。さらに、CおよびFにおける重ね合わせ像において見られるように、Veh-Mor動物において、セラミドレベルはミクログリア細胞と共局在した(黄色)。免疫血清および免疫IgGと同じ濃度の標準ウサギ血清(セラミドに対する)または標準マウスIgG(Iba1

10

【図19】セラミドがニューロンと共局在しないことを示す。Veh-Salラット(A~C)およびVeh-Morラット(D~F)からの固定凍結脊髄切片を、セラミド(赤色、A、D)またはニューロン(NeuN+、緑色、B、E)について染色した。CおよびFにおける重ね合わせ像において見られるように、Veh-Mor動物において、セラミドレベルはニューロンと共局在しなかった(黄色の欠如)。免疫血清および免疫IgGと同じ濃度の標準ウサギ血清(セラミドに対する)または標準マウスIgG(NeuNに対する)を用いた陰性対照は、低レベルのバックグラウンド蛍光しか示さなかった。顕微鏡写真は、異なる日に行った3匹の異なる動物に由来する後角(L4~L6)の表層の少なくとも3つの像の代表的なものである。

20

【図20】CIPNの発生におけるS1P1受容体の役割を示す。ビヒクル群( )と比較して、パクリタキセル( )の投与は、機械的異痛症(A)または機械的痛覚過敏(B)の時間依存的発生をもたらした。S1P1特異的アンタゴニストであるW146( $0.3 \mu$ M/日、 ;  $1 \mu$ M/日、 ; および  $3 \mu$ M/日、 )の連日s.c注射(0日目から15日目まで)は、機械的異痛症(A)および機械的痛覚過敏(B)の発生を阻止したが、その不活性鏡像異性体であるW140( $3 \mu$ M/日、 )ではそのようなことはなかった。単独で投与した場合、W146( $3 \mu$ M/日、 )は、ビヒクル群における逃避閾値に影響を及ぼさなかった。結果は、平均値 $\pm$ SEMとして表してある、 $n=6$ 。行動データは、ボンフェローニ事後比較を伴う両側二元配置ANOVAによって解析した。パクリタキセル対ビヒクルについて\*\*\* $P<0.001$ 、およびパクリタキセル対パクリタキセル+W146について+++ $P<0.001$ 。

30

【図21】パクリタキセル誘発性の神経因性疼痛の発生が、S1Pの生合成における前駆体であるセラミドの脊髄でのレベル上昇と関連していることを示す。ビヒクル(Veh、 )と比較して、パクリタキセル(P、 )の投与は、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ活性(SPT、A、 $n=5$ )および酸性スフィンゴミエリナーゼ活性(aSMase、B、 $n=4$ )を増強し、16日目に脊髄におけるセラミド(C、D; 赤色;  $n=3$ )およびその生理活性誘導体、スフィンゴシン1-リン酸(S1P、E、 $n=6$ )の産生増加をもたらした。免疫蛍光画像法(C、D)に関して、セラミドに対して標準ウサギ血清を用いた陰性対照は、低レベルのバックグラウンド蛍光しか示さなかった。顕微鏡写真は、異なる日に行った3匹の異なる動物に由来する後角(L4~L6)の表層の少なくとも3つの像の代表的なものである。結果は、動物( $n$ 匹)についての平均値 $\pm$ SEMとして表してあり、スチューデントの $t$ 検定によって解析している。パクリタキセル対ビヒクルについて、\* $P<0.05$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

40

【図22】パクリタキセル誘発性の神経因性疼痛の発生が、アストロサイトにおけるセラミド産生増加と関連していることを示す。ビヒクル処置(Veh; A、C、E)およびパクリタキセル処置(P; B、D、F)からの固定凍結脊髄切片を、セラミド(NT; 赤色; A、B)、およびアストロサイトに関するGFAP(緑色; C、D)について染色した。

【図23】S1P受容体表面発現を下方制御する強力なS1P受容体アゴニストであるフィンゴリモドが、CIPNの発生を弱めたことを示す。ビヒクル群( )と比較して、パクリタキセル( )の投与は、機械的異痛症(A)または機械的痛覚過敏(B)の時間依存的発生をもたらした。フィンゴリモド( $0.01 \text{ mg/kg/日}$ 、 )の連日s.c注射(0日目から15日目まで)は、機械的

50



異痛症(A)および機械的痛覚過敏(B)の発生を阻止した。単独で投与した場合、フィンゴリモド(3  $\mu$ M/日、 )は、ビヒクル群における逃避閾値に影響を及ぼさなかった。結果は、平均値  $\pm$  SEMとして表してある、 $n=6$ 。行動データは、ボンフェローニ事後比較を伴う両側二元配置ANOVAによって解析した。パクリタキセル対ビヒクルについて $^{***}P<0.001$ 、およびパクリタキセル対パクリタキセル+フィンゴリモドについて $++++P<0.001$ 。

【図24】S1P受容体表面発現を下方制御する強力なS1P受容体アゴニストであるフィンゴリモドが、CIPNの発生を弱めたことを示す。ビヒクル群と比較して、オキサリプラチン処置は、機械的異痛症(A)および機械的痛覚過敏(B)の発生をもたらした。フィンゴリモドの連日皮下注射(0日目~17日目)は、オキサリプラチン誘発性の機械的過敏症(A、B)の発生を有意に弱めた。さらに、17日目におけるフィンゴリモドによる処置の休止後、機械的過敏症が発生することはなかった。ビヒクルに対して $^{*}P<0.001$ ；オキサリプラチンに対して $^{+}P<0.001$ ；ボンフェローニ事後比較を伴う二元配置ANOVA。結果は、ラット2匹についての平均値  $\pm$  SEMとして表してある。

【図25】モルヒネ誘発性の痛覚過敏および耐性が、選択的S1P1受容体アンタゴニストであるW146によって阻止されることを示す。7日間にわたって生理食塩水の慢性s.c注入を受けたラット(Veh-Sal、 )と比較して、同じ時間枠にわたるモルヒネの注入(Veh-Mor、 )は、熱痛覚過敏(B)および抗侵害受容性耐性(B)の時間依存的発生をもたらし、この事象は、W146(0.3  $\mu$ M/日/5日間、 )；1  $\mu$ M/日/5日間、 )；および3  $\mu$ M/日/5日間、 )とのモルヒネの同時投与により、用量依存的様式で阻止されたが；その不活性鏡像異性体であるW140(3  $\mu$ M/日/5日間、 )ではそのようなことはなかった。生理食塩水の慢性s.c注入を受けたラットに単独で投与した場合、W146(3  $\mu$ M/日/5日間、 )およびW140(3  $\mu$ M/日/5日間、 )によって、ビヒクル群における足逃避潜時またはテールフリック反応は変化しなかった。結果は、平均値  $\pm$  SEMとして表してある； $n$ =ラット5匹。行動データは、ボンフェローニ事後比較を伴う両側二元配置ANOVAによって解析した。Veh-Salに対して $^{***}P<0.001$ 、およびVeh-Morに対して $^{+}P<0.05$ 、 $^{++}P<0.01$ 、 $^{+++}P<0.001$ 。

【図26】選択的S1P1受容体アンタゴニストであるW146によって、急性モルヒネに対する抗侵害受容反応が増強されないことを示す。モルヒネの抗侵害受容作用(1~6 mg/kg、白色バー)は、W146のi.th注射(1  $\mu$ M、15分前に投与、黒色バー)によって影響を受けない。テールフリック潜時(s)は、モルヒネのi.p注射の30分後に評価した。結果は、平均値  $\pm$  SEMとして表してある； $n$ =ラット3匹。データは、ボンフェローニ事後比較を伴う両側二元配置ANOVAによって解析した。

【図27】カラゲナン誘発性の熱痛覚過敏が、フィンゴリモドによって阻止されることを示す。ビヒクル(Veh、 )と比較して、カラゲナンの足底内注射(1%、 )は熱痛覚過敏の時間依存的増加を誘発し、これは0.5時間までに誘発され、2時間まで持続する。これらの事象は、カラゲナンの90分前に経口投与した場合に、FTY720(1 mg/kg、 )によって阻止される(BL)。平均値  $\pm$  SEM、 $n=4$ 、カラゲナンに対するボンフェローニ事後比較を伴う両側二元配置反復測定ANOVA。Vehに対して $^{***}P<0.001$ 、およびカラゲナンに対して $++++P<0.001$ 。

【図28】セラミド誘発性の痛覚過敏におけるS1P1受容体経路に対するS1Pの役割を示す。(A) 足底内LT1002またはLT1017ビヒクルおよびセラミドビヒクルを投与されたラット(Veh、 、 $n=3$ )と比較して、セラミドの足底内注射(10  $\mu$ g、 、 $n=3$ )は熱痛覚過敏の時間依存的発生をもたらし、これは抗S1P抗体LT1002(242  $\mu$ g、 、 $n=3$ )によって弱められたが、LT1017(286  $\mu$ g、 、 $n=3$ )によって弱められなかった。単独で投与した場合、LT1002( 、 $n=3$ )およびLT1017( 、 $n=3$ )は、影響を及ぼさなかった。(B) 足底内W146またはW140ビヒクルおよびセラミドビヒクルを投与されたラット(Veh、 、 $n=4$ )と比較して、セラミドの足底内注射(10  $\mu$ g、 、 $n=4$ )は熱痛覚過敏の時間依存的発生をもたらし、これは、0.3  $\mu$ g( 、 $n=4$ )、0.6  $\mu$ g( 、 $n=4$ )、または1.2  $\mu$ g、 $n=4$ )の、S1P1受容体アンタゴニストであるW146によって阻害されたが、W140(1.2  $\mu$ g、 、 $n=4$ )によって阻害されなかった。単独で投与した場合、W146( 、 $n=4$ )は影響を及ぼさなかった。結果は、ラット( $n$ 匹)についての平均値  $\pm$  SEMとして表してあり、ボンフェローニ事後検定を伴うANOVAに

10

20

30

40

50

よって解析し、Vehに対して $^*P < 0.001$ 、およびCerに対して $^{\dagger}P < 0.001$ である。参照により本明細書に組み入れられる、Doyle et al., Neuroscience Letters 499 (2011) 4- 8もまた参照されたい。

【図 2 9】抗体LT1009の重鎖可変領域を図示する。

【図 3 0】抗体LT1009の軽鎖可変領域を図示する。

【発明の概要】

【0010】

略語および定義

本発明の理解を容易にするため、本明細書において用いられるいくつかの用語および略語を以下に次のように定義する。

【0011】

「抗体」とは、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を通じて、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等などの標的に特異的に結合し得る免疫グロブリン分子である。本明細書において用いられる場合、本用語は、無傷のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のみならず、その断片(Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなど)、一本鎖(ScFv)、その変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む、免疫グロブリン分子のあらゆる他の改変された立体配置も包含する。抗体には、IgG、IgA、またはIgM(またはそのサブクラス)などのあらゆるクラスの抗体が含まれ、抗体は何らかの特定のクラスのものである必要はない。その重鎖の定常ドメインの抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMという5つの主要なクラスがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2にさらに分類することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および $\mu$ と称される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。

【0012】

「Fv」とは、完全な抗原認識および結合部位を含む抗体断片である。二本鎖Fv種において、この領域は、堅固に非共有結合された1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。一本鎖Fv種では、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖および重鎖が二本鎖Fv種と類似した二量体構造で結合できるように、可動性ペプチドリンカーによって共有結合され得る。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、VH-VL二量体の表面上で抗原結合特異性を規定するのは、この立体配置においてである。しかしながら、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、一般的には完全な結合部位よりも低い親和性ではあるものの、抗原を認識し抗原に結合する能力を有する。

【0013】

Fab断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常領域(CH1)もまた含む。Fab'断片は、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端において、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む数個の残基が付加されている点で、Fab断片とは異なる。

【0014】

「モノクローナル抗体」とは均一な抗体集団を指し、モノクローナル抗体は、抗原の選択的結合に関与するアミノ酸(天然および非天然)からなる。モノクローナル抗体の集団は特異性が高く、単一の抗原部位に向けられている。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷のモノクローナル抗体および完全長のモノクローナル抗体のみならず、その断片(Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなど)、一本鎖(ScFv)、その変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および必要な特異性の抗原認識部位および抗原に結合する能力を含む、免疫グロブリン分子のあらゆる他の改変された立体配置も包含する。抗体の供給源または抗体が作製される様式(例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、トランスジェニック動物等による)に関して、限定することは意図されていない。

【0015】

10

20

30

40

50

本明細書において用いられる「ヒト抗体」とは、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味し、当技術分野で公知のヒト抗体を作製するための技法のいずれかを用いて作製されている。ヒト抗体のこの定義には、少なくとも1つのヒト重鎖ポリペプチドまたは少なくとも1つのヒト軽鎖ポリペプチドを含む抗体が含まれる。そのような一例は、マウス軽鎖ポリペプチドおよびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を用いて生成することができる。1つの局面において、ヒト抗体は、ファージライブラリーがヒト抗体を発現する場合には、そのファージライブラリーから選択される(Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)。ヒト抗体は、トランスジェニック動物に、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたマウスに、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって作製することもできる。このアプローチは、米国特許第5,545,807号; 第5,45,806号; 第5,569,825号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; および第5,661,016号に記載されている。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原に対する抗体を産生するヒトBリンパ球を不死化することによって調製することもできる(そのようなBリンパ球は、個体から回収することもできるし、またはインビトロで免疫化されたものであってもよい)。例えば、Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; および米国特許第5,750,373号を参照されたい。

10

20

#### 【0016】

「キメラ抗体」とは、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列のそれぞれの一部分が、特定の種に由来するかまたは特定のクラスに属する抗体中の対応する配列に相同的である一方で、鎖の残りのセグメントが別の抗体中の対応する配列に相同的である抗体を指す。典型的には、これらのキメラ抗体では、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、哺乳動物の1つの種に由来する抗体の可変領域を模倣する一方で、定常部分は、別の種に由来する抗体中の配列に相同的である。このようなキメラ型の1つの明らかな利点は、例えば、可変領域を、容易に入手可能な非ヒト宿主生物由来のハイブリドーマまたはB細胞を用いて、現在知られている供給源から好都合に導出し、例えばヒト細胞調製物に由来する定常領域と組み合わせることができる点である。可変領域は調製が容易であるという利点を有し、特異性はその供給源によって影響を受けないが、ヒトである定常領域は、抗体を注射した際にヒト対象から免疫応答を誘発させる可能性が、非ヒト供給源からの定常領域よりも低い。しかしながら、この定義はこの特定の例に限定されない。

30

#### 【0017】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合; 補体依存性細胞傷害(CDC); Fc受容体結合; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC); 貪食; 細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体; BCR)の下方制御等が含まれる。このようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と結合していることを必要とし、そのような抗体エフェクター機能を評価するための、当技術分野で公知の様々なアッセイ法を用いて評価することができる。

40

#### 【0018】

「天然配列Fc領域」は、天然で見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。「変種Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸改変によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含むが、それでも天然配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を保持している。好ましくは、変種Fc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域中に約1個~約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1個~約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書における変種Fc領域は、好ましくは天然配列Fc領域および親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の配列同一性、最も好ましくはそれ

50

らと少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくはそれらと少なくとも約95%の配列同一性を有する。

#### 【0019】

本明細書において用いられる「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「ADCC」とは、Fc受容体(FcR)を発現する非特異的な細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)が、標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて該標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を指す。関心対象の分子のADCC活性は、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを用いて評価することができる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびNK細胞が含まれる。あるいはまたはそれに加えて、関心対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656に開示されているような動物モデルにおいてインビボで評価することもできる。

10

#### 【0020】

本明細書において用いられる「Fc受容体」および「FcR」とは、抗体のFc領域に結合する受容体を言う。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体と結合するもの(受容体)であり、これにはFc RI、Fc RII、およびFc RIIIサブクラスの受容体が含まれ、これらの受容体の対立遺伝子変種および選択的スプライシングされた形態も含まれる。Fc RII受容体には、Fc RIIA(「活性化受容体」)およびFc RIIB(「阻害性受容体」)が含まれ、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。FcRは、Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25-34; およびde Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41に概説されている。「FcR」にはまた、新生児受容体、FcRnも含まれ、これは母性IgGの胎児への移行を司っている(Guyer et al., 1976, J. Immunol., 117:587; およびKim et al., 1994, J. Immunol., 24:249)。

20

#### 【0021】

「補体依存性細胞傷害」および「CDC」とは、補体の存在下における標的の溶解を指す。補体活性化経路は、補体系の第1成分(C1q)の、同族抗原と複合体形成した分子(例えば、抗体)への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)に記載されているようなCDCアッセイを行うことができる。

30

#### 【0022】

本明細書において用いられる「LT1009」という用語は、それぞれ図29および図30に示される重鎖可変領域(SEQ ID NO:1)および軽鎖可変領域(SEQ ID NO:2)のアミノ酸配列を含む抗体を指す。LT1009のCDR部分もまた、図29および図30に図示されている。LT1009の作製および特徴づけは、米国特許第7,829,674号および対応するPCT特許出願第PCT/US2007/082647号に記載されている。

#### 【0023】

本明細書において用いられる抗体の「免疫特異的」結合とは、抗体の抗原結合部位と、その抗体によって認識される特異的抗原との間で起こる抗原特異的結合相互作用を指す(すなわち、抗体は、ELISAまたはその他の免疫測定法においてタンパク質と反応し、非関連のタンパク質とは検出可能には反応しない)。

40

#### 【0024】

抗体またはポリペプチドに「特異的に結合する」または「優先的に結合する」(本明細書において互換的に用いられる)エピトープとは、当技術分野で十分に理解されている用語であり、そのような特異的または優先的結合を決定する方法もまた、当技術分野で周知である。分子は、別の細胞または物質とよりも特定の細胞または物質とより頻繁に、より迅速に、より長く持続して、およびより高い親和性で反応または会合する場合に、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと称される。抗体は、他の物質に結合するよりもより高い親和性、結合力で、より容易に、およびより長く持続して結合する場合に、標的に「特異的に結合する」または「優先的に結合する」。例えば、S1Pに特異的または優先的

50

に結合する抗体とは、その他の分子に結合するよりもより高い親和性、結合力で、より容易に、およびより長く持続して、この分子と結合する抗体である。この定義を読むことによって、例えば、第1標的に特異的または優先的に結合する抗体(または部分もしくはエピトープ)は、第2標的に特異的または優先的に結合しても、しなくてもよいこともまた理解される。したがって、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的な結合を必要としない(ただし、含み得る)。一般に、必ずというわけではないが、結合への言及は優先的結合を意味する。

#### 【0025】

「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に用いられて、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは直鎖状または分枝状であってよく、修飾アミノ酸を含んでよく、非アミノ酸によって中断されてもよい。本用語はまた、天然にまたは介入によって；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分との結合などの任意の他の操作もしくは修飾によって修飾されたアミノ酸ポリマーもまた包含する。この定義には、例えば、1つまたは複数のアミノ酸の類似体(例えば、非天然アミノ酸等を含む)、および当技術分野で公知の他の修飾を含むポリペプチドもまた含まれる。本発明のポリペプチドは抗体に基づいているため、ポリペプチドは一本鎖または会合した鎖として存在し得ることが理解される。

#### 【0026】

本明細書において互換的に用いられる「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、およびそれらの類似体、または任意の適切なDNAもしくはRNAポリメラーゼを含むポリメラーゼによってポリマー内に取り込まれ得る任意の物質であってよい。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体などの、修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合には、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの会合前または会合後に与えられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてよい。ポリヌクレオチドは、標識成分との結合によるなど、重合後にさらに修飾されてよい。他の種類の修飾には、例えば、「キャップ」、天然ヌクレオチドのうちの1つまたは複数の類似体との置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合を有するもの(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カバメート(cabamate)等)および荷電結合を有するもの(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)、例えばタンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジン等)などの懸垂部分を含むもの、インターカレーター(例えば、アクリジン、ソラレン等)を有するもの、キレート剤(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された結合を有するもの(例えば、アノマー核酸等)、ならびに非修飾形態のポリヌクレオチドが含まれる。さらに、糖中に通常存在するヒドロキシル基のいずれかが、例えば、ホスホン酸基、リン酸基によって置換されるか、標準的な保護基によって保護されるか、もしくは付加的なヌクレオチドとのさらなる結合を調製するために活性化されてよく、または固体支持体に結合されてもよい。5'および3'末端のOHは、リン酸化され得るか、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機キャップ基部分で置換され得る。他のヒドロキシルもまた、標準的な保護基に誘導体化され得る。ポリヌクレオチドはまた、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-、またはT-アジド-リボース、炭素環糖類似体、アノマー糖、アラビノース、キシロース、またはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環状類似体、およびメチルリボシドなどの脱塩基ヌクレオシド類似体を含む、当技術分野で一般的に公知のリボースまたはデオキシリボース糖の類似体もまた含み得る。1つまたは複数のホスホジエステル結合は、代替の連結基によって置換され得る。これらの代替連結基には、リン酸がP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、「(O)NR<sub>2</sub>(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO、またはCH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)、式中、各RまたはR'は独立し

10

20

30

40

50

てHであるか、またはエーテル(-O-)結合を任意に含む置換もしくは非置換アルキル(1~20個のC)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラリジル(araldyl)である、によって置換された局面が含まれるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチド中のすべての結合が同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書において言及されるすべてのポリヌクレオチドに当てはまる。

#### 【0027】

抗体の「可変領域」とは、単独であるかまたは組み合わされた、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域(CDR)によって連結された4つのフレームワーク領域(FR)からなる。各鎖におけるCDRはFRによって非常に近接して共に固定されており、他方の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための少なくとも2つの技法が存在する：(1) 異種間の配列可変性に基づいたアプローチ(すなわち、Kabatt et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD))、および(2) 抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づいたアプローチ(Chothia et al. (1989) Nature 342:877; Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948))。本明細書において用いられるCDRとは、いずれかのアプローチまたは両方のアプローチの組み合わせによって規定されたCDRを指し得る。

#### 【0028】

抗体の「定常領域」とは、単独であるかまたは組み合わされた、抗体軽鎖の定常領域または抗体重鎖の定常領域を指す。

#### 【0029】

本明細書において用いられる「S1P」という用語は、スフィンゴシン-1-リン酸を指す。

#### 【0030】

「S1P受容体」は「S1PR」とも称され、S1Pが結合するか、またはS1Pによって活性化されるポリペプチドを指す。S1P受容体には、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、霊長類、またはウシを含むがこれらに限定されない、いかなる哺乳動物種のものも含まれる。この定義には、S1P受容体サブタイプS1P1、S1P2、S1P3、S1P4、およびS1P5が含まれ、これらはそれぞれS1PR<sub>1</sub>、S1PR<sub>2</sub>、S1PR<sub>3</sub>、S1PR<sub>4</sub>、およびS1PR<sub>5</sub>としても知られている。

#### 【0031】

本明細書において用いられる「抗S1P抗体」とは、S1Pに結合し、S1P生物活性、およびS1Pシグナル伝達または二次メッセンジャー活性によって媒介される下流経路を阻害することができる抗体を指す。抗S1P抗体は、受容体結合およびS1Pに対する細胞応答の誘発などの、S1Pシグナル伝達によって媒介される下流経路を含むS1P生物活性を阻止する、遮断する、抑制する、または減少させる(有意に、を含む)抗体を包含する。本発明の目的のために、「抗S1P抗体」という用語は、S1P自体、S1P生物活性(神経因性疼痛の任意の局面を媒介するその能力を含むが、これに限定されない)、または該生物活性の結果が、実質的に無効にされる、減少する、または任意の程度に中和される、先に特定されたすべての用語、表題、ならびに機能的状態および特徴を包含することが、明確に理解されるであろう。いくつかの局面において、抗S1P抗体はS1Pと結合し、S1P二量体化、およびS1P1受容体などのS1P受容体への結合を妨げる。他の局面において、抗S1P抗体はS1Pと結合し、S1P受容体二量体化およびS1Pリン酸化を妨げる。抗S1P抗体の例には、LT1009が含まれる。

#### 【0032】

本明細書において用いられる「抗S1P受容体抗体」とは、S1P受容体に結合し、S1P受容体生物活性を阻害することができる抗体を指す。抗S1P受容体抗体は、S1Pと協同した結合および細胞応答の誘発などの、S1P受容体生物活性を阻止する、遮断する、抑制する、または減少させる(有意に、を含む)抗体を包含する。本発明の目的のために、「抗S1P受容体抗体」という用語は、S1P受容体自体、S1P受容体生物活性(神経因性疼痛の任意の局面を媒介するその能力を含むが、これに限定されない)、または該生物活性の結果が、実質的に無効にされる、減少する、または任意の程度に中和される、先に特定されたすべての用語、表題、ならびに機能的状態および特徴を包含することが、明確に理解されるである

う。いくつかの局面において、抗S1P受容体抗体はS1P受容体と結合し、S1P二量体化およびS1Pへの結合を妨げる。他の局面において、抗S1P受容体抗体はS1P受容体と結合し、S1Pリン酸化を妨げる。

【0033】

本明細書において用いられる「S1P受容体アンタゴニスト」には、抗S1P抗体および抗S1P1受容体抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

「スフィンゴシンキナーゼ」への言及は、とりわけ、スフィンゴシンキナーゼシグナル伝達経路の活性化中の、スフィンゴシン-1-リン酸の生成に關与する該分子への言及と理解されるべきである。スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト活性を検出する方法には、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,172,879号およびPCT特許出願第PCT/AU98/00730号(WO 99/123533)に開示されている方法が含まれる。

【0035】

S1Pの「生物活性」とは、一般的に、S1P受容体と結合し、S1P1受容体シグナル伝達経路を含むがこれに限定されない、S1P受容体シグナル伝達経路を活性化する能力を指す。限定はしないが、生物活性には、以下のうちのいずれか1つまたは複数が含まれる：S1P受容体に結合する能力；S1P受容体二量体化およびリン酸化を促進する能力；S1P受容体シグナル伝達経路を活性化する能力；ならびに癌および化学療法誘発性の疼痛を含む、神経因性疼痛および痛覚過敏を媒介する能力。

【0036】

本明細書において用いられる「実質的に純粋」とは、少なくとも50%純粋(すなわち、汚染物質を含まない)、より好ましくは少なくとも90%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、より好ましくは少なくとも98%純粋、より好ましくは少なくとも99%純粋な物質を指す。

【0037】

「宿主細胞」には、ポリヌクレオチド挿入物を取り込ませるためのベクターのレシピエントとなることができる、またはレシピエントである個々の細胞または細胞培養物が含まれる。宿主細胞には単一の宿主細胞の子孫が含まれ、子孫は、天然の、偶発的な、または意図的な突然変異により、必ずしも元の親細胞と完全に同一(形態において、またはゲノムDNA補完物において)ではなくてもよい。宿主細胞には、本発明のポリヌクレオチドを用いてインビボでトランスフェクトされた細胞が含まれる。

【0038】

本明細書において用いられる「治療」とは、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果には、以下のうちの1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない：神経因性疼痛、痛覚過敏、異痛症、炎症性疼痛、癌性疼痛、または化学療法誘発性疼痛を含む、疼痛の任意の局面の改善または軽減。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果には、以下のうちの1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない：神経因性疼痛の任意の局面を含む、神経因性疼痛と関連した1つまたは複数の症状の重症度の低減、軽減(神経因性疼痛の持続期間の短縮、神経因性疼痛の感受性または感覚の低下など)；炎症性疼痛の任意の局面を含む、炎症性疼痛と関連した1つまたは複数の症状の重症度の低減、軽減(炎症性疼痛の持続期間の短縮、炎症性疼痛の感受性または感覚の低下など)、ならびに痛覚過敏および異痛症を含む過敏症の任意の局面を含む、痛覚過敏および異痛症と関連した1つまたは複数の症状の重症度の低減、軽減。

【0039】

薬物、化合物、または薬学的組成物の「有効量」とは、神経因性疼痛感覚の軽減または低下などの臨床結果を含む、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1回または複数回の投与で投与することができる。本発明の目的のために、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量とは、癌性疼痛および化学療法誘発性疼痛を含む神経因性疼痛、炎症性疼痛、ならびに過敏症を治療する、寛解させる、その強度を低下さ

せる、および予防するのに十分な量である。臨床状況において理解されるように、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、抗鬱薬、抗痙攣薬、NSAID、COX-2阻害剤、NOS阻害剤等などの、現在用いられている他の化合物を含む、別の薬物、化合物、または薬学的組成物と併用して投与された場合に達成されてもよく、またはそうでなくともよい。したがって、「有効量」は、1つまたは複数の治療薬を投与する状況において考慮することができ、1つまたは複数の他の薬剤と併用して望ましい結果が達成され得るまたは達成される場合には、単一の薬剤は有効量で与えられると考えてよい。

#### 【0040】

疼痛の「発生率の減少」とは、重症度の減少(例えばオピエートを含む、これらの状態に一般的に用いられる他の薬物および治療の必要性および量(例えば、それに対する曝露)の減少を含み得る)、持続期間の減少、および頻度の減少(例えば、個体において神経因性疼痛を遅延させるか、または神経因性疼痛までの時間を延ばすことを含む)のいずれかを意味する。当業者によって理解されるように、個体は治療に対するその反応の点で異なる場合があるため、例えば、「個体において神経因性疼痛の発生率を減少させる方法」は、そのような投与がその特定の個体における発生率のそのような減少を引き起こす可能性が高いであろうという合理的な予測に基づいて、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、または抗S1P抗体もしくは抗S1P1受容体抗体を含むがこれらに限定されないS1P受容体アンタゴニストを投与することを反映する。

10

#### 【0041】

神経因性疼痛、または神経因性疼痛(癌性疼痛または化学療法誘発性疼痛など)の1つもしくは複数の症状を「寛解させること」とは、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、または抗S1P抗体もしくは抗S1P1受容体抗体を含むがこれらに限定されないS1P受容体アンタゴニストを投与しない場合と比較した、神経因性疼痛の1つまたは複数の症状の低減または改善を意味する。「寛解させること」はまた、症状の持続期間の短縮または減少も含む。

20

#### 【0042】

神経因性疼痛、または神経因性疼痛(癌性疼痛または化学療法誘発性疼痛など)の1つもしくは複数の症状を「緩和すること」とは、本発明に従って、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、または抗S1P抗体もしくは抗S1P1受容体抗体を含むがこれらに限定されないS1P受容体アンタゴニストで治療した個体または個体の集団における、神経因性疼痛の1つまたは複数の望ましくない臨床徴候の程度の低減を意味する。

30

#### 【0043】

その中で用いられる、疼痛の発生を「遅延させること」とは、疼痛、例えば癌性疼痛または化学療法誘発性疼痛などの神経因性疼痛の進行を引き延ばす、妨げる、遅くする、遅らせる、安定化させる、および延期することを意味する。この遅延は、病歴および治療を受ける個体に応じて、様々な時間の長さであり得る。当業者には明らかなように、十分であるかまたは有意な遅延は、個体が神経因性疼痛を生じないという点で、事実上、予防を包含し得る。症状の発生を「遅延させる」方法とは、この方法を使用しない場合と比較して、所定の時間枠において症状が発生する確率を減少させる、および所定の時間枠において症状の程度を減少させる方法である。このような比較は、典型的には、統計的に有意な数の対象を用いた臨床研究に基づいている。

40

#### 【0044】

本明細書において用いられる「神経因性疼痛」とは、任意の病因の疼痛、ならびに末梢神経系および中枢神経系への損傷またはそれらの機能障害と関連した任意の疼痛を指す。神経因性疼痛の例には、末梢神経における癌の直接的な結果(例えば、腫瘍による圧迫)、または化学療法(すなわち、パクリタキセル、白金薬物による)、放射線障害、癌手術の副作用、神経系と関連した癌に伴う疼痛(「突出痛」および末期癌と関連した疼痛を含む)、末梢神経障害 ヘルペス後神経痛、および糖尿病に伴う疼痛が含まれる。

#### 【0045】

50



本明細書において用いられる「炎症性疼痛」とは、例えば、組織または関節の浮腫 腫脹、および炎症と関連した急性または慢性疼痛を指す。

【0046】

本明細書において用いられる「過敏症」または「疼痛過敏症」には、典型的に様々な病因の疼痛状態と関連した痛覚過敏および異痛症(熱/触覚/機械)が含まれる。

【0047】

「生体試料」は、個体から採取された様々な試料種を包含し、診断またはモニタリングアッセイにおいて使用することができる。この定義には、血液および生物学的起源の他の液体試料、生検標本などの固体組織試料、またはそれに由来する組織培養物もしくは細胞、およびその子孫が包含される。この定義には、試薬による処理、可溶化、またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドなどの特定成分の濃縮、または切片作製目的の半固体または固体マトリックス中への包埋によるなど、その獲得後に任意の様式で操作された試料もまた含まれる。「生体試料」という用語は臨床試料を包含し、本用語には、培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生体液、および組織試料もまた含まれる。

10

【0048】

「個体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、家畜(ウシなど)、運動動物、ペット(ネコ、イヌ、およびウマなど)、霊長類、マウス、およびラットが含まれるが、これらに限定されない。

【0049】

本明細書において用いられる「ベクター」とは、関心対象の1つまたは複数の遺伝子または配列を宿主細胞中に送達し、好ましくは発現させることができる構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、陽イオン縮合剤と会合したDNAまたはRNA発現ベクター、リボソーム内に封入されたDNAまたはRNA発現ベクター、および産生細胞などのある種の真核細胞が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0050】

本明細書において用いられる「発現制御配列」とは、核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現制御配列は、構成的もしくは誘導性プロモーターなどのプロモーター、またはエンハンサーであってよい。発現制御配列は、転写される核酸配列に機能的に連結される。

30

【0051】

本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」には、有効成分と組み合わせた場合に該成分が生物活性を保持することを可能にし、対象の免疫系と非反応性である任意の物質が含まれる。例として、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水乳濁液などの乳濁液、および様々な種類の湿潤剤などの、標準的な薬学的担体のいずれかが含まれるが、これらに限定されない。エアロゾルまたは非経口投与用の好ましい希釈剤は、リン酸緩衝生理食塩水または通常(0.9%)の生理食塩水である。このような担体を含む組成物は、周知の従来法(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; および Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000を参照されたい)によって製剤化される。

40

【0052】

本明細書において用いられる「 $K_{off}$ 」という用語は、抗体/抗原複合体からの抗体の解離速度定数を指すことが意図される。

【0053】

本明細書において用いられる「 $K_d$ 」という用語は、抗体抗原相互作用の解離定数を指すことが意図される。

【0054】

発明の概要

第1の局面において、本明細書に開示される本発明は、スフィンゴシンキナーゼアンタ

50

ゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つの治療有効量の投与により、個体における神経因性疼痛を治療するための方法を提供する。

【0055】

第2の局面において、本明細書に開示される本発明は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つの治療有効量の投与により、個体における炎症性疼痛を治療するための方法を提供する。

【0056】

第3の局面において、本明細書に開示される本発明はまた、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つの治療有効量の投与により、個体における、上記のように痛覚過敏および異痛症を含む過敏症を治療するための方法を提供する。

【0057】

第4の局面において、本明細書に開示される本発明はまた、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つの治療有効量の投与により、個体における抗侵害受容性耐性を治療するための方法を提供する。

【0058】

第5の局面において、本明細書に開示される本発明はさらに、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つの有効量、およびスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのうちの少なくとも1つの有効量を投与するための説明書を含むキットを提供する。

【発明を実施するための形態】

【0059】

発明の詳細な説明

本発明は、脊髄セラミドのオピオイド鎮痛耐性および痛覚過敏への関与が、S1Pを介したシグナル伝達によって起こるのかどうかを判定するために行われた研究に由来する。デノボ経路およびSMase経路における特定段階の薬理学的標的化を通して、脊髄で形成されたS1Pが、少なくとも部分的にグリア細胞機能の調節を介して、神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性に寄与する重要な二次メッセンジャーであることが初めて実証された。神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性を防止および治療するために、多くのレベルでセラミド代謝経路を妨害し得る、薬理学的操作の様々なプラットフォームアプローチが提供される。

【0060】

特に、セラミド由来のS1Pが、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生において重要な役割を果たすことが発見され、疼痛管理におけるオピエートの補助としての、セラミドおよびS1Pの阻害剤の開発の新規な機構原理が提供される。グリアにおけるS1Pの役割に加えて、S1Pは、ニューロンに影響を及ぼすことにより、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性の発生に寄与することが示された。この過程のモデルを図6に示すが、この図は、モルヒネの慢性投与が脊髄のグリア細胞(アストロサイトおよびミクログリア細胞)におけるセラミド代謝経路を活性化し、スフィンゴシンキナーゼによるS1Pの産生増加をもたらすことを提供している。その細胞外放出に続いて、S1Pは次にグリア細胞上のその受容体に結合し、一連のシグナル伝達経路を開始させ、周知の炎症誘発性および神経興奮性サイトカイン、IL-1、TNF- $\alpha$ 、およびIL-6の産生強化に至る。S1Pの阻害はこれらのサイトカインの形成を阻止し、このことから、S1P形成の阻害剤(スフィンゴシンキナーゼ阻害剤など)によるモルヒネ誘発性の痛覚過敏および耐性の減弱が、モルヒネ誘発性の脊髄のサイトカイン形成の抑制による二次的なものであることが示唆される。

【0061】

10

20

30

40

50

特定の理論によって縛られることはないが、S1P関与の機構は、グリア細胞からの炎症誘発性メディエータの産生を調節することが知られている、酸化還元感受性転写因子(例えば、NFKB)、ならびにP38およびERK1/2を含むいくつかのMAPKの活性化によって示され得ると考えられている(Watkins et al., 2001; Tanga et al., 2006)。さらに、NF-KB、P38キナーゼ、およびERKは、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に関連づけられている(Cui et al., 2006; Ndengele et al., 2009; Wang et al., 2009)。したがって、S1Pは、グリア細胞を活性化して、NF- $\kappa$ BおよびMAPK(P38キナーゼ、ERK)依存的様式で炎症誘発性サイトカインを放出することにより、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に寄与し得る。

#### 【0062】

加えて、特定の理論によって縛られることはないが、S1Pが関与する別のシグナル伝達経路が、ペルオキシ亜硝酸(「PN」)の形成および迅速な反応によって起こるようである。S1Pは、NAPDH酸化酵素および一酸化窒素合成酵素をそれぞれ活性化することにより、スーパーオキシドおよび一酸化窒素の形成を増加させ得る(Keller et al., 2006; Nayak et al., 2010)。スーパーオキシドおよび一酸化窒素はいずれも、やはりオピエート誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に関連づけられている(Salvemini and Neumann, 2009)、強力な炎症誘発性(Salvemini et al., 1998)でかつ侵害受容に親和的な窒素酸化種(Salvemini and Neumann, 2010)である、PNの生合成における前駆体である(Beckman et al., 1990)。

#### 【0063】

したがって、S1Pは、PNの産生を支持し、PNが次に、最適な脊髄のグルタミン酸作動性シグナル伝達の維持に関与することが知られている重要なグリア細胞タンパク質をニトロ化することにより、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に寄与する。実際に、DMSによるS1Pの阻害は、PNのマーカーである3-ニトロチロシン(「NT」)の形成を阻止した(Muscoli et al., 2007)。特にNMDA受容体によって媒介されるようなグルタミン酸神経伝達が、オピオイド耐性の発生において重要であることは、十分に確証されている(Trujillo and Akil, 1991)。細胞外グルタミン酸の恒常性は、ニューロンおよびグリアの両方の形質膜内のナトリウム依存性高親和性グルタミン酸輸送体(GT)によって厳密に調節されているが、機能的なグルタミン酸取り込みの大部分(90%超)は、グリアの輸送体：グルタミン酸/アスパラギン酸輸送体(GLAST)およびGLT-1によって媒介される(Danbolt, 2001)。GLAST/GLT-1機能が影響を受ける(すなわち、減少するかまたは排除される)場合には、グルタミン酸はCSF内で増加して、シナプス伝達の急速な変化に寄与し得る(Nakagawa et al., 2001)。

#### 【0064】

細胞外グルタミン酸の恒常性の調節におけるGTの中心的役割とは対照的に、グリア細胞酵素GSは、その細胞内代謝運命において極めて重要な役割を果たす(Suarez et al., 2002)。CNSにおいて、GSは主にアストロサイト内に位置し、これらの細胞の主な役割の1つは、過剰なアンモニアおよびグルタミン酸を取り込み、それらをグルタミンに変換することによって、興奮毒性からニューロンを保護することである(Suarez et al., 2002)。グルタミンは次にニューロンに輸送され、そこでグルタミン酸およびGABAの形成のための前駆体として役立つ(Waniewski and Martin, 1986)。GSの酵素不活性化は、ニューロン興奮を促進する(Suarez et al., 2002; Muscoli et al., 2005)。さらに、フィードバック調節を介して、グルタミン合成酵素の活性の減少はグルタミン酸輸送体の活性を減少させることができ(Suarez et al., 2002)、これら2つの経路間の相互作用が強調される。GS活性の阻害は、炎症性痛覚過敏と関連した中枢性感作を阻止する(Chiang et al., 2007)。

#### 【0065】

GLT-1およびGSのニトロ化がDMSによって阻害されることもまた、発見された。したがって、S1Pの阻害剤による痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の阻害は、少なくとも部分的には、PN生成、ならびにそれに続くGLT-1およびGSの翻訳後ニトロ化および不活性化の阻害による二次的なものである。いかなる特定の理論によっても縛られることはないが、これ

10

20

30

40

50

らのグリア細胞タンパク質のニトロ化を妨げることにより、DMSはグルタミン酸を基礎レベルまで下げ、そして最適なグルタミン酸作動性神経伝達を回復させると考えられる。

#### 【0066】

モルヒネの慢性投与、セラミド代謝経路の活性化、ならびに痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生の間の機構的関連性は、依然として不明である。この場合も同様に、特定の理論によって縛られることはないが、オピエート誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生、ならびに神経因性疼痛における、グリア細胞でのToll様受容体4(TLR4)の活性化を意味づける相次ぐデータが最近になって出現した(Tanga et al., 2005; Watkins et al., 2009)。単球およびマクロファージにおけるLPS(TLR4の周知の外因性リガンド)によるTLR4の活性化は、デノボ経路およびSM経路における酵素を活性化して、セラミドの産生増加をもたらし、これは次にNF- $\kappa$ BおよびMAPKを活性化して、一酸化窒素およびスーパーオキシドの産生、ならびに敗血症および敗血症性ショックの発生に結びつけられているTNF- $\alpha$  およびIL- $1\beta$  事象を増加させる(Delogu et al., 1999; Claus et al., 2005; Cuzzocrea et al., 2009)。したがって、まとめて解析した場合、最近になって実証されたTLR4アゴニストであるモルヒネ(Watkins et al., 2009)によるTLR4由来シグナル伝達経路の活性化は、慢性モルヒネ投与を、セラミド代謝経路の活性化、ならびにひいては痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に関連づけ得る。

10

#### 【0067】

オピエート媒介性の過敏症と、糖尿病およびその他の感覚性ニューロパチーによる慢性神経因性疼痛と関連した過敏症が、分子的、生化学的、および薬理的にかなり類似している(Mao et al., 1995; Watkins et al., 2005)ことを考慮して、セラミドおよびS1Pがそれら両方の状態において実行可能な治療標的となり得るという仮説もまた調べられた。そのような研究により、化学療法誘発性の神経因性疼痛のモデルにおいて特に重要であるものとして、S1P1受容体が同定された。

20

#### 【0068】

特に、S1P受容体アンタゴニストが、セラミド誘発性の痛覚過敏(図28)および化学療法誘発性の神経因性疼痛(図10および図11)を逆転させることが実証された。さらに、S1P受容体アゴニスト、特にS1P1、S1P3、およびS1P5受容体サブタイプに対するアゴニストが、化学療法誘発性の神経因性疼痛の発生を阻止することが実証された(図20～図24)。いかなる特定の理論によっても縛られることはないが、S1P受容体アゴニストはS1P受容体の内部移行を引き起こし、それらが再循環できないようにそれらを分解すると考えられる。さらなる実験データ(図27)から、S1P受容体アゴニストが、カラゲナンによって誘発される炎症性疼痛の発生を阻止することが示され、それにより、関節リウマチにおける慢性炎症性疼痛などの、すべての種類の炎症性疼痛の治療のための別の手段が提供される。

30

#### 【0069】

##### 一般的技法

本発明の特定の局面の実行は、他に指定のない限り、当技術分野の技術の範囲内にある分子生物学(組換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来の技法を使用する。このような技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and Cc. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Col

40

50

igan et al., eds., 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999) ; Immunobiology (CA. Janeway and P. Travers, 1997) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) ; および Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)などの文献において十分に説明されている。

【 0 0 7 0 】

10

#### 治療目的のために抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体を使用する方法

本発明の1つの局面では、S1Pの生物活性を減少させるおよび阻止するために、抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体を投与する。このアンタゴニスト活性は、神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性などの、脊髄における内因性S1P産生と関連した病理学的状態の治療において有用であると考えられる。好ましくは、これらの局面において、抗体の有効量を個体に投与する。したがって、1つの局面において、本発明は、本明細書に開示されるアンタゴニスト(LT1009などのポリペプチドおよび抗体を含む)のいずれかを用いて、ヒトS1P生物活性を遮断する方法を提供する。1つの局面において、本方法は、本明細書に記載されるポリペプチド(LT1009を含む)のいずれかとS1Pを接触させる段階を含み、それにより、S1P活性によって媒介される神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性が遮断される、減少する、阻止される、または抑制される。さらに別の局面においては、神経因性疼痛(癌性疼痛または化学療法誘発性疼痛など)を有する個体を、抗S1P抗体(LT1009を含む)もしくは抗S1P受容体抗体、またはそれらの組み合わせによって治療する。

20

【 0 0 7 1 】

簡単にするため、これらの方法が、本明細書に記載される変種抗体およびポリペプチドのいずれにも当てはまるという理解の下で、一般的に抗S1P抗体(LT1009を含む)または抗S1P受容体抗体に言及する。

【 0 0 7 2 】

抗S1P抗体もしくは抗S1P受容体抗体、または一本鎖(ScFv)などの断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fe等)、その変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および必要な特異性のS1P/S1P受容体(S1P1受容体を含む)認識部位を含む、抗S1P抗体もしくは抗S1P受容体抗体のあらゆる他の改変された立体配置の様々な製剤を、それを必要とする個体への投与に使用することができる。いくつかの局面では、抗S1P抗体および/もしくは抗S1P受容体抗体、またはそれらの様々な製剤を、そのまま投与することができる。他の局面では、抗S1P抗体もしくは抗S1P受容体抗体、またはそれらの様々な製剤(本明細書に記載される任意の組成物局面を含む)、および薬学的に許容される賦形剤を投与することができ、これらは様々な製剤中であってよい。薬学的に許容される賦形剤は、当技術分野において公知である。例えば、賦形剤は形態もしくは稠度を付与し得るか、または希釈剤として働き得る。適切な賦形剤には、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変更するための塩、封入剤、緩衝液、および皮膚浸透増進剤が含まれるが、これらに限定されない。非経口および非経口でない薬物送達のための賦形剤および製剤は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)に記載されている。

30

40

【 0 0 7 3 】

いくつかの局面において、これらの薬剤は注射(例えば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内等)による投与のために製剤化されるが、他の投与形式(例えば、経口、粘膜、吸入を介するもの、舌下等)を用いることもできる。したがって、抗S1P抗体および/または抗S1P受容体抗体、ならびにそれらの同等物は、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液などの、薬学的に許容されるビヒクルと併用することが好ましい。特定の投与計画、すなわち、用量、タイミング、および反復は、特定の個体およびその個体の病歴に依存する。

50

一般的に、以下の用量のいずれかを用いることができる：少なくとも約50 mg/kg体重；少なくとも約10 mg/kg体重；少なくとも約3 mg/kg体重；少なくとも約1 mg/kg体重；少なくとも約750 µg/kg体重；少なくとも約500 µg/kg体重；少なくとも約250 µg/kg体重；少なくとも約100 µg/kg体重；少なくとも約50 µg/kg体重；少なくとも約10 µg/kg体重；少なくとも約1 µg/kg体重、またはそれよりも少ない用量を投与する。数日またはそれ以上にわたって反復投与するには、状態に応じて、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで治療を継続する。例示的な投薬計画は、抗S1P抗体および/または抗S1P受容体抗体の約2 mg/kgの最初の用量、およびその後の約1 mg/kgの週に1度の維持用量、またはその後の1週間おきの約1 mg/kgの維持用量の投与を含む。しかしながら、医師が達成を望む薬物動態減衰のパターンに応じて、他の投与計画が有用である場合もある。半減期などの経験的考察が、一般的に投薬量の決定に寄与する。この治療法の進行は、従来の技法およびアッセイ法により容易にモニターされる。

10

20

30

40

50

#### 【0074】

個体によっては、2回以上の用量が必要となる場合がある。投与頻度は、治療過程にわたって決定および調整することができる。例えば、投与頻度は、治療される神経因性疼痛の種類および重症度、薬剤を予防目的で投与するのかまたは治療目的で投与するのか、以前の治療法、患者の病歴および薬剤に対する反応、ならびに主治医の裁量に基づいて、決定または調整することができる。典型的には、臨床医は、所望の結果を達成する投薬量に達するまで、抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体を投与する。場合によっては、抗S1P抗体および/または抗S1P受容体抗体の持続性連続放出製剤が適切であり得る。持続放出を達成するための様々な製剤および装置は、当技術分野において公知である。

#### 【0075】

1つの局面において、抗S1P抗体および/または抗S1P受容体抗体(またはポリペプチド)の投薬量は、1回または複数回の投与を受けた個体において、経験的に決定することができる。個体に、抗S1P抗体および/または抗S1P受容体抗体の漸増投薬量を投与する。抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体、またはその他の同等の抗体の有効性を評価するために、疾患症状(神経因性疼痛など)のマーカーをモニターすることができる。

#### 【0076】

本発明の方法に従った抗S1P抗体および/もしくは抗S1P受容体抗体またはポリペプチドの投与は、例えば、レシピエントの生理的状态、投与の目的が治療的であるかまたは予防的であるか、および医師に公知のその他の要因に応じて、連続的または断続的であってよい。抗体の投与は、あらかじめ選択された期間にわたって本質的に連続的であってよく、または、例えば神経因性疼痛、炎症性疼痛、もしくは痛覚過敏を生じる前、間、もしくは後のいずれかの、間隔を空けた一連の投与であってよい。

#### 【0077】

その他の製剤には、当技術分野で公知の適切な送達形態が含まれ、これにはリボソームなどの担体が含まれるが、これに限定されない。例えば、Mahato et al. (1997) Pharm. Res. 14:853-859を参照されたい。リボソーム調製物には、サイトフェクチン、多重膜小胞、および単層小胞が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0078】

いくつかの局面においては、2つ以上の抗体またはポリペプチドを投与することができる。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。そのような組成物は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つの異なる抗体を含み得る。抗体の混合物は、当技術分野でしばしば示されるように、より広範囲の個体集団を治療するのに特に有用であり得る。

#### 【0079】

本発明の抗体またはポリペプチド(抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体など)のいずれかをコードするポリヌクレオチドを、所望の細胞における本発明の抗体またはポリペプチドのいずれかの送達および発現に用いることもできる。発現ベクターを用いて、抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体またはポリペプチドの発現を指示することができることは明白であ

る。発現ベクターは、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、髄腔内、脳室内、経口、経腸、非経口、鼻腔内、経皮的、舌下、または吸入によるなど、当技術分野で公知の任意の手段によって投与することができる。例えば、発現ベクターの投与には、注射、経口投与、微粒子銃、またはカテーテル投与、および局所投与を含む、限局投与または全身投与が含まれる。当業者は、インビボで外因性タンパク質の発現を得るための発現ベクターの投与に精通している。例えば、米国特許第6,436,908号；第6,413,942号；および第6,376,471号を参照されたい。

#### 【0080】

本発明の抗体またはポリペプチド(抗S1P抗体および抗S1P受容体抗体など)のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む治療組成物の標的化送達を用いることもできる。受容体媒介性DNA送達技法は、例えば、Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (I. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338に記載されている。遺伝子治療プロトコルでは、限局投与のために、ポリヌクレオチドを含む治療組成物を約100 ng ~ 約200 mgのDNAの範囲で投与する。遺伝子治療プロトコルの期間に、約500 ng ~ 約50 mg、約1 mg ~ 約2 mg、約5 mg ~ 約500 mg、および約20 mg ~ 約100 mgの濃度範囲のDNAを用いることもできる。本発明の治療ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを用いて送達することができる。遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス起源または非ウイルス起源のものであってよい(一般的に、Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; およびKaplan, Nature Genetics (1994) 6:148を参照されたい)。このようなコード配列の発現は、内因性の哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを用いて誘導することができる。コード配列の発現は、構成的または調節性のいずれかであってよい。

#### 【0081】

所望のポリヌクレオチドの送達および所望の細胞における発現のためのウイルスに基づくベクターが、当技術分野で周知である。ウイルスに基づく例示的なビヒクルには、組換えレトロウイルス(例えば、PCT特許出願公開第WO 90/07936号；第WO 94/03622号；第WO 93/25698号；第WO 93/25234号；第WO 93/11230号；第WO 93/10218号；第WO 91/102805号；米国特許第5,219,740号；第4,777,127号；英国特許第2,200,651号；および欧州特許第0345242号を参照されたい)、アルファウイルスに基づくベクター(例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス(ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR- 532)、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(例えば、PCT特許出願公開第WO 94/12649号、第WO 93/03769号；第WO 93/19191号；第WO 94/28938号；第WO 95/11984号、および第WO 95/00655号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147に記載されているような、死滅アデノウイルスに連結されたDNAの投与も、使用することができる。

#### 【0082】

非ウイルス性の送達ビヒクルおよび方法を使用することもでき、これには、単独の死滅アデノウイルスに連結されたまたは連結されていないポリカチオン性濃縮DNA(例えば、Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147を参照されたい)；リガンド結合DNA(例えば、Wu J. Biol. Chem. (1989) 264:16985を参照されたい)；真核細胞送達ビヒクル細胞(例えば、米国特許第5,814,482号；PCT特許出願公開第WO 95/07994号；第WO 96/17072号；第WO 95/30763号；および第WO 97/42338号を参照されたい)、および核酸電荷中和または細胞膜との融合が含まれるが、これらに限定されない。裸のDNAを使用することもできる。裸のDNAの例示的な導入法は、PCT特許出願公開第WO 90/11092号および米国特許第5,580,859号に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして働き得るリボソームは、米国特許第5,422,120号；PCT特許出願公開第WO 95/13796号；第WO 94/23697号；第WO 91/14445号；および欧

州特許第0524968号に記載されている。さらなるアプローチは、Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411、およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581に記載されている。

#### 【0083】

本明細書に記載されるすべての方法に関して、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニストへの言及はまた、これらの薬剤の1つまたは複数を含む組成物を含む。これらの組成物は、緩衝液を含む薬学的に許容される賦形剤などの、適切な賦形剤をさらに含み得、こうした賦形剤は当技術分野で周知である。本発明は、単独で、または治療の他の従来法と併用して用いることができる。

10

#### 【0084】

神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性を治療するためのスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニスト

いくつかの局面において、本発明は、哺乳動物、ヒトおよび非ヒトの両方を含む個体における、神経因性疼痛(癌性疼痛および化学療法誘発性疼痛など)、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性を治療するための方法を提供する。

#### 【0085】

したがって、1つの局面において、本発明は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストの有効量を投与する段階を含む、個体における神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性を治療するための方法を提供する。本明細書において意図されるように、「治療」という用語には、個体における神経因性疼痛、誘発性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性を取り除くこと、その発生率を減少させること、寛解させること、抑制すること、緩和すること、およびその開始、発生、または進行を遅延させることが含まれるが、これらに限定されない。したがって、いくつかの局面では、個体、例えば癌を有する個体または化学療法の対象において疼痛を生じる前または疼痛エピソードの前に、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニストを投与する。

20

#### 【0086】

神経因性疼痛の緩和および炎症性疼痛の緩和は、緩和の時間経過によって特徴づけることができる。したがって、いくつかの局面において、疼痛の緩和は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストの投与後、約24時間以内に観察される。他の局面において、疼痛の緩和は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストの投与後、約36時間、48時間、60時間、72時間、または4日以内に観察され得る。さらなる他の局面において、疼痛の緩和は、神経因性疼痛または炎症性疼痛の改善の徴候が観察される前に、観察される。いくつかの局面では、疼痛の頻度および強度が減少し得、神経因性疼痛を患っている人の生活の質が向上し得る。痛覚過敏および異痛症については、同様の時間枠、および同様に改善された状態において、疼痛に対する感受性低下が観察され得る。

30

40

#### 【0087】

化学療法誘発性疼痛を治療する場合には、本発明の方法を任意の化学療法薬と併用して用いることができる。例示的な薬物には、タキサン、白金化合物、ビンカルカロイド、およびプロテアソーム阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。好ましい化学療法薬には、パクリタキセル、オキサリプラチン、ボルテゾミブ、およびビンクリスチンが含まれる。

#### 【0088】

スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニスト

50



1つの局面において、本発明は、受容体結合およびS1Pに対する細胞応答の誘発などの、S1Pシグナル伝達によって媒介される下流経路を含むS1P生物活性を阻止する、抑制する、または減少させる(有意に、を含む)任意の分子を指す用語である、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストを使用する方法を提供する。「アンタゴニスト」という用語は、生物学的作用の特定の機構を意味するのではなく、種々の異なる、化学的に多岐にわたる組成物によって達成され得る、S1Pとのすべての可能な薬理的、生理学的、および生化学的相互作用、ならびにその結果を明白に含み、包含すると見なされる。

【0089】

いくつかの公知のスフィンゴシンキナーゼアンタゴニストは、スフィンゴシンキナーゼの天然基質を分子的に模倣する薬剤である。このようなアンタゴニストは、場合によっては非可逆的にスフィンゴシンキナーゼに結合し、そうすることによりスフィンゴシンキナーゼの天然基質の結合を妨げ、最終的にこれらの基質のリン酸化を妨げる。スフィンゴシンキナーゼアンタゴニストの例には、メチルスフィンゴシン、N,N-ジメチルスフィンゴシン、トリメチルスフィンゴシン、D,L-スレオ-ジヒドロスフィンゴシン、および高密度リポタンパク質が含まれる。スフィンゴシンキナーゼ阻害剤として用いることができるその他のスフィンゴシン誘導体は、米国特許第5,583,160号；第5,627,171号；第5,466,716号；第5,391,800号；第5,137,919号；第5,151,360号；第5,248,824号；第5,260,288号；および第5,331,014号に記載されている。De Jongheらは、スフィンゴシンキナーゼの阻害剤として、短鎖スフィンガニン類似体および3-フルオロ-スフィンゴシン類似体を含む、短鎖スフィンゴイド塩基の使用を開示している(De Jonghe et al., Bioorg Med Chem Lett 1999 9 (21):3175-3180)。

【0090】

他のスフィンゴシンキナーゼアンタゴニストは、最終的に該キナーゼの触媒活性を妨害するという条件で、基質結合部位以外の部位でスフィンゴシンキナーゼに結合し得る。適切なスフィンゴシンキナーゼアンタゴニストは、基質または触媒との相互作用を妨害するもしくは妨げる、または産物の放出を妨害するもしくは妨げる、または酵素による基質の修飾を妨げることによって、スフィンゴシンキナーゼの触媒活性を妨害し得る。マウスのスフィンゴシンキナーゼ(GenBankアクセッション番号AF068748、AF068749)のクローニングがKohamaらによって報告されており、特異的スフィンゴシンキナーゼ活性の測定を目的とした発現研究および活性研究も報告されている。(Kohama et al., J Biol Chem 1998 273 (37):23722-8) GenBankアクセッション番号NM021972およびXM012589は、クローニングされたヒトスフィンゴシンキナーゼの配列に対応する。上記の薬剤クラスのいずれかのアクセイは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる文献、特にPCT特許出願第PCT/AU98/00730号(WO 99/12533)に記載されており、これは、スフィンゴシンキナーゼ活性を測定するための方法、ならびにスフィンゴシンキナーゼアゴニストおよびアンタゴニストを同定するための方法を記載している。

【0091】

例示的なS1PアンタゴニストまたはS1P受容体アンタゴニストには、抗S1P抗体(LT1002など)、抗S1P受容体抗体(LT1009など)、S1Pに対するアンチセンス分子(S1Pをコードする核酸に対するアンチセンス分子を含む)、S1P受容体(S1P1受容体など)に対するアンチセンス分子、S1P阻害化合物、およびS1P構造類似体が含まれるが、これらに限定されない。

【0092】

本発明の目的のために、「アンタゴニスト」という用語は、S1P自体、S1P生物活性(神経因性疼痛の任意の局面を媒介するその能力を含むが、これに限定されない)、または該生物活性の結果が、実質的に無効にされる、減少する、または任意の程度に中和される、先に特定されたすべての用語、表題、ならびに機能的状態および特徴を包含することが、明確に理解されるであろう。いくつかの局面において、S1PアンタゴニストまたはS1P受容体アンタゴニスト(例えば、抗体)は、S1Pと結合し、S1P受容体(S1P1受容体など)に結合し、下流のS1P受容体シグナル伝達またはS1P二次メッセンジャー活性を減少させる(妨げる

および阻止する)。他の局面において、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニストは、S1Pの形成を阻害し得る。したがって、いくつかの局面において、S1Pアンタゴニストは、スフィンゴシンキナーゼ、S1P、またはS1P受容体と結合する(物理的に相互作用する)。いくつかの局面において、S1Pアンタゴニストは、スフィンゴシンキナーゼ、S1P、またはS1P受容体に結合するポリペプチドである。

【0093】

いくつかの局面において、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストは、抗体もしくは抗体断片を含むペプチド、または改変されたペプチド(Fcドメインに融合されたS1P結合ペプチドなど)である。他の局面において、S1PアンタゴニストまたはS1P受容体アゴニストは、下流のS1P受容体シグナル伝達を減少させる(妨げるおよび阻止する)(例えば、キナーゼまたはリン酸化シグナル伝達の阻害剤)。さらなる他の局面において、アンタゴニストは、ヒト化されている抗S1P抗体(LT1009など)である。他の局面において、抗S1P抗体は、LT1009の1つまたは複数のCDR(LT1009由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはいくつかの局面では全6つのCDRなど)を含む。他の局面において、抗S1P抗体は完全にヒトである。さらなる他の局面において、抗S1P抗体は、図29(SEQ ID NO:1)および図30(SEQ ID NO:2)に示される、重鎖可変領域のアミノ酸配列および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。さらなる他の局面において、抗体は、免疫学的に不活性である、例えば、補体媒介性溶解を誘発しない、または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を刺激しない定常領域などの、改変された定常領域を含む。

10

【0094】

本発明において有用な抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fc等)、キメラ抗体、二重特異性抗体、異種複合体抗体、一本鎖(ScFv)、その変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、ならびに抗体のグリコシル化変種、抗体のアミノ酸配列変種、および共有結合により改変された抗体をはじめとする、必要な特異性の抗原認識部位を含む、免疫グロブリン分子のあらゆる他の改変された立体配置を包含し得る。抗体は、マウス、ラット、ヒト、またはあらゆる他の起源(キメラまたはヒト化抗体を含む)であってよい。

20

【0095】

例えば、抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体の、それぞれS1PまたはS1P受容体への結合に関する結合親和性は、約0.10~約0.80 nM、約0.15~約0.75 nM、および約0.18~約0.72 nMであってよい。1つの局面において、結合親和性は約2 pM~22 pMである。1つの局面において、結合親和性は約23 pM~約100 pMである。いくつかの局面において、結合親和性は約10 nMである。他の局面において、結合親和性は約10 nM未満である。他の局面において、結合親和性は約0.1 nMまたは約0.07 nMである。他の局面において、結合親和性は約0.1 nM未満または約0.07 nM未満である。他の局面において、結合親和性は、約100 nM、約50 nM、約10 nM、約1 nM、約500 pM、約100 pM、または約50 pMのいずれかから、約2 pM、約5 pM、約10 pM、約15 pM、約20 pM、または約40 pMのいずれかまでである。いくつかの局面において、結合親和性は、約100 nM、約50 nM、約10 nM、約1 nM、約500 pM、約100 pM、もしくは約50 pM、または約50 pM未満のいずれかである。いくつかの局面において、結合親和性は、約100 nM、約50 nM、約10 nM、約1 nM、約500 pM、約100 pM、もしくは約50 pMのいずれか未満である。さらなる他の局面において、結合親和性は、約2 pM、約5 pM、約10 pM、約15 pM、約20 pM、約40 pM、または約40 pM超である。

30

40

【0096】

抗体の結合親和性を決定するための方法は公知である。本発明による、S1PまたはS1P受容体に対する抗体の結合親和性を決定する1つの方法は、該抗体の単機能Fab'断片の結合親和性を測定することによる。単機能Fab断片を得るために、抗体(例えば、IgG)をパパインで切断するか、または組換えによって発現させることができる。例えば、抗体の抗S1P Fab断片の親和性は、表面プラズモン共鳴(BIAcore3000(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)システム、BIAcore, INC、Piscataway NJ)によって決定することができる。供給元の説明書に従って、CM5チップをN-エチル-N'-(3ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸

50

塩(EDC)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化することができる。ヒトS1P(または任意の他のS1P)を、10 mM酢酸ナトリウム pH 4.0中に希釈し、0.005 mg/mLの濃度で活性化チップ上に通液することができる。個々のチップチャンネルにわたって変動する流動時間を用いて、詳細な動力学的研究用の100~200応答単位(RU)およびスクリーニングアッセイ用の500~600 RUの2通りの抗原濃度範囲を得ることができる。チップは、エタノールアミンでブロックすることができる。HBS-EP緩衝液(0.01 M HEPES、pH 7.4、0.15 NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P29)を、BIAcoreアッセイ用のランニング緩衝液として用いることができる。精製Fab試料の段階希釈物(0.1~10×予測KD)を100 μL/分で1分間かけて通液することができ、最長2時間までの解離時間を可能にすることができる。Fabタンパク質の濃度は、標準物質として既知濃度のFab(アミノ酸分析により決定された)を用いて、ELISAおよびSDS-PAGE電気泳動によって決定することができる。動力学的な会合速度( $K_{on}$ )および解離速度( $K_{off}$ )は、BIAevaluationプログラムを使用して、データを1:1ラングミュア結合モデル(Karlsson, R. Roos, H. Fagerslam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6.99-110)に当てはめることによって、同時に得ることができる。平衡解離定数(KD)値は、 $K_{off}/K_{on}$ として算出することができる。このプロトコールは、ヒトS1P、別の脊椎動物(いくつかの局面では、哺乳動物)のS1P(マウスS1P、ラットS1P、霊長類S1Pなど)を含む、任意のS1Pに対する抗体の結合親和性の決定における使用に適している。

10

#### 【0097】

本発明のいくつかの局面において、抗S1P抗体はヒトS1Pと結合し、別の脊椎動物種(いくつかの局面では、哺乳動物)由来のS1Pとは有意に結合しない。いくつかの局面において、該抗体は、ヒトS1P、ならびに他の脊椎動物種(いくつかの局面では、哺乳動物)由来の1つまたは複数のS1Pと結合する。いくつかの局面において、該抗体は、ウマまたはイヌなどの哺乳動物種のS1Pには結合するが、別の哺乳動物種由来のS1Pには有意に結合しない。本段落の同じ基準が、抗S1P受容体抗体などの他の抗体にも当てはまり得る。

20

#### 【0098】

エピトープは、連続的であっても非連続的であってもよい。1つの局面において、該抗体は、米国特許出願第20070148168号；米国特許第6,881,546号および第6,858,383号；ならびに米国特許出願第10/029,372号；米国特許出願第60/854,971号および第11/924,890号、ならびに対応するPCT特許出願第PCT/US2007/082647号に記載されている抗体と本質的に同じS1Pエピトープと結合する。上記のエピトープはマウスおよびヒトのS1Pに関するものであるが、当業者は、マウスおよびヒトのS1Pの構造を他の種のS1Pと整列させ、これらエピトープに対する可能性のある対応物を同定することができることが理解される。

30

#### 【0099】

抗S1Pアンタゴニストまたは抗S1P受容体アンタゴニスト抗体は、当技術分野で公知の任意の方法によって作製することができる。宿主動物の免疫化の経路およびスケジュールは、一般的に、本明細書においてさらに記載されているような、抗体の刺激および産生のための確立された従来技法に沿うものである。ヒトおよびマウス抗体を生成するための一般的な技法は当技術分野で公知であり、本明細書に記載されている。

40

#### 【0100】

ヒトを含む任意の哺乳動物対象またはそれ由来の抗体産生細胞は、ヒトを含む哺乳動物のハイブリドーマ細胞株を生成するための基礎として役立つように操作することができることが意図される。典型的には、宿主動物に、本明細書に記載されるものを含む免疫原の一定量を、腹腔内、筋肉内、経口、皮下、足底内、および皮内より接種する。

#### 【0101】

ハイブリドーマは、Kohler, B. and Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497の、またはBuck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381 (1982)により改良された一般的な体細胞ハイブリッド形成技法を用いて、リンパ球および不死化骨髄腫細胞から調製することができる。ハイブリッド形成には、X63-Ag8.653、およびthe Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, California, USAからの骨髄腫株を含むがこれらに限定され

50

ない、入手可能な骨髓腫株を使用することができる。一般的に、この技法は、ポリエチレングリコールなどの融合源(fusogen)を使用するか、または当業者に周知の電気的手段により、骨髓腫細胞とリンパ球細胞を融合する段階を含む。融合後、細胞を融合培地から分離し、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(HAT)培地などの選択的増殖培地中で増殖させて、ハイブリッド形成していない親細胞を除去することができる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの培養には、血清を補充したまたは補充していない、本明細書に記載される培地のいずれかを使用することができる。細胞融合技法の別の代替手段として、EBVによって不死化したB細胞を用いて、本発明の抗S1Pモノクローナル抗体または抗S1P受容体モノクローナル抗体を生成することができる。必要に応じて、ハイブリドーマを増殖させ、サブクロニングすることができ、上清を、従来の免疫測定手順(例えば、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、または蛍光免疫測定法)により、抗免疫原活性についてアッセイすることができる。

10

#### 【0102】

抗体の供給源として使用することのできるハイブリドーマは、S1P、S1P受容体、またはそれらの一部に特異的なモノクローナル抗体を産生する親ハイブリドーマの子孫細胞である派生物をすべて包含する。

#### 【0103】

このような抗体を産生するハイブリドーマは、公知の手順を使用して、インビトロまたはインビボで増殖させることができる。そこから産生されたモノクローナル抗体は、必要に応じて、硫酸沈殿、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィー、限外ろ過などの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培地または体液から単離することができる。望ましくない活性が存在する場合には、例えば、固相に結合させた免疫原から作製された吸着剤上に調製物を流し、該免疫原から所望の抗体を溶出するまたは遊離させることによって除去することができる。免疫化する種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシのサイログロブリン、または大豆トリプシンインヒビターに、二官能性薬剤または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介して結合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCh、またはRとR'が異なるアルキル基である $R'N=C=NR$ を用いて結合させたS1Pで宿主動物を免疫化することにより、抗体の集団(例えばモノクローナル抗体)を得ることができる。

20

30

#### 【0104】

必要に応じて、関心対象の抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)を配列決定することができ、このポリヌクレオチド配列を発現または増殖のためにベクター中にクローニングすることができる。関心対象の抗体をコードする配列は、宿主細胞においてベクター中で維持することができ、次いで将来の使用のために該宿主細胞を増殖させ、凍結することができる。別法では、抗体を「ヒト化」するか、または抗体の親和性もしくは他の特徴を改善するために、該ポリヌクレオチド配列を遺伝子操作に使用することができる。例えば、抗体をヒトの臨床試験および治療において使用するには、適切であれば、免疫応答を回避するために、定常領域をヒト定常領域を模倣するように操作することができる。S1Pに対するより高い親和性、およびS1Pの阻害におけるより高い有効性を得るために、抗体配列を遺伝子操作することが望ましい場合がある。抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体に対して1つまたは複数のポリヌクレオチド変化を加えることができ、それでもなおそれぞれS1PおよびS1P受容体に対するその結合親和性が維持され得ることは、当業者に明白であろう。

40

#### 【0105】

モノクローナル抗体のヒト化は、以下のようにして達成することができる：(1) 出発抗体の軽鎖および重鎖可変ドメインのヌクレオチド配列および推定されるアミノ酸配列を決定する、(2) ヒト化抗体を設計する、すなわち、ヒト化過程においてどの抗体フレームワーク領域を使用するかを決定する、(3) ヒト化方法論/技法を適用する、ならびに(4) ヒト化抗体のトランスフェクションおよび発現。例えば、米国特許第4,816,567号；第5,807

50

,715号；第5,866,692号；第6,331,415号；第5,530,101号；第5,693,761号；第5,693,762号；第5,585,089号；および第6,180,370号を参照されたい。

【0106】

ヒト定常ドメインに融合させた、齧歯類V領域または改変された齧歯類V領域およびそれに伴う相補性決定領域(CDR)を有するキメラ抗体を含む、非ヒト免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を含む多くの「ヒト化」抗体分子が記載されている。例えば、Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991)、Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989)、Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987)、およびBrown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987)を参照されたい。他の参考文献は、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合前に、ヒト支持フレームワーク領域(FR)に移植された齧歯類CDRについて記載している。例えば、Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988)、Verhoeyen et al. *Science* 239: 1534-1536 (1988)、およびJones et al. *Nature* 321:522-525 (1986)を参照されたい。別の参考文献は、組換えによって張り合わせた齧歯類フレームワーク領域によって支持された齧歯類CDRについて記載している。例えば、欧州特許出願公開第0519596号を参照されたい。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおける齧歯類抗ヒト抗体分子部分の治療適用の期間および有効性を制限する、これら分子に対する望ましくない免疫応答を最小限に抑えるように設計される。例えば、抗体定常領域は、免疫学的に不活性(例えば、補体溶解を誘発しない)となるように操作することができる。例えば、PCT特許出願公開第PCT/GB99/01441号；英国特許出願第9809951.8号を参照されたい。同様に利用することのできる、抗体をヒト化する他の方法は、Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 (1991)、ならびに米国特許第6,180,377号；第6,054,297号；第5,997,867号；第5,866,692号；第6,210,671号；および第6,350,861号；ならびにPCT特許出願公開第WO 01/27160号によって開示されている。LT1009はヒト化抗体の一例である。

10

20

30

【0107】

さらに別の代替手段では、特定のヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように操作された市販のマウスを使用して、完全なヒト抗体を得ることができる。より望ましい(例えば、完全なヒト抗体)またはより強固な免疫応答を生じるように設計されたトランスジェニック動物を、ヒト化抗体またはヒト抗体の生成に使用することもできる。このような技術の例は、Abgenix, Inc. (Fremont, CA)からのXenomouse(商標)、ならびにMedarex, Inc. (Princeton, NJ)からのHuMAb-Mouse(登録商標)およびTC Mouse(商標)である。

40

50

【0108】

別法では、当技術分野で公知の任意の方法を用いて、抗体を組換えによって作製し、発現させることができる。例えば、抗体を、ファージディスプレイ技術によって組換えで作製することができる。例えば、米国特許第5,565,332号；第5,580,717号；第5,733,743号；および第6,265,150号；ならびにWinter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994)を参照されたい。あるいは、ファージディスプレイ技術(McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990))を用いて、非免疫化ドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロにおいてヒト抗体および抗体断片を生成することができる。この技法によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、M13またはfdなどの系状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングされ、機能的抗体断片としてファージ粒子の表面上に提示される。系状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むため、抗体の機能的特性に基づく選択によって、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択も行われる。したがって、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは様々な形式で行うことができる；総説については、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)を参照されたい。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源をファージディスプレイに用いることができる。Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)は、免疫化したマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模なランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。Mark et al., *J. Mol Biol.* 222:581-597 (1991)、またはGriffith et al., *EMBOJ.*

12:725-734 (1993)により記載されている技法に本質的に従って、非免疫化ヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原の多様なアレイ(自己抗原を含む)に対する抗体を単離することができる。自然の免疫応答では、抗体遺伝子は高い率で突然変異を蓄積する(体細胞超突然変異)。導入された変化の一部は、より高い親和性を付与することになり、高親和性の表面免疫グロブリンを提示するB細胞は、その後の抗原攻撃の際に優先的に複製され、分化する。この自然の過程は、「鎖シャフリング」として知られている技法を使用して模倣することができる。Marks, et al., Bio/Technol. 10:779-783 (1992))。この方法では、重鎖および軽鎖V領域遺伝子を、非免疫化ドナーから得られたVドメイン遺伝子の天然変種のレパートリー(レパートリー)と順次置換することによって、ファージディスプレイによって得られた「一次」ヒト抗体の親和性を改善することができる。この技法により、pM~nM範囲の親和性を有する抗体および抗体断片の生成が可能になる。非常に大きなファージ抗体レパートリー(「究極のライブラリー」としても知られている)を作製するための戦略は、Waterhouse et al., Nucl Acids Res. 21 :2265-2266 (1993)に記載されている。遺伝子シャフリングを使用して、齧歯類抗体から、その出発齧歯類抗体と同様の親和性および特異性を有するヒト抗体を導出することもできる。「エピトープ刷り込み」とも称されるこの方法によれば、ファージディスプレイ技法によって得られた齧歯類抗体の重鎖または軽鎖Vドメイン遺伝子が、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置換され、齧歯類-ヒトキメラが創出される。抗原上での選択により、機能的抗原結合部位を回復させることのできるヒト可変領域が単離される、すなわち、エピトープがパートナーの選択を支配する(刷り込む)。残りの齧歯類Vドメインを置換するためにこの過程を繰り返すと、CDR移植による齧歯類抗体のヒト抗体ヒト化、この技法は、齧歯類起源のフレームワークもCDR残基も有さない完全なヒト抗体を提供する。

10

20

#### 【0109】

上記の論述はヒト化抗体に関係するものであるが、論述された一般原理が、例えば、イヌ、ネコ、霊長類、ウマ、およびウシで使用するための抗体をカスタマイズするのに適用可能であることは明白である。本明細書に記載される、抗体をヒト化する1つまたは複数の局面を、例えば、CDR移植、フレームワーク突然変異、およびCDR突然変異と併用することもさらに明白である。

#### 【0110】

抗体は、最初に宿主動物から抗体および抗体産生細胞を単離し、遺伝子配列を取得し、その遺伝子配列を使用して、宿主細胞(例えば、CHO細胞)内で抗体を組み換えによって発現させることにより、組み換えで作製することができる。使用することのできる別の方法は、植物(例えば、タバコ)またはトランスジェニック乳汁中で抗体配列を発現させることである。植物または乳汁中で抗体を組み換え発現させる方法が開示されている。例えば、Peters, et al. Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar Int.Rev.Immunol. 13:65 (1995); およびPollock, et al., J Immunol Methods 231:147(1999)を参照されたい。

30

#### 【0111】

抗体の派生物、例えば、ヒト化、一本鎖等を作製するための方法は当技術分野で公知である

40

免疫測定法、および蛍光活性化細胞選別(FACS)などのフローサイトメトリー選別技法を使用して、S1PまたはS1P受容体に特異的な抗体を単離することもできる。

#### 【0112】

本発明による抗体は、必要に応じて、異なる担体に結合させることができる。担体は、活性があっても不活性であってもよい。周知の担体の例には、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、ガラス、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびに磁鉄鉱が含まれる。本発明の目的のために、担体の性質は可溶性または不溶性のいずれかであってよい。当業者は、抗体を結合させるための他の適切な担体を知っているか、または日常的な実験を用いてそのようなものを確認することができる。いくつかの局面において、担体は心筋を標的とする部分

50

を含む。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて、容易に単離し、配列決定することができる。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。ひとたび単離されたならば、このDNAを発現ベクター中にクローニングし、次にこれを、モノクローナル抗体を合成する目的で、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない、大腸菌(*E. coli*)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞などの宿主細胞内にトランスフェクトする。例えば、PCT特許出願公開第WO 87/04462号を参照されたい。DNAはまた、例えば、相同的なマウス配列に換えてヒト重鎖および軽鎖定常ドメインを置換することにより、Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81 :685J (1984)、または免疫グロブリンコード配列に対して、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全体もしくは一部を共有結合させることによって、改変することもできる。このようにして、本明細書における抗S1Pモノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

10

20

30

40

50

#### 【0113】

抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体は、当技術分野で周知の方法を用いて特徴づけることができる。例えば、1つの方法は、それが結合するエピトープ同定すること、または「エピトープマッピング」である。例えば、Chapter 11 of Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999に記載されているような、抗体抗原複合体の結晶構造の解明(例えば、タンパク質データバンク ID No. 3I9G)、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイ、および合成ペプチドに基づくアッセイを含む、タンパク質上のエピトープの位置をマッピングし、特徴づけるための、当技術分野で公知の多くの方法が存在する。さらなる例において、エピトープマッピングを用いて、抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体が結合する配列を決定することができる。エピトープマッピングは、Pepscan Systems(Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands)などのさまざまな供給元より市販されている。エピトープは、線状のエピトープであってよく、すなわち一続きのアミノ酸中に含まれてよく、または必ずしも一続きの中に含まれなくてもよい、アミノ酸の三次元相互作用によって形成される高次構造的エピトープであってよい。様々な長さ(例えば、少なくとも4~6アミノ酸長)のペプチドを単離するか、または合成し(例えば、組換えによる)、抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体との結合アッセイに使用することができる。

#### 【0114】

抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体を特徴づけるために用いることのできるさらに別の方法は、同じ抗原に結合することがわかっている他の抗体(例えば、抗S1P抗体の場合にはLT 1009)との競合アッセイを使用して、抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体が他の抗体と同じエピトープに結合するかどうかを判定することである。競合アッセイは、当業者に周知の方法を用いて行うことができる。

#### 【0115】

1つの態様では、発現ベクターを用いて、抗S1P抗体または抗S1P受容体抗体の発現を、それを必要とする患者における治療目的を含め、インビボで指示することができる。当業者は、インビボで外因性タンパク質の発現を得るための発現ベクターの投与に精通している。例えば、米国特許第6,436,908号；第6,413,942号；および第6,376,471号を参照されたい。発現ベクターの投与には、注射、経口投与、微粒子銃、またはカテーテル投与、および局所投与を含む、限局投与または全身投与が含まれる。別の局面では、発現ベクターを、交感神経幹もしくは神経節に直接、または冠動脈、心房、心室、もしくは心膜内に投与する。

#### 【0116】

発現ベクターまたはサブゲノムポリヌクレオチドを含む治療組成物の標的化送達を用いることもできる。受容体媒介性DNA送達技法は、例えば、Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993) 11 :202 ; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (I. A. Wolff, ed.) (1994) ; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621 ; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542 ; Zenke et al., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655 ; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338に記載されている。遺伝子治療プロトコルでは、限局投与のために、ポリヌクレオチドを含む治療組成物を約100 ng ~ 約200 mgのDNAの範囲で投与する。遺伝子治療プロトコルの期間に、約500 ng ~ 約50 mg、約1 µg ~ 約2 mg、約5 µg ~ 約500 µg、および約20 µg ~ 約100 µgの濃度範囲のDNAを用いることもできる。治療ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを用いて送達することができる。遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス起源または非ウイルス起源のものであってよい(一般的に、Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51 ; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845 ; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185 ; およびKaplit, Nature Genetics (1994) 6:148を参照されたい)。このようなコード配列の発現は、内因性の哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを用いて誘導することができる。コード配列の発現は、構成的または調節性のいずれかであってよい。

10

#### 【 0 1 1 7 】

所望のポリヌクレオチドの送達および所望の細胞における発現のためのウイルスに基づくベクターが、当技術分野で周知である。ウイルスに基づく例示的なビヒクルには、組換えレトロウイルス(例えば、PCT特許出願公開第WO 90/07936号 ; 第WO 94/03622号 ; 第WO 93/25698号 ; 第WO 93/25234号 ; 第WO 93/11230号 ; 第WO 93/10218号 ; 第WO 91/02805号 ; 米国特許第5, 219,740号および第4,777,127号 ; 英国特許第2,200,651号 ; ならびに欧州特許第0 345 242号を参照されたい)、アルファウイルスに基づくベクター(例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス(ATCC VR- 67 ; ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373 ; ATCC VR-1246)、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR-923 ; ATCC VR-1250 ; ATCC VR 1249 ; ATCC VR- 532))、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(例えば、PCT特許出願公開第WO 94/12649号、第WO 93/03769号 ; 第WO 93/19191号 ; 第WO 94/28938号 ; 第WO 95/11984号、および第WO 95/00655号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147に記載されているような、死滅アデノウイルスに連結されたDNAの投与も、使用することができる。

20

#### 【 0 1 1 8 】

非ウイルス性の送達ビヒクルおよび方法を使用することもでき、これには、単独の死滅アデノウイルスに連結されたまたは連結されていないポリカチオン性濃縮DNA(例えば、Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147を参照されたい) ; リガンド結合DNA(例えば、Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985を参照されたい) ; 真核細胞送達ビヒクル細胞(例えば、米国特許第5,814,482号 ; PCT特許出願公開第WO 95/07994号 ; 第WO 96/17072号 ; 第WO 95/30763号 ; および第WO 97/42338号を参照されたい)、および核酸電荷中和または細胞膜との融合が含まれるが、これらに限定されない。裸のDNAを使用することもできる。裸のDNAの例示的な導入法は、PCT特許出願公開第WO 90/11092号および米国特許第5,580,859号に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして働き得るリボソームは、米国特許第5,422,120号 ; PCT特許出願公開第WO 95/13796号 ; 第WO 94/23697号 ; 第WO 91/14445号 ; およびEP 0524968に記載されている。さらなるアプローチは、Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14 :2411、およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Set. (1994) 91:1581に記載されている。

30

#### 【 0 1 1 9 】

非抗体のスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニスト

40

本発明の別の局面では、抗S1P抗体または抗S1P受容体以外のスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストを使用することができる。本発明のいくつかの局面において、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストは、少なくとも1つのS1P活性の発現を阻止し得るかまたは減少させ得る少なくとも1つのアンチセンス分子を含む。スフィンゴシンキナーゼ、およびS1P1を含むS1P受容体のヌクレオチド配列は公知であり、公的に利用可能なデータベースから容易に入手可能である。他のポリヌクレオチドと交差反応することなく、スフィンゴシンキナーゼmRNAまたはS1P受容体mRNAと特異的に結合するアンチ

50



センスオリゴヌクレオチド分子を調製することが通例である。例示的な標的部位には、開始コドン、5'調節領域、コード配列、および3'非翻訳領域が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの局面において、オリゴヌクレオチドは、約10~100ヌクレオチド長、約15~50ヌクレオチド長、約8~25ヌクレオチド長、またはそれ以上である。オリゴヌクレオチドは、例えば、当技術分野で周知のホスホロチオエート結合および2'-O糖修飾などの骨格修飾を含み得る。

#### 【0120】

あるいは、S1Pの発現および放出ならびにS1P受容体発現は、当技術分野において周知の方法である遺伝子ノックダウン、モルホリノオリゴヌクレオチド、RNAi、またはリボザイムを用いて減少させることができる。

10

#### 【0121】

他の局面において、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストは、少なくとも1つのスフィンゴシンキナーゼ、S1P、およびS1P受容体阻害化合物を含む。本明細書において用いられる「阻害化合物」とは、特定の標的であるスフィンゴシンキナーゼ、S1P、またはS1P受容体の生物活性を直接または間接的に減少させる、阻害する、中和する、または消失させる、抗体以外の化合物を指す。スフィンゴシンキナーゼ、S1P、またはS1P受容体阻害化合物は、以下の特徴のうちのいずれか1つまたは複数を示すべきである：(a) その標的であるスフィンゴシンキナーゼ、S1P、またはS1P受容体のうちの少なくとも1つに結合し、標的生物活性、およびS1P機能によって媒介される下流経路を阻害する；(b) 神経因性疼痛(癌性疼痛など)、炎症性疼痛、または痛覚過敏の任意の局面を予防する、寛解させる、または治療する；(c) S1P受容体活性化(S1P1受容体二量体化およびリン酸化を含む)を阻止するまたは減少させる；ならびに(d) S1Pのクリアランスを増加させる。

20

#### 【0122】

いくつかの局面において、S1P阻害化合物はS1Pと結合する。例示的な標的(結合)部位には、S1P受容体に結合するS1Pの部分、および受容体結合領域に隣接し、受容体結合部分の正確な三次元形状に一部関与するS1Pの部分が含まれるが、これらに限定されない。別の局面において、S1P阻害化合物はS1P受容体(S1P1受容体など)と結合し、S1P生物活性を阻害する。他の局面において、S1P阻害化合物はスフィンゴシンキナーゼと結合して、S1P生物活性を阻害する。

30

#### 【0123】

いくつかの局面において、S1P阻害化合物は小分子である。小分子は、100~20,000ダルトン、500~15,000ダルトン、または1000~10,000ダルトンのうちのいずれかのあたりの分子量を有し得る。小分子のライブラリーは市販されている。小分子阻害剤は、吸入、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、髄腔内、脳室内、経口、経腸、非経口、鼻腔内、または経皮的を含む、当技術分野で公知の任意の手段を用いて投与することができる。一般的に、本発明によるスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストが小分子である場合、これは、1~3回またはそれ以上の用量に分割された、0.1~300 mg/kg患者体重の用量で投与される。成人患者については、1回用量当たり1 mg~5 gの範囲の用量を投与することができる。

40

#### 【0124】

他の局面において、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P1受容体アンタゴニストは、少なくとも1つのS1P構造類似体を含む。本発明における「S1P構造類似体」とは、S1Pの三次元構造の少なくとも一部と類似した三次元構造を有し、インビトロまたはインビボにおいて生理的条件下でスフィンゴシンキナーゼまたはS1P受容体に結合し、該類似体の結合がS1P生物活性またはS1P二次メッセンジャー活性を少なくとも部分的に阻害する化合物を指す。1つの局面において、S1P構造類似体はS1P1受容体に結合する。適切なS1P構造類似体は、例えばPCT特許出願公開第WO 96/06048号に記載されている方法により、S1P受容体結合の分子モデリングによって設計および合成することができる。

50

## 【0125】

本発明に従って、アンチセンスポリヌクレオチド、発現ベクター、またはサブゲノムポリヌクレオチドを含む治療組成物の標的化送達を用いることもできる。受容体媒介性DNA送達技法は、例えば、Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (1. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338に記載されている。遺伝子治療プロトコールでは、限局投与のために、ポリヌクレオチドを含む治療組成物を約100 ng~約200 mgのDNAの範囲で投与する。いくつかの局面では、遺伝子治療プロトコールの期間に、約500 ng~約50 mg、約1 µg~約2 mg、約5 µg~約500 µg、および約20 µg~約100 µgの濃度範囲のDNA、またはそれ以上を用いることもできる。

10

## 【0126】

本発明の治療ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを用いて送達することができる。遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス起源または非ウイルス起源のものであってよい(一般的に、Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; およびKaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148を参照されたい)。このようなコード配列の発現は、構成的または調節性発現を達成するために、内因性の哺乳動物のまたは異種のプロモーターおよびエンハンサーを用いて制御することができる。

20

## 【0127】

所望のポリヌクレオチドの送達および所望の細胞における発現のためのウイルスに基づくベクターが、当技術分野で周知である。ウイルスに基づく例示的なビヒクルには、組換えレトロウイルス(例えば、PCT特許出願公開第WO 90/07936号; 第WO 94/03622号; 第WO 93/25698号; 第WO 93/25234号; 第WO 93/11230号; 第WO 93/10218号; 第WO 91/02805号; 米国特許第5,219,740号および第4,777,127号; 英国特許第2,200,651号; ならびに欧州特許第0345242号を参照されたい)、アルファウイルスに基づくベクター(例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス(ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532))、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(例えば、PCT特許出願公開第WO 94/12649号、第WO 93/03769号; 第WO 93/19191号; 第WO 94/28938号; 第WO 95/111984号、および第WO 95/00655号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147に記載されているような、死滅アデノウイルスに連結されたDNAの投与も、使用することができる。

30

## 【0128】

非ウイルス性の送達ビヒクルおよび方法を使用することもでき、これには、単独の死滅アデノウイルスに連結されたまたは連結されていないポリカチオン性濃縮DNA(例えば、Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147を参照されたい); リガンド結合DNA(例えば、Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985を参照されたい); 真核細胞送達ビヒクル細胞(例えば、米国特許第5,814,482号; PCT特許出願公開第WO 95/07994号; 第WO 96/17072号; 第WO 95/30763号; および第WO 97/42338号を参照されたい)、および核酸電荷中和または細胞膜との融合が含まれるが、これらに限定されない。裸のDNAを使用することもできる。裸のDNAの例示的な導入法は、PCT特許出願公開第WO 90/11092号および米国特許第5,580,859号に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして働き得るリボソームは、米国特許第5,422,120号; PCT特許出願公開第WO 95/13796号; 第WO 94/23697号; 第WO 91/14445号; および欧州特許第0524968号に記載されている。さらなるアプローチは、Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411、およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581に記載されている。

40

## 【0129】

発現ベクターを用いて、本明細書に記載される、タンパク質に基づくスフィンゴシンキ

50

ナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニスト(例えば、抗S1P抗体)のいずれかの発現を指示することができることもまた明白である。

#### 【0130】

##### S1P受容体アゴニスト

さらなる局面において、本発明はS1P受容体アゴニストを使用する治療法を提供し、S1P受容体アゴニストとは、受容体結合およびS1Pに対する細胞応答の誘発などの、S1Pシグナル伝達によって媒介される下流経路を含むS1P受容体生物活性を誘導する任意の分子を指す。いかなる特定の理論によっても縛られることはないが、S1P受容体アゴニストは、それらが再循環できないようにS1P受容体の内部移行および分解を引き起こし、神経因性疼痛(癌性疼痛または化学療法誘発性疼痛を含む)、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性の有効な治療をもたらすようである。したがって、この局面において、本発明は、S1P受容体アゴニストの有効量を投与する段階を含む、個体における神経因性疼痛、炎症性疼痛、過敏症、および抗侵害受容性耐性を治療する方法を提供する。

10

#### 【0131】

「アゴニスト」という用語は、生物学的作用の特定の機構を意味するのではなく、種々の異なる、化学的に多岐にわたる組成物によって達成され得る、S1P受容体とのすべての可能な薬理的、生理学的、および生化学的相互作用、ならびにその結果を明白に含み、包含すると見なされる。1つの局面において、S1P受容体アゴニストは、インビトロまたはインビボにおいて生理的条件下でS1P受容体に結合し、その結合がS1P受容体に対するアゴニスト作用を発揮するスフィンゴシンおよびS1P構造類似体である。S1P[1~5]などのすべての種類のS1P受容体のアゴニストが許容可能であるが、S1P1のアゴニストが好ましい。S1P構造類似体は、S1P受容体のS1P結合部位に結合すると考えられる。しかしながら、アゴニストは、そのような結合がアゴニスト作用をもたらすのであれば、S1P結合部位以外の部位に結合してもよい。

20

#### 【0132】

例示的なアゴニストには、フィンゴリモド(コードネームFTY720、商品名Gilenya(商標)、Novartis Pharma AG、New York)、BAF312(Novartis Pharma AG、New York)、ボネシモド(ACT-128800、Actelion Ltd.、Switzerland)、ONO-4641(Ono Pharma、Japan)、CS-0777(Daiichi Sankyo、Japan)、KRP-203(Kyorin、Japan)、PF-991(Pfizer、New York)、およびW146(Cayman Chemical、Michigan)が含まれるが、これらに限定されない(Brinkmann et al. (2010) Nat. Rev. 9: Nov 2010: 883-897; Hla T. et al. (2011) Neurology 2011; 76; S3; Cusack et al. (2010) Curr. Op. in Dr. Disc. and Dev. 13 (4): 481-488; Strader et al. (2011) J. Nat. Prod. 2011, 74, 900-907)。フィンゴリモドが特に好ましい。

30

#### 【0133】

S1P受容体アゴニストが小分子である局面において、小分子は、100~20,000ダルトン、500~15,000ダルトン、または1000~10,000ダルトンのうちのいずれかのあたりの分子量を有し得る。小分子のライブラリーは市販されている。小分子は、吸入、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、髄腔内、脳室内、経口、経腸、非経口、鼻腔内、または経皮的を含む、当技術分野で公知の任意の手段を用いて投与することができる。一般的に、本発明によるS1P受容体アゴニストが小分子である場合、これは、1~3回またはそれ以上の用量に分割された、0.1~300 mg/kg患者体重の割合で投与される。標準体重の成人患者については、1回用量当たり1 mg~5 gの範囲の用量を投与することができる。

40

#### 【0134】

##### 本発明の方法において使用するための組成物

本発明の方法において使用される組成物は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニスト(抗S1P抗体など)の有効量を含み、いくつかの局面においては、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。いくつかの局面において、組成物は、本明細書に記載される方法のいずれかにおいて使用するためのものである。このような組成物の例および製剤化する方法は、前章およ

50

び以下にも記載されている。1つの局面において、組成物は、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストを含む。別の局面において、組成物は、1つまたは複数のスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストを含む。いくつかの局面において、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストは、有害な免疫応答を伴わない。いくつかの局面において、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストは、抗S1P抗体、抗S1P1受容体抗体、S1P1受容体に対するアンチセンス分子(S1P1受容体をコードする核酸に対するアンチセンス分子を含む)、S1P受容体(S1P1など)に対するアンチセンス分子、およびS1P阻害化合物、S1P構造類似体からなる群より選択される。別の局面において、S1PアンタゴニストまたはS1P1受容体アンタゴニストは抗S1P抗体である。他の局面において、抗S1P抗体はヒトS1Pを認識する。いくつかの局面において、抗S1P抗体はヒトである。さらなる他の局面において、抗S1P抗体はヒト化されている(本明細書に記載されるLT1009など)。さらなる他の局面において、抗S1P抗体は、抗体媒介性溶解またはADCCなどの、不要なまたは望ましくない免疫応答を誘発しない定常領域を含む。他の局面において、抗S1P抗体は、抗体LT1009の1つまたは複数のCDR(LT1009由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはいくつかの局面では全6つのCDRなど)を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0135】

本発明による組成物は、2つ以上のスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストを含み得る。例えば、組成物は、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストのあるクラスの2つ以上のメンバー(例えば、S1Pの異なる部位またはS1P1受容体の異なるエピトープを認識する抗S1P抗体の混合物)、およびS1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストの異なるクラスのメンバー(例えば、抗S1P抗体およびS1P阻害化合物)を含み得る。他の例示的な組成物は、同じエピトープを認識する2つ以上の抗S1P抗体、S1P受容体の異なるエピトープに結合する異なる種の抗S1P抗体、または異なるS1P阻害化合物を含む。

#### 【0136】

本発明による組成物は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover)をさらに含み得る。薬学的に許容される賦形剤は、本明細書においてさらに記載されている。

#### 【0137】

スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニスト、およびそれらの組成物はまた、該アンタゴニストおよび/またはアゴニストの有効性を高めるおよび補完するのに役立つ他の薬剤と併用することができる。例えば、神経因性疼痛、炎症性疼痛、痛覚過敏、および異痛症の治療のために、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト、またはS1P受容体アンタゴニストを、1つまたは複数の他の鎮痛薬、NSAID、またはステロイド剤と共に投与することができる。鎮痛薬には、アセトアミノフェン、トラマドール、カブサイシン(局所用)が含まれるが、これらに限定されない。NSAIDの例は、アスピリンを含むアセチル化サリチル酸；サルサラート、ジフルニサルを含む非アセチル化サリチル酸；エトドラク、ジクロフェナク、インドメタシン、ケトロラク、ナブメトンを含む酢酸；フェノプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジンを含むプロピオン酸；メクロフェナム酸、メフェナム酸を含むフェナム酸；フェニルブタゾン、ピロキシカム；セレコキシブ、エトリコキシブ、バルデコキシブ、ロフェコキシブ、ルミラコキシブを含むCOX-2阻害剤である。例示的なステロイド剤には、関節内コルチコステロイド(IAC)が含まれる。

#### 【0138】

本発明のアゴニストおよびアンタゴニストを含むキット

本発明はまた、検出および治療において使用するための、スフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1P受容体アゴニスト、S1P受容体アゴニスト、およびS1P受容体アンタゴニストを含むキットを提供する。キットは、例えば、神経因性疼痛(癌性疼痛および化学療法誘発性疼痛を含む)、炎症性疼痛、痛覚過敏、および異痛症を有する個体を治療することをはじめとする、本明細書に記載される方法のいずれかのために使用することができる。キットは任意に、緩衝液などの付加的な成分、および本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、抗体などのS1P受容体アゴニストおよびアンタゴニストを使用するための説明書を提供し得る。いくつかの局面において、キットは、疼痛を治療するための説明書を含む。いくつかの局面において、キットは、本明細書に記載されるS1Pアゴニストおよび抗体、ならびに個体における、癌性疼痛、炎症性疼痛、および痛覚過敏などの疼痛を治療するための説明書を含む。他の局面において、キットは、本明細書に記載されるスフィンゴシンキナーゼアンタゴニスト、S1Pアンタゴニスト、S1Pアゴニスト(フィンゴリモド、BAF312、ボネシモド、ONO-4641、CS-0777、KRP-203、PF-991、およびW146など)、またはS1P受容体アンタゴニスト(抗S1P抗体または抗S1P1受容体抗体など)のうちの1つまたは複数、および個体における痛覚過敏を治療するための説明書を含む。

10

#### 【実施例】

#### 【0139】

##### 実験

グリアと共局在し、ニューロンとは共局在しない、S1Pの生合成における前駆体であるセラミド

20

7日間にわたって生理食塩水の慢性皮下(s.c)注入を受けたラット(Veh-Sal、n=5)と比較して、同じ時間枠にわたるモルヒネの注入(Veh-Mor、n=5)は、1) 浸透圧ミニポンプの埋め込み前の足逃避潜時(ベースライン、1=0時間)と比較した、3日目および6日目における足逃避潜時(s)の有意な( $P<0.001$ )減少によって明らかな熱痛覚過敏(Hargreaves et al., 1988)の発生(図1A、C、ならびに2) 同じ時間枠にわたる抗侵害受容性耐性の発生(図1B、D、および図15A、B)をもたらした。後者は、7日間にわたって生理食塩水の注入を受けたラットと比較した場合の、同じ時間枠にわたって慢性モルヒネ注入を受けたラットにおける、3日目および6日目の、腹腔内(i.p)投与した急性用量のモルヒネ(6 mg/kg)による誘発の30分後の、テールフリック潜時の有意な( $P<0.001$ )減少によって示された(図1B、D、および図15A、B)。

30

#### 【0140】

6日目に観察されたモルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生は、腰膨大(L4~L6)からの脊髄の表層におけるものをはじめとする、免疫蛍光によって検出されたセラミド形成の有意な増加と関連しており(全脊髄後角を含むモンタージュ写真に関する図1Fおよび図16B)、以前の研究(Ndengele et al., 2009)が確認された。興味深いことに、セラミドはアストロサイト(図2D)[アストロサイトの細胞マーカーであるGFAP、グリア線維性酸性タンパク質(Romero-Sandoval et al., 2008a)を使用]およびミクログリア細胞(図2E)[ミクログリアの細胞マーカーであるIba1、イオン化カルシウム結合アダプター分子1(Narita et al., 2006)を使用]において優先的に上方制御され、共局在したが、ニューロンではそのようなことはなかった(図2F;ニューロンのマーカーであるNeuNを使用)。単一の標識を示す個々の写真を、図17~図19に示す。

40

#### 【0141】

3日目および6日目に観察されたモルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生は、スフィンゴ脂質の抽出後にELISA(Echelon Biosciences、Salt Lake City, UT)によって測定された、後角組織におけるS1Pレベルの有意な( $P<0.001$ )形成増加と関連していた(図1G、H)。セリンパルミトイルトランスフェラーゼの阻害剤であるミリオシン(Myrr-Mor; 0.3  $\mu$ M/日/6日間、n=4)(Delgado et al., 2006); セラミド合成酵素の競合的かつ可逆的阻害剤であるFB1(FB1-Mor;  $\mu$ M/日/6日間、n=4)(Delgado et al., 2006)、またはスフィンゴミエリナーゼの阻害剤であるD609(D609-Mor;  $\mu$ M/日/6日間、n=4)(Delgado et al., 2006)の連日(6日間)i.th注射とのモルヒネの同時投与により、S1Pの産生増加(図3A)

50

、ならびに痛覚過敏(図3B)および抗侵害受容性耐性(図3Cおよび図15C)の発生が阻止された。これらの用量において、これらの阻害剤が脊髄におけるセラミドの形成を効果的に阻止することは、以前に示されていた(Ndengele et al., 2009)。

#### 【0142】

#### モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生を阻止するS1P生合成の阻害剤

脊髄で形成されたS1Pが、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性に寄与する(セラミドの下流の)重要な二次メッセンジャーであるということが、スフィンゴシンキナーゼによって触媒されるセラミドのS1Pへの酵素的生物変換の阻害剤を用いた以下の研究において確認された。3日目および6日目に観察されるように、スフィンゴシンキナーゼの、構造的に非関連でかつ一般的に使用される2つの阻害剤、すなわちDMS(DMS-Mor; 0.3  $\mu$ M/日、n=5)またはSK-I(SK-I-Mor; 0.3  $\mu$ M/日/6日間、n=5)(French et al., 2003; Lee et al., 2004; Delgado et al., 2006)の連日i.th注射とのモルヒネの同時投与により、後角組織におけるS1Pの産生増加(図1G、 $p < 0.001$ )、ならびに痛覚過敏(図1A、 $p < 0.001$ )および抗侵害受容性耐性(図1Bおよび図15A、 $p < 0.001$ )の発生が阻止された。DMS(DMS-Mor; 0.03~0.3  $\mu$ M/日/6日間、n=5)またはSK-I(SK-I-Mor; 0.03~0.3  $\mu$ M/日/6日間、n=5)の完全な用量反応曲線を、最大効果の時点(6日目)において、図1E(痛覚過敏に関する)、図1Dおよび図15B(耐性に関する)、ならびに図1H(S1Pに関する)に示す。これらの結果から、S1Pシグナル伝達経路に対するスフィンゴシンキナーゼの役割が確認される。

#### 【0143】

これらの薬物は、生理食塩水注入(Veh-Sal)を受けたラットに6日間にわたって毎日単独で投与した場合、試験したいずれのパラメータにも影響を及ぼさなかった(表1)。7日間にわたり生理食塩水の慢性s.c注入を受けたラット(Veh-Sal、n=5)と比較して、同じ時間枠にわたるMry、FBI、D609、DMS、またはSK-Iの注入は、6日目に測定して、足逃避潜時に影響を及ぼさず、急性モルヒネに対する抗侵害受容反応に影響を及ぼさず、また脊髄組織におけるS1Pレベルに影響を及ぼさなかった。

#### 【0144】

(表1) 実験パラメータに及ぼす様々な化合物のインビボでの影響

	足逃避潜時(s)	%MPE (テールフリック)	S1P (pg/mg 組織)
<b>Veh-Sal</b>	<b>19 ± 0.5</b>	<b>93 ± 2.3</b>	<b>1.4 ± 0.10</b>
<b>Myr-Sal</b>	<b>19 ± 0.5</b>	<b>91 ± 3.0</b>	<b>1.2 ± 0.05</b>
<b>FB1-Sal</b>	<b>19 ± 0.8</b>	<b>92 ± 3.2</b>	<b>1.4 ± 0.06</b>
<b>D609-Sal</b>	<b>19 ± 0.7</b>	<b>92 ± 3.0</b>	<b>1.5 ± 0.06</b>
<b>DMS-Veh</b>	<b>19 ± 0.5</b>	<b>97 ± 3.0</b>	<b>1.7 ± 0.07</b>
<b>SK-I-Veh</b>	<b>19 ± 0.7</b>	<b>99 ± 0.9</b>	<b>1.3 ± 0.06</b>
n=動物4匹についての平均値±SEM			

結果は、n=動物5匹についての平均値±SEMとして表してある。

#### 【0145】

急性モルヒネを注射する前の、6日目における全群からのテールフリック潜時のベースライン値は、統計的に有意ではなく、2~3秒の範囲であった。DMSまたはSK-Iの急性i.th注射によるS1Pの阻害は、ひとたび確立された耐性を逆転させることはなく(n=4、表示せず)、セラミド由来のS1Pは、耐性の発生をもたらす事象に寄与するが、耐性の発現をもた

らす事象には寄与しないことが示される。さらに、セラミドまたはS1Pの阻害によって急性侵害受容は阻害されなかったため(表1)、これらのメディエータは正常な疼痛シグナル伝達には関与していないようである。

#### 【0146】

予備研究から、カテーテル処置を受けた動物が未処置の動物と同様のベースライン侵害受容閾値を示すことが明らかに実証されたが、慢性的なi.thカテーテルが、疼痛処理の変化を引き起こす脊髄環境に影響を及ぼし得るという可能性を排除することはできない。しかしながら、本発明者らが知っている限りでは、この種の懸念事項は検証されていない。同様に、一時的なまたは反復される直接的腰椎注射が、やはり疼痛処理の変化を引き起こし得る脊髄環境に影響を及ぼすという可能性も排除することができない。

10

#### 【0147】

グリア関連サイトカインの形成を増加させることによって、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に寄与するS1P

非耐性動物(図17Bおよび図18B)と比較して、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生は、アストロサイトおよびミクログリア細胞における、それぞれGFAPおよびIba1免疫蛍光の発現の誘導(図17Eおよび図18E);ならびにウェスタンブロットによるタンパク質発現の誘導(GFAPに関する図4A、A1、およびTha1に関する図4B、B1、 $p < 0.001$ )、ならびに後角組織におけるTNF- $\alpha$ (図4C)、IL-1 $\beta$ (図4D)、およびIL-6(図4E)の有意な( $P < 0.001$ )増加と関連していた。DMSのi.th送達( $0.3 \mu\text{M}/\text{日}/6\text{日間}$ 、 $n = 5$ )とのモルヒネの同時投与により、DMSによって誘発されるこれらマーカーのグリア細胞発現増加が有意に弱められ(GFAPの減少、 $P < 0.01$ 、およびIba1の減少、 $P < 0.001$ によって証明される、ウェスタンブロットによるタンパク質発現; GFAPに関する図4A、A1、およびIba1に関する図4B、B1)、ならびにTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、およびIL-6の産生増加が有意に弱められた(図4C~E)。

20

#### 【0148】

グリア関連GLT-1およびGSのニトロ化を介して、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生に寄与するS1P

ペルオキシ亜硝酸(PN、 $\text{ONOO}^-$ )は、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生における重要な成分である。データから、後角の表層における3-ニトロチロシン(NT)の形成が、脊髄のPN産生から生じることが示された(Muscili et al., 2007)。したがって、この設定におけるNTの検出は、PNのマーカーとして信頼して使用することができる(Moscili et al., 2007)。非耐性ラットと比較して、耐性ラットにおけるNT染色の出現が、DMS( $0.3 \mu\text{M}/\text{日}/6\text{日間}$ 、 $n = 5$ )とのモルヒネの同時投与によって阻止されたことが、今回示されている(図5A、5B、および5C)。

30

#### 【0149】

これらの知見により、モルヒネの慢性投与と脊髄PNの形成増加との機能的関連性が提供される。グルタミン酸の取り扱い、およびひいてはグルタミン酸作動性神経伝達において極めて重要な役割を果たすことが知られている2つの重要なグリア細胞タンパク質、すなわちグルタミン酸輸送体(GLT-1)およびグルタミン酸合成酵素(GS)が、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生中に、脊髄においてPNによってニトロ化されることが見出された(Moscili et al., 2007)。これらのタンパク質のニトロ化は、それらの生物学的機能の不活性化と密接に関連しており(Trotti et al., 1996; Minana et al., 1997; Trotti et al., 1999; Gorg et al., 2005)、それらの不活性化は、中枢性感作にとって重要であるグルタミン酸作動性神経伝達の増強によって顕在化する重要な派生的影響を有する(Salvemini and Neumann, 2010)。図5に見られ得るように、非耐性動物と比較して、抗侵害受容性耐性および痛覚過敏の発生はGLT-1(図5D、D1)およびGS(図5E、E1)のニトロ化と関連しており、これはDMSのi.th送達により有意に( $P < 0.001$ )に弱められ、よってS1P形成を導く慢性モルヒネ投与と、GLT-1およびGSのPN媒介性ニトロ化との関連性が確認される(図5)。GLT-1およびGSの全タンパク質レベルは、様々な群の間で変化しなかった( $n = 5$ 、表示せず)。

40

#### 【0150】

50

## 付加的な実験

本教示の局面は、以下の例に照らしてさらに理解され得るが、これらの例は、本教示の範囲を限定すると決して解釈されるべきではない。

### 【0151】

#### S1P活性および神経因性疼痛の評価

##### 材料および方法

##### 実験動物

雄のSprague Dawleyラット(200~250 g)はHarlan(米国および欧州)から購入し、ケージ当たり3~4匹を収容し、食糧および水が自由に摂取できるようにした制御された環境(12時間明/暗サイクル)で維持した。実験はすべて、実験動物福祉に関する国際疼痛学会および米国立衛生研究所の指針、ならびにSaint Louis University施設内動物実験委員会による推奨に従って行った。University of Magna Graecia, Catanzaro, Italyにおける動物の使用も同様に、実験および他の科学目的に用いられる動物の保護に関するイタリア規制(D.M. 116192)、ならびに欧州連合規制に従った。実験はすべて、処置条件を知らされていない実験者によって行われた。

### 【0152】

##### 浸透圧ポンプの埋め込み

軽いイソフルラン麻酔下のラットの皮下に(肩甲骨間領域に)浸透圧ポンプ(Alzet 2001; Alza, Mountain View CA)を埋め込んで、記載されているように(Vera-Portocarrero et al., 2006)、1  $\mu$ l/時間の生理食塩水または75  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> 時間<sup>-1</sup>のモルヒネを7日間にわたって送達した。ミニポンプは、製造業者の仕様書に従って充填した。浸透圧ポンプの使用により、間欠的な休薬期を回避したモルヒネの持続的送達が確実になる。ポンプ送達系の完全性は、脊髄を摘出した各実験の終了時に再点検した。

### 【0153】

##### 薬物投与

被験物質であるフモニシンB1(FB 1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、ミリオシン(Myrcal, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、D609(トリシクロデカン-9-イルキサントゲン酸、K; Calbiochem, San Diego, CA)、DMS(N,N-ジメチルスフィンゴシン、Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、SK-I 2-(p-ヒドロキシアニリノ)-4-(p-クロロフェニル)チアゾール、Calbiochem, San Diego, CA)、またはそれらのビヒクル(DMSO中0.5%)は、以前に記載されたように(Storkson et al., 1996)、髄腔内(i.th)カニューレが慢性的に埋め込まれたラットにおいて、i.th注射により送達した。被験物質は、全量10  $\mu$ lで、それに続き無菌生理食塩水を10  $\mu$ l流して、1日に1回、6日間にわたってi.th注射した。

### 【0154】

##### 行動試験

##### 熱痛覚過敏

Hargreavesらの方法を用いて、熱侵害受容刺激に対するベースライン侵害受容反応の変化を評価した(Hargreaves et al., 1988)。動物は、静かな試験室において、透明なガラスプレート上のPlexiglasの囲い内で順応させた。組織損傷を防ぐために、18~20秒というベースライン潜時および20秒という最大カットオフ時間で、放射熱源を後足の足底面に集中させた。足逃避潜時は、足逃避によって作動した動作検出器がタイマーを停止することによって決定される。ミニポンプの埋め込みの前日(ベースライン)、ならびにそれに続いて実験期間の1日目、3日目、および6日目に足逃避潜時を得て、モルヒネ耐性動物が熱刺激に対する感受性増加を生じるかどうかを判定した。浸透圧ミニポンプの埋め込み前との経時的な足逃避潜時の有意な(P<0.05)減少を、熱痛覚過敏と特徴づける。

### 【0155】

Hargreaves試験の後、すべての動物において、以下のようにして抗侵害受容性耐性の発生を決定した。急性侵害受容。有害な放射熱源からの尾の逃避潜時を測定するテールフリック試験を用いて、組織傷害を防ぐために、4~5秒というベースライン潜時および10秒というカットオフ時間で、熱侵害受容感受性を測定した(D'Amour, 1941)。モルヒネの抗侵



害受容作用に対する耐性は、この用量で最大抗侵害受容を生じることが以前に実証された時間である、急性用量のモルヒネ(6 mg/kg、i.p投与)による誘発後の、注射時点の30分後の、テールフリック潜時の有意な( $P < 0.05$ )減少によって示された。得られたデータは、以下のようにして最大可能抗侵害受容作用に対する割合(%MPE)に変換した：(反応潜時 - ベースライン潜時)/(カットオフ潜時 - ベースライン潜時)  $\times 100$ 。被験物質またはビヒクルは、行動試験の完了後、0~6日目に投与した。行動試験後の必要な時点で、脊髄の腰膨大セグメント(L4~L6)由来の脊髄組織および後角組織を採取し、免疫組織化学的解析、ウェスタンブロット解析、および生化学的解析のために組織を処理した。実験はすべて、処置条件を知らされていない実験者によって行われた。

#### 【0156】

免疫組織化学的検出および免疫蛍光検出

脊髄内のニトロ化タンパク質については、腰椎切片(L4~L6)を固定し、十分に特徴づけられたモノクローナル抗ニトロチロシン抗体(10%標準ウマ血清中で1:100、Calbiochem、La Jolla CA)を用いて、記載されているように(Wang et al., 2004 ; Ndengele et al., 2008)免疫組織化学染色用に処理した。処理した試料を、製造業者の説明書(Vector ABC Elite Kit、Vector Laboratories、Burlingame CA)に従って二次抗体、NB複合体、およびジアミノベンジジンを用いて、免疫標識について可視化した。

#### 【0157】

脊髄におけるセラミド発現については、ホルマリン固定し、OCT包埋した(Sakura Finetek USA、Torrance CA)脊髄腰部(L4~L6)から10  $\mu$ mの切片を作製し、使用時まで-20  $^{\circ}$ Cで保存した。切片をPBSでリンスし、40 mlのDIVAデクローカー(de-cloaker)(BioCare Medical、Concord CA)中に浸漬し、100  $^{\circ}$ Cの圧力釜中で5分間、抗原回復に供した。スライドを室温(RT)まで冷却し、PBSでリンスし、ブロッキング緩衝液(PBS、5%標準ヤギ血清、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、および0.25% Triton X-100)中で、RTで加湿しながら2時間インキュベートした。ブロッキングした切片をPBSでリンスし、希釈したブロッキング緩衝液(1:10)中の、十分に特徴づけられたウサギポリクローナル抗セラミド抗体(Krishnamurthy et al., 2007)(1:50または1:100)、ならびにニューロン用のマウスモノクローナル抗NeuN(1:200)(Chemicon、Billerica MA)、アストロサイト用のマウスモノクローナル抗GFAP(1:100)(Abeam、Cambridge MA)、またはミクログリア用のマウスモノクローナル抗Iba1(1:100)(Abeam、Billerica MA)を用いて、4  $^{\circ}$ Cで加湿しながら16時間かけて二重標識した。切片をPBSでリンスし；希釈したブロッキング緩衝液(1:10)中のヤギ抗ウサギローダミンおよびヤギ抗マウスAlexafluor 488(1:300、Invitrogen、Carlsbad CA)を用いて、RTで加湿しながら2時間かけてタンパク質を検出した。PBSでリンスした後、DAPIを含むVectaShield(Vector Laboratories、Burlingame CA)中に切片を封入し、カバーガラスを乗せ、Olympus FV 1000 MPE共焦点顕微鏡で写真撮影した。切片を、一次抗体と等しい濃度の標準ウサギIgGまたは標準マウスIgG(Sigma、St. Louis MO)で処理し、非特異的なバックグラウンド蛍光のみを生じる対照として使用した。

#### 【0158】

免疫沈降および免疫プロットティング

以前に記載されているように(Takagi et al., 2000 ; Wang et al., 2004 ; Muscoli et al., 2007)、サイトゾル画分およびP2膜を取得し、-80  $^{\circ}$ Cで直ちに保存した。免疫沈降解析およびウェスタンブロット解析は、記載されているように(Takagi et al., 2000 ; Wang et al., 2004 ; Muscoli et al., 2007)行った。電気泳動転写の前に、タンパク質を7.5%(GLT-1)、10%(グルタミン合成酵素およびGFAP)、または420%(Iba1) SDS-PAGEで分離した。膜を、TBS-T(50 mM Tris  $\cdot$  HCl、(pH 7.4)、150 mM NaCl、0.01% Tween-20)および0.1%チメロサル中の1% BSA中、室温で1時間ブロッキングし；次に、マウスモノクローナル抗グルタミン合成酵素抗体(1:2000、BD、San Jose CA)、ポリクローナルウサギ抗GLT-1抗体(1:1000、Alpha Diagnostic、San Antonio TX)、モノクローナルマウス抗GFAP抗体(1:1000、Dako、Carpinteria CA)、またはポリクローナルヤギ抗Iba1抗体(1:1000、Waco、Richmond VA)でプロービングした。膜をTBS/Tで洗浄し、RTで1時間の西洋ワサビペル

10

20

30

40

50

オキシダーゼ結合二次抗体(Thermo Fisher Scientific、Rockford IL)、および高感度化学発光(ECL、GEHealthcare、Piscataway NJ、またはFemtoキット、Thermo Fisher Scientific、Rockford IL)で可視化した。神経組織によって発現されたタンパク質の大部分を含むラット脳溶解物(Upstate、Billerica MA)を、陽性対照として使用した。プロットを剥がし取り、マウスモノクローナル抗アクチン抗体(1:2000、Sigma、St. Louis MO)でプロベリングした。ImageQuant 5.2ソフトウェア(Molecular Dynamics、CA)を用いて、フィルムから関心対象のタンパク質バンドの相対密度を決定し、アクチンバンドに対して正規化した。

【0159】

データの統計解析

データは、統計的有意差をP値<0.05と定義して使用される分散分析(ANOVA)およびその後のダネットの事後検定によって解析した。統計解析はすべて、GraphPad Prism(Release 5.03、GraphPad Software, Inc、La Jolla, CA)を使用して行った。

【0160】

化学療法誘発性の神経因性疼痛

実験動物

Harlan(Indianapolis, IN)からの雄のSprague Dawleyラット(開始体重200~220 g)またはマウス(手術時体重25~30 g)は、食糧および水が自由に摂取できるようにした制御された環境(12時間明/暗サイクル)において、ケージ当たり3~4匹を収容した。実験はすべて、実験動物福祉に関する国際疼痛学会および米国国立衛生研究所の指針、ならびにSaint Louis University施設内動物実験委員会による推奨に従って行った。実験はすべて、処置条件を知らされていない実験者によって行われた。

【0161】

パクリタキセル誘発性：

パクリタキセル誘発性疼痛は、Bennettによって開発された、十分に特徴づけられたラットモデルを用いて研究され、このモデルでは、低用量のパクリタキセルの反復腹腔内(i.p)注射を施すと、全身毒性または運動障害のほとんどない神経因性疼痛(機械的異痛症および機械的痛覚過敏)が誘発される(Polomano et al., Pain 94, 293-304 (2001))。行動反応は数週間~数カ月間持続し、そのため患者における有痛性ニューロパチーのモデルとなる。パクリタキセル(Parentapharm、Yardley, PA)またはそのビヒクル(1:1比でのCremophor ELおよび95%無水エタノール)は、1日おきに4回(4 mg/kgの最終累積用量で0日目、2日目、4日目、および6日目に)、ラットにi.p注射した。MnTE-2-PyP<sup>5+</sup>、W146(供給源)、W140(供給源)、またはそれらのビヒクルは、以前に記載されており、薬物送達のために一般的に用いられるL5/L6腰椎アプローチ(Ramos et al. Neuroscience 169, 1888-1900 (2010) ; Schoeniger-Skinner, Brain Behav Immun 21, 660-667 (2007) ; Doyle, et al. Neurosci Lett (2010))を用いて、髄腔内(i.th)カニューレが慢性的に埋め込まれたラットにおいて、i.th注射により送達した(全量10 µlに続き、無菌生理食塩水を10 µl流す)。薬物は、0日目(D0)からその後D15まで毎日、パクリタキセルまたはそのビヒクルの30分前に注射した。別の実験セットでは、フィンゴリモド(フィンゴリモド、Cayman Chemicals、Ann Arbor, MI)またはそのビヒクル(生理食塩水中の1.2%エタノール)を、D0からD15まで腹腔内注射(i.p、0.2 ml)により投与した ; D0およびベースラインにおいて、ならびにそれに続きD12、D16、およびD22において、行動試験を行った。

【0162】

オキサリプラチンおよびボルテゾミブ誘発性：

オキサリプラチン(Oncology Supply、Dothan, AL)またはそのビヒクル(5%ブドウ糖)は、最終累積用量が10 mg/kgになるように、5日間連続で(D0~D4)ラットにi.p.注射した。ボルテゾミブ(Selleck Chemicals、Houston, TX)またはそのビヒクル(5% Tween80、5% EtOH)は、最終累積用量が1 mg/kgになるように、5日間連続で(D0~D4)ラットにi.p.注射した。フィンゴリモド(フィンゴリモド、Cayman)またはそのビヒクル(生理食塩水中の1.2%エタノール)は、D0からD15まで腹腔内注射(i.p、0.2 ml)により投与した ; D0およびベー

10

20

30

40

50

スラインにおいて、ならびにそれに続きD12、D16、およびD22において、行動試験を行った。

#### 【0163】

行動試験：

0日目のベースラインにおいて、すべてのラットからベースライン値を得た。次に研究中の薬物またはビヒクルを投与し、その30分後に化学療法薬またはビヒクルを投与した。その後、D12、D16、およびD22において行動試験を行った。

#### 【0164】

機械的異痛症および機械的痛覚過敏

機械的逃避閾値は、von Frey試験の自動電子型(動的足底触覚計、モデル37450 ; Ugo Basile, Milan, Italy)を用いて評価した。各ラットをPlexiglasチャンバー(28×40×35-cm、金網床)内に入れ、15分間順応させた。順応後、サーボ制御機械刺激(先のとがった金属フィラメント)を足底面に加えたが、この刺激は、10秒以内に50 gにまで達する、漸増する点状圧力を加える。明らかな自発的な後足逃避反応を誘起する圧力(通常は40~45 g)が自動的に記録され、これを機械的閾値指数と見なした。機械的閾値は各時点で3回評価して、平均値を得て、これは平均絶対閾値(グラム、g)として報告される。機械的異痛症の発生は、パクリタキセル処置前(ベースライン)には逃避反応を誘発することができなかった力での機械的平均絶対足逃避閾値(グラム、g)の有意な( $P < 0.05$ )減少によって証明される。機械的痛覚過敏は、Ugo-Basile無痛覚計を用いるRandallおよびSellitto足圧試験6により評価したが、この無痛覚計は、ラットの後足の背部に対して直線的に増加する機械力を加える。侵害受容閾値は、ラットがその足を引っ込める際の力(g)と定義した(カットオフは250 gに設定)。

#### 【0165】

パクリタキセル処置は、両側性の異痛症および痛覚過敏をもたらす。いずれの群のいずれの時点においても、左と右の後足で閾値は異ならなかったため、さらなる解析およびデータ表示に関して、両足からの値を平均化した。パクリタキセル、または試験した実験的被験物質の存在下でのパクリタキセルの投与を受けた動物は、毒性の徴候を示さなかった；これらの動物は、正常な姿勢、毛づくろい、運動行動を示し、被毛は正常であり、立毛またはポルフィリンの徴候はなく、かつ体重増加は正常であり、ビヒクル処置ラットに匹敵した。

#### 【0166】

スフィンゴミエリナーゼ活性の決定

スフィンゴミエリナーゼ活性は、製造業者の説明書に従って、Amplex(登録商標) 赤色スフィンゴミエリナーゼアッセイキット(Molecular Probes, Eugene, OR)を利用して測定した。最初に、ラットの脊髄または末梢神経組織を、以前に記載されているように特定の緩衝液中でホモジナイズした。酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の検出には、溶解緩衝液中に酢酸ナトリウム(100 mM、pH 5.0)を使用した。加えて、リソソーム酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を検出するには、溶解緩衝液にEDTA(2 mM)を添加した。中性スフィンゴミエリナーゼ活性アッセイについては、Hepes(20 mM、pH 7.4)を含む溶解緩衝液中で組織をホモジナイズした。ホモジナイズ後、試料をスフィンゴミエリンと共に37 °Cで0.5時間ブレインキュベートし、次いでスフィンゴミエリナーゼ活性を蛍光マイクロプレートリーダーにおいて1.5時間かけて測定した。スフィンゴミエリナーゼ活性は、タンパク質濃度( $\mu\text{g/mL}$ )により正規化して、mU/sとして表した。陽性対照として、過酸化水素および精製スフィンゴミエリナーゼを使用した。

#### 【0167】

セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT)活性の決定：

SPT活性は、以前に記載された方法(Williams et al., Arch Biochem Biophys 228, 282-291 (1984))に従って、[3H]セリンの3-ケトスフィンガニンへの取り込みを測定することにより決定した。SPT活性は、カウント数/分により測定して、タンパク質濃度( $\mu\text{g/mL}$ )により正規化した。

10

20

30

40

50

## 【0168】

## 免疫蛍光検出

脊髄におけるセラミド発現については、ホルマリン固定し、OCT包埋した(Sakura Finetek USA, Torrance CA)脊髄腰部(L4~L6)から10  $\mu$ mの切片を作製し、使用時まで-20℃で保存した。切片をPBSでリンスし、40 mlのDIVAデクローカー(BioCare Medical, Concord, CA)中に浸漬し、100 psiの圧力釜中で5分間、抗原回復に供した。スライドを室温(RT)まで冷却し、PBSでリンスし、ブロッキング緩衝液(PBS、5%標準ヤギ血清、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、および0.25% Triton X-100)中で、RTで加湿しながら2時間インキュベートした。ブロッキングした切片をPBSでリンスし、希釈したブロッキング緩衝液(1:10)中の、十分に特徴づけられたウサギポリクローナル抗セラミド抗体9(1:50または1:100)、およびアストロサイト用のマウスモノクローナル抗GFAP(1:100)(Abcam, Cambridge, MA)を用いて、4℃で加湿しながら16時間かけて二重標識した。切片をPBSでリンスし；希釈したブロッキング緩衝液(1:10)中のヤギ抗ウサギローダミンおよびヤギ抗マウスAlexafluor 488(1:300, Invitrogen, Carlsbad CA)を用いて、RTで加湿しながら2時間かけてタンパク質を検出した。PBSでリンスした後、DAPIを含むVectaShield(Vector Laboratories, Burlingame CA)中に切片を封入し、カバーガラスを乗せ、Olympus FV 1000 MPE共焦点顕微鏡で写真撮影した。一次抗体と等しい濃度の標準ウサギIgGまたは標準マウスIgG(Sigma, St. Louis MO)で処理した切片を、非特異的なバックグラウンド蛍光のみを生じる対照として使用した。

10

20

## 【0169】

モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性

## 実験動物

雄のSprague Dawleyラット(200~230 g)はHarlan(米国および欧州)から購入し、ケージ当たり3~4匹を収容し、食糧および水が自由に摂取できるようにした制御された環境(12時間明/暗サイクル)で維持した。実験はすべて、実験動物福祉に関する国際疼痛学会および米国立衛生研究所の指針、ならびにSaint Louis University施設内動物実験委員会による推奨に従って行った。実験はすべて、処置条件を知らされていない実験者によって行われた。

## 【0170】

## 浸透圧ポンプの埋め込み

雄のSprague Dawleyラットにイソフルランで軽く麻酔し、準備した浸透圧ミニポンプ(Alzet 2001; Alza, Mountain View, CA)を皮下に(肩甲骨間領域に)埋め込んで、King et al.(Pain 132, 154-168 (2007))およびVera-Portocarrero et al.(Pain 129, 35-45 (2007))によって記載されているように、1  $\mu$ l/時間の生理食塩水または75  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> 時間<sup>-1</sup>のモルヒネを7日間にわたって送達した。モルヒネ硫酸塩の濃度は、およそ8~9 mg/kg(ラットの体重による)の1日用量をもたらした。ミニポンプは、製造業者の仕様書に従って充填した。浸透圧ポンプの使用により、間欠的な休薬期を回避したモルヒネの持続的皮下送達が確実になる。ラットが無痛であることを確認するために、ミニポンプの埋め込みの2時間後にラットを無痛について試験したところ、およそ100%の無痛が達成されていた。このことはポンプがうまく作動していることを確認するのに役立ち、これは典型的には問題ない。ポンプ送達系の完全性は、脊髄を摘出した各実験の終了時に再点検した。

30

40

## 【0171】

## 薬物投与：

被験物質であるW146もしくはW140またはそれらのビヒクル(生理食塩水中の0.001%エタノール)は、以前に記載されており、薬物送達のために一般的に用いられるL5/L6腰椎アプローチ(Ramos et al., Neuroscience 169, 1888-1900 (2010); Schoeniger-Skinner et al., Brain Behav Immun 21, 660-667 (2007); Doyle, et al., Neurosci Lett (2010))を用いて、髄腔内(i.th)カニューレが慢性的に埋め込まれたラットにおいて、i.th注射により送達した。被験物質は、全量10  $\mu$ lで、それに続き無菌生理食塩水を10  $\mu$ l流して、1日に1回、6日間にわたってi.th注射した。

50

## 【0172】

行動試験熱痛覚過敏

熱に対する痛覚過敏反応は、組織損傷を防ぐために20秒というカットオフ潜時を使用して、Basile足底試験(Ugo Basile ; Comerio, Italy)12を用いたHargreavesの方法により決定した。動物は、静かな試験室において、透明なガラスプレート上のPlexiglasの囲い内で順応させた。可動式の赤外発生器の位置を合わせて、熱刺激をチャンバーの真下から個々の後足に直接送った。電子クロック回路および熱電対により、注射された足の逃避潜時を決定した。ミニポンプの埋め込み前の0日目(ベースライン)、ならびにそれに続いて実験期間の1日目、3日目、および6日目に足逃避潜時を得て、モルヒネ耐性動物が熱刺激に対する感受性増加を生じるかどうかを判定した。浸透圧ミニポンプの埋め込み前との経時的な足逃避潜時の有意な( $P < 0.05$ )減少を、熱痛覚過敏と特徴づける。Hargreavesの試験の後、すべての動物において、以下のようにして抗侵害受容性耐性の発生を決定した。

10

## 【0173】

急性侵害受容

有害な放射熱源からの尾の逃避潜時を測定するテールフリック試験を用いて、組織傷害を防ぐために、2~3秒というベースライン潜時および10秒というカットオフ時間で、熱侵害受容感受性を測定した(D'Amour, J Pharmacol Exp Ther 72, 74-79 (1941))。モルヒネの抗侵害受容作用に対する耐性は、この用量で最大抗侵害受容を生じることが以前に実証された時間である、急性用量のモルヒネ硫酸塩(6 mg/kg、i.p投与)による誘発後の、注射時点の30分後の、テールフリック潜時の有意な( $P < 0.05$ )減少によって示された。得られたデータは、以下のようにして最大可能抗侵害受容作用に対する割合(%MPE)に変換した： $(\text{反応潜時} - \text{ベースライン潜時}) / (\text{カットオフ潜時} - \text{ベースライン潜時}) \times 100$ 。被験物質またはビヒクルは、行動試験の完了後、0~6日目に投与した。

20

## 【0174】

カラゲナン誘発性の熱痛覚過敏

軽く麻酔したラット[CO<sub>2</sub> (80%)/O<sub>2</sub> (20%)]に、右後足へのカラゲナン(生理食塩水中の1%溶液50  $\mu$ l)またはそのビヒクル(生理食塩水50  $\mu$ l)の足底下注射を行った。フィンゴリモードまたはそれらのビヒクルは、カラゲナンまたはそのビヒクルの90分前に、経管により投与した(0.2 ml)。熱に対する痛覚過敏反応は、組織損傷を防ぐために20秒というカットオフ潜時を使用して、Basile足底試験(Ugo Basile ; Comerio, Italy)を用いたHargreavesの方法(Hargreaves et al., Pain 32, 77-88 (1988))により決定した。ラットは個々に、Plexiglasチャンバーに拘束した。可動式の赤外発生器の位置を合わせて、熱刺激をチャンバーの真下から個々の後足に直接送った。電子クロック回路および熱電対により、注射された足の逃避潜時を決定した。結果を足逃避潜時(s)として表す。

30

## 【0175】

統計解析

データはすべて、平均値  $\pm$  SEMとして表す。行動データおよびS1P形成データは、パクリタキセルまたはモルヒネ処置動物に対するボンフェローニ事後比較を伴う両側二元配置分散分析(ANOVA)によって評価した。セラミド生成酵素の活性は、対応のないスチューデントのt検定によって解析した。有意差は $P < 0.05$ と定義した。

40

## 【0176】

結果

セラミドおよびS1Pの脊髄でのレベル上昇と関連しているパクリタキセル誘発性の神経因性疼痛の発生

低用量のパクリタキセルの反復腹腔内(i.p)注射により、全身毒性または運動障害のほとんどない神経因性疼痛(機械的異痛症および機械的痛覚過敏)が誘発される(Polomano et al., Pain 94, 293-304 (2001))、Bennettのグループによって開発された、十分に特徴づけられたラットモデルを使用した。予備実験から、神経因性疼痛は12日目(D12)までに顕著となり、D16までにピークに達することが明らかになった。したがって、D0からD16ま

50

で経時的研究を実行して、ピーク痛覚過敏の時点、D16においてすべての生化学的評価を行うことに決定した。薬物またはそれらのピヒクルはすべて、D0からD15まで髄腔内(i.th)投与した。ピヒクル群と比較して、パクリタキセルの投与は、機械的異痛症(図20A)および機械的痛覚過敏(図20B)の発生をもたらし、これはセリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT、図21A)およびスフィンゴミエリナーゼ(SMase、図21B)の酵素活性増加、ならびに腰膨大(L5~L6)からの脊髄の表層におけるものをはじめとする、免疫蛍光によって検出された、S1Pの生合成における前駆体であるセラミドの形成増加(図21D)と関連していた。さらに、図21Eに見られ得るように、神経因性疼痛の時間依存的発生は、スフィンゴ脂質の抽出後にELISA(Echelon Biosciences、Salt Lake City, UT)によって測定された、後角組織におけるS1Pの対応する時間依存的形成と関連していた。

10

#### 【0177】

加えて、ピヒクル処置動物(Veh; A、C、E)およびパクリタキセル処置動物(P; B、D、F)からの固定凍結脊髄切片を、セラミド(NT; 赤色; A、B)、およびアストロサイトに関するGFAP(緑色; C、D)について染色した。ピヒクル処置動物由来の脊髄におけるセラミド免疫蛍光(図22A)と比較して、パクリタキセルはセラミド発現を実質的に増加させた(図22B)。重ね合わせ像(図22E、F)において、パクリタキセル誘発性のセラミドは、GFAP<sup>+</sup>アストロサイトと共同在した(黄色)(図22F)。NTに対して標準ウサギ血清、またはGFAPに対して標準マウスIgGを用いた陰性対照は、低レベルのバックグラウンド蛍光しか示さなかった。顕微鏡写真は、異なる日に行った3匹の異なる動物に由来する後角(L4~L6)の表層の少なくとも3つの像の代表的なものである。図9も参照されたい。

20

#### 【0178】

パクリタキセル誘発性の神経因性疼痛の発生に寄与する、S1P1受容体を介したS1P作用

ピヒクル群と比較して、パクリタキセルの投与は機械的異痛症および機械的痛覚過敏の発生をもたらし、これは、S1P1アンタゴニストであるW146の連日髄腔内送達(0.3~3  $\mu$ M/日、n=5; 図20AおよびB)によって用量依存的様式で弱められたが、以前の研究(Rosen et al., Immunol Rev 223, 221-235 (2008); Sanna et al., Nat Chem Biol 2, 434-441 (2006))より選択された用量での、その不活性S-鏡像異性体であるW140(3  $\mu$ M/日、n=5; 図20AおよびB)によって弱められなかった。試験した最も高い用量で単独で投与した場合(3  $\mu$ M/日、n=5)、W146はベースライン逃避閾値に影響を及ぼさなかった(図20AおよびB)。

30

#### 【0179】

さらなる研究を行って、フィンゴリモドが化学誘発性の末梢神経障害(「CIPN」)の発生を防ぐことができるかどうかを確認した。フィンゴリモドは、多発性硬化症の治療に関してFDAによって最近承認された新規なS1P1修飾薬であり(Brinkmann et al., Nat Rev Drug Discov 9, 883-897 (2010))、かついくつかの前臨床モデル(例えば、脳虚血、癌、臓器移植において有益な効果を示した(Hla et al., Neurology 76, S3-8 (2011); Strader et al., J Nat Prod 74, 900-907 (2011))。フィンゴリモドは、スフィンゴシンキナーゼ2によるリン酸化後にインピボで活性化して、フィンゴリモド-Pリン酸塩(フィンゴリモド-P)を形成し(Brinkmann et al., Nat Rev Drug Discov 9, 883-897 (2010))、これはリガンドS1Pと類似しており、5種類のS1P受容体のうちの4種類に対する結合についてそれと競合する。フィンゴリモド-PはS1P1に対して最も高い結合親和性を有し、わずかにより低い親和性でS1P3およびS1P5に結合し、S1P2に対する親和性は報告されていない(Brinkmann et al., Nat Rev Drug Discov 9, 883-897 (2010))。

40

#### 【0180】

S1P1、S1P3、またはS1P5に対するS1Pまたはフィンゴリモド-Pのいずれかの結合は、受容体の内部移行を引き起こし、S1Pによる結合ではおよそ2時間以内に受容体の細胞表面への再循環が起こるのに対して、フィンゴリモド-Pによる結合は受容体再循環経路を阻止すると考えられ、よって受容体分解をもたらす。いくつかの研究から、細胞がS1P1、S1P3、S1P5受容体の正常な発現を回復するには、フィンゴリモド-Pに対する曝露後、2日~8日を要すると推定された。フィンゴリモドの免疫抑制効果は、S1P1の下方制御に依存している(Brinkmann et al., Nat Rev Drug Discov 9, 883-897 (2010)) S1P1受容体内部移行に

50

は重要であるが、S1P1受容体シグナル伝達には必要ではないカルボキシ末端セリンリッチS1P1モチーフを変異させたノックインマウス(S1p1rS5A/S5A)における知見によって支持される研究。この突然変異は、該薬物の有益な効果を弱めた(Thangada, S., et al. Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. J Exp Med 207, 1475-1483 (2010))。いかなる特定の理論によっても縛られることはないが、その免疫細胞輸送と無関係である種々の前臨床試験において、フィンゴリモドが有益な効果を有することが明らかになりつつある(Hla et al., Neurology 76, S3-8 (2011); Strader et al., J Nat Prod 74, 900-907 (2011); Thangada et al., J Exp Med 207, 1475-1483 (2010); Choi et al., Proc Natl Acad Sci U SA 108, 751-756 (2011)); 関係する受容体は、おそらくは個々の状況に依存する。

10

#### 【0181】

##### フィンゴリモドによって阻止されるパクリタキセル誘発性の神経因性疼痛

ビヒクル処置群と比較して、パクリタキセルの投与は、D16までにピークとなり、D22までプラトーである機械的異痛症(図23A)および機械的痛覚過敏(図23B)の発生をもたらした。機械的異痛症および機械的痛覚過敏の発生は、フィンゴリモドの連日(D0~D15)投与(0.01 mg/kg/日、i.p、n=6)によって弱められた(図23A、B)。重要なことには、見られ得るように、D22日に試験した機械的異痛症および機械的痛覚過敏の発生は、D15における薬物終了によって元に戻らなかった。単独で投与した場合、フィンゴリモドはベースライン逃避閾値に影響を及ぼさなかった(図23A、B)。

#### 【0182】

##### フィンゴリモドによって阻止されるオキサリプラチン誘発性の神経因性疼痛

ビヒクル処置群と比較して、オキサリプラチンの投与は、D16までにピークとなり、D22までプラトーである機械的異痛症(図24A)および機械的痛覚過敏(図24B)の発生をもたらした。機械的異痛症および機械的痛覚過敏の発生は、フィンゴリモドの連日(D0~D15)投与(0.01 mg/kg/日、i.p、n=6)によって弱められた(図24A、B)。フィンゴリモドの用量は、免疫抑制効果を有さないことが示されたため、以前の研究から同定し、選択した。重要なことには、見られ得るように、D22日に試験した機械的異痛症および機械的痛覚過敏の発生は、D15における薬物終了によって元に戻らなかった。単独で投与した場合、フィンゴリモドはベースライン逃避閾値に影響を及ぼさなかった(図24A、B)。

20

#### 【0183】

この研究の結果から、フィンゴリモドが神経因性疼痛の発生を阻止したことが示される。この効果は持続的であり；特に重要なことは、フィンゴリモドによる処置を15日目に終了しても、CIPNが、観察期間の残りのD22まで元に戻らなかったことが見出されたという知見であった。これらの知見は、これらのことから、ひとたび発生を防ぐと、疼痛は再発しないということが示唆されるため、非常に刺激的である。

30

#### 【0184】

様々な癌を治療するための化学療法戦略は、観察される多くの副作用によって妨げられる。疼痛は、用量を限定すること、および心理的苦痛を与えることによって、このような戦略の成功を大幅に減少させる。S1P形成の減弱またはその作用の障害に基づいて化学療法誘発性の慢性神経因性疼痛を妨げる新規方法論(抗S1P抗体、または選択的受容体アゴニスト/アンタゴニスト)は、変革となる。本明細書において報告される知見は、S1Pが、化学療法薬の臨床的有用性を改善するための新規治療標的であることを確認するのに必要である重要な情報を提供する。CIPNを阻止することで、切迫した神経障害のために、現在のところパクリタキセルのような薬物による治療(または継続的治療)の候補とならない患者が、むしろ最大力の抗腫瘍投薬量から恩恵を受けることが確実になる。これらの知見により、S1P経路の標的化が、化学療法誘発性疼痛の疼痛の発生を防ぐための新規戦略であるという主張が支持される。

40

#### 【0185】

##### モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性におけるS1P1サブタイプの役割

S1P1サブタイプの潜在的関与を、強力で、競合的で、選択的で、かつ十分に特徴づけら

50

れたS1P1サブタイプアンタゴニストであるW146(Rosen et al., Immunol Rev 223, 221-235 (2008); Sanna et al., Nat Chem Biol 2, 434-441 (2006); Im, Acta Pharmacol Sin 31, 1213-1222 (2010); Taha et al., Biochim Biophys Acta 1682, 48-55 (2004); Takabe et al. (2008))を用いて試験した。W146は、マウスS1P1サブタイプにおけるのと等しい効力で、ヒト受容体に対して約80 nMというKi値(GTP- S結合アッセイ)を示す。10~20  $\mu$ M程の高い用量で、他の公知のS1P受容体サブタイプに対して、アンタゴニスト(またはアゴニスト)活性は観察されていない(Rosen et al., Immunol Rev 223, 221-235 (2008))。文献における大部分の研究は、0.1~10  $\mu$ M範囲のW146を使用している(Rosen et al., Immunol Rev 223, 221-235 (2008); Sanna et al., Nat Chem Biol 2, 434-441 (2006); Im, Acta Pharmacol Sin 31, 1213-1222 (2010); Taha et al., Biochim Biophys Acta 1682, 48-55 (2004); Takabe et al. (2008))。

10

#### 【0186】

W146は、0.3、1、および3  $\mu$ Mで試験した。W146またはそのビヒクル(生理食塩水中の0.01%エタノール)は、7日間にわたって生理食塩水またはモルヒネのs.c注入を受けているラットにおいて、全量10  $\mu$ lで、それに続き無菌生理食塩水を10  $\mu$ l流して、5日間にわたって(D0日目から開始)1日に1回、i.th注射した。注射は、行動試験の完了後に行った(薬物投与間の時間間隔、~24時間)。図25に見られ得るように、7日間にわたって生理食塩水の慢性s.c注入を受けたラット(Veh-Sal、n=5)と比較して、同じ時間枠にわたるモルヒネの注入(Veh-Mor、n=5)は、(1)浸透圧ミニポンプの埋め込み前(0日目(D0))の足逃避潜時と比較した、D1ではなくD3およびD6における後足逃避潜時(s)の有意な用量依存的減少によって明らかな、熱痛覚過敏(Hargreaves et al., Pain 32, 77-88 (1988))の発生(図25A)、ならびに(2)同じ時間枠にわたる抗侵害受容性耐性の用量依存的発生(図25B)をもたらした。後者は、7日間にわたって生理食塩水の注入を受けたラットと比較した場合の、同じ時間枠にわたって慢性モルヒネ注入を受けたラットにおける、D1ではなくD3およびD6で明らかな、急性用量のモルヒネ(6 mg/kg、i.p)による誘発の30分後の、テールフリック潜時(D'Amour, J Pharmacol exp Ther 72, 74-79 (1941))の有意な減少によって示された(図25B)。

20

#### 【0187】

S1P1受容体アンタゴニストW146(n=5; 3  $\mu$ M/日)とのモルヒネの同時投与は、熱痛覚過敏(Hargreaves et al. Pain 32, 77-88 (1988))および抗侵害受容性耐性(D'Amour, J Pharmacol exp Ther 72, 74-79 (1941))の発生を、用量依存的様式で>90%阻止したが、その不活性鏡像異性体であるW140(n=5; 3  $\mu$ M/日)ではそのようなことはなかった。観察可能な副作用は見られなかった(すなわち、ラットの体重は安定を保つかまたは増加し、ラットは機敏でかつ活動的であり、運動機能障害の徴候は認められず、正常な毛づくろい行動および姿勢を示し、被毛は正常であり、立毛またはポルフィリンの徴候はなく、食物および水の摂取は正常範囲内のままであった)。ビヒクル群と比較して、W146(n=5; 3  $\mu$ M/日)、またはその不活性鏡像異性体であるW140(n=5; 3  $\mu$ M/日)の連日i.th注射は、後足足回避潜時またはテールフリック潜時に影響を及ぼさなかった(図25A、B)。モルヒネの急性注射の前にD1、D3、およびD6で測定されたテールフリックベースライン潜時は、ミニポンプ埋め込み前のD0で得られたものと同様であり、経時的研究を通して実験群間で異ならなかった(2~3秒の範囲; 表示せず)。W146の阻害効果は、W146と急性モルヒネとの間の急性抗侵害受容相互作用に起因しなかった。実際に、図26に示される結果から、W146(1  $\mu$ M n=3)を、1、3、または6 mg/kgの急性モルヒネ(i.p、n=3)の15分前にi.th投与した場合、モルヒネに対する用量反応は変化しなかったことが明らかに実証される。テールフリック潜時(s)は、モルヒネの前およびモルヒネの30分後に試験した(図26)。

30

40

#### 【0188】

これらの知見から、重度の疼痛の管理において、S1P経路の標的化が、モルヒネ誘発性の痛覚過敏および抗侵害受容性耐性の発生を防ぐための効果的な方法であることが示される。

#### 【0189】

50



フィンゴリモドによって阻止されるカラゲナン誘発性の熱痛覚過敏

ラットにおけるカラゲナンの足底内注射は、Hargreaves試験を用いた足逃避潜時の減少によって明らかな熱痛覚過敏の発生をもたらした。カラゲナンの90分前にフィンゴリモド(0.3または1 mg/kg)を経口投与すると、時間依存的様式で痛覚過敏が阻止されたが、そのビヒクル(蒸留水中の50% DMSO)ではそのようなことはなかった(図27)。

【0190】

他の局面

上記の詳細な説明は、当業者が本発明を実行するのを援助するために提供するものである。しかしながら、本明細書に開示される特定の局面は、本発明のいくつかの局面の例証として意図されているため、本明細書において記載され、主張される本発明は、これらの局面によって範囲が限定されることはない。いかなる同等の局面も、本発明の範囲内にあることが意図される。実際に、本明細書において示され、記載されるものに加えて、本発明の発見の精神または範囲から逸脱しない本発明の様々な変更が、前述の説明から当業者に明らかになるであろう。そのような変更もまた、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

【0191】

引用参考文献

本明細書において引用される出版物、特許、公開された特許出願、およびその他の参考文献はすべて、個々の出版物、特許、特許出願、またはその他の参考文献が詳細にかつ個別に、すべての目的のために全体として参照により組み入れられることが示されるのと同程度に、すべての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられる。本明細書における参考文献の引用は、それが本発明の先行技術となることの承認として解釈されるべきではない。

【0192】

その全体が参照により本明細書に組み入れられる出版物には、以下のものが含まれる：

10

20

Arner S, Rawal N, Gustafsson LL (1988) Clinical experience of long-term treatment with epidural and intrathecal opioids--a nationwide survey. *Acta Anaesthesiol Scand* 32:253-259.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.

10

Bryant L, Doyle T, Chen Z, Cuzzocrea S, Masini E, Vinci MC, Esposito E, Mazzon E, Petrusca DN, Petrache I, Salvemini D (2009) Spinal ceramide and neuronal apoptosis in morphine antinociceptive tolerance. *Neurosci Lett* 463:49-53.

Chiang CY, Wang J, Xie YF, Zhang S, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ (2007) Astroglial glutamate-glutamine shuttle is involved in central sensitization of nociceptive neurons in rat medullary dorsal horn. *J Neurosci* 27:9068-9076.

20

Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Losche W, Kinscherf R, Deigner HP (2005) Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *Faseb J* 19:1719-1721.

Cui Y, Chen Y, Zhi JL, Guo RX, Feng JQ, Chen PX (2006) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance. *Brain Res* 1069:235-243.

30

Cuzzocrea S, Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C, Di Paola R, Bramanti P, Salvemini D (2009) Fumonisin B1 reduces the development of multiple organ failure induced by zymosan in mice. *Shock* 31: 170-177.

D'Amour F (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol exp Ther* 72:74-79.

40

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL, Fabrias G (2006) Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1758:1957-1977.

Delogu G, Famularo G, Amati F, Signore L, Antonucci A, Trinchieri V, Di Marzio L, Cifone MG (1999) Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 27:2413-2417.

Doyle T, Chena Z, Obeid LM, Salvemini D (2011) Sphingosine-1-phosphate acting via the S1P1 receptor is a downstream signaling pathway in ceramide-induced hyperalgesia. *Neuroscience Letters* 499: 4– 8.

10

Doyle T, Chen Z, Muscoli C, Obeid LM, and Salvemini D (2011) Intraplantar-injected ceramide in rats induces hyperalgesia through an NF-B- and p38 kinasedependent cyclooxygenase 2/prostaglandin E2 pathway. *The FASEB Journal* article fj.10-178095.

Foley KM (1995) Misconceptions and controversies regarding the use of opioids in cancer pain. *Anticancer Drugs* 6 Suppl 3:4-13.

20

French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, Yun JK, Smith CD (2003) Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 63:5962-5969.

Gorg B, Wettstein M, Metzger S, Schliess F, Haussinger D (2005) Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology* 41: 1065-1073.

30

Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 139-150.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.

40

Jolly PS, Rosenfeldt HM, Milstien S, Spiegel S (2002) The roles of sphingosine1- phosphate in asthma. *Mol Immunol* 38:1239-1245.

Keller M, Lidington D, Vogel L, Peter BF, Sohn HY, Pagano PJ, Pitson S, Spiegel S, Pohl U, Bolz SS (2006) Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries. *FASEB J* 20:702-704.

Kitano M, Hla T, Sekiguchi M, Kawahito Y, Yoshimura R, Miyazawa K, Iwasaki T, Sano H, Saba JD, Tam YY (2006) Sphingosine I-phosphate/sphingosine I-phosphate receptor 1 signaling in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression. *Arthritis Rheum* 54:742-753.

Krishnamurthy K, Dasgupta S, Bieberich E (2007) Development and characterization of a novel anti-ceramide antibody. *J Lipid Res* 48:968-975.

10

Lai WQ, Irwan AW, Goh HH, Howe HS, Yu DT, Valle-Onate R, McInnes IB, Melendez AJ, Leung BP (2008) Anti-inflammatory effects of sphingosine kinase modulation in inflammatory arthritis. *J Immunol* 181:8010-8017.

Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.

Lee C, Xu DZ, Feketeova E, Kannan KB, Yun JK, Deitch EA, Fekete Z, Livingston DH, Hauser CJ (2004) Attenuation of shock-induced acute lung injury by sphingosine kinase inhibition. *J Trauma* 57:955-960.

20

Maines LW, Fitzpatrick LR, French KJ, Zhuang Y, Xia Z, Keller SN, Upson JJ, Smith CD (2008) Suppression of ulcerative colitis in mice by orally available inhibitors of sphingosine kinase. *Dig Dis Sci* 53 :997-1012.

Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995) Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 62:259-274.

30

Melendez AJ (2008) Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 1784:66-75.

Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23-36.

40

Minana MD, Kosenko E, Marcaida G, Hermenegildo C, Montoliu C, Grisolia S,

Felipo V (1997) Modulation of glutamine synthesis in cultured astrocytes by nitric oxide. *Cell Mol Neurobiol* 17:433-445.

Muscoli C, Visalli V, Colica C, Nistico R, Palma E, Costa N, Rotiroti D, Nistico O, Mollace V (2005) The effect of inflammatory stimuli on NMDA-related activation of glutamine synthase in human cultured astroglial cells. *Neurosci Lett* 373:184-188.

Muscoli C, Cuzzocrea S, Ndengele MM, Mollace V, Porreca F, Fabrizi F, Esposito E, Masini E, Matuschak OM, Salvemini D (2007) Therapeutic manipulation of peroxynitrite attenuates the development of opiate-induced antinociceptive tolerance in mice. *J Clin Invest* 117:3530-3539.

10

Nakagawa T, Ozawa T, Shige K, Yamamoto R, Minami M, Satoh M (2001)

Inhibition of morphine tolerance and dependence by MS-153. a glutamate transporter activator. *Eur J Pharmacol* 419:39-45.

Narita M, Yoshida T, Nakajima M, Narita M, Miyatake M, Takagi T, Yajima Y, Suzuki T (2006) Direct evidence for spinal cord microglia in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *J Neurochem* 97:1337-1348.

20

Nayak D, Huo Y, Kwang WX, Pushparaj PN, Kumar SD, Ling EA, Dheen ST (2010) Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience* 166: 132-144.

Ndengele MM, Cuzzocrea S, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Matuschak OM, Salvemini D (2008) Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB J* 22:3154-3164.

30

Ndengele MM, Cuzzocrea S, Masini E, Vinci MC, Esposito E, Muscoli C, Petrusca DN, Mollace Y, Mazzon E, Li D, Petrache I, Matuschak OM, Salvemini D (2009) Spinal ceramide modulates the development of morphine antinociceptive tolerance via peroxynitrite-mediated nitroxidative stress and neuroimmune activation. *J Pharmacol Exp Ther* 329:64-75.

40

Nishiuma T, Nishimura Y, Okada T, Kuramoto E, Kotani Y, Jahangeer S, Nakamura S (2008) Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L1085-1093.

OsSIPov MH, Lai J, Vanderah TW, Porreca F (2003) Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. *Sci* 73:783-800.

Pushparaj PN, H'Ng S C, Melendez AJ (2008) Refining siRNA in vivo transfection: silencing SPHK1 reveals its key role in C5a-induced inflammation in vivo. *Im J Biochem Cell Biol* 40:1817-1825.

10

Renfrey S, Downton C, Featherstone J (2003) The painful reality. *Nat Rev Drug Discov* 2:175-176.

Romero-Sandoval A, Chai N, Natile-McMenemy N, Deleo JA (2008a) A comparison of spinal Thal and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res* 1219:116-126.

Romero-Sandoval EA, Horvath RJ, DeLeo JA (2008b) Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. *Curr Opin Investig Drugs* 9:726-734.

20

Salvemini D, Neumann WL (2009) Peroxynitrite: a strategic linchpin of opioid analgesic tolerance. *Trends Pharmacol Sci* 30: 194-202.

Salvemini D, Neumann W (2010) Targeting peroxynitrite driven nitroxidative stress with synzymes: A novel therapeutic approach in chronic pain management. *Life Sci* 86:604-614.

30

Salvemini D, Jensen MP, Riley DP, Misko TP (1998) Therapeutic manipulations of peroxynitrite. *Drug News Perspect* 11 :204-214.

Simonnet G, Rivat C (2003) Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport* 14: 1-7.

40

Snider AJ, Kawamori T, Bradshaw SG, Orr KA, Gilkeson GS, Hannun YA, Obeid LM (2009) A role for sphingosine kinase 1 in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Faseb J* 23:143-152.

Storkson RV, Kjorsvik A, Tjolsen A, Hole K (1996) Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. *J Neurosci Methods* 65: 167-172.

Suarez I, Bodega G, Fernandez B (2002) Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int* 41: 123-142.

Taha TA, Argraves KM, Obeid LM (2004) Sphingosine-I-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta* 1682:48-55.

Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2008) "Inside-out" signaling of sphingosine-I-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 60:181-195. 10

Takagi N, Logan R, Teves L, Wallace MC, Gurd JW (2000) Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia. *J Neurochem* 74: 169-178.

Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5856-5861. 20

Tanga FY, Raghavendra V, Nutile-McMenemy N, Marks A, Deleo JA (2006) Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. *Neuroscience* 140:1003-1010.

Taylor DA, Fleming WW (2001) Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 297:11-18. 30

Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2:848.

Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A (1996) Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 271:5976-5979. 40

Trujillo KA, Akil H (1991) Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251:85-87.

Vera-Portocarrero LP, Zhang ET, King T, OsSIPov MH, Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2006) Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways. *Pain*.

Wang Z, Ma W, Chabot JG, Quirion R (2009) Cell-type specific activation of p38 and ERK mediates calcitonin gene-related peptide involvement in tolerance to morphine-induced analgesia. *FASEB J* 23:2576-2586.

10

Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D (2004) A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309:869-878.

Waniewski RA, Martin DL (1986) Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem* 47:304-313.

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2001) Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24:450-455.

20

Watkins LR, Hutchinson MR, Johnston IN, Maier SF (2005) Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci* 28:661-669.

Watkins LR, Hutchinson MR, Rice KC, Maier SF (2009) The “toll” of opioid-induced glial activation: improving the clinical efficacy of opioids by targeting glia. *Trends Pharmacol Sci* 30:581-591.

30

Zhang YH, Vasko MR, Nicol GD (2002) Ceramide, a putative second messenger for nerve growth factor, modulates the TTX-resistant Na(+) current and delayed rectifier K(+) current in rat sensory neurons. *J Physiol* 544:385-402.

Zhang YH, Fehrenbacher JC, Vasko MR, Nicol GD (2006) Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 96: 1042-1052.

40

Hla T. et al. (2011) Sphingosine 1-phosphate (S1P) : Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology* 2011;76;S3.



Brinkmann et al. (2010) Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews, Drug Discovery* 9: November 2010: 883-897.

Cusack et al. (2010) S1P<sub>1</sub> receptor agonists: Assessment of selectivity and current clinical activity. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 13 (4): 481-488.

10

Strader et al. (2011) Fingolimod (FTY720): A Recently Approved Multiple Sclerosis Drug Based on a Fungal Secondary Metabolite. *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 900-907.

Polomano, R.C., Mannes, A.J., Clark, U.S. & Bennett, G.J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 94, 293-304 (2001).

20

Storkson, R.V., Kjorsvik, A., Tjolsen, A. & Hole, K. Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. *J Neurosci Methods* 65, 167-172 (1996).

Ramos, K.M., et al. Spinal upregulation of glutamate transporter GLT-1 by ceftriaxone: therapeutic efficacy in a range of experimental nervous system disorders. *Neuroscience* 169, 1888-1900 (2010).

30

Schoeniger-Skinner, D.K., et al. Interleukin-6 mediates low-threshold mechanical allodynia induced by intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Brain Behav Immun* 21, 660-667 (2007).

Doyle, T., et al. Spinal NADPH oxidase is a source of superoxide in the development of morphine-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *Neurosci Lett* (2010).

40

Randall, L.O. & Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111, 409-419 (1957).

Dobrowsky, R.T. & Kolesnick, R.N. Analysis of sphingomyelin and ceramide levels and the enzymes regulating their metabolism in response to cell stress. *Methods Cell Biol* 66, 135-165 (2001).

Williams, R.D., Wang, E. & Merrill, A.H., Jr. Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 228, 282-291 (1984).

Krishnamurthy, K., Dasgupta, S. & Bieberich, E. Development and characterization of a novel anti-ceramide antibody. *J Lipid Res* 48, 968-975 (2007).

King, T., et al. Morphine treatment accelerates sarcoma-induced bone pain, bone loss, and spontaneous fracture in a murine model of bone cancer. *Pain* 132, 154-168 (2007). 10

Vera-Portocarrero, L.P., et al. Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways. *Pain* 129, 35-45 (2007).

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88 (1988). 20

D'Amour, F. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol xp Ther* 72, 74-79 (1941).

Rosen, H., et al. Modulating tone: the overture of S1P receptor immunotherapeutics. *Immunol Rev* 223, 221-235 (2008). 30

Sanna, M.G., et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol* 2, 434-441 (2006).

Brinkmann, V., et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 9, 883-897 (2010).

Hla, T. & Brinkmann, V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology* 76, S3-8 (2011). 40

Strader, C.R., Pearce, C.J. & Oberlies, N.H. Fingolimod (FTY720): A Recently Approved Multiple Sclerosis Drug Based on a Fungal Secondary Metabolite. *J Nat Prod* 74, 900-907 (2011).

Thangada, S., et al. Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. *J Exp Med* 207, 1475-1483 (2010).

Choi, J.W., et al. Fingolimod (FTY720) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 751-756 (2011).

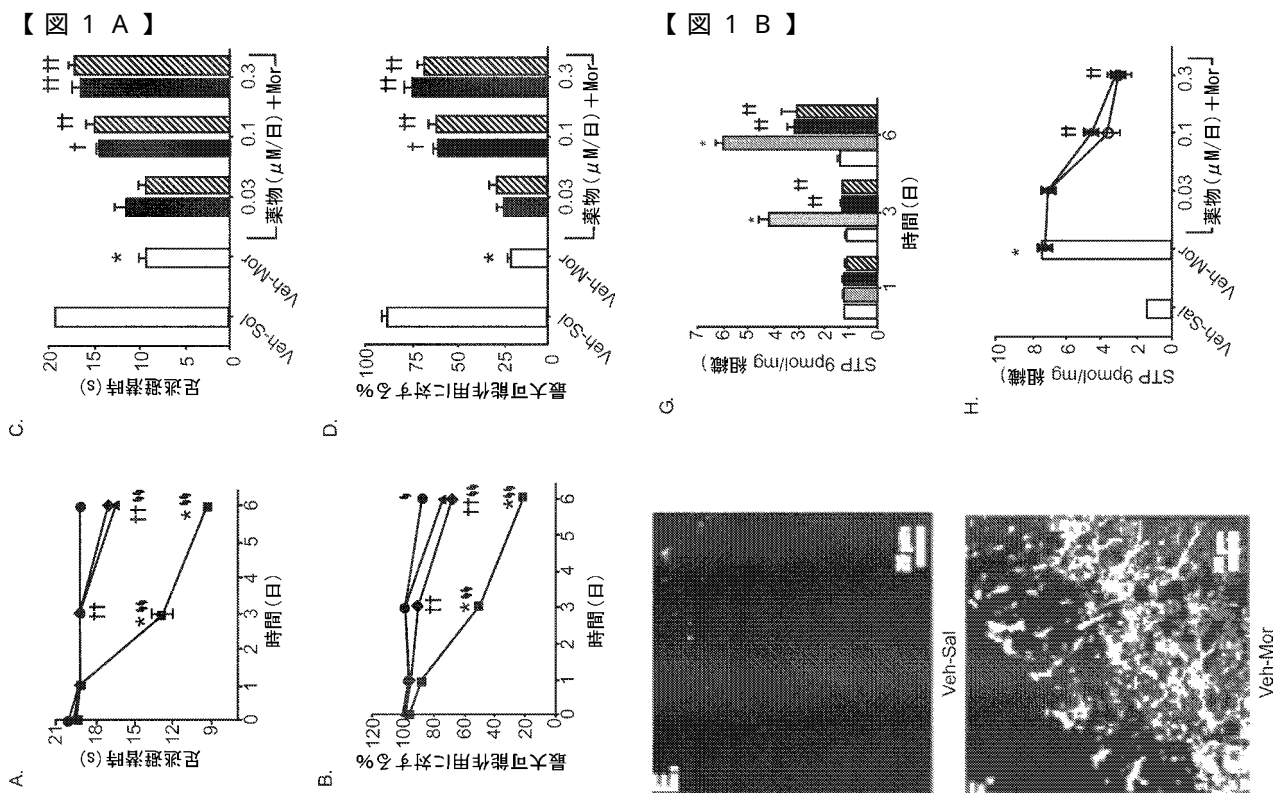
10

Im, D.S. Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. *Acta Pharmacol Sin* 31, 1213-1222 (2010).

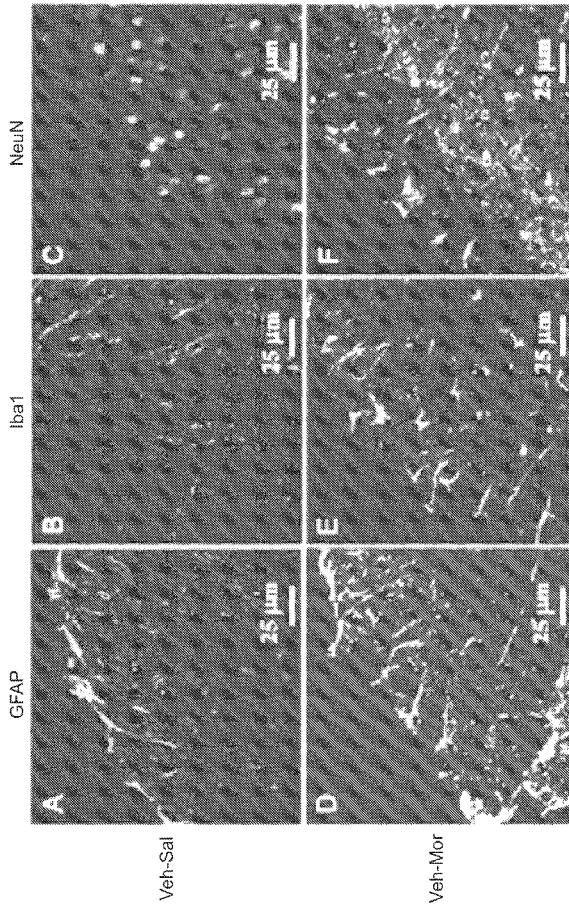
Taha, T.A., Argraves, K.M. & Obeid, L.M. Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta* 1682, 48-55 (2004).

20

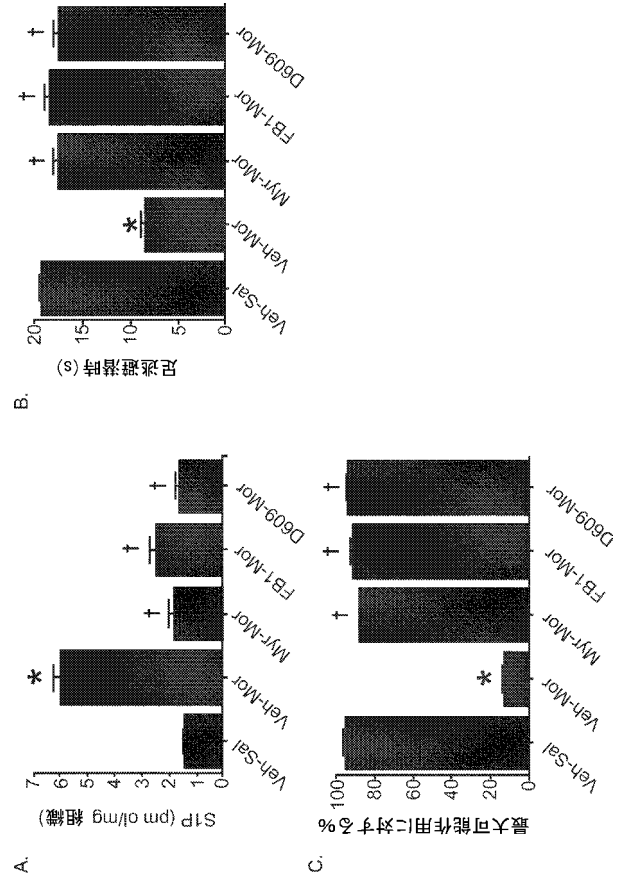
Takabe, K., Paugh, S.W., Milstien, S. & Spiegel, S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 60, 181-195 (2008).



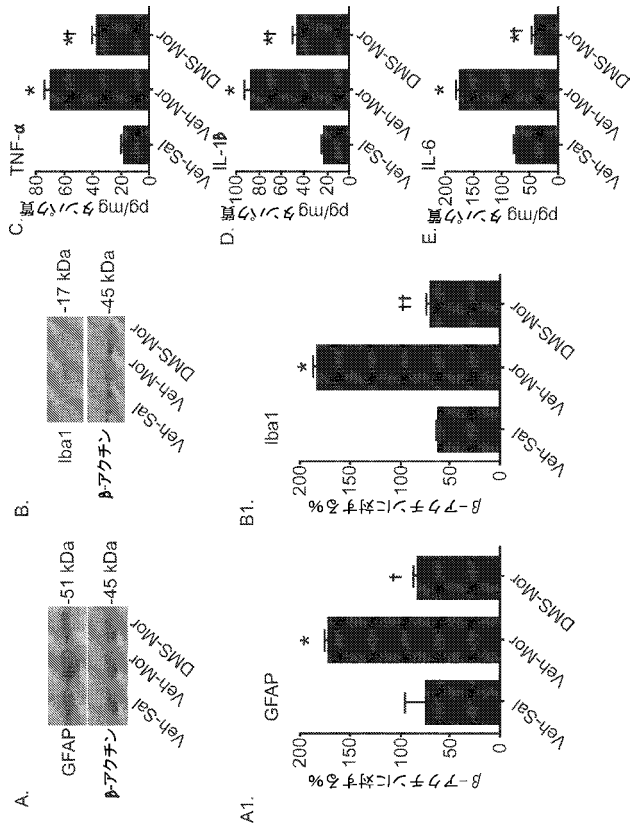
【図 2】



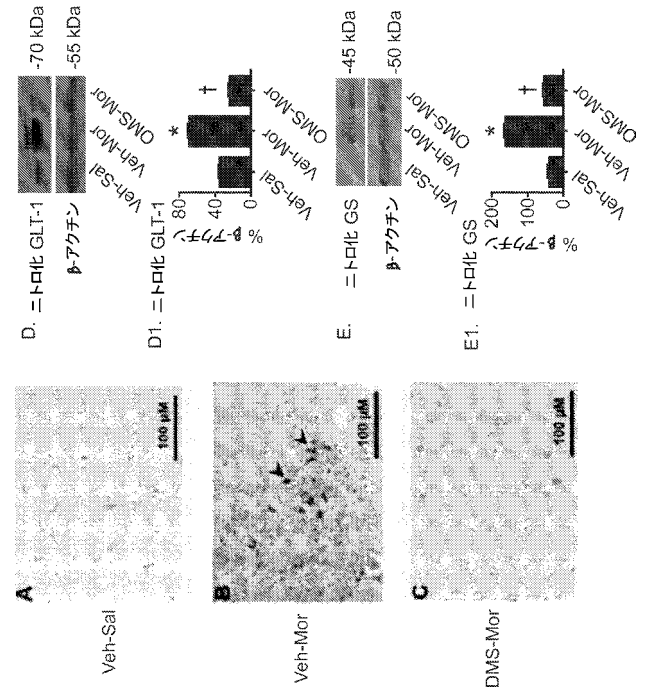
【図 3】



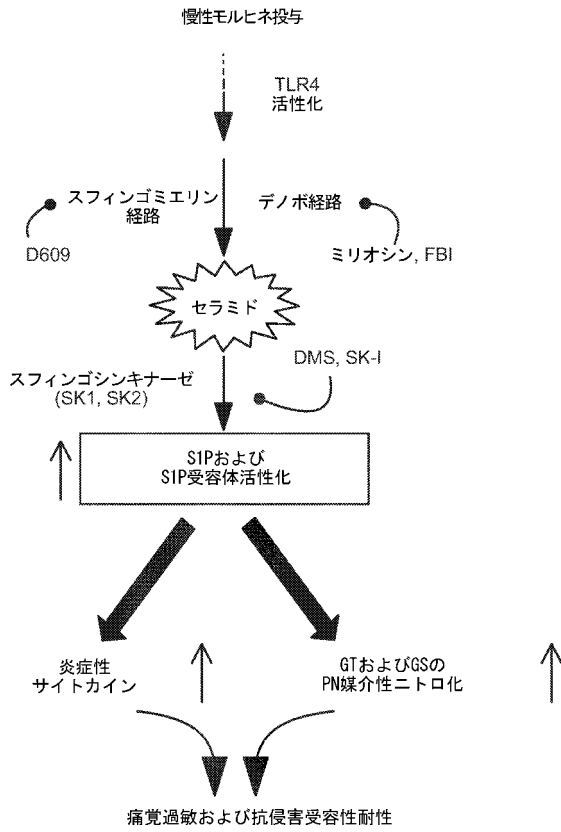
【図 4】



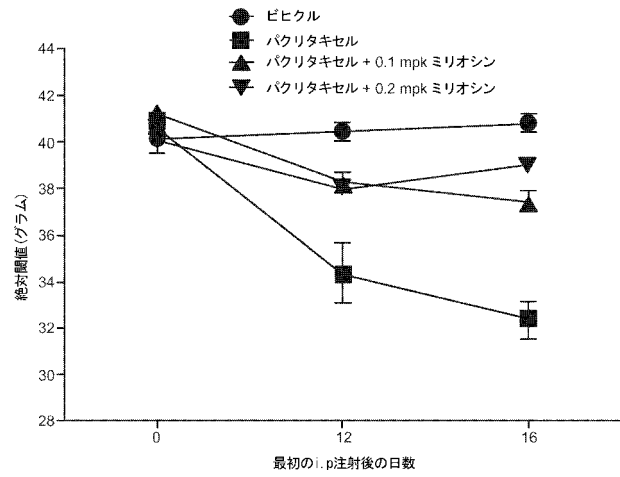
【図 5】



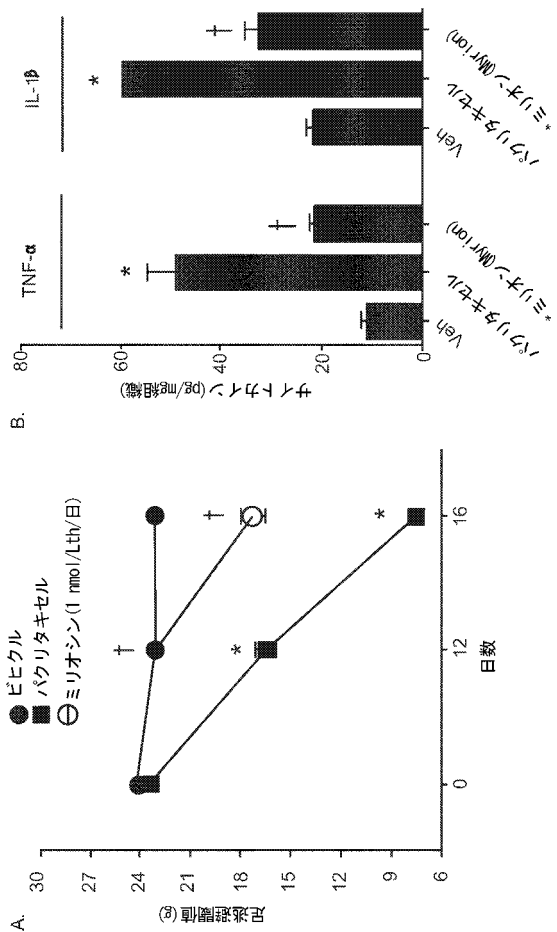
【 図 6 】



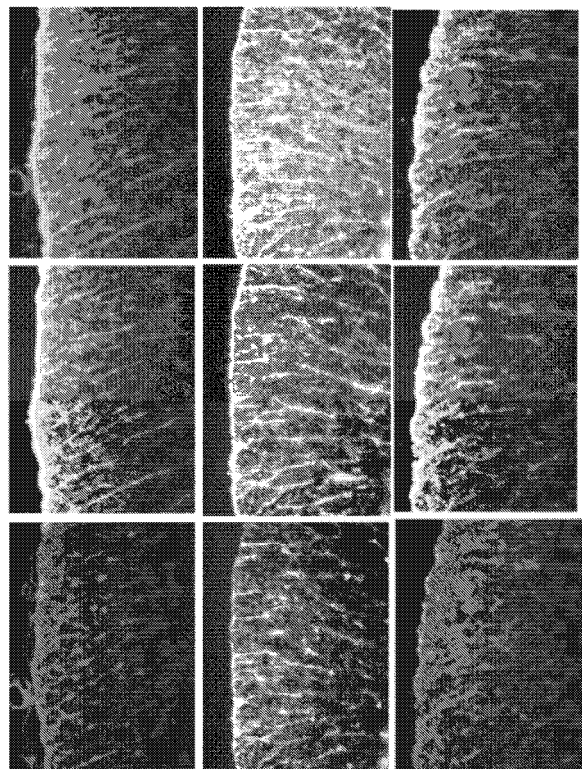
【 図 7 】



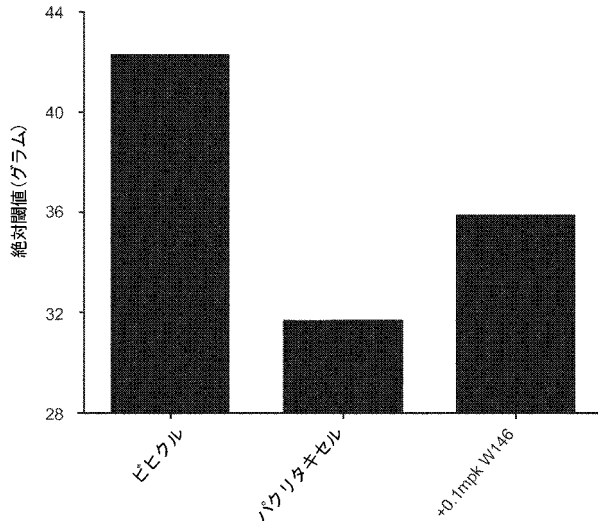
【 図 8 】



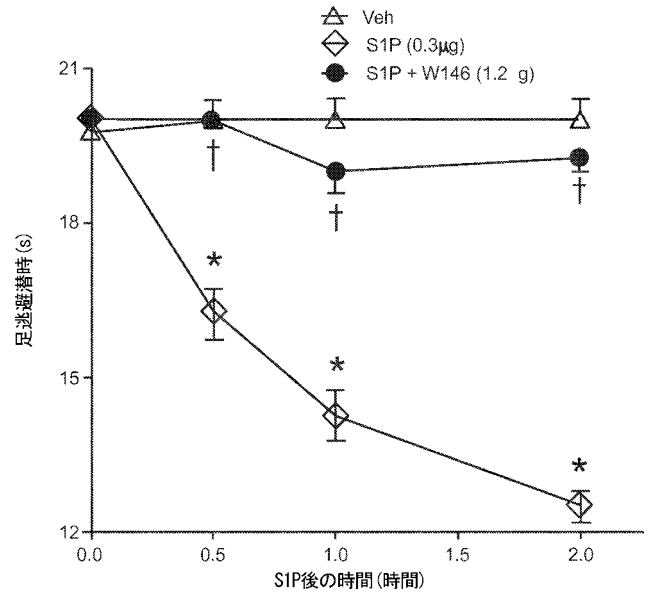
【 図 9 】



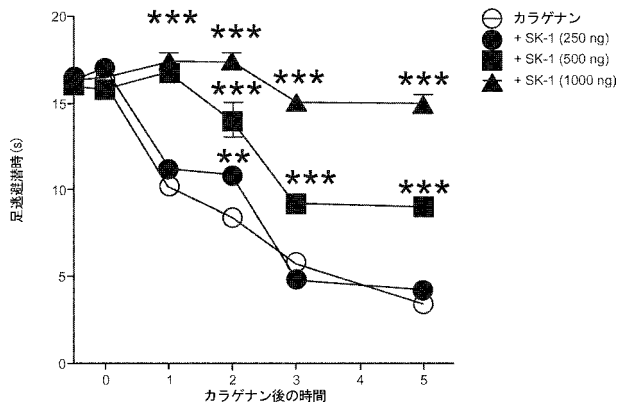
【図 10】



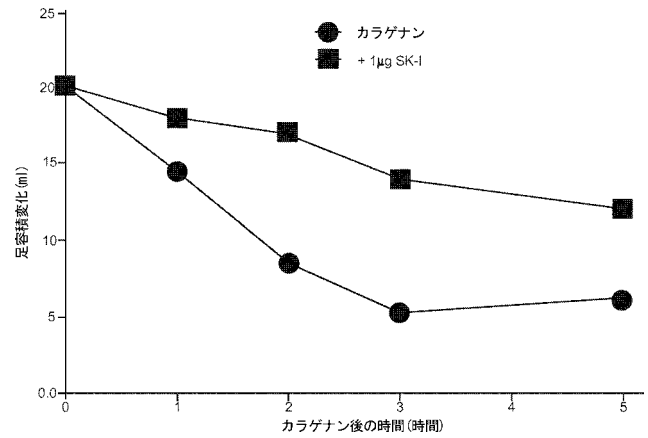
【図 11】



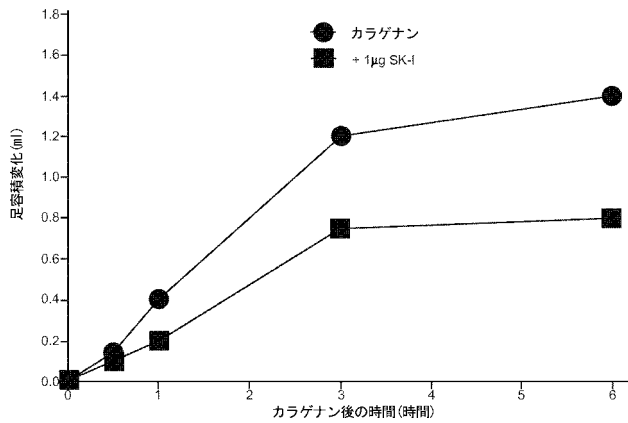
【図 12】



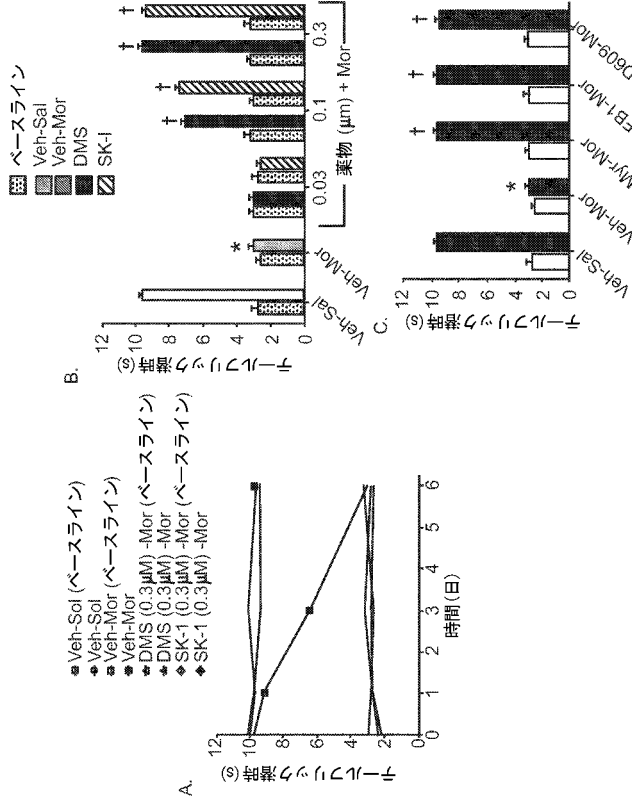
【図 14】



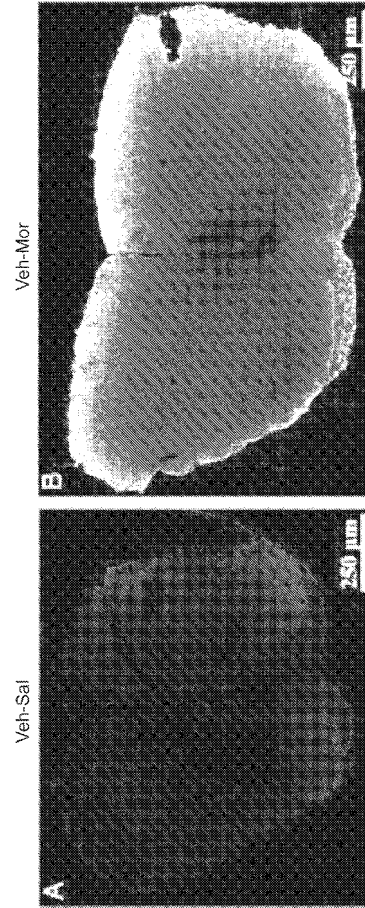
【図 13】



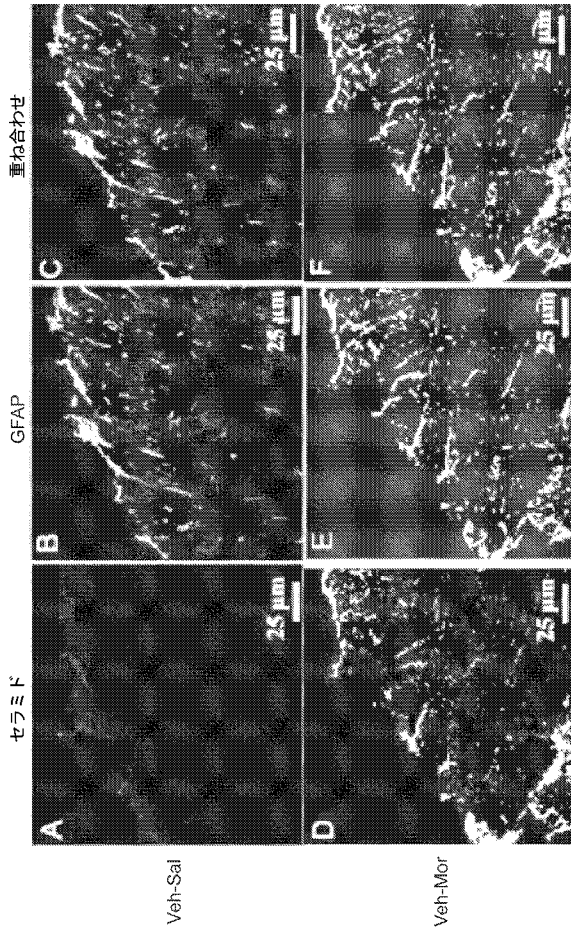
【図 15】



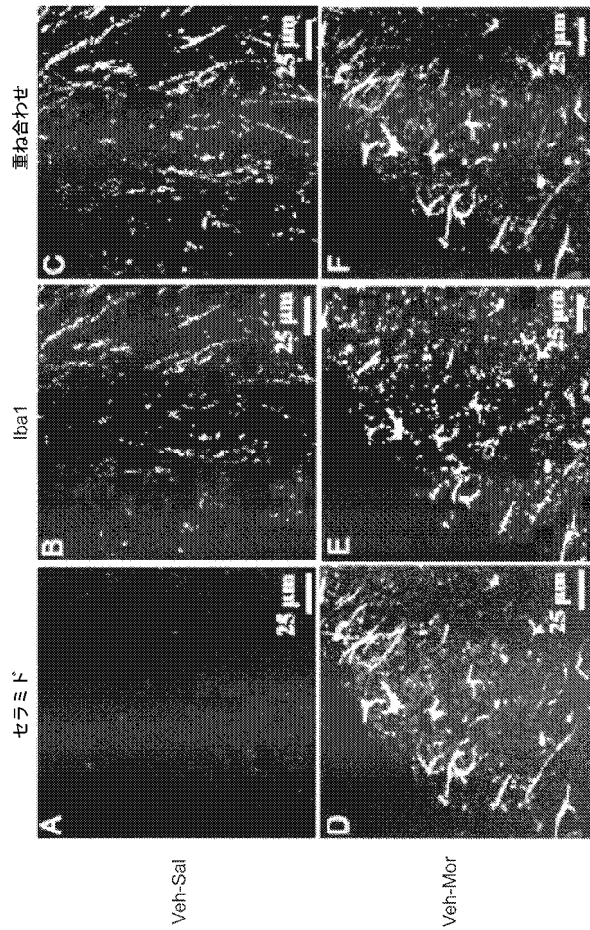
【図 16】



【図 17】

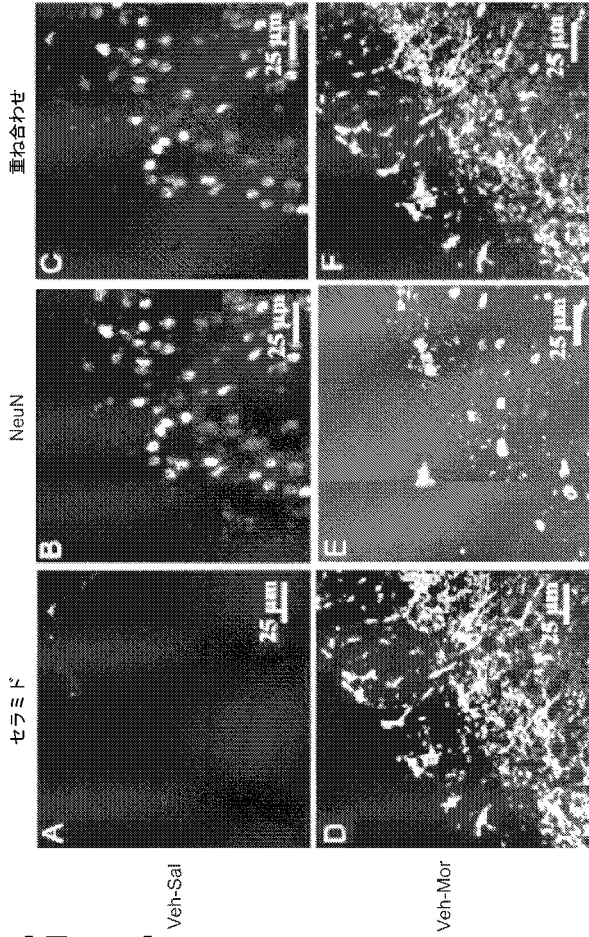


【図 18】

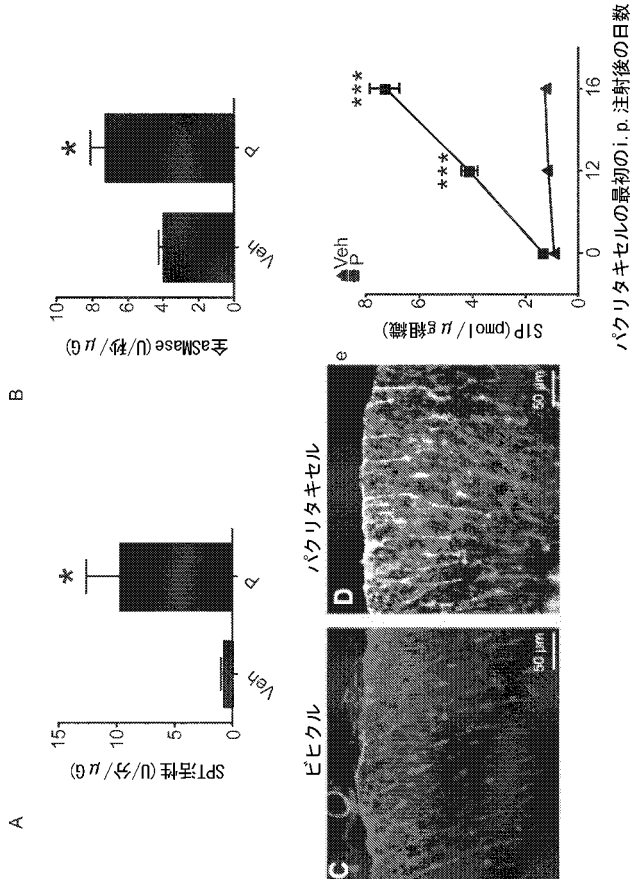




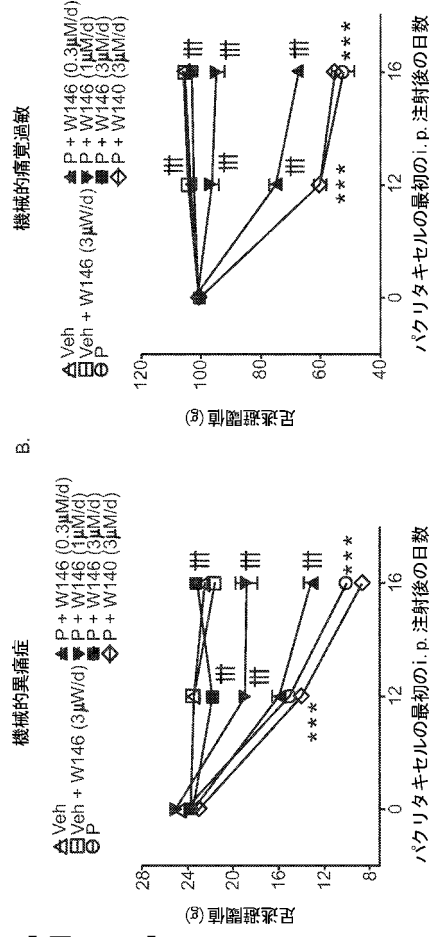
【図 19】



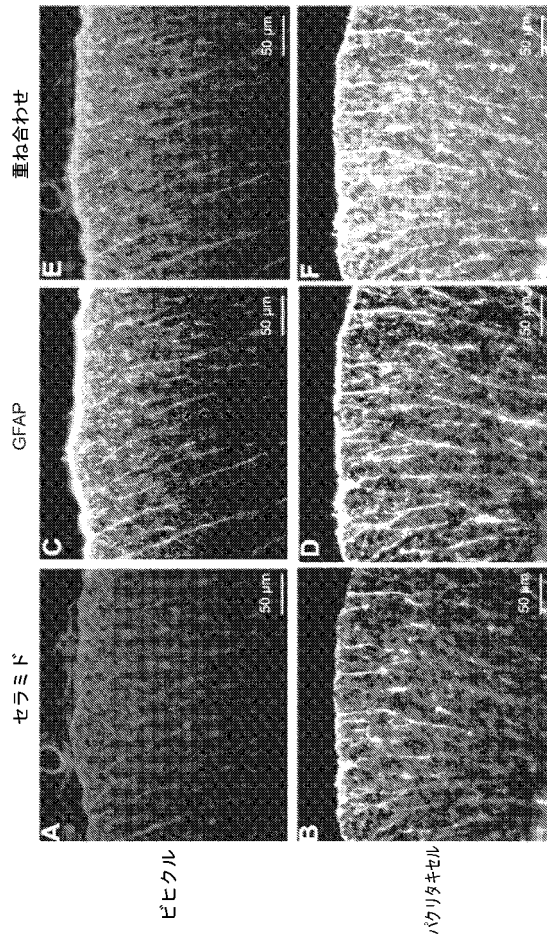
【図 21】



【図 20】

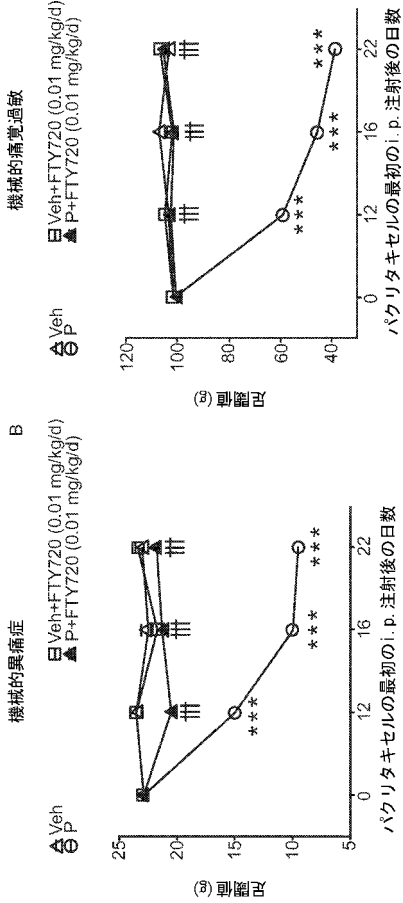


【図 22】

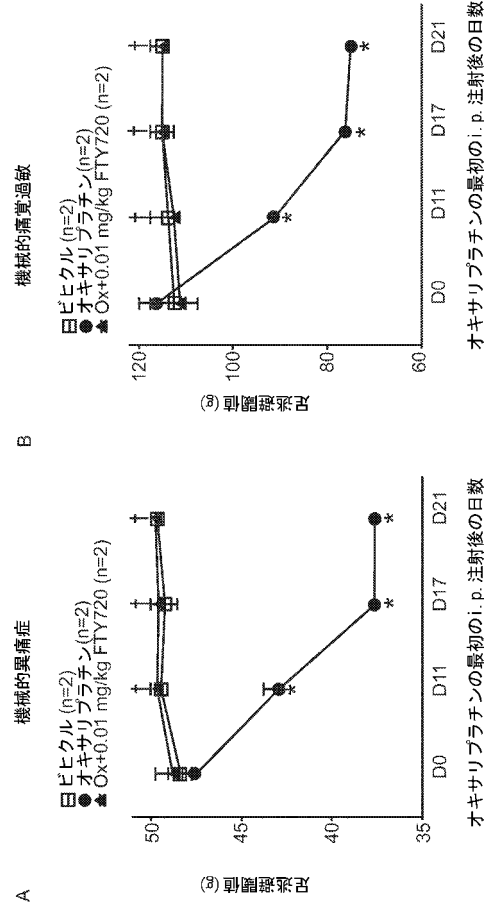




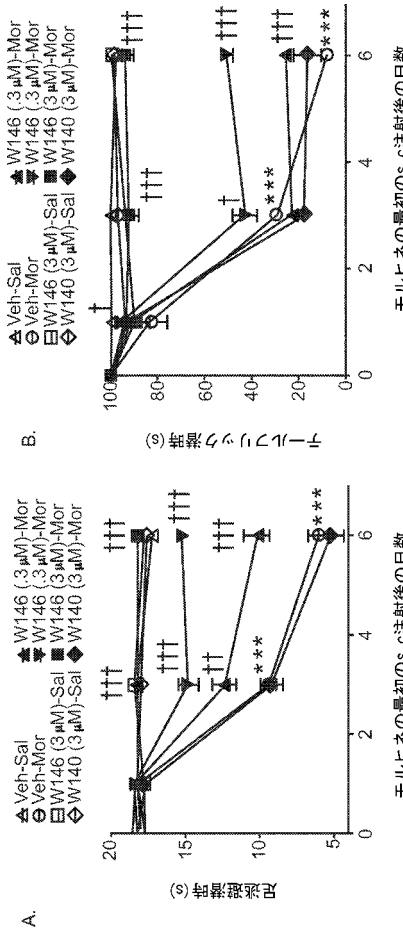
【図 2 3】



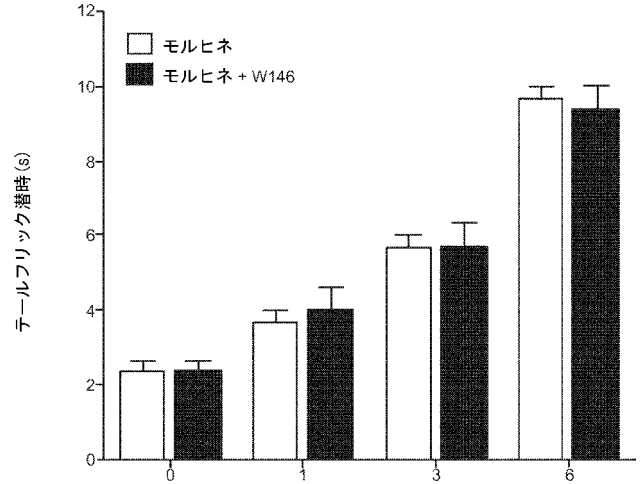
【図 2 4】



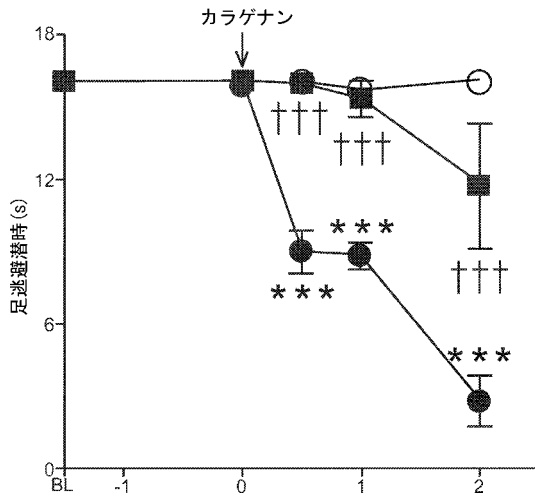
【図 2 5】



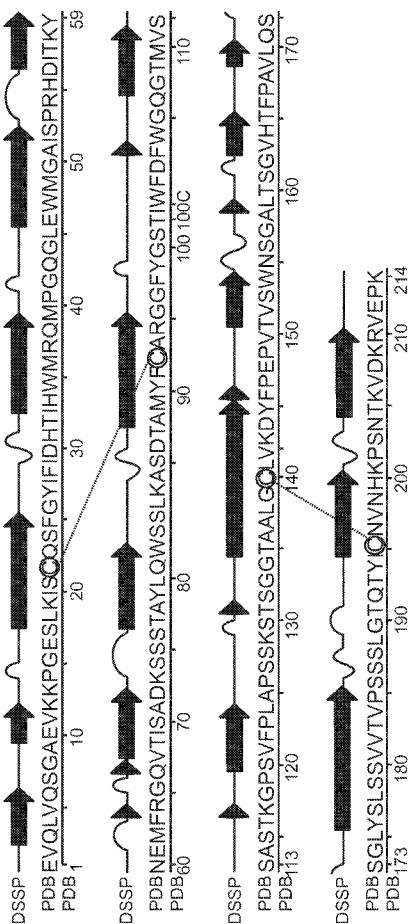
【図 2 6】



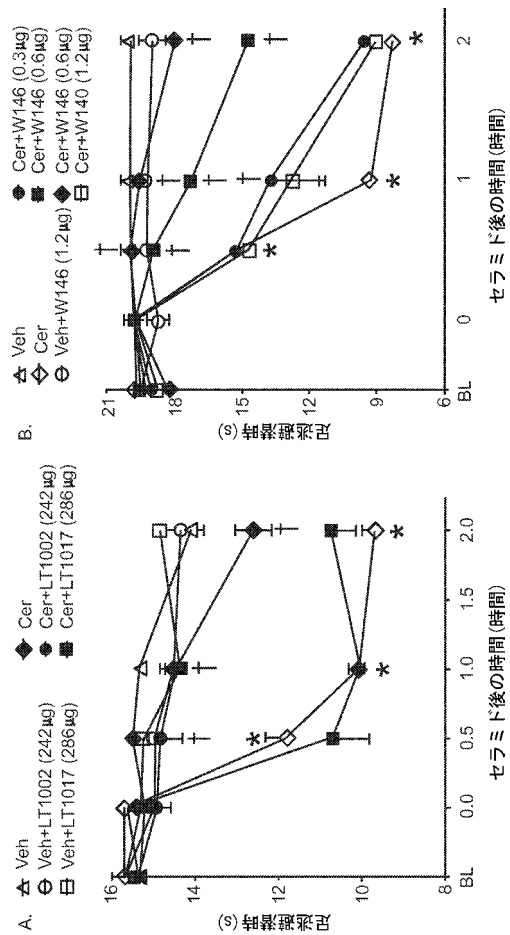
【図 27】



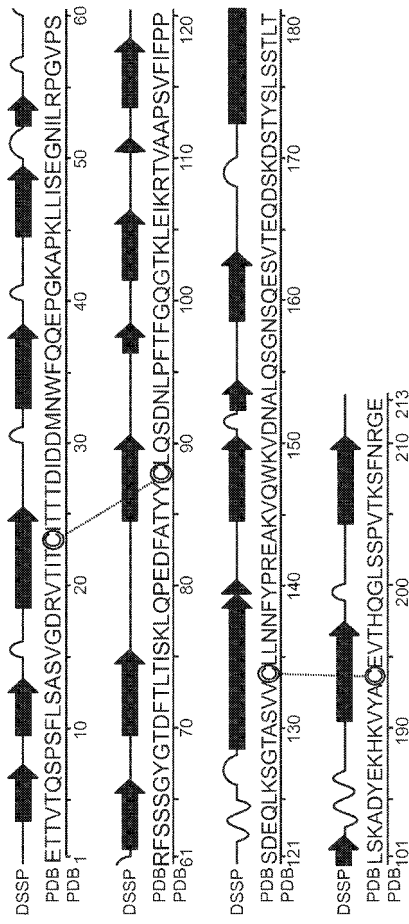
【図 29】



【図 28】



【図 30】



【配列表】

2013533286000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2011/045236

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K31/00 A61K31/133 A61K31/137 A61K31/40 A61K31/426 A61K39/00 A61P29/00 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MUSCOLI CAROLINA ET AL: "Counter-Regulation of Opioid Analgesia by Glial-Derived Bioactive Sphingolipids", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 30, no. 46, November 2010 (2010-11), pages 15400-15408, XP002662965, ISSN: 0270-6474 the whole document -----	1-4,7, 11-13, 19-21, 27-29
X,P	DOYLE, TIM ET AL: "Role for peroxynitrite in sphingosine-1-phosphate-induced", PAIN, 152(3), 643-648 CODEN: PAINDB; ISSN: 0304-3959, April 2011 (2011-04), XP002667360, the whole document ----- -/-	1-4,6, 11-13, 15, 19-21, 23, 27-29,31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  19 January 2012		Date of mailing of the international search report  30/01/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hoff, Philippe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2011/045236**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2011/ 045236

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 7(completely); 1-4, 11-13, 19-21, 27-29(partially)

A method for treating neuropathic pain,  
pain-hypersensitivity, antinociceptive tolerance or  
inflammatory pain with sphingosine kinase antagonists  
---

2. claims: 8-10, 16-18, 24-26, 32-34(completely); 1-4, 11-13,  
19-21, 27-29(partially)

A method for treating neuropathic pain,  
pain-hypersensitivity, antinociceptive tolerance or  
inflammatory pain with S1P antagonists  
---

3. claims: 5, 6, 14, 15, 22, 23, 30, 31(completely); 1-4, 11-13,  
19-21, 27-29(partially)

A method for treating neuropathic pain,  
pain-hypersensitivity, antinociceptive tolerance or  
inflammatory pain with S1P receptor agonists  
---

4. claims: 1-4, 11-13, 19-21, 27-29(all partially)

A method for treating neuropathic pain,  
pain-hypersensitivity, antinociceptive tolerance or  
inflammatory pain with S1P receptor antagonists  
---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/045236

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	TIM DOYLE ET AL: "Sphingosine-1-phosphate acting via the S1P1 receptor is a downstream signaling pathway in ceramide-induced hyperalgesia", NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 499, no. 1, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 4-8, XP55016229, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/j.neulet.2011.05.018 abstract; figure 3 -----	1-4,6, 8-13, 15-21, 23-29, 31-34
X	WO 2008/141013 A1 (ALLERGAN INC [US]; DONELLO JOHN E [US]; BEARD RICHARD L [US]; SCHWEIGH) 20 November 2008 (2008-11-20) -----	1-4, 11-13, 19-21, 27-29
Y	page 1, line 30 - line 33 page 51, line 11 - page 65, line 2; claims 1,2; examples -----	7-10, 16-18, 24-26, 32-34
X	WO 2010/019646 A1 (ALLERGAN INC [US]; NGUYEN PHONG X [US]; HEIDELBAUGH TODD M [US]; CHOW) 18 February 2010 (2010-02-18) page 1, line 11 - line 15 page 5, line 6 - line 17 page 22, line 16 - page 23, line 11 -----	1,11, 27-29
X	COSTE OVIDIU ET AL: "Antinociceptive activity of the S1P-receptor agonist FTY720", JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE, vol. 12, no. 3, June 2008 (2008-06), pages 995-1004, XP002662966, ISSN: 1582-1838 the whole document -----	1-6, 11-15, 19-23, 27-31
X	WO 2007/092638 A1 (UNIV VIRGINIA [US]; LYNCH KEVIN R; MACDONALD TIMOTHY L [US]) 16 August 2007 (2007-08-16) page 3, paragraph 11 page 5, paragraph 18 - page 6, line 3 page 7, paragraph 30 -----	1-4,11
X	WO 99/37298 A1 (UNIV MICHIGAN [US]; HOLOSHITZ JOSEPH [US]; SHAYMAN JAMES A [US]; TAN S) 29 July 1999 (1999-07-29) page 1, line 13 page 4, line 31 - line 33 claims 1-4; example 6 -----	27-29
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/045236

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/270630 A1 (SMITH CHARLES D [US] ET AL) 30 November 2006 (2006-11-30) abstract page 2, paragraphs 10,11 page 4, paragraph 29; claims 1,2,5 -----	27-29
X	LAI WEN-QI ET AL: "Anti-inflammatory effects of sphingosine kinase modulation in inflammatory arthritis.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 DEC 2008 LNKD- PUBMED:19017993, vol. 181, no. 11, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 8010-8017, XP002662967, ISSN: 1550-6606 the whole document -----	27-29
X	NICOL GRANT D: "Nerve growth factor, sphingomyelins, and sensitization in sensory neurons.", SHENG LI XUE BAO : [ACTA PHYSIOLOGICA SINICA] 25 OCT 2008 LNKD- PUBMED:18958367, vol. 60, no. 5, 25 October 2008 (2008-10-25), pages 603-604, XP002662968, ISSN: 0371-0874 the whole document -----	11,27
Y		7
A	COSTE OVIDIU ET AL: "Sphingosine 1-Phosphate Modulates Spinal Nociceptive Processing", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 47, November 2008 (2008-11), pages 32442-32451, XP002662969, ISSN: 0021-9258 abstract page 32444, right-hand column, last paragraph - page 32445, left-hand column, paragraph 1; figure 2 -----	1-34
X	EP 1 484 057 A1 (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]) 8 December 2004 (2004-12-08)  abstract page 2, paragraph 8 page 5, line 46 - line 47 page 8, line 35 - line 44; claims 1,8,9 ----- -/--	1-6, 11-15, 19-23, 27-31



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/045236

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2004/105773 A2 (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]; MICHAELIS MARTIN [DE] SANOFI AVENTIS DEUTSCH) 9 December 2004 (2004-12-09)</p> <p>page 1, line 13 - line 19  page 7, line 16 - line 23  page 16, line 31 - page 17, line 7  page 22, line 23 - page 23, line 15  page 36, line 8 - line 16; claims 19-23</p>	1-6, 11-15, 19-23, 27-31
X	<p>EP 1 431 284 A1 (KYORIN SEIYAKU KK [JP])  23 June 2004 (2004-06-23)  abstract; example 46  page 31, paragraph 123; claims 9-13</p>	27-31
X	<p>EP 1 733 724 A1 (SANKYO CO [JP])  20 December 2006 (2006-12-20)  abstract; example 1  page 59, paragraph 253; claims 16,17</p>	27-31
X	<p>US 2007/082933 A1 (BINKERT CHRISTOPH [CH] ET AL) 12 April 2007 (2007-04-12)  abstract; claims 1,13,47,48; examples 84-86</p>	27-31
X	<p>BOLLAG WENDY B: "Potential role of sphingosine 1-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 49, no. 11, November 2008 (2008-11), pages 2281-2282, XP002667398, ISSN: 0022-2275  the whole document</p>	27-29
Y	<p>WO 2008/070344 A2 (LPATH THERAPEUTICS INC [US]; SABBADINI ROGER A [US]; GARLAND WILLIAM A) 12 June 2008 (2008-06-12)</p> <p>abstract; claims 1-3,69-70  page 24, line 30 - page 25, line 17</p>	8-10, 16-18, 24-26, 32-34
Y	<p>WO 2009/124294 A2 (LPATH INC [US]; SABBADINI ROGER A [US]; PANCOAST SCOTT R [US]; HANSEN) 8 October 2009 (2009-10-08)</p> <p>abstract  page 1, line 1 - line 11  page 16, line 12 - line 22  page 17, line 30 - line 34; claims;  examples</p>	8-10, 16-18, 24-26, 32-34
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2011/045236

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>M. M. NDENGELE ET AL: "Spinal Ceramide Modulates the Development of Morphine Antinociceptive Tolerance via Peroxynitrite-Mediated Nitroxidative Stress and Neuroimmune Activation", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 329, no. 1, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 64-75, XP55010200, ISSN: 0022-3565, DOI: 10.1124/jpet.108.146290 the whole document</p> <p>-----</p>	1-34

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/045236

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008141013 A1	20-11-2008	US 2010249069 A1 WO 2008141013 A1	30-09-2010 20-11-2008
WO 2010019646 A1	18-02-2010	AU 2009282017 A1 CA 2733970 A1 CN 102119140 A EP 2328863 A1 US 2010041715 A1 WO 2010019646 A1	18-02-2010 18-02-2010 06-07-2011 08-06-2011 18-02-2010 18-02-2010
WO 2007092638 A1	16-08-2007	AU 2007212193 A1 CA 2641718 A1 EP 1987013 A1 JP 2009526073 A US 2009042955 A1 US 2011195936 A1 WO 2007092638 A1	16-08-2007 16-08-2007 05-11-2008 16-07-2009 12-02-2009 11-08-2011 16-08-2007
WO 9937298 A1	29-07-1999	AU 2327599 A US 6098631 A US 6518259 B1 WO 9937298 A1	09-08-1999 08-08-2000 11-02-2003 29-07-1999
US 2006270630 A1	30-11-2006	NONE	
EP 1484057 A1	08-12-2004	AT 424195 T AU 2004246763 A1 BR PI0411208 A CA 2528409 A1 EP 1484057 A1 EP 1635803 A1 IL 172290 A JP 4778419 B2 JP 2006527171 A MX PA05012797 A WO 2004110421 A1	15-03-2009 23-12-2004 18-07-2006 23-12-2004 08-12-2004 22-03-2006 31-03-2011 21-09-2011 30-11-2006 17-05-2006 23-12-2004
WO 2004105773 A2	09-12-2004	AT 532522 T AU 2004243475 A1 AU 2010235846 A1 BR PI0410960 A CA 2527759 A1 CN 1838961 A EP 1481680 A1 EP 1641468 A2 JP 2007518698 A JP 2011168589 A KR 20060054188 A RU 2362565 C2 US 2005032744 A1 US 2010137257 A1 WO 2004105773 A2	15-11-2011 09-12-2004 04-11-2010 04-07-2006 09-12-2004 27-09-2006 01-12-2004 05-04-2006 12-07-2007 01-09-2011 22-05-2006 27-07-2009 10-02-2005 03-06-2010 09-12-2004
EP 1431284 A1	23-06-2004	BR 0212894 A CA 2461212 A1 CN 1561331 A DE 60223699 T2 DK 1431284 T3	13-10-2004 10-04-2003 05-01-2005 30-10-2008 18-02-2008

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/045236

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
			EP 1431284 A1	23-06-2004
			ES 2292809 T3	16-03-2008
			JP 4217620 B2	04-02-2009
			JP 2009040794 A	26-02-2009
			MX PA04002679 A	30-07-2004
			PT 1431284 E	21-01-2008
			US 2004254222 A1	16-12-2004
			WO 03029205 A1	10-04-2003
-----				
EP 1733724	A1	20-12-2006	AU 2005215320 A1	01-09-2005
			BR P10507944 A	24-07-2007
			CA 2557536 A1	01-09-2005
			CN 1921847 A	28-02-2007
			EP 1733724 A1	20-12-2006
			NZ 549162 A	24-12-2009
			US 2007191468 A1	16-08-2007
			WO 2005079788 A1	01-09-2005
			ZA 200607059 A	30-01-2008
-----				
US 2007082933	A1	12-04-2007	AR 047128 A1	11-01-2006
			AT 483698 T	15-10-2010
			AU 2004295047 A1	16-06-2005
			BR P10416752 A	27-02-2007
			CA 2545582 A1	16-06-2005
			CN 1882555 A	20-12-2006
			DK 1689726 T3	06-12-2010
			EP 1689726 A1	16-08-2006
			EP 2295418 A1	16-03-2011
			ES 2352555 T3	21-02-2011
			HR 20100714 T1	31-01-2011
			JP 4061332 B2	19-03-2008
			JP 4129286 B2	06-08-2008
			JP 2007511563 A	10-05-2007
			JP 2008081504 A	10-04-2008
			KR 20060117328 A	16-11-2006
			MY 145074 A	15-12-2011
			NZ 547962 A	25-06-2010
			PT 1689726 E	09-12-2010
			RU 2379299 C2	20-01-2010
			SI 1689726 T1	31-01-2011
			TW 1323659 B	21-04-2010
			US 2007082933 A1	12-04-2007
			US 2008146629 A1	19-06-2008
			US 2008280962 A1	13-11-2008
			US 2009275625 A1	05-11-2009
			WO 2005054215 A1	16-06-2005
			ZA 200605077 A	30-05-2007
-----				
WO 2008070344	A2	12-06-2008	AU 2007329759 A1	12-06-2008
			CA 2667574 A1	12-06-2008
			CN 101679506 A	24-03-2010
			EP 2087002 A2	12-08-2009
			JP 2010515427 A	13-05-2010
			KR 20100043137 A	28-04-2010
			US 2009010922 A1	08-01-2009
			US 2009130099 A1	21-05-2009
			US 2009130100 A1	21-05-2009
			US 2009137037 A1	28-05-2009

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/045236

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2009148443 A1	11-06-2009
		US 2010003242 A1	07-01-2010
		WO 2008070344 A2	12-06-2008
		ZA 200902860 A	28-07-2010
-----			
WO 2009124294 A2	08-10-2009	US 2010098700 A1	22-04-2010
		WO 2009124294 A2	08-10-2009
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	
<b>C 0 7 K 16/44 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02	
	A 6 1 P 29/00	1 0 1
	C 0 7 K 16/44	Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 サルベミニ ダニエラ

アメリカ合衆国 ミズーリ州 チェスターフィールド オーチャード ヒル ドライブ 1 8 2 0

F ターム(参考) 4C084 AA17 MA13 MA16 MA52 MA55 MA56 MA57 MA66 NA14 ZA082

ZA962 ZB112 ZB152

4C085 AA13 AA14 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB43

BB44 CC22 CC23 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08

GG10

4C086 AA01 AA02 BC82 MA01 MA04 MA07 MA10 NA14 ZA08 ZA96

ZB11 ZB15

4C206 AA01 AA02 FA03 FA08 KA01 MA01 MA04 MA11 MA14 NA14

ZA08 ZA96 ZB11 ZB15

4H045 AA30 BA10 DA76 EA21 FA74