

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5732182号
(P5732182)

(45) 発行日 平成27年6月10日 (2015. 6. 10)

(24) 登録日 平成27年4月17日 (2015. 4. 17)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 Z N A N
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 27/06 (2006. 01)	A 6 1 P 27/06
C 0 7 K 16/44 (2006. 01)	C 0 7 K 16/44
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 6 (全 115 頁)

(21) 出願番号	特願2009-534892 (P2009-534892)	(73) 特許権者	508129218
(86) (22) 出願日	平成19年10月26日 (2007. 10. 26)		エルパス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2010-508297 (P2010-508297A)		L p a t h, I n c.
(43) 公表日	平成22年3月18日 (2010. 3. 18)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 - 1 4 0 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/082675		カリフォルニア州 サンディエゴ、ソレン
(87) 国際公開番号	W02008/055072		ト バレー ブルーバード、4 0 2 5 番
(87) 国際公開日	平成20年5月8日 (2008. 5. 8)	(74) 代理人	100109634
審査請求日	平成22年10月25日 (2010. 10. 25)		弁理士 舩谷 威志
(31) 優先権主張番号	60/855, 003	(74) 代理人	100129263
(32) 優先日	平成18年10月27日 (2006. 10. 27)		弁理士 中尾 洋之
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロジャー・エイ・サバディニ
(31) 優先権主張番号	60/956, 890		アメリカ合衆国 9 2 0 4 0 カリフォルニア
(32) 優先日	平成19年8月20日 (2007. 8. 20)		州レイクサイド、デル・ソル・ロード 1 2
(33) 優先権主張国	米国 (US)		5 0 9 番

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 眼疾患と症状を処置するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スフィンゴシンー1-リン酸 (S1P) のレベル上昇に関連する眼の疾患または障害の処置または予防のための、生理的条件下でS1Pと特異的に結合する抗S1Pヒト化抗体又は前記抗体のS1P結合フラグメントを含む医薬組成物であって、

S1Pのレベルの上昇に関連する眼の疾患または障害が、加齢性黄斑変性症、脈絡膜血管新生、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、角膜移植拒絶反応、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、鎌状赤血球網膜症、特発性ポリープ状脈絡膜血管障害、虚血性網膜症、レーザー損傷、網膜静脈閉塞性疾患、血管新生緑内障、黄斑パッカー、セロファン網膜症、ERM形成、コンタクトレンズの過剰装着、牽引性網膜剥離、増殖性硝子体網膜症、外傷性眼損傷、眼の瘢痕性類天疱瘡、眼ヒストプラスマ症、網膜血管腫増殖、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮剥離症、翼状片、角膜の感染症、および眼手術の影響からなる群から選択され、

S1Pのレベルの上昇に関連する眼の疾患または障害が、異常な新血管形成、異常な線維成長、線維症、瘢痕化および／または炎症によって少なくとも部分的に特徴付けられるものであり、

前記抗体又は前記S1P結合フラグメントの各々は、重鎖にDHTIH (配列番号: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (配列番号: 18) 及び GGFYGSTIWFDF (配列番号: 15) を含んだ相補性決定領域を備えており、軽鎖にITTTDIDDDMN (配列番号: 10)、EGNILRP (配列番号: 11) 及び LQS DNLPFT (配列番号: 12) を含んだ相補性決定領域を備えている医薬組成物。

【請求項 2】

角膜の感染症が、単純ヘルペス感染症、帯状疱疹感染症、および原虫感染症からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

眼手術が、屈折矯正手術、硝子体茎切除術および緑内障手術からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

全身、眼内または局所で投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

加齢性黄斑変性症が、乾燥型加齢黄斑変性症である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 6】

加齢性黄斑変性症が、湿潤型加齢黄斑変性症である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

先行出願

本願は、2006年、10月27日出願の仮出願第60/855,003号（代理人事件番号LPT-3020-PV）および2007年、8月20日出願の仮出願第60/956,890号（代理人事件番号LPT-3020-PV2）の利益と優先権を主張するものであり、その内容は目的を問わず、出典明示より、そのまま本明細書の一部とされる。

20

【0002】

配列表

本願は、添付の配列表とともに出願し、それを含んでいるが、この配列表は適用すべき規則および手続きに従って作製および提出したものである。この配列表も、目的を問わず、出典明示より、そのまま本明細書の一部とされる。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）と結合する薬剤、特に、生理条件下でS1Pと特異的に反応する、ヒト化モノクローナル抗体、抗体フラグメントおよび抗体誘導体に関する。このような薬剤は、このような薬剤を含有する医薬組成物の送達による種々の疾患または障害の治療および／または予防に使用可能である。

30

【0004】

以下の記載は本発明の理解に役立つ情報を含んでいる。本明細書に示される情報または本明細書中で明示的または暗示的に引用される刊行物はいずれも、ここに請求される発明の先行技術である、あるいは特にここに請求される発明と関連することを認めるものではない。

【背景技術】

【0005】

2. 背景

40

生物活性シグナル伝達脂質

脂質およびそれらの誘導体は現在、単に細胞膜の単純な構造要素または β -酸化、解糖もしくは他の代謝過程のエネルギー源としてだけではなく、医学研究の重要な標的として認識されている。特に、ある種の生物活性脂質は、動物およびヒトの疾患において重要なシグナル伝達メディエーターとして機能する。原形質膜の脂質のほとんどのものはもっぱら構造的役割を果たすが、一部のものは細胞外刺激を細胞へ中継することに関与する。「脂質シグナル伝達」とは、セカンドメッセンジャーとして細胞膜脂質を用いるいくつかの細胞シグナル伝達経路を指すとともに、脂質シグナル伝達分子とその固有の特異的受容体との直接的相互作用を指す。脂質シグナル伝達経路は、増殖因子から炎症性サイトカインまで、種々の細胞外刺激によって活性化され、アポトーシス、分化および増殖などの細胞

50

の運命の決定を調節する。ますます多くの生物活性脂質が確認され、それらの作用が同定されているので、生物活性脂質シグナル伝達に対する研究は、活発な科学研究分野である。

【0006】

生物活性脂質の例としては、エイコサノイド（カンナビノイド、ロイコトリエン、プロスタグランジン、リポキシン、エポキシエイコサトリエン酸およびイソエイコサノイドを含む）、非エイコサノイドカンナビノイドメディエーター、リン脂質およびそれらの誘導体、例えば、ホスファチジン酸（PA）およびホスファチジルグリセロール（PG）など、血小板活性化因子（PAF）およびカルジオリピン、ならびにリゾリン脂質、例えば、リゾホスファチジルコリン（LPC）および種々のリゾホスファチジン酸（LPA）が挙げられる。生物活性シグナル伝達脂質性メディエーターとしてはまた、スフィンゴミエリン、セラミド、セラミド-1-リン酸、スフィンゴシン、スフィンゴシルホスホリルコリン、スフィンガニン、スフィンガニン-1-リン酸（ジヒドロ-S1P）およびスフィンゴシン-1-リン酸などのスフィンゴ脂質が挙げられる。スフィンゴ脂質およびそれらの誘導体は、重要な細胞プロセスに対して多面発現作用を有する細胞外および細胞内シグナル伝達分子の一群を表す。生物活性シグナル伝達脂質の他の例としては、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジリノシトール（PI）、ホスファチジルエタノールアミン（PEA）、ジアシルグリセリド（DG）、スルファチド、ガングリオシドおよびセレブロシドが挙げられる。

【0007】

スフィンゴ脂質は、それらの当初の不可解な性質のためにスフィンクスにちなんで命名されたユニークな脂質種である。スフィンゴ脂質は最初に、細胞膜の主要な構成成分として同定されたが、最近の研究では、スフィンゴ脂質は細胞シグナル伝達・調節分子としても働くことが示されている(Hannun, et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993; Spiegel, et al., FASEB J. 10:1388-1397, 1996; Igarashi, J. Biochem 122:1080-1087, 1997; Hla, T. (2004). Semin Cell Dev Biol, 15, 513-2; Gardell, S.E., Dubin, A.E. & Chun, J. (2006). Trends Mol Med, 12, 65-75)。スフィンゴ脂質は、細胞シグナル伝達・調節分子としても働く、細胞膜の主要な構成成分である(Hannun and Bell, Adv. Lipid Res. 25: 27-41, 1993; Igarashi, J. Biochem 122: 1080-1087, 1997)。スフィンゴ脂質シグナル伝達メディエーターであるセラミド（CER）、スフィンゴシン（SPH）およびスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は最も広く研究されており、最近、心血管系、脈管形成および腫瘍生物学におけるそれらの役割が認識されている(Claus, et al., Curr Drug Targets 1: 185-205, 2000; Levade, et al., Circ. Res. 89: 957-968, 2001; Wang, et al., J. Biol. Chem. 274: 35343-50, 1999; Wascholowski and Giannis, Drug News Perspect. 14: 581-90, 2001; Spiegel, S. & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 397-407)。

【0008】

スフィンゴ脂質代謝の総説としては、Liu, et al., Crit Rev. Clin. Lab. Sci. 36:511-573, 1999を参照。スフィンゴミエリンシグナル伝達経路の総説としては、Hannun, et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993; Liu, et al., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 36: 511-573, 1999; Igarashi, J. Biochem. 122:1080-1087, 1997; Oral, et al., J. Biol. Chem. 272:4836-4842, 1997;およびSpiegel et al., Biochemistry (Moscow) 63:69-83, 1998を参照。

【0009】

S1Pは細胞増殖のメディエーターであり、生存経路の活性化によってアポトーシスから保護する(Maceyka, et al. (2002), BBA, vol. 1585): 192-201およびSpiegel, et al. (2003), Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 4: 397-407)。CER/SPHレベルとS1Pの間のバランスが、細胞が細胞死経路へ向けられるかアポトーシスから保護されるかを決定するレオスタット機構をもたらすのではないかと提案されている。このレオスタット機構の鍵となる調節酵素はスフィンゴシンキナーゼ（SPHK）であり、そ

の役割は細胞死促進生物活性シグナル伝達脂質 (CER/SPH) を成長促進 S1P へ変換することである。S1P は 2 つの運命を持ち、S1P は、S1P をホスホエタノールアミンとヘキサデカノールに切断する酵素 S1P リアーゼにより分解されるか、あるいは多くはないが、S1P ホスファターゼにより SPH へと加水分解され得る。

【0010】

S1P の多面発現的生物活性は、もともと内皮分化遺伝子 (EDG) として知られる G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーによって媒介される。S1P₁/EDG-1、S1P₂/EDG-5、S1P₃/EDG-3、S1P₄/EDG-6 および S1P₅/EDG-8 という 5 つの GPCR が高親和性 S1P 受容体 (S1PR) として同定されており、1998 年といった最近になって初めて確認されたものである (Lee, et al., 1998)。S1P によって誘発される多くの反応は種々のヘテロ三量体 G タンパク質 (G_q、G_i、G₁₂₋₁₃) および Rho ファミリーの小さな GTP アーゼと結びついている (Gardell, et al., 2006)。

10

【0011】

成体では、S1P は、血小板 (Gardell, et al., 2006) および肥満細胞から放出され、創傷治癒を促進し、炎症性応答に関与するために遊離 S1P の局所的パルス (S1PR の K_d を十分超えるように) を作り出す。正常な条件下では、血漿中の全 S1P はかなり高い (300~500 nM) が、大部分の S1P は血清タンパク質、特に、リポタンパク質 (例えば、HDL > LDL > VLDL) およびアルブミンによって緩衝されている可能性があることから、生物活性 S1P (または S1P の遊離画分) は S1PR を認め得るほどに活性化するのに十分なものではない (Murata et al., 2000)。もしこの限りでなければ、不適切な脈管形成や炎症が起こる。S1P の細胞内作用も示唆されている (例えば、Spiegel S, Kolesnick R (2002), Leukemia, vol. 16: 1596-602; Suomalainen, et al (2005), Am J Pathol, vol. 166: 773-81 参照。)

20

【0012】

細胞表面 S1P 受容体の散在発現は、増殖、接着、収縮、運動性、形態形成、分化および生存を含む、S1P に多様な細胞応答域に影響を及ぼさせる。この応答域は、細胞および組織系の中の S1P 受容体の重複または異なる発現パターンに依存しているように思われる。さらに、S1P と血小板由来増殖因子 (PDGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) および塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含む増殖因子シグナル伝達経路の間のクロストークが最近実証された (例えば、Baudhuin, et al. (2004), FASEB J, vol. 18: 341-3)。S1P を含む種々の細胞プロセス、とりわけ、ニューロンシグナル伝達、血管緊張、創傷治癒、免疫細胞移動、生殖および心血管機能の調節に特定の影響を有する。これらの系内の S1P の内在レベルの変更は、癌、炎症、脈管形成、心疾患、喘息および自己免疫疾患を含むいくつかの病態生理学的状態を誘発する有害な作用を持つ。

30

【0013】

心血管疾患、脳血管疾患および種々の癌を含む種々の疾患および障害の処置に対する最近の新規なアプローチは、単独で、または他の処置と組み合わせて、生物学的に利用可能な S1P のレベルを低下させることを含む。SPHK のようなスフィンゴ脂質代謝経路の鍵酵素を標的とするスフィンゴ脂質に基づく処置戦略が提案されているが、脂質性メディアーター S1P 自体との干渉は、大方は、この脂質標的を直接緩和することが困難なために、特に、S1P 標的に対する抗体をまず作製し、次に検出することが困難なために、最近になるまで強調されて来なかった。

40

【0014】

最近、S1P に特異的な抗体の作製が記載された。例えば、同一所有者の米国特許出願第 20070148168 号; WO2007/053447 参照。このような抗体は、例えば、血清から S1P を選択的に吸収することができ、細胞外 S1P を中和する分子スポンジとして働く。同一所有者の米国特許第 6,881,546 号および同第 6,858,383 号および米国特許出願第 10/029,372 号も参照。Lpath, Inc. が開発し、上記で引用された特許または特許出願に記載されているネズミモノクローナル抗体 (mAb

50

b)であるSPHINGOMAB(商標)は、ヒト疾患モデルで有効であることが示されている。場合によっては、特に、ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答が生じ得る、ヒトにおける治療的使用のためには、ネズミ抗体よりもヒト化抗体のほうが好ましい場合がある。このような応答は、結合活性を中和することにより、かつ／または身体において循環から抗体を迅速に浄化することにより、抗体の有効性を低減し得る。HAMA応答はまた、その後マウス抗体を投与した際に毒性を生じる可能性がある。

【0015】

今般、ヒト化抗S1P抗体が開発され、本明細書に記載される。この抗体は、S1Pとの結合、S1Pの中和、およびS1Pに関連する病態の調節における有効性に関してネズミmAbの利点を全て持ち、ヒトに関して用いる場合のネズミmAbの潜在的欠点を全く持たないと予想される。以下の例に記載されるように、このヒト化抗体(LT1009またはsonepcizumabと呼ぶ)は、実際に、疾患の動物モデルにおいて親(ネズミ)抗体よりも大きな活性が示されている。

【発明の概要】

【0016】

3. 定義

本発明を詳しく述べる前に、本発明の文脈で用いるいくつかの用語を定義する。これらの用語に加え、他のものも必要に応じて本明細書の他所で定義する。特に断りのない限り、本明細書で用いられる技術用語はそれらの技術分野で認識されている意味を有する。矛盾がある場合には、定義を含む本明細書を調整する。

【0017】

「免疫誘導部分」は、抗体(Ab)または免疫グロブリン(Ig)を含み、免疫グロブリン遺伝子に由来するか、免疫グロブリン遺伝子の後にモデル化されるか、または免疫グロブリン遺伝子にコードされている任意の形態のペプチド、ポリペプチド、または誘導形態、あるいは抗原またはエпитープと結合し得るこのようなペプチドまたはポリペプチドのフラグメントを指す(例えば、Immunobiology, 5th Edition, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik, (editors), Garland Publishing (2001)参照)。本発明において、抗原は生物活性脂質分子である。

【0018】

「抗S1P抗体」または「S1Pに対して反応性のある免疫誘導部分」とは、S1Pと結合する任意の抗体または抗体由来分子を指す。これらの定義から理解されるように、抗体または免疫誘導部分はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよく、様々な手段で作製し、かつ／またはヒト対象を含む動物から単離することができる。

【0019】

「生物活性脂質」とは、脂質シグナル伝達分子を指す。一般に、生物活性脂質は、そのシグナル伝達作用を発揮する際は生体膜には存在せず、いわば、このような脂質種は生体膜(例えば、細胞膜、細胞オルガネラの膜など)のいくつかの点に存在する可能性があり、生体膜と結びついた際には「生物活性脂質」ではなく、代わりに「構造脂質」分子となる。生物活性脂質は、細胞外および／または細胞内シグナル伝達を媒介し、従って、分化、遊走、増殖、分泌、生存および他のプロセスを変調することにより、多くの細胞種の機能の制御に関与するという点で構造脂質(例えば、膜結合リン脂質)とは区別される。in vivoにおいて、生物活性脂質は細胞外液中に見られ、そこでそれらは、例えばアルブミンおよびリポタンパク質などの血清タンパク質などの他の分子と複合体を形成しているか、または「遊離」形態、すなわち、別の分子種と複合体を形成していない可能性がある。細胞外メディエーターとして、いくつかの生物活性脂質は、膜結合型イオンチャネルまたはGタンパク質共役型受容体(次に、細胞の機能または生存に変化をもたらす複雑なシグナル伝達系を活性化させる)を活性化することにより、細胞のシグナル伝達を変更する。細胞内メディエーターとして、生物活性脂質は、酵素およびイオンチャネルなどの細胞内成分と直接相互作用することによって、それらの作用を発揮し得る。生物活性脂質の代表例としては、LPAおよびS1Pがある。

【0020】

「治療薬」とは、脈管形成および／または新血管新生、例えば、C N VおよびB Vの成熟、浮腫、血管透過性および繊維症、繊維形成およびそれに関連する瘢痕化、または眼球の疾患および症状の基礎にある病態の一部を軽減する薬剤を意味する。

【0021】

「併用療法」とは、示された治療効果を得るために少なくとも2つの異なる療法の提供を含む治療計画を指す。例えば、併用療法は、例えば抗L P A抗体と抗S 1 P抗体などの、2種類以上の化学的に異なる有効成分の投与を含み得る。あるいは、併用療法は生物活性脂質に対して反応性のある免疫誘導部分の投与と1以上の他の化学療法薬の投与を含み得る。あるいはまた、併用療法は、放射線療法および／または外科術などの他の処置の送達を伴う抗脂質抗体の投与を含み得る。さらに、併用療法は、1以上の他の生物薬剤（例えば、抗V E G F、T G F β 、P D G Fまたはb F G F剤）、化学療法薬ならびに放射線療法および／または外科術などの他の処置を伴う抗脂質抗体の投与を含み得る。2種類以上の化学的に異なる有効成分を用いた併用療法については、これらの有効成分は同じ組成物の一部として投与することもできるし、あるいは異なる組成物として投与することもできると理解される。別個の組成物として投与する場合、異なる有効成分を含む組成物は同時または異なる時間に、同じまたは異なる経路で、同じまたは異なる投与計画を用いて(using the same of different)投与することができる（全て、特定の文脈の必要に応じ、また、担当医の判断に従う）。同様に、単独または1以上の化学療法薬と組み合わせた、1以上の抗脂質抗体種、例えば抗L P A抗体を、例えば放射線および／または外科術と併用する場合、これらの薬剤は外科術または放射線処置の前または後に送達することができる。

10

20

【0022】

「抗S 1 P剤」とは、S 1 Pに対して特異的に活性がある任意の薬剤を指し、S 1 Pおよびその変異体と結合する抗体または抗体由来分子もしくは非抗体由来部分を含む。

【0023】

「ハプテン」とは、ハプテンとコンジュゲートして、それによりハプテンを免疫原性とするのに適合した分子を指す。代表的な、非限定種のハプテンはタンパク質であり、その例としてアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、ヘマグルタニン(hemagglutinin)、破傷風およびジフテリア毒が挙げられる。本発明に従った使用に好適なハプテン分子の他の種類および例は当技術分野で公知である。これらの、ならびに今後発見されるか、または発明される天然ハプテンまたは合成ハプテンは本発明に従った適用に適合させることができる。

30

【0024】

「化学療法薬」とは、抗癌剤および他の抗過剰増殖剤を意味する。簡単には、「化学療法薬」とは、細胞および組織を破壊することを意図した化学物質を指す。このような薬剤としては、限定されるものではないが、(1) D N A傷害薬およびD N A合成を阻害する薬剤：アントラサイクリン（ドキシソルビシン(doxorubicin)、ドノルビシン(donorubicin)、エピルビシン(epirubicin)、アルキル化剤（ベンダムスチン(bendamustine)、ブスルファン(busulfan)、カルボプラチン(carboplatin)、カルムスチン(carmustine)、シスプラチン(cisplatin)、クロラムブシル(chlorambucil)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ダカルバジン(dacarbazine)、ヘキサメチルメラミン(hexamethylmelamine)、イフォスファミド(ifosfamide)、ロムスチン(lomustine)、メクロレタミン(mechlorethamine)、メルファラン(melphalan)、ミトタン(mitotane)、マイトマイシン(mytomicin)、ピポブロマン(pipobroman)、プロカルバジン(procarbazine)、ストレプトゾシン(streptozocin)、チオテパ(thiotepa)およびトリエチルメラミン(triethylenemelamine))、白金誘導体（シスプラチン(cisplatin)、カルボプラチン(carboplatin)、シスジアミンジクロロ白金)、テロメラゼならびにトポイソメラーゼ阻害剤（カンプトサー(Camptosar))、(2) (2) チューブリン脱重合薬：タキソイド（パクリタキセル(Paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、B A Y 5 9 - 8 8 6 2)、(3) カペシタビン(capecitabine)、ク

40

50

ロデオキシアデノシン(chlorodeoxyadenosine)、シタラビン(cytarabine) (およびその活性化形態、a r a - C M P)、シトシンアラビノシド、デカルバジン(dacabazine)、フロクスウリジン(floxuridine)、フルダラビン(fludarabine)、5-フルオロウラシル、5-D F U R、ゲムシタピン(gemcitabine)、ヒドロキシ尿素、6-メルカプトプリン、メトトレキサート(methotrexate)、ペントスタチン、トリメトレキサート、6-チオグアニン)などの代謝拮抗物質、(4)抗脈管形成剤(アバスタチン(Avastin)、サリドマイド(thalidomide)、サニチニブ(sunitinib)、レナリドミド(lenalidomide)、血管障害剤(フラボノイド/フラボン、D M X A A、コンブレタスタチン誘導体(例えば、C A 4 D P、Z D 6 1 2 6、A V E 8 0 6 2 Aなど)、(5)抗体または抗体フラグメントなどの生物製品(ヘルセプチン(Herceptin)、アバスタチン(Avastin)、パノレックス(Panorex)、リツキサン(Rituxan)、ゼバリン(Zevalin)、マイロターグ(Mylotarg)、キャンパス(Campath)、ベキサール(Bexar)、エルビタックス(Erbix)、ルセンチス(Lucentis))、ならびに(6)内分泌療薬:アロマターゼ阻害剤(4-ヒドロアンドロステンジオン(4-hydroandrostenedione)、エキセメスタン(exemestane)、アミノグルテヒミド(aminoglutehimide)、アナストロゾール(anastrozole)、レトゾール(letozole))、抗エストロゲン作用薬(タモキシフェン(Tamoxifen)、トレミフィン(Toremifine)、ラオキシフェン(Raioxifene)、ファスロデックス(Faslodex))、ステロイド(デキサメタゾン(dexamethasone)など)、(7)免疫調節剤:サイトカイン(I F N- β およびI L 2など)、インテグリン、他の接着タンパク質およびマトリックスメタロプロテイナーゼに対する阻害剤、(8)ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤。(9)イマチニブ(imatinib)(グリベック(Gleevec))のようなチロシンキナーゼ阻害剤などのシグナル伝達阻害剤、(10)熱ショックタンパク質阻害剤、(11)全てのトランスレチノイン酸などのレチノイド、(12)増殖因子受容体または増殖因子自体の阻害剤、(12)ナベルビン(navelbine)、パクリタキセル(paclitaxel)、タキソテル(taxotere)、ビンブラスチン(vinblastine)、ビンクリスチン(vincristine)、ビンデシン(vindesine)およびビノレルビン(vinorelbine)などの抗有糸分裂化合物、(14)C O X阻害剤などの抗炎症薬、ならびに(15)細胞周期レギュレーター、例えば、チェックポイントレギュレーターおよびテロメララーゼ阻害剤などが含まれる。

【0025】

本明細書において「スフィンゴ脂質」とは、限定されるものではないが以下の化合物を含むスフィンゴ脂質として当技術分野で知られている化合物種を指す(後ろに英数の文字列で示されているリンクを含むサイトとしての<http://www.lipidmaps.org>参照。これらのリンクは対応する化合物の化学式、構造情報などを含む):

スフィンゴイド塩基 [S P 0 1]

スフィンゲル-4-エニン(スフィンゴシン) [S P 0 1 0 1]

スフィンガニン [S P 0 1 0 2]

4-ヒドロキシスフィンガニン(フィトスフィンゴシン) [S P 0 1 0 3]

スフィンゴイド塩基相同体および変異体 [S P 0 1 0 4]

スフィンゴイド塩基1-リン酸 [S P 0 1 0 5]

リゾスフィンゴミエリンおよびリゾグリコスフィンゴ脂質 [S P 0 1 0 6]

N-メチル化スフィンゴイド塩基 [S P 0 1 0 7]

スフィンゴイド塩基類似体 [S P 0 1 0 8]

セラミド [S P 0 2]

N-アシルスフィンゴシン(セラミド) [S P 0 2 0 1]

N-アシルスフィンガニン(ジヒドロセラミド) [S P 0 2 0 2]

N-アシル-4-ヒドロキシスフィンガニン(フィトセラミド) [S P 0 2 0 3]

アシルセラミド [S P 0 2 0 4]

セラミド1-リン酸 [S P 0 2 0 5]

ホスホスフィンゴ脂質 [S P 0 3]

セラミドホスホコリン(スフィンゴミエリン) [S P 0 3 0 1]

セラミドホスホエタノールアミン [S P 0 3 0 2]

セラミドホスホイノシトール [SP0303]
 ホスホノスフィンゴ脂質 [SP04]
 中性グリコスフィンゴ脂質 [SP05]
 単純Glc系 (GlcCer、LacCerなど) [SP0501]
 GalNAcb1-3Galal-4Galb1-4Glc- (グロボ(Globo)系) [SP0502]
 GalNAcb1-4Galb1-4Glc- (ガングリオ(Ganglio)系) [SP0503]
 Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (ラクト(Lacto)系) [SP0504]
 Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (ネオラクト(Neolacto)系) [SP0505]
 GalNAcb1-3Galal-3Galb1-4Glc- (イソグロボ(Isoglobo)系) [SP0506]
 GlcNAcb1-2Manal-3Manb1-4Glc- (モル(Mollu)系) [SP0507]
 GalNAcb1-4GlcNAcb1-3Manb1-4Glc- (アルトロ(Arthro)系) [SP0508]
 Gal- (ガラ(Gala)系) [SP0509]
 その他 [SP0510]
 酸性グリコスフィンゴ脂質 [SP06]
 ガングリオシド [SP0601]
 スルホグリコスフィンゴ脂質 (スルファチド) [SP0602]
 グルクロノスフィンゴ脂質 [SP0603]
 ホスホグリコスフィンゴ脂質 [SP0604]
 その他 [SP0600]
 塩基性グリコスフィンゴ脂質 [SP07]
 両性グリコスフィンゴ脂質 [SP08]
 アルセノスフィンゴ脂質 [SP09]

10

20

【0026】

30

本発明は、以下にさらに詳細に記載するように、癌などの過剰増殖性障害および心血管または脳血管の疾患および障害ならびに種々の眼球障害を治療または予防するのに有用な抗スフィンゴ脂質S1P薬を提供する。特に本発明は、S1Pならびに限定されるものではないが、スフィンゴシン-1-リン酸 [スフィンゲネ-1-リン酸; D-エリスロースフィンゴ-1-リン酸; スフィンゲ-4-エニン-1-リン酸; (E, 2S, 3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシーオクタデク-4-エノキシ] ホスホン酸 (AS26993-30-6)、DHS1Pはジヒドロスフィンゴ-1-リン酸 [スフィンガニン-1-リン酸と定義される; [(2S, 3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシーオクタデクオキシ] ホスホン酸; D-エリスロージヒドロ-D-スフィンゴ-1-リン酸 (CAS19794-97-9)]; SPCはスフィンゴシルホスホリルコリンである、リゾスフィンゴミエリン、スフィンゴシルホスホコリン、スフィンゴシンホスホリルコリン、エタンアミニウム; 2-(((2-アミノ-3-ヒドロキシー-4-オクタデセニル) オキシ) ヒドロキシホスフィニル) オキシ)-N, N, N-トリメチルー、クロリド、(R-(R*, S*-(E))), 2-[[(E, 2R, 3S)-2-アミノ-3-ヒドロキシーオクタデク-4-エノキシ]-ヒドロキシーホスホリル] オキシエチルートリメチルーアザニウムクロリド (CAS10216-23-6) を含むその変異体に導かれる。

40

【0027】

本明細書において「エピトープ」または「抗原決定基」とは、特に断りのない限り、抗S1P剤が反応性を示すS1Pの領域を指す。

【0028】

50

「過剰増殖性障害」とは、限定されるものではないが、癌または新生物および良性腫瘍を生じる器官および組織の細胞の制御されない増殖を含む、制御されない増殖細胞に関連する疾患および障害を指す。内皮細胞に関連する過剰増殖性障害は、血管腫、子宮内膜症、肥満、加齢性黄斑変性および種々の網膜症などの脈管形成の疾患、ならびにアテローム性動脈硬化症の処置におけるステント留置の結果として再狭窄を引き起こす内皮細胞および平滑筋細胞の増殖を起こし得る。繊維芽細胞を含む過剰増殖性障害（例えば、繊維形成）としては、限定されるものではないが、加齢性黄斑変性、心筋梗塞に関連する心臓のリモデリングおよび心不全などの過剰な癒着（例えば、繊維症）、外科術または損傷、ケロイド、ならびに繊維性腫瘍およびステント留置の結果として通常起こるものなどの過剰な創傷治癒が含まれる。

10

【0029】

本発明の組成物はスフィンゴ脂質に基づく療法に用いられる。「療法」とは、疾患、障害または物理的外傷の予防および／または治療を指す。

【0030】

「心血管療法」は、心臓療法ならびに心疾患などの心血管系に関連する他の障害の予防および／または治療を包含する。「心疾患」とは、心臓または心筋組織を含むいずれの種類の疾患、障害、外傷または外科処置も包含する。特に注目されるものとして、低酸素症および／または心筋組織の虚血および／または心不全に関連する心疾患がある。虚血から起こり得る心疾患の1つの種類が、抗凝固薬、血小板溶解薬または抗狭心症薬が療法に用いられる場合、あるいは心臓血管が血管形成術により、または冠動脈移植により外科的に開かれた場合に起こり得るものなどの再灌流傷害である。本発明が対象とする別の種の心疾患は、虚血の一般的な原因である動脈硬化症、特にアテローム性動脈硬化症から起こり得る冠動脈疾患（CAD）である。CADは安定または不安定狭心症などの症状を有し、心筋梗塞（MI）や突然心臓死をもたらすことがある。特に注目される症状としては、限定されるものではないが、心筋虚血；急性心筋梗塞（AMI）；冠動脈疾患（CAD）；急性冠動脈症候群（ACS）；ステント留置を伴う、または伴わない経皮的血行再建術（冠動脈血管形成術）の際に、またはその結果として起こり得る心臓細胞および組織の傷害；冠動脈バイパス移植（CABG）またはヒトにおいて虚血性もしくは虚血性／再灌流傷害を引き起こし得るその他の外科的もしくは医学的手順もしくは療法；および心血管外傷が挙げられる。「心不全」とは、急性心筋梗塞、心筋炎、心筋症、うっ血性心不全、敗血性ショック、心臓外傷および特発性心不全を包含する。心不全をもたらす範囲の虚血症状を急性冠動脈症候群（ACS）と呼ぶ。

20

30

【0031】

「心臓治療薬」とは、心臓および心筋疾患および障害によって引き起こされる、または関連する疾患および障害に対する治療薬となる薬剤を指す。

【0032】

「脳血管療法」とは、脳虚血および／または低酸素症に関連する疾患および障害の予防および／または治療に向けられる療法を指す。特に注目されるものとして、限定されるものではないが心不全を含む心疾患から起こる全虚血から起こる脳虚血および／または低酸素症がある。

40

【0033】

「スフィンゴ脂質代謝産物」とは、スフィンゴ脂質が作られる、ならびに特定のスフィンゴ脂質の分解から生じる化合物を指す。言い換えれば、「スフィンゴ脂質代謝産物」は、スフィンゴ脂質代謝経路に参与する化合物である。代謝産物は、代謝前駆体および代謝生成物を含む。「代謝前駆体」とは、スフィンゴ脂質が作られる化合物を指す。特に注目される代謝前駆体としては、限定されるものではないが、SPC、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴシン、ジヒドロセラミドおよび3-ケトスフィンガニンが挙げられる。「代謝生成物」とは、ホスホリルコリン（例えば、ホスホコリン、コリンホスフェート）、遊離脂肪酸などの脂肪酸、およびヘキサデカナール（例えば、パルミトアルデヒド）などのスフィンゴ脂質の分解から生じる化合物を指す。

50

【0034】

本明細書において「治療の」とは、疾患または障害の処置全域を包含する。本発明の「治療」薬は、リスクがあると特定され得る個体に対してデザインされた手順を組み込んだものを含む予防的または回避的な様式（薬理遺伝学）、または本質的に緩和的または治療的な様式で働く場合もあるし、あるいは処置される疾患または障害の少なくとも1つの症状の進行の速度または程度を緩慢にする働きをする場合もあるし、あるいは必要な時間、不快感もしくは痛みの存在もしくは程度、または疾患、障害もしくは物理的外傷からの回復に関連する物理的制限を最小化する働きをする場合もあるし、あるいは他の療法および処置に対する補助として使用される場合もある。

【0035】

「処置」とは、治療的処置と予防的または回避的手段の双方を指す。処置を必要とするものには、すでに障害を有しているものならびに障害が予防されるものが含まれる。

【0036】

「併用療法」とは、示された治療効果を得るために少なくとも2つの異なる療法の提供を含む治療計画を指す。例えば、併用療法は、例えば即効性化学療法薬と抗脂質抗体などの、2種類以上の化学的に異なる有効成分の投与を含み得る。あるいは、併用療法は単独、または放射線療法および／または外科術などの他の処置の送達を伴う、抗脂質抗体および／または1以上の化学療法薬の投与を含み得る。さらに、併用療法は、1以上の他の生物薬剤（例えば、抗VEGF、TGFβ、PDGFまたはbFGF剤）、化学療法薬ならびに放射線療法および／または外科術などの他の処置を伴う抗脂質抗体の投与を含み得る。2種類以上の化学的に異なる有効成分の併用療法については、これらの有効成分は同じ組成物の一部として投与することもできるし、あるいは異なる組成物として投与することもできると理解される。別個の組成物として投与する場合、異なる有効成分を含む組成物は同時または異なる時間に、同じまたは異なる経路で、同じまたは異なる投与計画を用いて(using the same of different)投与することができる（全て、特定の文脈の必要に応じ、また、担当医の判断に応じる）。同様に、単独または1以上の化学療法薬と組み合わせた、1以上の抗脂質抗体種、例えば抗LPA抗体を、例えば放射線および／または外科術と併用する場合、これらの薬剤は外科術または放射線処置の前または後に送達することができる。

【0037】

「単剤療法」とは、単回投与としての投与であれ、経時的に数回の投与であれ、1種類の治療上有効量の化合物の送達に基づく処置計画を指す。

【0038】

「新生物」または「癌」とは、異常、かつ、制御されない細胞成長を指す。「新生物」または腫瘍は、異常で、制御されず、無秩序な細胞成長の増殖であり、一般に癌と呼ばれる。新生物は良性または悪性であり得る。破壊的な増殖、浸潤性および転移の特性を持っていれば、新生物は悪性、または癌性である。浸潤性とは、一般に組織の境界を規定している基底膜を破り、それによりしばしば身体の循環系に入り込む、周囲組織の浸潤または破壊による新生物の局部的拡散を指す。転移とは一般に、リンパ管または血管による腫瘍細胞の伝播を指す。転移とはまた、漿液腔、またはくも膜下もしくは他の空間を通じた直接的拡大による腫瘍細胞の遊走を指す。転移の過程を通じた、腫瘍細胞の身体の他の部位への遊走は最初に出現した部位から離れた領域に新生物を形成する。

【0039】

処置の目的で「哺乳類」とは、ヒト、家庭動物および農場動物、ならびに動物園、競技またはペット動物（イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）を含む哺乳類として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳類はヒトである。

【0040】

「天然抗体」および「天然免疫グロブリン」は通常、2つの同じ軽（L）鎖と2つの同じ重（H）鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有結合的ジスルフィド結合によって重鎖と連結されているが、このジス

ルフィド結合の数は免疫グロブリンイソ型が異なる重鎖では異なっている。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に配置された鎖内ジスルフィド橋も有する。各重鎖は一方の末端に可変ドメイン (V_H) を有し、その後いくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は一方の末端に可変ドメイン (V_L) と、他方の末端に定常ドメインを有し、この軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一の定常ドメインと一直線となり、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと一直線になっている。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の境界をなすと考えられている。

【0041】

「可変」領域は、フレームワークおよびCDR（他に超可変としても知られる）を含み、可変ドメインのある特定の部分が抗体間で配列が広範囲に異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性に用いられるということとを指す。しかしながら、この可変性は抗体の可変ドメインに一様に分布しているのではない。可変性は、軽鎖および重鎖可変ドメイン双方の超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより保存性の高い部分はフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、4つのFR（それぞれFR1、FR2、FR3およびFR4）を含み、主として、3つの超可変領域によって接続された β -シート構造をとり、この β -シートを接続し、場合によってはその一部をなすループを形成している。各鎖の超可変領域はこれらのFRによってともに近接して保持され、他方の鎖に由来する超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している (Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), pages 647-669参照)。定常ドメインは抗体と抗原の結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与のような種々のエフェクター機能を発揮する。

【0042】

本明細書において「超可変領域」とは、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」に由来するアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメインでは、残基24～34 (L1)、50～56 (L2) および89～97 (L3)、また、重鎖可変ドメインでは、31～35 (H1)、50～65 (H2) および95～102 (H3) ; Kabat, et al. (1991), 前掲) および/または「超可変ループ」に由来するの残基（例えば、軽鎖可変ドメインでは、残基26～32 (L1)、50～52 (L2) および91～96 (L3)、また、重鎖可変ドメインでは26～32 (H1)、53～55 (H2) および96～101 (H3) ; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) を含む。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義されたような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0043】

抗体のパパイン消化によって、それぞれ1つの抗原結合部位を有する「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同じ抗原結合フラグメントと残りの「Fc」フラグメントを生じ、その名称は容易に結晶化するその能力を表している。ペプシン処理では、2つの抗原結合部位を有して、なお抗原架橋能がある2つの $F(ab')_2$ フラグメントを生じる。

【0044】

「Fv」は、完全な抗原認識・結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの強固な非共有結合の二量体からなる。各可変ドメインの3つの超可変領域が $V_H - V_L$ 二量体の表面で抗原結合部位を規定すべく相互作用するには、この部位である。これら6つの超可変領域は一緒になって抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかしながら、1つの可変ドメイン（または抗原に対して特異的な超可変領域を3つだけ含むFvの半分）であっても、完全な結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、抗原と結合することができる。

【0045】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一の定常ドメイン (CH1) も含む。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1以上のシステインを含む重

10

20

30

40

50

鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に数個の残基が付加されていることでFabフラグメントとは異なる。本明細書では、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を保持しているFab'を表す。F(ab')₂抗体フラグメントは、初めは、間にヒンジシステインを有するFab'フラグメント対として作製された。抗体フラグメントの他の化学組合せも知られている。

【0046】

脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる明らかに異なる2種類に割り付けることができる。

【0047】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り付けられる。現在、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの5つの主要なクラスの免疫グロブリンがあり、これらのいくつかは、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2などのサブクラス（イソ型）にさらに分類される。異なるクラスの免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γおよびμと呼ばれる。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構造はよく知られている。

【0048】

本明細書において「抗体」は最も広い意味で用いられ、特に、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗体フラグメントおよび親抗体のCDRを用いる結合因子（または抗原結合活性を保持するその変異体）を包含する。抗体は、本明細書では、親抗体の少なくとも1つの所望の活性を保持しているとして定義される。所望の活性としては、抗原と特異的に結合する能力、in vitroでプロレレーション(proloration)を阻害する能力、in vivoで脈管形成を阻害する能力およびin vitroでサイトカイン特性を変化させる能力が含まれる。

「抗体フラグメント」は、全長抗体の一部、一般にその抗原結合ドメインまたは可変ドメインを含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント；ダイアボディー；線状抗体；単鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0049】

本明細書において「モノクローナル抗体」とは、実質的にホモな抗体の集団から得られた抗体を指し、例えば、その集団に含まれる個々の抗体は、わずかな量で存在し得る自然発生突然変異の可能性があること以外は、同一である。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位に向けられている。さらに、一般に異なる決定基（エピトープ）に向けられた異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に向けられている。修飾詞「モノクローナ」は、実質的にホモな抗体集団から得られたという抗体の特徴を示すのであって、その抗体をいずれかの特定の方法によって生産することが必要であると考えるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler, et al., Nature 256:495 (1975)によって初めて記載されたハイブリドーマ法によって作製することができるか、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号参照）によって作製することができる。「モノクローナル抗体」はまた、例えばClackson, et al., Nature 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)に記載されている技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0050】

本明細書においてモノクローナル抗体は特に、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属す抗体の対応する配列と同一または相同であるが、その鎖の残りの部分は、別種に由来する、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属す抗体、ならびに所望の生物活性を示す限りは、そのような抗体のフラグメントの対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ン)を含む(米国特許第4, 816, 567号;およびMorrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)参照)。

【0051】

非ヒト(例えばネズミ)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの部分では、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種に由来する超可変領域残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに精密にするために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変領域の全てまたは実質的全てが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも1つ、一般には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は所望により、一般にはヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部も含む。さらに詳しくは、Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Reichmann, et al., Nature 332:323-329 (1988);およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)およびHansen, W 02006105062を参照)。

【0052】

「単鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、FvポリペプチドはさらにV_HドメインとV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーを含み、これにより、sFvに抗原結合に求められる構造を採らせることができる。sFvに関する総説としては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照。

【0053】

「ダイアボディー」とは、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に接続された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_L)。同じ鎖上の2つのドメイン間で対合するには短いリンカーを使用することで、これらのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対合して、2つの抗原結合部位を作り出すことを余儀なくされる。ダイアボディーは例えばEP404, 097; WO93/11161;およびHollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)にさらに詳しく記載されている。

【0054】

本明細書を通じて用いる「線状抗体」とは、Zapata, et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)に記載されている抗体を指す。要するに、これらの抗体は、1対の抗原結合領域を形成する1対のタンデムFdセグメント(V_H-C_H1-V_H-C_H1)を含む。線状抗体は二重特異性または単一特異性である。

【0055】

本明細書において「変異体」抗スフィンゴ脂質抗体とは、「親」抗スフィンゴ脂質抗体アミノ酸配列とは、1以上のアミノ酸残基の付加、欠失および/または置換のために親抗体配列とアミノ酸配列が異なるが、親抗体結合抗体の少なくとも1つの所望の活性を保持する分子を指す。所望の活性としては、抗原と特異的に結合する能力、in vitroでプロレレーション(proliferation)を阻害する能力、in vivoで脈管形成を阻害する能力およびin vitroでサイトカイン特性を変化させる能力が含まれる。一実施形態では、変異体は親抗体の1以上の超可変領域に1以上のアミノ酸置換を含む。例えば、この変異体は、親抗体の1以上の超可変領域に少なくとも1つ、例えば約1~約10、好ましくは約2~約5の置換を含み得る。通常、この変異体は親抗体の重鎖または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも50%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より

好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。この配列に対する同一性または相同性は本明細書では、配列をアラインし、必要であればギャップを導入して最大パーセントの配列同一性を達成した後に、親抗体残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。配列同一性または相同性に影響を及ぼすとみなされるN末端、C末端もしくは内部延長、欠失または抗体配列中への挿入はない。変異体はスフィンゴ脂質と結合する能力を保持し、好ましくは親抗体よりも優れた所望の活性を有する。例えば、変異体はより強い結合親和性、増強された脈管形成低減および／または腫瘍進行休止能を持ち得る。このような所望の特性（例えば、免疫原性の低下、半減期の延長、安定性の増強、能力の増強）を分析するためには、本明細書に開示されている生物活性アッセイにおいて、抗スフィンゴ脂質抗体の形式がその活性に影響を及ぼすことが分かっていることから、例えば、変異体のFb型と親抗体のFb型を比較するか、あるいは変異体の全長型と親抗体の全長型を比較すべきである。本明細書において特に注目される変異体抗体は少なくとも1つの所望の活性の少なくとも約5%、好ましくは少なくとも約10%、25%、59%またはそれ以上を示すものであり得る。好ましい変異体は、親抗体と比べて、in vitroで測定されるようなより優れた生物物理学的特性またはin vitroもしくはin vivoで測定されるようなより優れた生物学的活性を有するものである。

10

【0056】

本明細書において「親」抗体は、変異体の作製に用いられるアミノ酸配列によってコードされているものである。好ましくは、親抗体はヒトフレームワーク領域を有し、存在する場合には、ヒト抗体定常領域を有する。例えば、親抗体はヒト化またはヒト抗体であり得る。

20

【0057】

「単離された」抗体とは、その天然環境の成分から同定および分離および／または回収されたものである。その天然環境の夾雑成分は抗体の診断上または治療上の使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモンおよびその他のタンパク質性もしくは非タンパク質性の溶質を含み得る。好ましい実施形態では、抗体は、（1）ローリー法によって測定した場合に抗体が95重量%を超える、最も好ましくは99重量%を超えるまで、（2）スピニングカップシークエネーターの使用によって少なくとも15残基のN末端または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、または（3）クーマシーブルーまたは好ましくは銀染色を用いた還元または非還元条件下でのSDS-PAGEにより均質となるまで精製される。単離された抗体には、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないことから、組換え細胞内のin situ抗体を含む。しかしながら通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製される。

30

【0058】

本明細書において「標識」とは、抗体に直接的または間接的にコンジュゲートされている検出可能な化合物または組成物を指す。標識はそれ自体、自体で検出可能であるか（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）または酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒し得る。

【0059】

「固相」とは、本発明の抗体が接着可能であるか、あるいは抗体または他の抗S1P結合試薬がそれ以外の方法で固定可能である非水性マトリックスを意味する。本明細書に含まれる固相の例としては、部分的または完全にガラスからなるもの（例えば、細孔性ガラス）、多糖類（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンが挙げられる。特定の実施形態では、文脈にもよるが、固相はアッセイプレートの壁面を含んでもよく、他には精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム）がある。この用語はまた、米国特許第4,275,149号に記載されているものなどの離散粒子の不連続な固相も含む。

40

【0060】

「リボソーム」は、薬剤（本明細書に開示される抗スフィンゴ脂質抗体、および任意の

50

化学療法薬など）を哺乳類に送達するのに有用な様々な種類の脂質、リン脂質および／または界面活性剤からなる小胞である。リボソームの成分は一般に、生体膜の脂質配置と類似した二重層の形に配置されている。「単離された」核酸分子は、天然源の抗体核酸において通常会合されている少なくとも1種類の夾雑核酸分子から同定および分離されている核酸分子である。単離された核酸分子は自然状態で見られる形態または状態以外にある。従って、単離された核酸分子は天然細胞中に存在している場合の核酸分子とは区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、例えば核酸分子が天然細胞の場合と異なる染色体位置にある抗体を通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

【0061】

「制御配列」とは、特定の宿主生物において作動可能なように連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。例えば、原核生物に好適な制御配列には、プロモーター、任意のオペレーター配列およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを使用することが知られている。

10

【0062】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれている場合に、「作動可能なように連結されている」。例えば、あるポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現させる場合には、プレ配列または分泌リーダーのDNAがそのポリペプチドのDNAに作動可能なように連結され；ある配列の転写に影響を及ぼす場合には、プロモーターまたはエンハンサーがそのコード配列に作動可能なように連結され；あるいは翻訳を容易にするように配置される場合には、リボソーム結合部位がコード配列に作動可能なように連結される。一般に、「作動可能なように連結される」とは、連結される核酸分子が隣接している、また、分泌リーダーの場合には隣接し、かつ、読み取り相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接していなくてもよい。連結は便宜な制限部位における連結反応によって達成される。このような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが常法に従って用いられる。

20

【0063】

本明細書において「細胞」、「細胞系統」および「細胞培養」は互換的に用いられ、このような全ての表記には後代が含まれる。よって、「形質転換体」および「形質転換細胞」には、主題の細胞および移植の回数にかかわらずにそれらに由来する培養物が含まれる。また、意図的または偶発的突然変異によって、全ての後代がDNA含量が厳密に同じであるわけではないと理解される。最初の形質転換細胞でスクリーニングされたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体後代が含まれる。異なる表記が意図される場合には、それは文脈から明らかである。

30

【0064】

本発明の「特許性のある」組成物、方法、機械、または製品は、分析が実施される時点で特許性に関する全ての法定要件を満たすことを意味する。例えば、新規性、非自明性などに関して、後の調査により、1以上のクレームが新規性、非自明性などを否定することになる1以上の実施形態を包含することが明らかになった場合、定義により「特許性のある」実施形態に限定されるクレームは、具体的に特許性のない実施形態を排除する。また、本明細書に添付したクレームは、最も広い妥当な範囲を提供するとともに、それらの妥当性を保持すると解釈すべきである。さらに、特許性に関する1以上の法定要件が訂正されるか、あるいは本願が特許として出願または発行される時から、1以上の添付クレームの妥当性が疑問視される時まで、特許性に関する特定の法定要件を満たすかどうかを評価するための基準が変化する場合には、クレームは、(1) それらの妥当性を保持し、(2) その状況下において最も広い妥当な解釈を提供するものと解釈されるべきである。

40

【0065】

「薬学上許容される塩」とは、本発明の薬剤および化合物の生物学的有効性および特性を保持し、かつ、生物学的に、または他の点で不都合がない塩を指す。多くの場合、本発明の薬剤および化合物は、荷電基、例えば、荷電アミノ基および／またはカルボキシル基またはそれに類似する基の存在のために酸塩および／または塩基塩を形成することができ

50

る。薬学上許容される酸付加塩は無機酸および有機酸から製造することができ、薬学上許容される塩基付加塩は無機および有機塩基から製造することができる。薬学上許容される塩に関しては、Berge, et al. (1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19を参照。

【0066】

「複数」とは、1を超えることを意味する。

【0067】

「分離された」、「精製された」、「単離された」などとは、サンプル保持容器に入ったサンプルの1以上の成分が、その容器内に存在する1以上の他のサンプル成分から物理的に取り出されている、あるいはその存在下で希釈されていることを意味する。分離または精製工程で取り出し、または希釈可能なサンプル成分としては、化学反応生成物、非反応化学物質、タンパク質、炭水化物、脂質および非結合分子が含まれる。

10

【0068】

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

【0069】

「特異的に会合する」および「特異的会合」などとは、2つの分子間の特異的、非無作為の相互作用を指し、この相互作用は、それらの分子間の適当な化学的または分子的相互作用を可能とする構造的、疎水的／親水的、および／または電気的特徴の存在に依存している。

20

【0070】

「対象」または「患者」とは、本発明の分子によって達成され得る処置を必要とする動物を指す。本発明に従って処置され得る動物としては脊椎動物を含み、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタおよび霊長類（ヒトおよび非ヒト霊長類を含む）などの哺乳類が特に好ましい例である。

【0071】

「治療上有効な量」（または「有効量」）とは、対象または患者に投与した際に処置を達成するのに十分な有効成分、例えば、本発明の薬剤の量を指す。よって、本発明の組成物の治療上有効な量を構成するものは、当業者により容易に決定することができる。癌療法に関して、「治療上有効な量」とは、眼球の疾患または症状に関連する1以上の遺伝子の発現の増強または低減を含む眼球の疾患または症状の処置、アポトーシスまたは他の細胞死経路の誘導、症候の臨床的改善、異常な新血管新生または炎症などに関連する1以上のパラメーターにおいて客観的に測定される変化をもたらすものである。もちろん、治療上有効な量は、処置される特定の対象および症状、対象の体重および年齢、病態の重篤度、選択される特定の化合物、準拠する投与計画、投与のタイミング、投与様式などによって異なり、これらは全て、当業者により容易に決定することができる。併用療法に関して、特定の有効成分の治療上有効な量を構成するものは、単剤療法（すなわち、有効成分として1つの化学存在だけを用いる治療計画）として投与される場合の有効成分の治療上有効な量を構成するものとは異なり得ると考えられる。

30

【0072】

「処置」または「処置する」とは、疾患または障害に対する防止または保護（すなわち、臨床徴候を発症させないこと）；疾患または障害の阻害（すなわち、臨床徴候の発症の阻止または抑制）；および／または疾患または障害の緩和（すなわち、臨床徴候を回復させること）を含む。当然のことながら、疾患または障害の「防止」と「抑制」の間の区別は、最終的に誘発される事象が未知であり、または潜在性である場合もあるため、常に可能であるわけではない。よって、「予防」とは、「防止」と「抑制」の双方を含む「処置」の一種をなすと理解される。よって、「処置」には「予防」が含まれる。

40

【0073】

「治療計画」とは、化学療法薬、放射線療法、外科術、遺伝子療法、DNAワクチンおよび療法、siRNA療法を含むアンチセンスに基づく療法、抗脈管形成療法、免疫療法

50

、骨髄移植、アプタマーおよび他の生物製品（抗体および抗体変異体など）、受容体デコイおよび他のタンパク質に基づく治療薬を用いる疾患または障害の処置を意味する。

【0074】

発明の概要

本発明に従って、特許性のある方法が、生物活性脂質、スフィンゴシン-1-リン酸、またはその改変体に対して反応性の免疫誘導部分（immune-derived moiety）（例えば、抗体）を含む医薬組成物を、その有効濃度を低下させ、それにより標的生物活性脂質が、全体的にまたは部分的にその望まれない作用を発揮することを抑制するように投与することを介して、眼の疾患または症状を処置するために提供される。この特定の実施態様において、免疫誘導部分は、リゾ脂質、S1Pに対して反応性のヒト化モノクローナル抗体または改変体である。方法は、また、目の、異常な線維成長、線維症または瘢痕化；炎症；異常な新血管形成；外科的および外傷の傷治癒反応（wound healing response）の調節の低減または予防のため、または眼免疫反応の抑制のために提供される。さらに、標的生物活性脂質の有効な眼の濃度または活性を低減させるための方法が提供される。S1Pの代表的な改変体は、スフィンゴシルホスホリルコリン、ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸を含む。

10

【0075】

本発明のもう1つの態様は、担体および単離された免疫誘導部分、例えば、生物活性脂質に対して反応性の、モノクローナル抗体または抗体フラグメント、改変体または誘導体を含む、眼への投与用組成物を含む、特許性のある医薬組成物または獣医用組成物に関する。特に、組成物がヒトにおける治療的使用を意図されるとき、好ましい担体は医薬的に許容可能なものを含む。非ヒトの治療適用のために（例えば、ペット、家畜、魚または家禽）、動物医薬に許容可能な担体が採用され得る。

20

【0076】

本発明の、好ましくは治療組成物の部分としての、免疫誘導部分の投与経路の例は、全身投与、非経口的投与（例えば、静脈内、筋肉内または皮下ルートを介した注射）、経皮、皮内または経粘膜的な送達、眼内または眼周囲の注射、粘膜または局所投与または吸入によるものを含む。

【0077】

本発明のこれらおよびそれ以外の態様は、以下に続くセクションでより詳しく議論される。本発明の上記およびそれ以外の態様は、下記の詳細な説明、添付図面および特許請求の範囲から、より明らかになるだろう。

30

【0078】

本発明のこれらおよびその他の態様および実施形態を以下の節でさらに詳しく述べる。本発明の以上およびその他の態様は以下の詳細な説明、添付図面および特許請求の範囲からさらに明らかになるであろう。本発明の実施または試験においては本明細書に記載されるものと類似または同等の方法および材料も使用可能であるが、好適な方法および材料を以下に記載する。さらに、以下の材料、方法および例は単に例であって、限定を意図するものではない。

【0079】

発明の詳細な説明

1. 化合物

本発明は、生物活性脂質 S1P と特異的に反応性のあるある種の抗 S1P 剤、特に、抗体を含む免疫誘導部分であるものを記載し、言い換えれば、該抗 S1P 剤が反応する生物活性脂質が S1P である。

【0080】

抗体分子または免疫グロブリンは、通常、2種類の異なるポリペプチド鎖からなる、分子量およそ 150 kDa の大きな糖タンパク質分子である。一方のポリペプチド鎖は「重」鎖（H）と呼ばれ、およそ 50 kDa である。もう一方のポリペプチドは「軽」鎖（L）と呼ばれ、およそ 25 kDa である。各免疫グロブリン分子は通常、2つの重鎖と2つ

50

の軽鎖からなる。2つの重鎖はジスルフィド結合によって互いに連結され、その数は免疫グロブリンイソ型の異なる重鎖では異なっている。各軽鎖は1つの共有結合的ジスルフィド結合によって重鎖と連結している。いずれの天然抗体分子も、これら2つの重鎖および2つの軽鎖は同一であり、2つの同一の抗原結合部位を保持しており、従って、二価、すなわち、2つの同一の分子と同時に結合する能力を有するとされている。

【0081】

いずれかの脊椎動物種に由来する抗体分子の「軽」鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明瞭に異なる種、カッパ(k)とラムダ(λ)のいずれかに割り付けることができる。これら2種の軽鎖の比率は種ごとに異なる。例として、平均k/λ比は、マウスでは20:1、ヒトでは2:1、ウシでは1:20である。

10

【0082】

いずれかの脊椎動物種に由来する抗体分子の「重」鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、イソ型と呼ばれる5つの明瞭に異なる種のいずれかに割り付けることができる。いくつかのイソ型は、数種の亜種を持っている。5つの主要な免疫グロブリンクラスが、免疫グロブリン(IgM)、免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンA(IgA)および免疫グロブリンE(IgE)である。IgGは最も多いイソ型であり、数種のサブクラス(ヒトでは、IgG1、2、3および4)を有する。Fcフラグメントおよびヒンジ領域は異なるイソ型の抗体では異なるので、それらの機能特性を決定づける。しかしながら、これらのドメインの全体的な構成は全てのイソ型で同様である。

【0083】

20

「可変領域」とは、抗体分子またはそのフラグメントのN末端配列を指す。一般に、これら4つの鎖の各々はそのアミノ末端部分に可変(V)領域を有し、これはイソ型を決定する抗原結合部位および定常(C)領域に寄与する。軽鎖は多くの非共有結合的相互作用によって、また、ジスルフィド結合によって重鎖と結合され、重鎖および軽鎖のV領域は抗体分子の各腕で、2つの同じ抗原結合部位を形成するように対をなす。いくつかのアミノ酸残基が軽鎖および重鎖可変ドメイン間の界面をなしていると考えられている(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991); Clothia et al., J. Mol. Biol., vol. 186:651 (1985)参照)。

【0084】

30

変異性は抗体の可変ドメイン中に一様に分布しているのではなく、軽鎖および重鎖可変ドメインの双方に「相補性決定領域」(CDR)または「超可変領域」と呼ばれる3つのセグメントに集中していることを注記しておく。可変ドメインのより保存性の高い部分は「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、3つのCDRによって接続された4つのFR領域を含む。各鎖のこれらのCDRはFR領域によってともに近接して保持されており、他の鎖のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)参照)。合わせて考えると、これら6つのCDRは抗体分子の結合特性に寄与している。しかしながら、1本の可変ドメイン(または抗原に特異的なCDRを3つだけ含むFvの半分)であっても抗原を認識し、抗原と結合する能力を有する(Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)参照)。

40

【0085】

「定常ドメイン」とは、抗体重鎖または軽鎖のC末端領域を指す。一般に、これらの定常ドメインは抗原に対する抗体分子の結合特性に直接的な関与はしないが、抗体依存性の細胞傷害性における抗体の関与といった種々のエフェクター機能を発揮する。ここで、「エフェクター機能」とは、Fcドメインと免疫系のタンパク質との分子的相互作用による免疫細胞の動員により媒介される、抗体の様々な生理学的作用(例えば、オプソニン作用、細胞溶解、肥満細胞、好塩基球および好酸球分解および他のプロセス)を指す。重鎖の

50

イソ型は抗体の機能的特性を決定する。それらの明瞭に異なる機能特性は、重鎖のカルボキシ末端部分によって付与され、それらは軽鎖に関連しない。

【0086】

本明細書において「抗体フラグメント」は、完全抗体の抗原結合部位または可変領域を含む完全抗体の一部を指し、この部分は完全抗体のFc領域の定常重鎖ドメイン（例えば、CH2、CH3およびCH4）を欠いていてもよい。あるいは、定常重鎖ドメイン（例えば、CH2、CH3およびCH4）の部分は「抗体フラグメント」に含まれていてもよい。抗体フラグメントの例は抗原結合を保持するものであり、Fab、Fab'、F(ab')₂、FdおよびFvフラグメント；ダイアボディー；トリアボディー；単鎖抗体分子（sc-Fv）；ミニボディー、ナノボディー、および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれる。例として、Fabフラグメントはまた軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一の定常ドメイン（CH1）も含む。

10

【0087】

「変異体」とは、抗体の天然のアミノ酸配列と、少なくとも1つのアミノ酸残基改変で異なるアミノ酸配列を指す。天然型または親または野生型アミノ酸配列とは、天然に見られる抗体のアミノ酸配列を指す。抗体分子の「変異体」としては、限定されるものではないが、Fc領域、Fab領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびヒンジ領域を含む、軽鎖および／または重鎖の可変領域または定常領域内の変化が含まれる。

【0088】

20

「特異的」とは、その標的エピトープへの、抗体の選択的結合を指す。抗体分子は、与えられた条件セット下で、所望の抗原に対する結合と、無関連の抗原または類似体抗原または抗原混合物とを比較することに体抗原または抗原混合物とを比較することにより、結合の特異性に関して試験することができる。好ましくは、本発明の抗体は、無関連の抗原と、または標的抗原の類似体とさえ、有意な結合をしない。ここで、「抗原」とは、抗原と結合する抗体分子または免疫により誘導される物質によって認識され、結合する分子を指す。抗体が結合する抗原の特有的部分は「エピトープ」と呼ばれる。「ハプテン」とは、ほとんどの状況下で、例えばタンパク質、ポリエチレングリコール（PEG）、金コロイド、シリコーンビーズなどの担体と結合された場合にのみ免疫応答を惹起する（すなわち、抗原として働く）ことができる小分子を指す。この担体は、それ自体によっても免疫応答を惹起しないものであり得る。

30

【0089】

「抗体」とは、最も広い意味で用いられ、モノクローナル、ポリクローナル、多重特異性（例えば、抗体の各腕が同じまたは異なる抗原の異なるエピトープと反応性がある二重特異性）、ミニボディー、ヘテロコンジュゲート、ダイアボディー、トリアボディー、キメラおよび合成抗体、ならびに所望の結合特性および／または生物活性で抗原と特異的に結合する抗体フラグメントを包含する。

【0090】

「モノクローナル抗体」（mAb）とは、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体または抗体集団を指し、特定の方法による抗体の産生を必要として構築されるものではない。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler G. and Milstein C. (1975), Nature, vol. 256:495-497が最初に記載したハイブリドーマ法によって、または組換えDNA法によって作製することができる。

40

【0091】

「キメラ」抗体（または免疫グロブリン）とは、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属す抗体中の対応する配列と同一または相同であるが、その鎖の残りの部分は別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属す抗体中の対応する配列と同一または相同である重鎖および／または軽鎖を含む分子、ならびに所望の生物活性を示す限り、このような抗体のフラグメントを指す(Cabilly, et al., *infra*; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 81:6851 (1984))

50

).

【0092】

「ヒト化抗体」とは、ヒト配列の代わりに非ヒト（例えばネズミ）抗体に由来する選択された配列も含むヒト抗体を意味する。ヒト化抗体は、保存的アミノ酸置換、またはその結合活性および／または生物活性を有意に変化させない、同じ種または異なる種に由来する非天然残基を含み得る。このような抗体は非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は、ほとんどの部分では、レシピエントの相補性決定領域（CDR）に由来する残基が、所望の特性を有するマウス、ラット、ラクダ、ウシ、ヤギまたはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDRに由来する残基で置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも移入されたCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含むこともできる。これらの改変は抗体の性能をさらに精密にし、最大限とするために行われる。よって、一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、一態様では2つの可変ドメインを全て含み、この場合、全ての、または全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、全ての、または実質的に全てのFR領域ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は所望により、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、またはヒト免疫グロブリンのそれも含む。例えば、Cabilly, et al., 米国特許第4, 816, 567号; Cabilly, et al., 欧州特許第0, 125, 023 B1号; Boss, et al., 米国特許第4, 816, 397号; Boss, et al., 欧州特許第0, 120, 694 B1号; Neuberger, et al., WO 86/01533; Neuberger, et al., 欧州特許第0, 194, 276 B1号; Winter, 米国特許第5, 225, 539号; Winter, 欧州特許第0, 239, 400 B1号; Padlan, et al., 欧州特許出願第0, 519, 596 A1号; Queen, et al. (1989), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 86:10029-10033参照。

【0093】

「二重特異性抗体」とは、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体またはモノクローナル抗体を指し得る。一実施形態では、これらのエピトープは同じ抗原に由来する。別の実施形態では、これらのエピトープは2つに異なる抗原に由来する。二重特異性抗体を作製する方法は当技術分野で公知である。例えば、二重特異性抗体は2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現を用いて、組換え的に産生させることができる。あるいは、二重特異性抗体は化学的結合を用いて作製することもできる。当業者ならば、当技術分野で公知であるようなこれら、または他の方法を用いて二重特異性抗体を生産することができる。二重特異性抗体には、二重特異性抗体フラグメントが含まれる。本発明に包含される二重特異性抗体の一例としては、S1PエピトープおよびLPAエピトープに対して結合特性を有する抗体であり、従って、S1PおよびLP1の双方を認識し、それらと結合することができる。本発明に包含される二重特異性抗体の別の例としては、生物活性脂質由来のエピトープおよび細胞表面抗原由来のエピトープに結合特性を有する抗体がある。よって、この抗体は生物活性脂質を認識し、それと結合することができ、例えば標的化のために細胞を認識し、それと結合することができる。

【0094】

「ヘテロコンジュゲート抗体」とは、2つの共有結合的に結合された抗体を指す。このような抗体は、架橋剤の使用を含む合成タンパク質化学における公知の方法を用いて作製することができる。本明細書において「コンジュゲート」とは、1以上の抗体フラグメントまたは結合部分と1以上のポリマー分子の共有結合によって形成された分子を指す。

【0095】

「生物学的に活性」とは、所望のエピトープと結合することができ、かつ、何らかの方法で生物学的作用を発揮し得る抗体または抗体フラグメントを指す。生物学的効果としては、限定されるものではないが、成長シグナルの調節、抗アポトーシスシグナルの調節、アポトーシスシグナルの調節、エフェクター機能カスケードの調節および他のリガンド相互作用の調節が挙げられる。

【0096】

「組換えDNA」とは、ヒトにより操作、作出または改変された核酸およびそれらから発現される遺伝子産物を指す。「組換え」ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術によって、例えば、所望のポリペプチドまたはタンパク質をコードする外来DNA構築物により形質転換された細胞から産生されたポリペプチドまたはタンパク質である。「合成」ポリペプチドまたはタンパク質は化学合成によって製造されたものである。

【0097】

「発現カセット」とは、構造遺伝子（すなわち、本発明の抗体などのタンパク質コード配列）の、このような配列に適合した宿主での発現に影響を及ぼし得るヌクレオチド分子を指す。発現カセットとしては、ポリペプチドコード配列と、また所望により、例えば転写終結シグナルなどの他の配列と、作動可能なように連結された少なくとも1つのプロモーターを含む。また、例えばエンハンサーなど、発現の達成に必要なまたは有用な付加的調節エレメントを用いてもよい。よって、発現カセットはプラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、任意の形態の組換え型の「裸のDNA」ベクターなどを含む。

10

【0098】

抗体の供給源は本明細書で例示されているもの（例えば、ネズミおよびヒト化ネズミ抗体）に限定されない。抗体は、哺乳類種（例えば、マウス、ラット、ラクダ、ウシ、ヤギ、ウマ、モルモット、ハムスター、ヒツジおよびウサギ）および鳥類（カモ、ニワトリ）を含む多くの種で作製可能である。作製された抗体は、それらが作製された動物とは異なる種に由来するものであってもよい。例えば、Xenomouse（商標）(Abgenix, Inc., Fremont CA)は完全なヒトモノクローナル抗体を産生する。ある特定の目的では、ある力価のそのようなS1P自己抗体を示し得る個体から単離したS1Pに対する抗体のような天然ヒト抗体を使用することができる。あるいは、ヒト抗体配列ライブラリーを用いて、ヒト配列を含む抗体を作製することもできる。

20

【0099】

2. 適用

本発明は、1以上の望ましくない生物活性脂質、またはその前駆体もしくは代謝産物の活性または濃度を変化させる1以上の治療薬を用い、ある種の疾患および症状を治療または予防する組成物および方法を記載する。本発明の治療方法および組成物は、有効濃度を変更すること、すなわち、特定の望ましくない生物活性脂質の、絶対的、相対的、効果的および／または利用可能な濃度および／または活性を変化させることによって作用する。生物活性脂質の有効濃度を低下させることとは、標的脂質または下流作用を含むその望ましくない作用を「中和する」と言うことができる。ここで、「望ましくない」とは、疾患過程における例えばシグナル伝達分子としてのその関与のために望ましくない生物活性脂質、または過剰に存在する場合に疾患に関与する生物活性脂質の望ましくない量を指す。

30

【0100】

特定の理論に縛られるものではないが、S1Pおよび／またはその代謝産物または下流エフェクターの不適切な濃度は、様々な疾患および障害の発症を引き起こすかまたは関与し得ると考えられる。それ自体、組成物および方法は、特に、特定の標的脂質、例えばS1Pおよび／またはその変異体の有効in vivo濃度を低下させることによって、これらの疾患および障害を処置するために使用することができる。特に、本発明の組成物および方法は、少なくとも部分的に、異常な新血管新生、脈管形成、繊維形成、線維症、瘢痕化、炎症および免疫応答を特徴とする疾患を処置するのに有用であると考えられる。

40

【0101】

本発明に従って処置され得る数種の疾患の例を以下に記載する。多くの疾患および症状は、少なくとも部分的に、複数の病理学的プロセス（例えば、病理学的新血管新生および瘢痕化の両方）を特徴とし、本明細書で提供される分類は記述的利便性を目的とするものであって、本発明を限定するものではないと考えられる。

【0102】

S1Pと過剰増殖性障害

本発明の一態様は、過剰増殖性障害を処置する方法に関する。これらの方法は、意図さ

50

れる適用が必要な場合に、S 1 P 関連過剰増殖性障害に罹患していることが分かっている、または罹患していることが疑われる哺乳類（例えば、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジまたはブタ動物、特に、ヒト）に、S 1 P 活性を妨げる薬剤を、好ましくは薬学上または獣医学上許容される担体中に含む治療上有効な量の組成物を投与することを含む。S 1 P 関連過剰増殖性障害としては、新生物、内皮細胞の増殖に関連する障害および繊維形成に関連する障害が含まれる。ほとんどの場合、新生物は癌である。内皮細胞増殖に関連する典型的な障害は脈管形成依存性障害、例えば、固形腫瘍により引き起こされる癌、血液性腫瘍および加齢性黄斑変性である。繊維形成に関連する障害としては、心不全などの異常な心臓リモデリングに関与するものが含まれる。

【0103】

多くの既知の過剰増殖性障害があり、それらでは種々の組織および器官の細胞が異常なパターンの成長、増殖、遊走、シグナル伝達、老化および死滅を示す。これらの疾患のいくつかのものに取り組むためにいくつかの処置が開発されているが、多くがまだ既存の技術ではまだ処置不能であり、他の場合では、処置が適用可能ではあるが、最適と言えるほどのものではない場合が多く、治癒は希有である。

【0104】

癌はおそらく最も広く認識されている種類の過剰増殖性障害であろう。癌は破壊的な種類の疾患であり、それらを合わせると、唯一心血管疾患に次ぐ死亡率を持つ。多くの癌は分子レベルで十分理解されていない。結果として、癌は米国政府および製薬会社双方の研究開発プログラムの主な焦点となっている。この結果は先例のない R & D 努力と癌に対抗する助けとなる有用な多くの治療薬の製造をもたらした。

【0105】

残念なことに、これらの多大な癌研究は癌によって引き起こされる甚大なダメージを克服するには十分なものとはなっていない。なお、癌と診断される新たな症例はなお年間 100 万件を超え、米国だけで 50 万人を超える死者を出している。このことは、癌の新規治療薬を開発するために多大な努力を払ってきたとしても、この疾患に対抗する有効な治療薬はつかみどころがないままであるということの劇的な実証である。

【0106】

癌は現在主として、外科術、放射線および化学療法の 1 種類または 3 種類の療法の組合せで処置される。外科術は罹患組織の本体除去を含む。外科術は、乳房、結腸および皮膚などの特定の部位に存在する腫瘍を除去には有効である場合があるが、背骨などのその他の部位に存在する腫瘍の処置にも、白血病などの播種性の新生物症状の処置には使用できない。放射線療法は生きている組織に電離放射線を当てて、曝された細胞に細胞死または傷害を引き起こすことを含む。放射線療法の副作用は急性または一過性であり得るが、不可逆的なものもある。化学療法は細胞複製または細胞代謝の混乱を含む。

【0107】

さらに良くないことに、現行の治療薬は通常、毒性および重篤な副作用という形で患者にとって甚大な欠点を含む。従って、多くのグループが最近、癌と闘うために新しいアプローチを探し始めている。これらの新しいいわゆる「革新的療法」としては、遺伝子療法およびモノクローナル抗体などの治療タンパク質が含まれる。

【0108】

癌の処置に臨床上用いられた最初のモノクローナルは、1997 年に市場に出され、治療薬としての二重特異性モノクローナル抗体の有用性が実証されたリツキサン(Rituxan) (リツキシマブ)であった。よって、驚くことではないが、以来、癌に処方される 6 つを含む 16 の他のモノクローナル抗体が臨床使用に認可された。これらの製品の成功ならびに小分子に比べてのモノクローナル抗体を開発するためのコストの低減および時間の短縮は、モノクローナル抗体治療薬を小分子に次ぐ薬剤候補の第二の最も大きなカテゴリーとした。さらに、小分子治療薬に比べて抗体の絶妙な特異性は有効性および毒性の双方の観点で主要な利点となることが分かった。癌だけで言えば、現在、270 を超える産業抗体 R & D 事業が存在し、50 社を超える企業が新規な癌抗体治療薬の開発に関わっている。

10

20

30

40

50

結論として、癌の処置において主要な役割を演じるものとなりつつあり、それらは増大している癌治療薬市場のシェアを取るものと評価されている。

【0109】

腫瘍の成長および生存を促進する細胞外メディエーターの同定は、癌の罹患率および死亡率を引き下げる治療的介入を発見する上で重要な段階である。以下に記載されるように、スフィンゴ脂質シグナル伝達カスケードの鍵となる成分であるスフィンゴ-1-リン酸 (S1P) は多面発現性、腫瘍形成性の増殖因子であると考えられる。S1Pは細胞増殖、細胞生存および転移を刺激することによって腫瘍成長を促進する。S1Pはまた、腫瘍内に新血管を形成することから、内皮細胞の遊走および生存を補助することによって腫瘍の脈管形成を促進する。これらのことを考え合わせると、S1Pは癌進行に寄与する、増殖、脈管形成促進性および抗アポトーシス性の一連の事象を誘発する。よって、in vivo でS1Pレベルを調節する、特に低下させる治療薬は癌の処置に有用である。

10

【0110】

研究によれば、最近、スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) が腫瘍成長を促進する細胞外スフィンゴ脂質シグナル伝達分子、スフィンゴ-1-リン酸 (S1P) を産生する妥当な癌遺伝子であることが実証された。腫瘍成長は、腫瘍細胞の増殖および転移に関連するS1Pの増殖因子作用ならびにS1Pの脈管形成促進作用によって直接および間接的の双方で促進される。本出願者は、S1Pを選択的に吸収し、それにより腫瘍体積および転移能に予期された低下を伴って、この腫瘍増殖因子の細胞外濃度を低下させると同時に、そうでなければ成長中の腫瘍に血液供給を行う新血管の形成を遮断する治療用分子スポンジとして使用可能な二重特異性モノクローナル抗S1P抗体 (抗S1P mAb) を製造した。この分子吸収の概念の予期された成功は癌処置の革新的アプローチである。後段で実証されるように、本出願者は重要な腫瘍増殖因子であるスフィンゴ-1-リン酸 (S1P) に対するmAbを開発した。本出願者は、この抗体が、多くの癌種に関連する増殖、転移能および脈管形成、従って、一般に癌、ならびにその疾患に伴う腫瘍の脈管形成の低下に有効であり得ると考えている。

20

【0111】

天然型のスフィンゴミエリナーゼ (nSMase) は、スフィンゴ脂質シグナル伝達経路の鍵となる最初の成分である (Chatterjee, Adv. Lipid Res. 26: 25-46, 1993; Liu, Obein, and Hannun, Semin. Cell Dev. Biol. 8: 311-322, 1997)。nSMaseは、アルカリ性、酸性、酸性亜鉛依存性および中性マグネシウム依存性を含み、少なくとも5つの同定されているSMaseのうちの1つである (Liu, Obein, and Hannun, Semin. Cell Dev. Biol. 8: 311-322, 1997)。nSMaseクラスは一般に表面膜に関連しており (Das, Cook, and Spence, Biochim Biophys Acta 777: 339 - 342, 1984; Dobrowsky, Cell Signal 12: 81-90., 2000)、炎症性サイトカイン、腫瘍壊死因子 α (TNF α) (Segui, et al., J. Clin. Invest. 108: 143-151, 2001)、T細胞受容体 (Tonnetti, et al., J. Exp. Med 189: 1581-1589, 1999)、電離放射線 (Haimovitz-Friedman, et al., J. Exp. Med 180: 525-535, 1994) およびアントラサイクリン抗新生物薬 (Andrieu-Abadie, et al., FASEB J. 13: 1501-1510, 1999) などの、アポトーシスを引き起こす種々の刺激によって活性化され得る。腫瘍壊死因子 α (TNF α) は、癌細胞系統 (Andrieu-Abadie, et al., FASEB J. 13: 1501-1510, 1999; Hannun and Obein, Trends in Biol. Sci. 20: 72-76, 1995; Kolesnick, trends Biochem Sci 24: 224-5, 1999; Obeid, et al., Science 259: 1769-1771, 1993) を含む多くの細胞種において、nSMase (Adam, et al., J. Bio Chem 271: 14617-14622, 1996; Dressler, Mathias, and Kolesnick, Science 255: 1715-1718, 1992; Kim, et al., J. Biol. Chem. 266:1: 484-489, 1991; Kronke, Chem Phys Lipids 102: 157-66., 1999; Yanaga and Watson, FEBS Letters 314: 297-300, 1992)、CER産生 (Kronke, Chem Phys Lipids 102: 157-66., 1999) およびアポトーシス (Rath and Aggarwal, J. Clin. Immuno. 19: 350-364, 1999; Robaye, et al., Am J Pathol 138: 447-453, 1991; Takeda et al., Int. Immunol. 5: 691-694, 1993) の周知のアクチベーターであり、このnSMaseの活性化はTNF α により誘発されるアポトーシスに重

30

40

50

要であることが示されている(Luberto, et al., J. Biol. Chem. 277: 41128-41139, 2002; Segui, et al., J. Clin. Invest. 108: 143-151, 2001)。結論として、n S M a s e はまた、創薬の標的としても提案されている(Wascholowski and Giannis, Drug News Perspect. 14: 581-90, 2001)。

【0112】

スフィンゴ脂質シグナル伝達分子である S 1 P は、スフィンゴシンキナーゼ (S P H K) の作用によって S P H から産生される。このキナーゼの 2 つのイソ型 S P H K 1 および S P H K 2 が同定されている(Liu, J Biol Chem 275: 19513-20, 2000; Nava, et al., Exp Cell Res 281: 115-127, 2002)。C E R および S P H は一般にアポトーシスに関連するが、これに対して S 1 P は細胞増殖および生存経路の活性化のメディエーターである(An, Ann N Y Acad Sci 905: 25-33, 2000; Maceyka, et al., BBA 1585: 193-201, 2002; Zhang, et al., J. Cell Biol. 114: 155-167, 1991)。それは、最近、以前は E d g 受容体として知られていた S 1 P / L P A 受容体ファミリーに属する一連の G タンパク質共役型受容体 (G P C R) を活性化し得る細胞外メディエーターとして認識されているが(An, Ann N Y Acad Sci 905: 25-33, 2000; An, Goetzl, and Lee, J. cell biochem 30/31: 147-157, 1998; Lee, et al., Science 279: 1552-1555, 1998; Okamoto, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 260: 203-208, 1999)、S 1 P の細胞内作用も示唆されてきた(Van Brocklyn, et al., J. Cell Biol. 142: 229-240, 1998)。さらに、C E R / S P H レベルと S 1 P の間のバランスが、細胞が細胞死経路に送られるのか、アポトーシスから保護されるのかを決めるレオスタット機構を提供することが示唆されている(Kwon, et al., J Biol Chem 276: 10627-10633, 2001; Maceyka, et al., BBA 1585: 193-201, 2002; Pyne, Biochem J. 349: 385-402, 2000)。このレオスタット機構の鍵となる調節酵素が S P H K であり、その役割は、細胞死を促進するスフィンゴ脂質 (C E R / S P H) を、成長を促進する S 1 P に変換することである。

【0113】

最初に S P H K を癌遺伝子として提案した画期的な研究はアデレードのグループによって発表され、このキナーゼで安定的にトランスフェクトされた N I H - 3 T 3 繊維芽細胞が、S 1 P 産生の増強を伴った高い細胞増殖を示したということが実証された(Vadas and Gamble, Circ. Res. 79: 1216-1217, 1996; Xia et al., Curr Biol 10: 1527-1530, 2000)。さらに、これらの S P H K 過剰発現体は、形質転換細胞が一般に示す特性である接触障害を回避した。この知見は、S 1 P が選択されたヒト癌細胞系統の転移能を増強することを示す最近の報告(Igarashi, Ann. N.Y. Acad. Sci. 845: 19-31, 1998; Takuwa, Biochim Biophys Acta. 1582: 112-120, 2002)と一致している。さらにまた、これらの形質転換体は、N O D / S C I D マウスに皮下注射した際には腫瘍を作り出した。これらの結果は、最近、腹腔内投与された S P H K の小分子阻害剤が、J C 乳腺癌細胞の皮下注入を受けた S C I D マウスにおいて腫瘍体積を低減可能であったことを示す研究で確認されている(French, et al., Cancer Res 63: 5962-5969, 2003)。有意義にも、S P H K が新規な癌遺伝子であり得るという概念は、S P H K が乳房、結腸、肺、卵巣、胃、子宮、腎臓および直腸のものなど、多くの固形腫瘍で過剰発現されるという知見(French, et al., Cancer Res 63: 5962-5969, 2003)によって確実となった。さらに、数種のヒト腫瘍由来細胞系統が S P H K 小分子阻害剤で処置した際にアポトーシスへ導かれ得ること、およびそれらの有効性が S 1 P レベルを低下させるそれらの能力によるものと考えられ得ることが実証された。まとめると、これらの知見は、S 1 P が腫瘍細胞自体により産生され得る増殖因子であり、S 1 P の濃度の低下が増殖因子を除去した際に見られるアポトーシスを引き起こし得ることを実証する。

【0114】

S 1 P と腫瘍脈管形成

脈管形成は、既存の血管から新たな血管が形成されるプロセスである。脈管形成はいくつかの生理学的プロセスに重要な役割を果たし、腫瘍成長、浸潤および転移を含む種々の障害の病因に関連づけられている。固形腫瘍および循環腫瘍に関連する脈管形成プロセス

(腫瘍脈管形成)は、腫瘍形成および疾患進行の重要な成分であると考えられ、新しい血管が非癌性細胞よりも腫瘍細胞に有利な成長を与える。従って、脈管形成の臨床管理は癌およびその他の脈管形成依存性疾患の処置に重要な成分となる。血管内皮細胞(EC)は癌細胞ほど容易に突然変異せず、そのため、ECは癌細胞よりも長期療法に耐性を獲得しにくく、それらは良好な潜在的治療標的となるので、抗脈管形成治療薬は特に魅力的である。

【0115】

数種の増殖因子が癌性脈管形成に関連づけられている。生体脂質スフィンゴー１ーリン酸(S1P)は、癌にとって重要な多くの細胞プロセスのメディエーターであることが判明している。S1Pはその作用の大部分を、S1P₁ - ₅と呼ばれるGタンパク質共役型受容体ファミリーの特異的リガンドとして発揮する。これらの受容体は、脈管形成および血管成熟、細胞遊走およびリンパ球移動を調節する。S1Pとは対照的に、S1Pの前駆体であるスフィンゴシンおよびセラミドは成長の停止およびアポトーシスに関連づけられている。最後に、S1PとVEGF、EGF、PDGF、bFGFおよびIL-8などの他の脈管形成促進性増殖因子の間には複雑なクロストークが存在する。S1Pは受容体S1P₁と結合することにより、VEGFR、EGFRおよびPDGFRで見られるような増殖因子受容体チロシンキナーゼをトランス活性化する。脈管形成依存性腫瘍におけるS1Pの重要性はS1Pを癌処置の格好の標的とする。これらの知見に基づき、細胞外S1Pを中和する抗体アプローチは血管形成の阻害をもたらし、腫瘍成長を支えるのに必要な栄養および酸素を同時に欠乏させる。さらに、最近の研究では、多くの脈管形成阻害剤が、最初の腫瘍から離れた部位へ癌の拡散を軽減する助けとなり得る抗浸潤化合物および抗転移化合物としても働き得ることが示唆されている。

【0116】

最も強力な脈管形成促進薬の1つとしてS1Pに関連づける、増えつつある最近の証拠は、S1PをVEGFおよびbFGFなどの薬剤と直接比較する研究から得られるものである。S1Pは、多細胞構造の分化の誘導中にDNA合成およびヒト静脈内皮細胞(HUVEC)の走化運動性を刺激し、その全てが初期の血管形成におけるS1Pの役割を示唆している(Graves, et al., 2004; Lee et al., 1999; Liu, et al., 2000)。また、S1Pは、骨髄由来EC前駆体の新血管新生部位への遊走を促進する(Annabi, et al., 2003)。S1P₁を過剰発現する細胞は抗脈管形成薬サリドマイドおよびネオバスタット(neovastat)に耐性がある(Annabi et al., 2003)。さらに、S1PとVEGF、EGF、PDGF、bFGFおよびIL-8などの他の脈管形成促進性増殖因子の間に実質的なクロストークが存在することも実証されている。例えば、S1PはEGF受容体(Shida, et al., 2004)およびVEGF2受容体(Spiegel & Milstien, 2003)をトランス活性化し、VEGFはS1P₁受容体の発現をアップレギュレーションする(Igarashi, et al., 2003)。また、S1P₁および「VEGF軸」を介して作用するS1Pは、後脚の脈管形成および新血管新生にも必要とされる(Chae, et al., 2004)。

【0117】

癌に対する抗脈管形成アプローチは、抗脈管形成薬ベバシズマブ(アバスチン(Avastin)(登録商標)、Genentech)が結腸癌処置のために細胞傷害性化学療法の補助として最近FDA認可されたことによって大きく進展した。

【0118】

S1Pに対して高い結合親和性および特異性を有する抗S1PネズミMAbであるLT1002が最近開発された。LT1002はヒト癌の数種の動物モデルで、腫瘍進行および関連の脈管形成を有意に遅くすることが示された。さらに、LT1002は、加齢性黄斑変性(AMD)の脈管形成の十分確立されたモデルで、脈絡膜の新血管新生(CNV)病変形成を緩和した。CNVはブルッフ膜および網膜色素上皮の異常がある疾患で見られる。このタイプの最も一般的な疾患が、高齢患者における重篤な視野欠損の最も多い原因であるAMDである。これらの結果は、LT1002が、(1)腫瘍細胞増殖に対する直接的な作用、(2)血管内皮細胞に対する間接的な抗脈管形成作用および(3)他の脈管形

成促進性増殖因子の放出および作用を防止する間接的な抗脈管形成作用を含む、いくつかの作用機序を持つことを示唆した。

【0119】

S1Pが腫瘍脈管形成に寄与することの最も直接的なin vivo証拠は、分子吸入によって細胞外S1Pを中和するように設計されたネズミモノクローナル抗体(mAb)に着目した本発明者らの最近の発表から得られる(Visentin, et al., 2006)。HUVECを用いた種々のin vitroアッセイでは、抗S1P mAbは管形成、血管内皮細胞の遊走および細胞死からの保護(それぞれS1Pによって誘発されたもの)を中和した。S1Pはマウスに移植されたマトリゲルプラグへの新たな毛細血管成長を増強し、この作用は抗S1P mAbの全身投与によって中和とされた。mAbはネズミマトリゲルプラグアッセイでbFGFおよびVEGFによって誘発された脈管形成を実質的に中和し、in vitroおよびin vivoにおいてS1Pにより刺激された、腫瘍細胞からの脈管形成促進性サイトカイン(VEGF、IL-8、IL-6)の放出を緩和した。重要なことに、正所性のヒト癌細胞を異種移植したマウスは、抗S1P mAb処置により腫瘍進行の実質的遅延を示した。このことは、ヒト乳癌、卵巣癌および肺癌のネズミモデルならびにネズミ黒色腫の同種移植モデルで実証された(Visentin, et al., 2006)。

【0120】

種々の疾患および障害の治療的処置としてのモノクローナル抗体(mAb)の使用は、それらが安全で効果的な治療薬であることが示されたことから、急速に増えている。認可された治療用mAbとしては、アバスタチン(Avastin)(登録商標)、エルビタックス(Erbix) (登録商標) およびリツキサン(Rituxan)(登録商標)がある。さらなるmAbが種々の疾患に対する臨床開発の様々な段階にあり、その大多数が種々の形態の癌を標的としている。一般に、モノクローナル抗体は非ヒト哺乳類で作製される。しかしながら、ネズミモノクローナル抗体の治療上の有用性は、主として、ヒト患者がネズミ抗体に対して固有の抗体応答を装備しているという事実のために限定されたものである。この応答、いわゆるHAMAs(ヒト抗マウス抗体)応答の結果、最終的な中和とネズミmAbの急速な排除が起こる。この制限は、ネズミ抗体の「ヒト化」と呼ばれるプロセスの開発によって克服された。ヒト化は、投与された治療用MAbに対する免疫応答の発生を大きく緩和し、それにより、HAMAsの結果としての半減期の短縮および治療効力の低減を回避する。大部分、ヒト化プロセスは、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)にネズミ相補性決定領域(CDR)をグラフトすることからなる。この戦略は「CDRグラフティング」と呼ばれる。最初にグラフトされた構築物に欠損している親和性を回復させるために、ヒトFR中の選択された残基のネズミアミノ酸残基に対する「復帰突然変異」が必要な場合が多い。

【0121】

mAbの製造は、タンパク質自体の可変性から来る複雑なプロセスである。mAbの可変性はタンパク質主鎖および／または炭水化物部分に存在し得る。このヘテロ性は選択的ジスルフィド対合の形成、脱アミド化およびイソアスパルチル残基の形成、メチオニンおよびシステインの酸化、N末端グルタミン残基のピルグルタメートへの環化および哺乳類カルボキシペプチダーゼによるC末端リシンの部分的酵素切断に帰することができる。操作は一般に、安定性、プロテアーゼ耐性、凝集挙動の増強など、それらの特性を改良するため、およびヘテロ系での発現レベルを増強するために抗体分子に適用される。

【0122】

ここでは、S1Pに対するネズミMAbのヒト化を記載する。全体的な戦略は、LT1002由来の6つのCDRをヒトフレームワークにグラフトすることからなった。抗体性能をさらに精密化および至適化するためにさらなる改良を施した。このヒト化MAbはLT1002と同じ特徴を示し、よって、臨床試験にかけるのに好適である。

【0123】

S1Pと繊維症

繊維芽細胞、特に、筋繊維芽細胞は、細胞の傷害および炎症に応答した瘢痕形成の鍵と

10

20

30

40

50

なる細胞エレメントである[Tomasek, et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63およびVirag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]。筋線維芽細胞によるコラーゲン遺伝子発現はリモデリングの特徴であり、癒痕形成に必要である[Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6およびSun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]。S 1 Pは、コラーゲン生産の増加中に繊維芽細胞の遊走および増殖を活性化することによって創傷治癒を促進する[Sun, et al. (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]。傷害を受けた細胞によって局部的に産生されたS 1 Pは、リモデリングおよび癒痕形成に関連する不適応な創傷治癒の一因となり得る。よって、S 1 P阻害剤は少なくとも部分的に異常な繊維形成または繊維症を特徴とする疾患または症状に有用であると考えられる。ここで、「繊維形成」は、繊維芽細胞の過剰な活性または数と定義され、「繊維症」は、過剰または不適切なコラーゲン生産および癒痕化、生理学的組織構造の破壊および／または網膜剥離などの病理をもたらすマトリックスの不適切な収縮または器官機能の障害をもたらすその他のプロセスに至る繊維芽細胞の過剰な活性または数と定義される。

10

【0124】

S 1 Pと繊維芽細胞コラーゲンの発現：S 1 Pは、静止中の繊維芽細胞の分化を促進して、癒痕形成の際に高いコラーゲン発現を示す筋繊維芽細胞を活性化させる[Urata, et al. (2005), Kobe J Med Sci, vol 51: 17-27]。繊維芽細胞の増殖および癒痕化領域への遊走とともに、筋繊維芽細胞は主としてオステオポンチンおよびフィブロネクチンからなる一次的顆粒ネットワークを沈積する[Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]。リモデリングプロセスとして、この一次的マトリックスは吸収され、コラーゲンネットワークが確立される[Sun and Weber (2000), Cardio生産を促進することを実証した。周知の繊維性メディエーターであるTGFβは、おそらくはS 1 Pの作用によって、数種の繊維形成促進性タンパク質をアップレギュレーションし、繊維芽細胞を筋繊維芽細胞へ変換し、炎症性タンパク質の発現を刺激することが示されている[Squires, et al. (2005), J Mol Cell Cardiol, vol 39: 699-707およびButt, Laurent and Bishop (1995), Eur J Cell Biol, vol 68: 330-5]。TGFβにより刺激される繊維芽細胞から筋繊維芽細胞への分化に関連づけられているシグナル伝達分子TIMP1のアップレギュレーションはSPHK1に対するsiRNAによって遮断される[Yamanaka, et al., J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):53994-4001]が、このことはヒト化型の抗S 1 P抗体がTGFβの繊維形成促進作用を緩和するとともにS 1 P自体の繊維形成作用も緩和し得ることを示唆している。

20

30

【0125】

不適応な癒痕化を最小限とすることは、限定されるものではないが、眼球疾患、心血管疾患、創傷治癒および硬皮症を含む繊維性疾患および症状の処置に有用であると考えられる。

【0126】

硬皮症の処置のための抗S 1 P抗体

本発明の組成物および方法は、少なくとも部分的に、異常な新血管新生、脈管形成、繊維形成、線維症、癒痕化、炎症および免疫応答を特徴とする障害および疾患の処置において有用である。このような疾患の1つが硬皮症であり、全身性硬化症とも呼ばれる。

40

【0127】

硬皮症は、皮膚の癒痕化または肥厚を引き起こし、時には、肺、心臓および／または腎臓を含む他の身体領域も含む自己免疫疾患である。硬皮症は、身体の皮膚および臓器において、関連領域の肥厚および硬化をもたらし、結果として機能低下を伴い得る癒痕組織の形成（線維症）を特徴とする。今日、硬皮症財団によれば、約300,000人のアメリカ人が硬皮症を有する。罹患している3分の1またはそれ以下の者は広範囲の疾患を有し、残りの3分の2は主に皮膚疾患を有する。該疾患が肺に作用して癒痕化を引き起こす場合には、このような肺はもはやあるべきような拡張ができないことから、呼吸が制限されるようになり得る。呼吸の能力を測定するために、医師は強制肺活量（FVC）を評価す

50

る装置を用いる。予測値の50パーセント未満のFVCを有する人々において、硬皮症に関連した肺疾患からの10年間の死亡率は約42パーセントである。死亡率が非常に高い1つの理由は、現在利用できる有効な処置がないためである。

【0128】

本願の実施例に記載されているように、S1Pが、繊維芽細胞の活性化、増殖およびその結果としての不適応な癒痕化およびリモデリングと関連する繊維芽細胞の活性の増強に寄与し得る繊維形成促進性増殖因子であることを示す証拠が存在する。さらに、皮膚および他のタイプの繊維芽細胞の活性におけるS1Pの潜在的役割が実証された。例えば、生物活性脂質はネズミ皮膚繊維芽細胞の遊走を刺激すること(Hama, et al., J Biol Chem. 2004 Apr 23;279(17):17634-9)およびヒト皮膚繊維芽細胞が数種のS1P受容体サブタイプを発現すること(Zhang, et al., Blood. 1999 May 1;93(9):2984-90)が示されている。繊維芽細胞の活性に対するS1Pの多くの直接的作用に加えて、S1Pはまた、繊維芽細胞の活性に対する多くの潜在的な間接的作用も持ち得る。例えば、S1Pは、TGF- β および血小板由来増殖因子(PDGF)などの他の周知の繊維形成促進因子の作用を促進し得る。TGF- β は、最も広く研究され、認識されている繊維症の因子の1つである(Desmouliere, et al., J Cell Biol 122: 103-111, 1993)。TGF- β は、SphK1の発現および活性をアップレギュレーションして、ECM分解を阻害するタンパク質であるメタロプロテイナーゼ1(TIMP-1)の組織阻害剤の発現増強をもたらす(Yamanaka, et al., J Biol Chem 279: 53994-54001, 2004)。TIMP-1の発現増強は、心不全患者における間質性繊維症および拡張機能不全と関連がある(Heymans, et al., Am J Pathol 166: 15-25, 2005)。逆に、S1PはTGF- β の発現および放出を刺激する(Norata, et al., Circulation 111: 2805-2811, 2005)。S1PとPDGFの間のクロストークの明らかな証拠もある。S1Pは、PDGFの発現を直接刺激する(Usui, et al., J Biol Chem 279: 12300-12311, 2004)。さらに、S1P₁受容体およびPDGF受容体は互いに結合し、その会合は種々の細胞種の増殖および遊走に關与する下流シグナル伝達のPDGF活性化に必要である(Long, et al., Prostaglandins Other Lipid Mediat 80: 74-80, 2006; Baudhuin et al., Faseb J 18: 341-343, 2004)。繊維症に対するTGF- β およびPDGFの作用はそれ自体、部分的に、S1Pシグナル伝達経路とのクロストークによるものであり得る。本発明の組成物および方法はそれ自体、特に、特定の標的脂質、例えばS1Pの有効in vivo濃度を低下させることによって硬皮症を処置するために使用することができる。

【0129】

全身性の硬皮症は、PDGF受容体に対する刺激性自己抗体によって悪化すると考えられ(Baroni, et al., N Engl J Med. 2006 v354(25):2667-76)、PDGF受容体がTGF- β に応答した硬皮症繊維芽細胞においてアップレギュレーションされる(Yamakage, et al., J Exp Med. 1992 May 1;175(5):1227-34)。S1P、PDGFおよびTGF- β シグナル伝達系間の実質的なクロストークのために、S1Pの生物活性を抗S1P剤(例えば、抗S1P mAb)で遮断すると、PDGFおよびTGF- β の硬化促進作用を間接的に緩和することができた。さらに、このような抗S1P剤による処置は、皮膚および疾患の進行に關与する他の形態の繊維芽細胞に対するS1Pの直接的作用を緩和することによって硬皮症患者に有益であり得た。

【0130】

S1Pと眼球の疾患および症状

病理学的なまたは異常な脈管形成／新血管新生、異常なリモデリング、繊維症および癒痕化および炎症が、加齢性黄斑変性(AMD)、糖尿病性網膜症(DR)などの網膜および眼球の疾患と関連して、また、未熟児網膜症(ROP)および他の発育障害において起こり[Eichler, et al. (2006), Curr Pharm Des, vol 12: 2645-60]、ならびに眼に対する感染および機械的損傷の結果である[Ciulla, et al. (2001), Curr Opin Ophthalmol, vol 12: 442-9およびDart et al (2003), Eye, vol 17: 886-92]。S1Pに対する抗体は、病理学的なまたは異常な脈管形成／新血管新生、異常なリモデリング、繊維症および

瘢痕化または炎症がその成分である眼球疾患を処置するのに有用であると考えられる。

【0131】

眼の脈管形成／新血管新生

病理学的な眼球脈管形成は、様々な臨床症状において失明の主因である。脈絡膜新血管新生（CNV）はいくつかの眼球疾患で起こり、最も多いものは滲出型または「ウェット」型のAMDである。高齢者が増えてきた結果として、AMDは今日、西洋諸国で60歳以上の患者に流行し、失明の主因となっている。AMDによって引き起こされる視力喪失が流行しているにもかかわらず、AMDの進行を遅延させ得るのはほんのいくつかの療法であり（ほとんどのものが抗VEGFに基づく）、視力喪失を逆転できるものはさらに少ない[Bylisma and Guymer (2005), Clin Exp Optom, vol 88: 322-34, Gryziewicz (2005), Adv Drug Deliv Rev, vol 57: 2092-8およびLiu and Regillo (2004), Curr Opin Ophthalmol, vol 15: 221-6]。従って、病理学的新血管新生のための新規な処置を発見することは非常に重要である。

10

【0132】

AMDは、異常な脈管形成／新血管新生、異常なリモデリング、繊維症および瘢痕化、および炎症に関係する眼球症状を記載する上で単に例示のために本明細書で用いられるものであり、その症状は、本明細書で開示および特許請求されるような他の眼球疾患および障害においても見出される。AMDは、加齢性の病理学的変化を包含する[Tezel, Bora, and Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20およびZarbin (2004), Arch Ophthalmol, 122: 598-614]。複数の理論が存在するが、AMDの正確な病因および病理はまだ十分に理解されていない。加齢は、酸化損傷の蓄積、ブルッフ膜の肥厚および結晶腔の形成と関連がある。酸化ストレスは、網膜色素上皮（RPE）細胞および場合によっては脈絡毛細管枝に損傷をもたらす[Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614およびGorin, et al. (1999), Mol Vis, vol 5: 29]。RPEへの損傷は、ブルッフ膜および脈絡膜内に慢性的な炎症性応答を誘起する傾向がある[Johnson et al. (2000), Exp Eye Res, vol 70: 441-9]。この損傷および炎症は、CNVおよび萎縮を刺激することによって網膜損傷を助長し、増進させる[Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614およびWitmer, et al. (2003), Prog Retin Eye Res, vol 22: 1-29]。CNVは、創傷として認識される可能性のある血管（BV）の欠損および漏出をもたらす[Kent and Sheridan (2003), Mol Vis, vol 9: 747-55]。創傷治癒は脈絡膜から起こり、ブルッフ膜およびRPEを経て網膜下空間へ入る。創傷治癒応答は、典型的な初期炎症応答、著しい脈管形成応答および組織形成、その後の関与するエレメントの最終段階の成熟を特徴とする。創傷リモデリングは、光受容体とそのそばのRPEを不可逆的に損なうことになり、抗脈管形成療法以上のものでCNVを処置する必要性が当化される[La Cour, Kiilgaard, and Nissen (2002), Drugs Aging, vol 19: 101-33.12]。

20

30

【0133】

CNV関連繊維症、浮腫および炎症の結果としての正常な網膜および網膜下構造における変化は、個々にまたは累積的にAMD関連の視力喪失をもたらす[Tezel and Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20およびAmbati, et al. (2003), Surv Ophthalmol, vol 48: 257-93]。滲出性AMDと関連のある複数の細胞とサイトカインの相互作用は、有効な処置の探索を極めて複雑にする。CNVおよび浮腫は抗VEGF治療薬により部分的に管理することができるが、瘢痕形成および炎症を緩和し得る可能性のある処置は十分に組み立てられてきていない[Bylisma and Guymer (2005), Clin Exp Optom, vol 88: 322-34およびPauleikhoff (2005), Retina, vol 25: 1065-84]。新生血管複合体が完全な状態で維持される限り、抗VEGF剤で処置された患者の場合がそうであるように、網膜下繊維症および将来的な視力喪失の可能性が続く。

40

【0134】

抗VEGF-A療法は、滲出性AMDの処置において近年顕著な進歩を示す。しかしながら、VEGF-Aの165のイソ型を選択的に阻害する高親和性アプタマーであるPEGAPTANIBを用いた第III相VISION試験では、平均的な患者は視力を喪失

50

し続け、少ない割合の患者のみが視力を得たことを示している[Gragoudas, et al. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]。抗体フラグメント R A N I B I Z U M A B による V E G F - A の全てのイソ型の阻害 (p a n - V E G F 阻害) では、はるかに優れた結果が得られた[Brown, et al., N Eng Med (2006), vol. 355:1432-44, Rosenfeld, et al. N Eng J Med (2006), vol. 355:1419-31]。2年間の M A R I N A 治験および1年間の A N C H O R 治験から、およそ40%の患者がある程度の視力回復を達成したことが示された。これらの結果は滲出性AMDを処置するための本発明者らの能力の大きな進歩を示すが、60%の患者は視力改善を示さないこともまた示す。さらに、これらの患者は、厳密に定義された包含・除外基準を満たさなければならなかった。より大きな患者集団についての結果は、確実性が低いかもしれない。

10

【0135】

C N V の進行における他のステップを標的とするさらなる治療薬および最終的に光受容体破壊をもたらすプロセスを開発するという十分定義された必要性がなおある。第一に、脈絡膜 B V の成長には、全プロセスを調節または阻害する機会を提供する、V E G F のみならず多くのメディエーター間での組織的な相互作用が含まれる[Gragoudas, et al. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]。第二に、滲出性AMDは血管および血管外成分からなる。血管成分は血管内皮細胞 (E C)、E C 前駆体および周皮細胞を含む。容量的に最大成分であると思われる血管外成分は、炎症性細胞、グリア細胞、網膜色素上皮 (R P E) 細胞および繊維芽細胞からなる。組織損傷は、いずれかの成分から生じ得る。病理プロセスのこれら他の態様は、現在の抗 V E G F 処置では取り込まれていない。AMDに

20

【0136】

眼球疾患における炎症

炎症、特にマクロファージおよび補体系[Klein, et al. (2005), Science, vol 308: 385-9;およびHageman, et al.(2005), Proc Natl Acad Sci U S A, vol 102: 7227-32]が滲出性AMDの病因において重要な役割を果たすという証拠が増えている。外科的に摘出した脈絡膜新生血管膜の組織病理は、マクロファージがほとんど普遍的に存在するというを示す[Grossniklaus, et al. (1994), Ophthalmology, vol 101: 1099-111およびGrossniklaus, et al. (2002), Mol Vis, vol 8: 119-26]。マクロファージは、細胞を傷害し、ブルッフ膜を分解するとともに脈管形成促進性サイトカインを放出し得る酵素の分泌を含む複数の作用[Otani, et al. (1999), Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1912-20およびAmin, Puklin, and Frank (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 35: 3178-88]によって、C N V の形成および増殖を媒介する上で能動的な役割を果たし得るという証拠が増大している[Grossniklaus, et al. (2003), Mol Vis, vol 8: 119-26; Espinosa-Heidmann, et al. (2003), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 44: 3586-92; Oh, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8; Cousins, et al. (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 1013-8; Forrester (2003), Nat Med, vol 9: 1350-1およびTsutsumi, et al. (2003), J Leukoc Biol, vol 74: 25-32]。損傷部位で、マクロファージは、脱顆粒など、活性化の微細形態学的徴候を示す[Oh, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8およびTrautmann et al. (2000), J Pathol, vol 190: 100-6]。すなわち、マクロファージ浸潤を脈絡膜新生血管複合体中に制限した分子は、C N V 形成を制限する助けとなり得ると考えられる。

30

40

【0137】

眼球疾患における脈絡膜新血管新生および血管成熟

脈管形成は、炎症性細胞に酸素および栄養素を送達し、残渣の除去を助けするので、正常な創傷治癒の必須構成要素である[Lingen (2001), Arch Pathol Lab Med, vol 125: 67-71]。進行性の脈管形成は、2つの異なるプロセスからなる：ステージ I：血管 E C の、近傍刺激に応答した、それらが増殖し、管腔構造を形成する毛細血管の先端への遊走；お

50

よびステージ I I : 血管網の退縮(pruning)および血管系の最適化[Guo, et al. (2003), Am J Pathol, vol 162: 1083-93]。

【0138】

ステージ I : 新血管新生

脈管形成はほとんどの場合、創傷治癒を補助する。しかしながら、制御されなければ、新生血管は一般に欠陥があり、漏出、大量出血および炎症を助長する。脈管形成促進性 G F を標的化することによって機能不全 B V および漏出性 B V を低下させることは、A M D の進行をある程度遅延できることが示されている[Pauleikhoff (2005), Retina, vol 25: 1065-84.14 および van Wijngaarden, Coster, and Williams (2005), JAMA, vol 293: 15 09-13]。

10

【0139】

ステージ I I : 血管成熟および薬剤脱感作

P a n - V E G F 阻害は、実際の C N V 病変が著しくは退縮しないので、主として、網膜内および網膜下の浮腫の分解をもたらす抗透過性作用を介して有益な作用を発揮するものと思われる。著しい C N V 退縮がないのは、1 つには、周皮細胞被覆による、新しく形成された血管の成熟の結果かもしれない。周皮細胞は、血管組織の発達と維持に重要な役割を果たす。周皮細胞の存在は、抗 V E G F 剤に対する耐性を付与し、脈管形成を阻害するそれらの能力を抑えるようである[Bergers and Song (2005), Neuro-oncol, vol 7: 45 2-64; Yamagishi and Imaizumi (2005), Int J Tissue React, vol 27: 125-35; Armulik, Abramsson and Betsholtz (2005), Circ Res, vol 97: 512-23; Ishibashi et al. (19 95), Arch Ophthalmol, vol 113: 227-31]。周皮細胞の動員に対して阻害作用を有する薬剤はおそらく、血管チャネルの構築および脈絡膜の新生血管チャネルの成熟を妨害し、それにより抗脈管形成薬に対するそれらの感受性を保持するのであろう。

20

【0140】

血管網のリモデリングは、栄養要求を満たすための血管 (B V) 密度の調整を含む[Gar iano and Gardner (2005), Nature, 438: 960-6]。B V 未成熟期間は、新生血管は機能するが周皮細胞被覆をまだ獲得していない期間に相当する[Benjamin, Hemo, and Keshet (1 998), Development, 125: 1591-8 および Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, 2003. 314: 15-23]。この遅延は、網膜または脈絡膜の栄養要求に従い、発達中の血管系の微調整に可塑性の余地をもたらすのに不可欠なものである。

30

【0141】

生物活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S 1 P)、V E G F、P D G F、アンギオポエチン (A n g) および他の増殖因子 (G F) は、血管成長を増大させ、平滑筋細胞 (S M C) および周皮細胞をナイーブ血管に動員して、出現血管のリモデリングを促進する[Allende and Proia (2002), Biochim Biophys Acta, vol 582: 222-7; Gariano and Gardner (2005), Nature, vol 438: 960-6; Grosskreutz, et al. (1999), Microvasc Res, vol 58: 128-36; Nishishita, and Lin (2004), J Cell Biochem, vol 91: 584-93 および Erber, et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40.32]。周皮細胞は、ほとんどの場合、おそらく、E C 発芽時に in situ において間葉細胞前駆体の分化によってか、または動脈平滑筋細胞の遊走および脱分化から生じ、緊密に会合し、E C を被覆し、血管全体の成熟および生存をもたらす[Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), Development, vol 125: 1591-8]。最近の研究では、S 1 P および S 1 P 1 受容体が、細胞-細胞間の接着分子 N-カドヘリンの細胞表面移動および活性化に関与することが示されている[Paik, et al. (2004), Genes Dev, vol 18: 2392-403]。N-カドヘリンは、安定な血管床の発達を促進する E C、周皮細胞および壁細胞の間の相互作用に不可欠である[Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, vol 314: 15-23]。S 1 P 1 遺伝子の広範囲な欠失により、胚発生中の B V 安定化に必要な発生期 B V の異常な壁細胞被覆をもたらす[Allende and Proia (2002), Biochim Biophys Acta, vol 1582: 222-7]。腫瘍異種移植モデルにおいて s i R N A を S 1 P 1 へ局所注入すると、血管の安定化が抑制される[Chae, et al. (2 004), J Clin Invest, vol 114: 1082-9]。トランスジェニックマウス試験では、V E G

40

50

FおよびPDGF-Bが、新生BVの成熟および安定化を促進することが示された[Guo, et al. (2003), Am J Pathol, 162: 1083-93およびGariano and Gardner (2005), Nature, vol 438: 960-6.50]。VEGFはAng-1 (mRNAおよびタンパク質) をアップレギュレーションする[Asahara, et al. (1998), Circ Res, vol 83: 233-40]。Ang-1は、周皮細胞による内皮周囲の支持を補充および維持する上で主要な役割を果たす[Asahara, et al. (1998), Circ Res, vol 83: 233-40]。VEGFの眼球内注射は、EC網状組織の周皮細胞被覆を促進した[Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), Development, vol 125: 1591-8]。PDGF-B欠損マウスの胚は、微細血管周皮細胞欠損しており、これが浮腫、微細動脈瘤および致命的な出血につながる[Lindahl, et al. (1997), Science, vol 277: 242-5]。マウス胎児の研究では、血管床成熟の完全なVEGF刺激およびPDGF刺激にはさらなるシグナルが必要とされることが示された。上記のS1Pのトランス活性化に基づけば、この因子はS1Pである可能性がある[Erber et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40]。血管の安定化および成熟は、可塑性の低下、ならびにVEGFおよび他のGFの離脱に対する退行の不在ならびに抗脈管形成療法に対する耐性と関連がある[Erber, et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40およびHughes and Chan-Ling (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 2795-806]。脈管形成阻害剤に対するBVの耐性は、まず成熟した血管を安定化させる周皮細胞、そして療法の際に未熟な血管に動員される周皮細胞によって付与される[Erber, et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40]。未熟なECの被覆後、周皮細胞は、アポトーシス促進剤からECを保護する代償的生存因子 (Ang-1およびPDGF-B) を発現する。

【0142】

眼球疾患における浮腫および血管透過性

CNV膜は、それらの血管内内容物を周辺空間に漏出し、その結果、網膜下出血、滲出物および体液蓄積をもたらす傾向のある有窓血管ECからなる[Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, vol 14: 15-23]。長い間、CNV組織それ自体が、また最近では網膜内新血管新生が、AMDに関連する視力低下に関与していることが示唆されてきた。しかしながら現在では、血管透過性 (VP) の増加により引き起こされる黄斑浮腫とそれに続く血液網膜関門 (BRB) の崩壊が、AMDと関連した視力喪失および他の眼球疾患 (糖尿病関連の失明を含む) において主要な役割を果たすと考えられている[Hughes and Chan-Ling (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 2795-806; Felinski and Antonetti (2005), Curr Eye Res, vol 30: 949-57; Joussen, et al. (2003), FASEB J, vol 17: 76-8およびStrom, et al. (2005), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 46: 3855-8]。特に、糖尿病性網膜症 (DR) および糖尿病性黄斑浮腫 (DME) は糖尿病患者において一般的な微小血管合併症であり、糖尿病関連の失明の最も多い原因である。DMEは微小血管透過性の増大から起こる。Joussen, et al. (2003), FASEB J, vol 17: 76-8。これらを一緒にすると、労働人口において新たな失明の最も多い原因である。S1Pを標的とする抗体などの化合物はこれらの症状に治療上有用であると考えられる。

【0143】

本発明に従って処置され得る数種の疾患の例を以下に記載する。多くの疾患および症状は、少なくとも部分的に、複数の病理学的プロセス (例えば、病理学的新血管新生および瘢痕化の両方) を特徴とし、本明細書で提供される分類は記述的利便性を目的とするものであって、本発明を限定するものではないと考えられる。

【0144】

a. 網膜上および／または網膜下の膜形成を特徴とする病理学的新血管新生および疾患と関連した虚血性網膜症 (ischemic retinopathy)

虚血性網膜症 (IR) は、網膜血流の低下を特徴とする多様な障害群である。IRの例としては、糖尿病性網膜症 (DR)、未熟児網膜症 (ROP)、鎌状細胞網膜症および網膜静脈閉塞性疾患が含まれる。これらの障害は全て、VEGFにより駆動される病理学的な網膜新血管新生の増殖に関連づけることができ、やがては眼球内出血、網膜上膜形成および牽引性網膜剥離に至り得る。特発性網膜上膜 (ERM) は、黄斑パッカーまたはセロ

ファン網膜症 (cellophane retinopathy) と呼ばれ、網膜構造の変形に次いで視力低下を引き起こし得る。これらの膜は、外科的に除去しても再発することがあり、網膜虚血を伴うこともある。VEGFおよびその受容体はERMに局在している。増殖性糖尿病網膜症、増殖性硝子体網膜症および黄斑パッカーと関連のある膜内にVEGFが存在することは、このサイトカインが、脈管形成において、虚血性網膜疾患において、また、増殖性硝子体網膜障害における膜増殖において、重要な役割を果たすことをさらに示唆する。さらにVEGF受容体VEGFR1およびVEGFR2もまた、ERMの細胞で同定される。これらのデータは、VEGFが血管性および無血管性ERMの進行に関与し得る自己分泌および／またはパラ分泌刺激因子であり得ることを示す。PDGFおよびその受容体[Robbins, et al. (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663]は、増殖性網膜疾患に罹患している眼球において記載されている[Cassidy, et al. (1998), Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85およびFreyberger, et al. (2000), Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108: 106-109]。これらの知見は、PDGFリガンドおよび受容体は、種々の起源の増殖性網膜の膜中に拡散していることを示唆し、PDGFによる自己分泌およびパラ分泌刺激はERM病理に関与し得ることを示唆している。トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) は、TGF染色および免疫活性によって示されるように、ERMの形成に関与している[Pournaras, et al. (1998), Klin Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358]。さらに、TGF- β 受容体Iは、糖尿病性膜およびPVR膜のERMの筋繊維芽細胞で発現される。これらの結果は、網膜およびERMの複数の細胞種で産生されたTGF- β は、PVR、糖尿病性の、および二次的なERMの処置のための魅力的な標的であることを示唆する。インターロイキン-6 (IL-6) は、増殖性糖尿病性網膜症(PDR)においてヒト硝子体中で増加するということが報告されており[La Heij, et al. (2002), Am J Ophthalmol, 134: 367-375]、ある研究では、研究された100%糖尿病性ERMがIL-6タンパク質を発現した[Yamamoto, et al. (2001) Am J Ophthalmol, vol 132: 369-377]。

【0145】

塩基性繊維芽細胞性増殖因子(bFGF)の外的投与は、内皮増殖およびVEGF発現を誘発することが示されている[Stavri, et al. (1995), Circulation, vol 92: 11-14]。これらの知見と一致して、bFGF濃度は、PDR患者からの硝子体サンプル内で増加している[Sivalingam, et al. (1990), Arch Ophthalmol, vol 108: 869-872およびBoulton, et al. (1997), Br J Ophthalmol, vol 81: 228-233]。bFGFは、ERMの形成にも関与しており[Hueber, et al. (1996), Int. Ophthalmol, vol 20: 345-350]、試験した10のPDR膜のうち8つの膜においてbFGFを示した。さらに、これらの研究者らは、対応する受容体FGFR1について陽性染色を見出した。また、bFGFに対する免疫反応性は、無血管性特発性ERMにおいても示されている。これらの結果は、血管性および無血管性ERMの双方の形成にbFGFを関連づけるものである。Harada, et al. (2006), Prog in Retinal and Eye Res, vol 25; 149-164。上昇したbFGFは、ROP患者の血清でも検出されている[Becerril, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112, 2238]。

【0146】

S1Pの既知の多面発現作用、およびVEGF、bFGF、PDGF、TGF- β およびIL-6との相互作用を考えれば、S1Pと結合する、S1Pに拮抗する、S1Pの作用または産生を阻害する薬剤は、虚血性網膜症および血管性または無血管性ERM形成を特徴とする後眼部疾患において病理学的網膜新血管新生を抑制する際に有効であると考えられる。少なくとも部分的に、異常な新血管新生または脈管形成を特徴とする他の眼球症状には、加齢性黄斑変性、角膜移植拒絶反応、新生血管緑内障、コンタクトレンズの過剰装着、角膜感染(単純ヘルペス、帯状疱疹および原虫感染を含む)、翼状片、感染性ブドウ膜炎、慢性網膜剥離、レーザー損傷、鎌状細胞網膜症、静脈閉塞疾患、脈絡膜新血管新生、網膜血管腫増殖 (retinal angiomatous proliferation) および特発性ポリープ状脈絡膜血管障害 (idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy) を含む。

【0147】

b. 増殖性硝子体網膜症 (PVR)

PVRは、自然発生的裂孔原性網膜剥離後および外傷性網膜剥離後に見られる。それは、網膜剥離術の失敗が主な原因である。それは、後部硝子体表面および硝子体基体上での網膜両側の細胞膜の増殖および収縮を特徴とする。眼におけるこの過剰な瘢痕組織の発生は、牽引性網膜剥離の進行をもたらし、そのために増殖性硝子体網膜症 (PVR) の予防または阻害に向けた処置は、網膜剥離の管理に関する論理的原理である。病理組織学的にPVRは、過剰なコラーゲン産生、収縮および細胞増殖を特徴とする[Michels, Retinal Detachment 2nd Edition. Wilkinsin CP, Rice TA Eds, Complicated types of retinal detachment, pp 641-771, Mosby St Louis 1997]。PVR膜において同定された細胞種は、主として網膜色素上皮細胞、繊維芽細胞、マクロファージおよび血管内皮細胞を含む[Jerdan, et al. (1989), Ophthalmology, vol 96: 801-10およびVidinova, et al. (2005), Klin Monatsbl Augenheilkd; vol 222:568-571]。この過剰な瘢痕化反応の病態生理は、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) β 、塩基性繊維芽細胞性増殖因子 (bFGF)、インターロイキン-6 (IL)-6およびインターロイキン-8 (IL)-8を含む多くのサイトカインによって媒介されることが明らかである[Nagineni, et al. (2005), J Cell Physiol, vol 203: 35-43; La Heij, et al (2002), Am J Ophthalmol, 134: 367-75; Planck, et al. (1992), Curr Eye Res; vol 11: 1031-9; Canataroglu et al. (2005) Ocul Immunol Inflamm; vol 13: 375-81およびAndrews, et al. (1999), Ophthalmol Vis Sci; vol 40: 2683-9]。これらのサイトカインの阻害は、タイミング良く与えられれば、PVRの発症を防ぐか、またはその重篤度を制限するのに役立ち得る[Akiyama, et al (2006), J Cell Physiol, vol 207:407-12およびZheng, et al (2003), Jpn J Ophthalmol, vol 47:158-65]。

【0148】

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、多面発現作用を有する生物活性リゾ脂質である。それは脈管形成促進性、炎症性 (マクロファージおよびマスト細胞の動員を刺激する) および繊維形成促進性 (瘢痕形成を刺激する) である。S1Pは一般に、細胞を刺激して増殖させ、遊走させ、抗アポトーシス性である。S1Pは、多くのサイトカインおよび増殖因子との相互作用を介してこれらの生物学的に多様な機能を達成する。モノクローナル抗体 (SPHINGOMAB) を介するS1Pの阻害は、血管内皮増殖因子 (VEGF)、bFGF、IL-6およびIL-8の機能を遮断することを示されている[Visentin, B et al. (2006), Cancer Cell, vol 9: 1-14]。また、S1PとS1P₁ 受容体との結合は、PDGF産生も増加させることができ、従って、S1Pと結合する薬剤はPDGF産生も低下させると予想される[Milstien and Spiegel (2006), Cancer Cell, vol 9:148-150]。下記の実施例で示されるように、今般、in vitroにおいて、S1PはヒトRPE細胞を、PVRで見られる種類と類似した筋繊維芽細胞様の表現型に変換することが示された。PVRにおいて見られる過剰な瘢痕化を最終的にもたらず病態生理およびこれらの同じ重要なメディエーターに対するS1Pの既知の作用を考えれば、S1Pと結合する、S1Pと拮抗する、またはS1Pの作用または産生を阻害する薬剤は、PVRの発症および眼に対するその重篤な損傷作用を排除または最小限にする点で有効であると考えられる。

【0149】

c. ブドウ膜炎.

ブドウ膜炎は、眼のブドウ膜の炎症性障害である。それは、眼の前部 (前方) または後部 (後方) またはその双方に影響し得る。それは、病因においては特発性または伝染性であって、視力を脅かす可能性がある。特発性ブドウ膜炎は、前房におけるCD4+発現の増強と関連づけられている[Calder, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 2019-24]。これらデータはまた、ブドウ膜炎の病理におけるTリンパ球およびその化学誘引物質IP-10の病理学的役割も示唆している[Abu El-Asrar (2004), Am J Ophthalmol, vol 138: 401-11]。急性前部ブドウ膜炎におけるその他のケモカインとしては、

マクロファージ炎症性タンパク質、単球走化性タンパク質-1およびIL-8が含まれる。これらのサイトカインはおそらく、急性前部ブドウ膜炎における白血球動員に重要な役割を果たしている。Verma, et al. (1997), Curr Eye Res; vol 16: 1202-8。S1Pシグナル伝達カスケードの著しい多面発現作用を考えれば、生物活性脂質の有効濃度を低下させるSPHINGOMABおよびその他の免疫部分は、ブドウ膜炎に関連する眼球内炎症を軽減または調節する有効な方法として役立つと考えられる。

【0150】

d. 屈折矯正手術.

角膜創傷治癒応答は、安全性および効力の主要な決定因子であるため、屈折矯正法に対して特に関連がある。これらの手法は、近眼、遠視および乱視の処置のために行われる。レーザーin situ角膜曲率形成術(LASIK)および光学的角膜切除術(PRK)は最も一般的な屈折矯正法であるが、合併症を克服する試みにおいてその他の方法も開発されている。これらの合併症には、とりわけ、過剰矯正、矯正不足、退行および間質角膜混濁が含まれる。多くの一般的な合併症は治療応答に関連し、手術に対する生物学的応答にその基礎を持つ。角膜の生物学における最大の挑戦の1つは、繊維形成ではなく再生による組織修復を促進することである。再生と繊維形成の間の選択は繊維芽細胞活性化の制御にあると考えられる[Stramer, et al (2003), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 44: 4237-4246およびFini (1999) Prog Retin Eye Res, vol 18: 529-551]。筋繊維芽細胞と呼ばれる細胞は、手術または損傷後1~2週間で上皮間質に出現し得る。おそらく、筋繊維芽細胞は、TGF- β の影響下にあるケラチノサイト(kerateocytes)から誘導される[Jester, et al. (2003), Exp Eye Res, vol 77: 581-592]。角膜のかすみおよび間質の瘢痕化は、角膜の透明性の低下を特徴とし、繊維芽細胞および筋繊維芽細胞生成と関連づけることができる。in situおよびin vitroにおける研究では、TGF- β およびPDGFが筋繊維芽細胞分化の刺激に重要であることが示唆されている[Folger, et al. (2001), Invest Ophthalmol Vis Sci; 42: 2534-2541]。かすみは、特定の環境下でのLASIK後の中心部の界面において言及することができる。これらには、広範囲の表層角膜炎、ドーナツ型フラップおよび界面での上皮破片の保持が含まれる。これらの各々は、上皮細胞から活性化されたケラチノサイトへのTGF- β のアクセス増と関連するようである[Netto, et al. (2005), Cornea, vol 24: 509-522]。退行は、角膜繊維芽細胞および/または筋繊維芽細胞による上皮調節増殖因子の産生増加などの、高まった上皮-間質創傷治癒の相互作用のためである可能性が最も高い[Netto, et al. (2005), 前掲]。局所的抗TGF- β 抗体を用いたTGF- β の受容体への結合の阻害は、PRKにより誘発されるかすみを軽減することが示されている[Jester, et al. (1997), Cornea, vol 16: 177-187]。それは、繊維形成過程に対する抗生物活性脂質抗体およびTGF- β の既知の作用を考えれば、かすみ、間質の瘢痕化および退行などの屈折矯正手術の合併症のいくつかを処置する助けとなると考えられる。

【0151】

e. 緑内障過手術の調節

緑内障は、従来、高い眼球内圧が視神経に損傷を引き起こし、最終的には視野および/または視力が低下する疾患であると考えられてきた。視神経損傷が正常圧の状況で起こり得る他の形態の緑内障、いわゆる「正常眼圧緑内障」も存在する。多くの患者に対して、投薬でその疾患を管理することができるが、眼内に外科的に瘻孔を作出して体液を排出させる緑内障過手術を必要とする場合もある。これは、繊維柱帯切除術、医療装置の移植またはその他の外科的介入法を介して果たすことができる。緑内障過手術は、繊維芽細胞の増殖および最終的な瘢痕化を特徴とする創傷治癒過程のために上手くいかない。5-フルオロウラシルおよびマイトマイシンCなどの代謝拮抗物質はその後の瘢痕化を軽減することができるが、これらの薬剤を用いたとしても、長期間追跡すると、外科的失敗がなお深刻な臨床的課題であることが示される[Mutsch and Grehn (2000), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; vol 238: 884-91およびFontana, et al. (2006), Ophthalmology, vol 113: 930-936]。ヒトのトノン囊繊維芽細胞の研究では、それらがbFGFおよびPDG

FおよびTGF- β を合成する能力を有すること、およびこれらの増殖因子がこの方法の失敗の一因となる緑内障手術後の組織修復過程に関わっていることを示している。Trpathi, et al. (1996), Exp Eye Res, vol 63: 339-46。また、これらの増殖因子を浸潤後の創傷応答に関連づけたさらなる研究では[Denk, et al. (2003), Curr Eye Res; vol 27: 35-44]、PDGFの様々なイソ型が緑内障手術後のトノン囊繊維芽細胞の増殖の主な刺激因子であり、一方、TGF- β はトノン囊繊維芽細胞から筋繊維芽細胞への変換に不可欠であることが結論づけられた。本発明者らは、S1Pがヒトのトノン囊／結膜の繊維芽細胞に存在すること、およびS1Pが創傷治癒応答において強く発現するということを実証した。S1Pはまた、複数の繊維芽細胞種の繊維形成促進機能および筋繊維芽細胞表現型への変換およびコラーゲン産生も刺激する。S1Pの特異的な多面発現作用およびbFGF、PDGFおよびTGF- β とのその既知の相互作用を考えれば、S1Pと結合する、S1Pに拮抗する、S1Pの作用または産生を阻害する薬剤は、緑内障手術の失敗をもたらす創傷治癒および／または繊維形成促進応答を調節するのに有効であり、首尾よい外科的成果を高める有効な治療方法であると考えられる。この薬剤は例えば硝子体内または結膜下注射により、または局所的に投与できると考えられる。

【0152】

f. 角膜移植

角膜移植（全層角膜移植（PK））は、ヒトにおいて最も成功している組織移植法である。米国では年間47,000例の角膜移植が行われるが、角膜の同種移植片拒絶は、依然として角膜移植の失敗の主因である[Ing, et al. (1998), Ophthalmology, vol 105: 1855-1865]。現在のところ、免疫抑制および免疫調節は有望なアプローチであり得るが、同種移植片拒絶を十分に回避することはできない。最近、CD4(+)T細胞が角膜同種移植片の拒絶反応においてヘルパー細胞ではなくエフェクター細胞として直接的に機能することが発見された。Hegde, et al. (2005), Transplantation, vol 79: 23-31。ネズミでの研究では、拒絶を受けている角膜の間質において好中球、マクロファージおよびマスト細胞の数の増加が示された。マクロファージが主要な浸潤細胞種であり、これにT細胞、マスト細胞および好中球が続いた。リスクの高い角膜移植における初期のケモカインの発現は、IL-8（マクロファージ炎症タンパク質-2）および単球走化性タンパク質-1（MCP-1）のマウスホモログであった[Yamagami, et al. (2005), Mol Vis, vol 11, 632-40]。

【0153】

FTY720（FTY）は、リンパ球移動を変化させることによって作用する新規な免疫抑制薬であり、末梢血リンパ球減少およびリンパ節におけるリンパ球数増加をもたらす。FTYは、リンパ球で発現したS1P受容体のいくつかと結合することによって、その免疫調節作用に介在する[Bohler, et al. (2005), Transplantation, vol 79: 492-5]。該薬剤を経口投与すると、一回の経口用量により、末梢リンパ球数を30～70%まで減少させた。FTYはT細胞サブセットのCD8(+)細胞よりもCD4(+)細胞をより減少させた。Bohler, et al. (2004), Nephrol Dial Transplant, vol 19: 702-13。FTY処置マウスは、経口投与した場合に、同所角膜移植片生着期間の有意な延長を示した。Zhang, et al. (2003), Transplantation, vol 76: 1511-3。FTY経口処置はまた、ラット対マウス角膜異種移植モデルにおける拒絶を顕著に遅延させ、その重篤度を引き下げた[Sedlakova, et al. (2005), Transplantation, vol 79, 297-303]。同種移植片拒絶の既知の病因を、S1Pシグナル伝達的作用を調節することで角膜移植片生着率を改善できることを示唆するデータを考え合わせると、生物活性脂質の有効濃度を低下させる免疫部分、例えばSPHINGOMABもまた、例えば、免疫応答を弱めることにより、同種移植片拒絶などの免疫学的症状の処置に有用であり、従って、PK後の角膜移植片生着率を改善する可能性があると考えられる。また該薬剤は、全身投与の他、局所投与、例えば局所的眼周囲送達または眼球内送達が可能であるという付加的利点も持ち得る。

【0154】

炎症または免疫成分を有する他の眼球疾患には、慢性硝子体炎、（単純ヘルペス、帯状

10

20

30

40

50

疱疹および原虫感染感染を含む) および眼球ヒストプラズマ症が含まれる。

【0155】

g. 癬痕化を特徴とする前眼部疾患

また、生物活性脂質を標的とする抗体を用いた処置は、前眼部の癬痕化を特徴とするいくつかの症状に利益を与えると考えられる。これらには下記のものが含まれる。

i. 外傷

眼の前方構造としての角膜は、物理的外傷をもたらす得る空気中のゴミから鈍的外傷にわたる様々な危険に曝されている。角膜および前眼部表面は、手術および酸やアルカリなどの化学物質の傷害による他の形態の外傷に曝される可能性もある。これらの種類の傷害の結果は壊滅的であり得、角膜および結膜の癬痕化眼球癒着(symblephera)形成をもたらすことも多い。さらに角膜の新血管新生が結果として起こり得る。好中球の蓄積、ロイコトリエンのそれらの放出、およびインターロイキン-1およびインターロイキン-6の存在は、角膜に浸潤し、タンパク質分解酵素を放出する炎症性細胞の一連の波を動員する働きをし[Sotozono, et al. (1997), Curr Eye Res, vol 19: 670-676]、さらなる角膜組織の損傷および分解ならびに角膜溶解をもたらす。さらに、角膜および結膜の繊維芽細胞が活性化され、浸潤してコラーゲン沈着および繊維症をもたらす。過剰な炎症および癬痕化の望ましくない作用は、TGF- β によって促進される。Saika, et al. (2006), Am J Pathol vol 168, 1848-60。この過程は角膜の透明性の損失および視力喪失をもたらす。好中球浸潤の低下および繊維症の低下を含む炎症の低下は、アルカリ焼けした角膜のマウスモデルにおいてより迅速かつより完全な治癒をもたらした[Ueno, et al. (2005), Ophthalmol Vis Sci, vol 46: 4097-106]。

【0156】

ii. 眼球癬痕性類天疱瘡(OCPP)

OCPPは、主として結膜を侵す慢性癬痕性(癬痕形成性)自己免疫疾患である。該疾患は常に進行性であり、予後は極めて悪い。その最終ステージにおいて、結膜の癬痕化および関連した角膜症が両眼失明をもたらす。組織学的にこの結膜は、粘膜下の癬痕化および慢性的炎症を示し、この場合、マスト細胞の関与が驚くほど大きい[Yao, et al. (2003), Ocul Immunol Inflamm, vol 11: 211-222]。自己抗原は自己抗体の形成をもたらす。自己抗原に対する自己抗体の結合は、Tリンパ球の浸潤を伴う複雑な一連の事象を始動させ、この場合には、CD4(ヘルパー)細胞はCD8(サプレッサー)細胞よりも遙かに数が多い。マクロファージおよびマスト細胞の浸潤、さらには炎症性および繊維形成促進性サイトカインの放出も結果として起こる。サイトカインにより誘発された結膜繊維芽細胞の増殖および活性化が、結果としての上皮下の繊維症とともに起こる(下記実施例参照)。研究から、OCPP患者での結膜繊維症におけるTGF- β およびIL-1の役割が示された[Razzaque, et al. (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 1174-81]。

【0157】

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

SJSおよびTENは、投薬に対する生命を脅かす副作用である。これら2つの関連症状の眼球後遺症は重篤であり、眼球および眼瞼結膜、瞼および角膜の病理学的変化を含む。薬剤および感染症が最も多い関与因子である。慢性的な眼の所見としては、癬痕化、瞼球癒着形成および初期炎症過程の結果としての結膜の癬痕形成が含まれる。これは、眼瞼内反形成、睫毛乱生症および涙液層の不安定化をもたらす。眼球表面の崩壊は、角膜の癬痕化、新血管新生および重篤な場合には角質化をもたらす。OCPPの場合と同様に、結膜の上皮下繊維症が起こる。薬剤または感染に対する活発な自己免疫リンパ球応答は、SJS/TENの発症に役割を果たすと考えられる。Harilaos, et al. (2005), Erythema Multiforme, Stevens Johnson Syndrome, and Toxic Epidermal Necrolysis, in Cornea 2nd edition. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia. SJSにおける浸潤性細胞集団は、マクロファージ、CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を含む。この細胞集団は化学損傷に見られるものと類似している。Kawasaki, et al. (2000

10

20

30

40

50

), J Ophthalmol, vol 84: 1191-3.

【0158】

i v. 翼状片

臨床上、翼状片は、眼瞼間の裂溝に存在する肉質の血管塊として見られる。翼状片本体は、肉質の繊維性血管塊である。活発な翼状片は、著しい血管充血および連続的成長を特徴とする。それらは、眼球に強固に付着する。進行した症例では、翼状片は、角膜上に侵入し、視軸内で角膜の透明性の損失または異常な乱視に次ぐ、視力喪失を引き起こし得る。症候的には、患者は、異質な身体感覚、裂傷およびぼやけた視力を経験し得る。組織病理学は、固有質の上皮下結合組織のヒアルイン化、繊維芽細胞数の増加およびマスト細胞の増加を示す。Butrus, et al. (1995), Am J Ophthalmol, vol 119: 236-237。翼状片の管理には問題が残っている。外科的切除が行われる場合が多いが、再発率は高い[Krag, et al. (1992), Acta Ophthalmol, vol 70: 530]。翼状片の再発率を引き下げる助けとす
10
ために、マイトマイシン-Cおよびダウノルビシンなどの種々の薬理学的アジュバンドが用いられている。これらは有用であり得るが、長期データは限られており、それらは角膜薄層化および角膜溶解に関わり得る。Dougherty, et al. [(1996), Cornea, vol 15: 537-540およびLee, et al. (2001)は、VEGFが翼状片の発症に重要な役割を果たし得ることを初めて実証し、翼状片の上皮組織においてVEGFおよび一酸化窒素を同定した。これらの研究者らは、これらは、他のサイトカインと同様に、翼状片に特徴的な繊維性血管の増殖を担うという仮説を立てた。原発性および再発性双方の翼状片において、塩基性FGFおよびTGF- β 1の存在が示されており[Kira, et al. (1998), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, vol 236: 702-8]、発表された形態学および免疫組織学化学的証拠は、脈管形成が翼状片の形成において役割を果たし得るという概念をさらに裏付けるものであった[Marcovich, et al (2002), Curr Eye Res, vol 25:17-22]。他の研究では、翼状片の発症に関連し得るメディエーターとしてIL-6およびIL-8ならびにVEGFを示唆した[Di Girolamo, et al. (2006), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 47: 2430-7]。翼状片の形成および成長に対する有効な薬剤は、外科的介入の必要性を低くするか、または再発率を減少させ得る。

【0159】

繊維形成、繊維症または瘢痕化成分を有する他の眼球疾患および症状としては、AMD、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、鎌状細胞網膜症、虚血性網膜症、網膜静脈閉塞性疾患およびコンタクトレンズ過剰装着を含む。

【0160】

要約すると、過剰な瘢痕化は、多くの眼球疾患および非眼球の疾患および症状の病態生理の根本的な要素である。生物活性脂質様のS1Pがこの過程において役割を果たし、これらの薬剤の濃度を減少させるための抗体関連処置は、該処置を受ける患者に対して治療的利益をもたらす可能性がある。一実施形態において、生物活性脂質の阻害剤、特にS1Pに対するモノクローナル抗体および／またはその変異体は、外科的および外傷性の創傷治療応答を調節するのに有用であると考えられる。

【0161】

繊維症、繊維形成および瘢痕形成

網膜下繊維症の形成は、光受容体への不可逆的な損傷および永久的な視力低下をもたらす。新生血管複合体が完全な状態を維持する限り、抗VEGF剤で処置された患者の場合がそうであるように、網膜下繊維症および将来的な視力喪失の可能性が残る。RANIBIZUMAB(ルセンチス(Lucentis)(登録商標))のPRONTOTM試験の最新情報では、視力を失った患者は、網膜下繊維症またはRPE裂傷のいずれかの結果としてそうなったことが見出された。繊維芽細胞浸潤およびコラーゲン沈着の程度を低減可能な薬剤は有用である。

【0162】

繊維芽細胞、特に筋繊維芽細胞は、細胞の損傷および炎症に応答した瘢痕形成における重要な細胞要素である[Tomasek, et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-6

10

20

30

40

50

3およびVirag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]。筋繊維芽細胞によるコラーゲン遺伝子の発現はリモデリングの顕著な特徴であり、瘢痕形成に必要である[Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6およびSun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]。S 1 Pは、繊維芽細胞の遊走および増殖を活性し、一方でコラーゲン産生を増強することによって創傷治癒を促進する[Sun, et al. (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]。損傷細胞によって局所的に産生されたS 1 Pは、リモデリングおよび瘢痕形成に関連する不適応な創傷治癒を担い得る。よって、S 1 P阻害剤は、少なくとも部分的に、異常な繊維形成または繊維症を特徴とする疾患または症状に有用であると考えられる。

【0163】

網膜下繊維症の形成は、光受容体への不可逆的な損傷および永久的な視力低下をもたらす。新生血管複合体が完全な状態を維持する限り、抗VEGF剤で処置された患者の場合がそうであるように、網膜下繊維症および将来的な視力喪失の可能性が残る。

【0164】

S 1 Pの中和による不適応な瘢痕形成の最小化は有益であり、網膜下繊維症およびそれに続く光受容器の損傷の程度を制限することにより、視力の不可逆的低下を防ぐ。S 1 Pが滲出性AMDに関連する不適応な網膜リモデリングの初期および後期ステージの双方に関与し得ることを示唆する証拠が増えている。S 1 Pは著しい非VEGF依存性脈管形成促進作用を有する。S 1 Pはまた、滲出性AMDおよび他の眼球障害の複数の不適応なプロセス(関与する)の遊走、増殖および生存も刺激する。S 1 Pは、VEGF、bFGF、PDGFおよび滲出性AMDの病理に関与するその他の増殖因子(GF)の酸性および活性化に関連する。最後に、S 1 Pは、抗脈管形成薬に対する感受性の低下をもたらす過程である新生血管の成熟を調節し得る。S 1 Pの作用を阻害することは、もっぱら抗VEGFアプローチにまさる有意な利点を与え得るか、または最終的にAMDに関連する視力喪失をもたらす複雑な過程および複数のステップに取り組むためにそれらと相乗作用し得る滲出性AMDに対する有効な治療的処置であり得る。

【0165】

AMDに対する現行の好ましい治療モダリティとしてはルセンチス(登録商標)およびオフラベル使用のアバスタチン(Avastin)(登録商標)(Genentech, Inc.)が含まれ、双方とも単一の増殖因子(VEGF-A)を標的とし、実際の脈絡膜新生血管(CNV)病変は著しくは退縮しないので、網膜下および網膜内浮腫の消散をもたらす抗透過性作用を介してそれらの有益な効果の大部分を発揮するようである。しかしながら、滲出性AMDに関連する視力喪失はCNVにより誘発される網膜下および網膜内浮腫によるだけではない。CNV、網膜下繊維症、浮腫および炎症が一緒になって引き起こす網膜および網膜下構造の病理学的な破壊およびリモデリングはAMDに関連する視力の喪失をもたらす。これらの複数の原因は、ルセンチス(登録商標)を含む利用可能な処置によって取り組まれていない。従って、視力喪失を引き起こす複数の機構を処置することができる治療薬は、単剤療法として、または抗VEGF剤(例えば、ルセンチス(登録商標)またはアバスタチン(登録商標))との組合せで大きな価値がある。

【0166】

よって、特定の理論に縛られるものではないが、S 1 Pなどの望ましくないスフィンゴ脂質および/または1以上のそれらの代謝産物のレベルが、不適切な炎症、繊維症および/または脈管形成が疾患の病因に関与する種々の眼球疾患および症状の発症に原因であるか、または関与すると考えられる。抗S 1 P抗体が臨床上有用である可能性のある眼の疾患および症状としては、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、PVR、前眼部疾患および加齢性黄斑浮腫、緑内障の柵状膜切除術または弁移植などの術後のウェット型とドライ型の双方が含まれる。

【0167】

硬皮症の処置のための抗S 1 P抗体

本発明の組成物および方法は、少なくとも部分的に、異常な新血管新生、脈管形成、繊

10

20

30

40

50

維形成、線維症、癍痕化、炎症および免疫応答を特徴とする障害および疾患の処置において有用である。このような疾患の1つが硬皮症であり、全身性硬化症とも呼ばれる。

【0168】

硬皮症は、皮膚の癍痕化または肥厚を引き起こし、時には、肺、心臓および／または腎臓を含む他の身体領域も含む自己免疫疾患である。硬皮症は、身体の皮膚および臓器において、関連領域の肥厚および硬化をもたらし、結果として機能低下を伴い得る癍痕組織の形成（線維症）を特徴とする。今日、硬皮症財団によれば、約300,000人のアメリカ人が硬皮症を有する。罹患している3分の1またはそれ以下の者は広範囲の疾患を有し、残りの3分の2は主に皮膚疾患を有する。該疾患が肺に作用して癍痕化を引き起こす場合には、このような肺はもはやあるべきような拡張ができないことから、呼吸が制限されるようになり得る。呼吸の能力を測定するために、医師は強制肺活量（FVC）を評価する装置を用いる。予測値の50パーセント未満のFVCを有する人々において、硬皮症に関連した肺疾患からの10年間の死亡率は約42パーセントである。死亡率が非常に高い1つの理由は、現在利用できる有効な処置がないためである。

10

【0169】

特定の理論に縛られるものではないが、S1Pなどの脂質および／またはその代謝産物の不適切な濃度は硬皮症を引き起こす、またはその発症に関与すると考えられる。本発明の組成物および方法はそれ自体、特に、例えばS1Pなどの特定の標的脂質の有効in vivo濃度を低下させることによって硬皮症の処置に使用することができる。

20

【0170】

本願の他所に記載されているように、S1Pが、繊維芽細胞の活性化、増殖およびその結果としての不適応な癍痕化およびリモデリングと関連する繊維芽細胞の活性の増強に寄与し得る繊維形成促進性増殖因子であることを示す証拠が存在する。S1Pの生物活性を抗S1P剤（例えば、抗S1P mAb）で遮断すると、PDGFおよびTGF- β の硬化促進作用を間接的に緩和することができると考えられる。さらに、このような抗S1P剤による処置は、皮膚および疾患の進行に関与する他の形態の繊維芽細胞に対するS1Pの直接的作用を緩和することによって硬皮症患者に有益であり得た。

【0171】

心血管および脳血管障害

特定の理論に縛られるものではないが、CER、SPHまたはS1Pおよび／または1以上のそれらの代謝産物といった望ましくないスフィンゴ脂質のレベルは、心臓機能不全、再灌流傷害およびその結果としての心臓リモデリングおよび心不全などの心虚血の際またはその後、心臓機能不全の直接的原因となり得る。

30

【0172】

S1Pなどのスフィンゴ脂質は肝臓組織の繊維形成および創傷治癒(Davaille, et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000; Ikeda, et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279:G304-G310, 2000)、受傷した血管系の治癒(Lee, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000)、ならびに癌、脈管形成および炎症などのような疾患に関連するその他の病状または事象(Pyne, et al., Biochem. J. 349:385-402, 2000)に関連することから、本開示の組成物および方法は、これらの疾患だけでなく心臓疾患の処置にも適用可能である。

40

【0173】

このことは、心臓またはその他の非脳起源のスフィンゴ脂質が脳卒中に関与することを示唆する。結局のところ、スフィンゴ脂質の産生および／または作用の妨害は、脳卒中、特に、末梢血管疾患、アテローム性動脈硬化症および心臓障害によって引き起こされる脳卒中の緩和に有益であり得る。最近の証拠としては、外的に投与されたS1Pは血液脳関門を通過し、脳血管収縮を促進することが示唆されている(Tosaka, et al., Stroke 32: 2913-2919, 2001)。

【0174】

心虚血の過程における初期事象（すなわち、心臓への血液供給に欠如）は、天然化合物

50

スフィンゴの心筋による過剰生産であること、およびその他の代謝産物、特に、S 1 Pも心臓組織自体か、または心臓のスフィンゴ脂質生産と、それに続く血中での変換に結果としての血液成分のいずれかによって産生される。本発明は、S 1 Pをヒト化モノクローナル抗体で中和する方法を提供する。よって、本発明はヒト化抗スフィンゴ脂質抗体および関連組成物ならびに鍵となるスフィンゴ脂質S 1 Pの血液および組織レベルを低下させる方法を提供する。このような抗体は例えば全血中の望ましくないスフィンゴ脂質と結合し、その有効濃度を低下させるのに有用である。

【0175】

本発明の治療方法および組成物は、これらの療法がある特定の望ましくない、有毒な、または心臓毒性のスフィンゴ脂質の相対的濃度、絶対濃度または利用可能な濃度を変化させ得ることを示すために「スフィンゴ脂質に基づく」と言われる。「有毒なスフィンゴ脂質」とは、細胞の壊死および／またはアポトーシスを引き起こす、または増強する、またはそうでなければ、場合によっては特定の組織または器官に見られる特定の細胞種を含む、器官または組織の機能を損なう（例えば、過剰な繊維症による）可能性のあるいずれのスフィンゴ脂質も指す。「心臓毒性スフィンゴ脂質」は、不適応な瘢痕化（繊維形成）によって心不全を直接的または間接的に引き起こし、心臓に見られる、または心臓に関連する細胞（限定されるものではないが、心筋細胞、心臓ニューロンなどを含む）の陰性変力状態を引き起こすか、それらの壊死および／またはアポトーシスを引き起こす、もしくは増強し、かつ／またはスフィンゴ脂質および／またはそれらの代謝産物の陰性変力的律動的冠動脈血管収縮／痙攣作用によって心機能の低下を引き起こし得る有毒なスフィンゴ脂質である。「望ましくないスフィンゴ脂質」としては、有毒および心臓毒性スフィンゴ脂質、ならびに有毒および心臓毒性スフィンゴ脂質の代謝産物、特に、代謝前駆体を含む。特に注目される望ましくない、心臓毒性および／または有毒スフィンゴ脂質としては、限定されるものではないが、セラミド（CER）、セラミンドー１ーリン酸（C1P）、スフィンゴー１ーリン酸（S-1-P）、ジヒドロ-S 1 P（DHS 1 P）、スフィンゴシルホスホリルコリン（SPC）、スフィンゴ（SPH；D（+）-エリスロー２-アミノ-４-トランス-オクタデセン-1，3-ジオール、またはスフィンガニン）および種々の代謝産物が含まれる。

【0176】

低酸素症および再酸素化に対する心筋細胞の最も早い応答の１つは、中性スフィンゴミエリナーゼの活性化とセラミドの蓄積であることが知られている。Hernandez, et al. (2000), Circ. Res. 86:198-204, 2000。SPHは様々な細胞種のアポトーシス細胞死において初期のシグナル伝達事象を媒介するとして物議を醸してきた(Ohta, et al., FEBS Letters 355:267-270, 1994; Ohta, et al., Cancer Res. 55:691-697, 1995; Cuvillier, et al., Nature 381:800-803, 1996)。低酸素症の心臓毒性作用は、１つには、心機能に悪影響を及ぼすスフィンゴ脂質の産生および／または他の代謝産物（例えば、プロトン、カルシウムおよびある種のフリーラジカル）またはシグナル伝達分子（例えば、MAPキナーゼ、カスパーゼ）の不適切な産生から起こり得る。

【0177】

S 1 Pは血小板に保存され、ヒト血漿および血清の通常の構成要素である(Yatomi, et al., J. Biochem. 121:969-973, 1997)。S 1 Pは冠動脈血管収縮薬であり、イヌ心臓においてその他の生物作用を持つ。Sugiyama, et al. (2000), Cardiovascular Res. 46:119-125。アテローム性動脈硬化症におけるS 1 Pの役割には仮説がある(Siess, et al., IUBMB Life 49:161-171, 2000)。これは、HDLの保護作用がS 1 P産生の遮断によるものであるという証拠を含む他のデータによっても裏付けられている(Xia, et al., PNAS 95:14196-14201, 1998; Xia, et al., J Biol Chem 274:33143-33147, 1999)。

【0178】

低酸素症下にある実験動物においてセラミドの代謝前駆体であるスフィンゴミエリンが上昇していることが報告されている(Sergeev, et al., Kosm. Biol. Aviakosm. Med. (Russian) 15:71-74, 1981)。他の研究では、筋細胞の内膜が高い含量のSPHおよびスフィ

10

20

30

40

50

ンゴミエリンを含んでいるという報告がある(Sumnicht, et al., Arch. Biochem. Biophys. 215:628-637, 1982; Sabbadini, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:752-758, 1993)。実験動物をフモニシンB真菌毒素で処置すると、S P HおよびD H S P Hの血清レベルが上昇し(S 1 Pは測定されなかった)、心臓に対する陰性変力作用を伴う(Smith, et al., Toxicological Sciences 56:240-249, 2000)。

【0179】

他の疾患または症状

新血管新生、脈管形成、異常な繊維形成、繊維症および癒痕化、ならびに炎症および免疫応答を含む多くのプロセスにおいて生物活性脂質シグナル伝達が関与するため、これらの1以上のプロセスに関連する多様な疾患および症状において、これらの生物活性脂質の阻害剤は有用であると考えられる。このような疾患および症状は、全身（例えば、全身性硬皮症）であるか、または1以上の特定の身体系、身体部分または器官（例えば、皮膚、肺、心血管系または眼）に局在し得る。

【0180】

患者において望ましくないスフィンゴ脂質の量を制御するための1つの方法は、1以上のスフィンゴ脂質に結合し、それにより遊離型の望ましくないスフィンゴ脂質のレベルを低下させる治療「スポンジ」として作用させる1以上のヒト化抗スフィンゴ脂質抗体を含む組成物を提供することによる。化合物を「遊離型」とであるとする場合、その化合物は、その望ましくない作用を発揮する部位に到達することを制限する手段が何もない。一般に、遊離化合物はその遊離化合物の作用部位であるか、または作用部位を含むか、あるいは化合物がそこから作用部位へ自由に遊走可能な血液および組織中に存在する。遊離化合物はまた、その化合物を望ましくない化合物に変換する酵素によって作用されるべく、利用され得る。

【0181】

特定の理論に縛られるものではないが、S P HまたはS 1 Pなどの望ましくないスフィンゴ脂質および／またはそれらの1以上の代謝産物のレベルは心臓および心筋疾患および障害を引き起こすか、またはその発症に関与すると考えられる。

【0182】

スフィンゴ脂質は肝臓組織の繊維形成および創傷治癒 (Davaille, et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000; Ikeda, et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279:G304-G310, 2000)、受傷した血管系の治癒(Lee, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000)および他の病態または障害、あるいは癌、脈管形成、過剰な繊維症および炎症に関連する種々の眼球疾患などの疾患または障害に関連した事象にも関与することから、本開示の組成物および方法はこれらの疾患および障害ならびに心臓および心筋疾患および障害の処置に適用することができる。

【0183】

スフィンゴ脂質に基づく療法の1つの形態としては、望ましくない有毒スフィンゴ脂質の実際の、相対的なおよび／または利用可能なin vivo濃度を低下させるためにスフィンゴ脂質の代謝経路を操作することを含む。本発明は、ヒト化抗スフィンゴ脂質抗体を患者に投与して望ましくない有毒なスフィンゴ脂質またはその代謝産物と結合させる、疾患、障害または物理的外傷を治療または予防するための組成物および方法を提供する。

【0184】

このようなヒト化抗スフィンゴ脂質抗体は、疾患、障害または物理的外傷の処置を含む多様な目的で有用な医薬組成物として製剤化することができる。本発明の1以上のヒト化抗スフィンゴ脂質抗体を含む医薬組成物は、このような処置のためのキットおよび医療デバイス中に組み込むこともできる。医療デバイスは、本発明の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与するために使用可能であり、本発明の一実施形態によれば、このようなデバイスを含むキットが提供される。このようなデバイスおよびキットは、本発明の医薬組成物の自己投与を含む通常の投与向けにデザイン可能である。このようなデバイスおよびキットはまた、例えば、救急または応急室、手術中、または損傷の可能性があるが、十

分な医学的留意をすぐには使えない活動（例えば、ハイキングおよびキャンプまたは戦闘状態）における応急使用向けにデザインすることもできる。

【0185】

投与方法

本明細書に記載されている疾患および症状の処置は、種々の製剤およびデバイスを用いる様々な経路によって本発明の薬剤および組成物を投与することにより行うことができる。好適な薬学上許容される希釈剤、担体および賦形剤は当技術分野でよく知られている。当業者ならば、任意の特定の処置プロトコールのために投与すべき量は容易に決定できるとことが分かるであろう。好適な量は、 $10\text{ }\mu\text{g}$ ／用量～ 10 g ／用量の範囲内、好ましくは 10 mg ／用量～ 1 g ／用量の範囲内にある。

10

【0186】

薬剤物質は、限定されるものではないが全身、皮下、皮内、粘膜（吸入によるものを含む）および局所投与を含む当技術分野で既知の技術によって投与することができる。粘膜は、身体の内腔をつなぐ上皮組織を指す。例えば、粘膜は、口、食道、胃、腸および肛門を含む消化管；鼻腔、気管、気管支および肺を含む気道；および性器を含む。本明細書の目的では、粘膜には、眼の外表面、すなわち角膜および結膜も含まれる。本アプローチは潜在的な全身性副作用を制限でき、治療効果もなお認められるので、局所投与（全身投与に対して）が有利であり得る。

【0187】

本発明において用いられる医薬組成物は、限定されるものではないが、溶液、エマルションおよびリポソーム含有製剤を含む。これらの組成物は、限定されるものではないが、既製の液体、自己乳化固体および自己乳化半固体を含む多様な成分から調製することができる。

20

【0188】

本発明において用いられる医薬製剤は、製薬業で周知の従来技術に従って調製することができる。このような技術には、有効成分を医薬担体または賦形剤と会合させるステップを含む。好ましい担体は、特に該組成物がヒトの治療的使用を意図したものである場合には、薬学上許容されるものを含む。非ヒト治療適用（例えば、愛玩動物、家畜、魚または家禽の処置）では、獣医学上許容される担体も使用することができる。一般に、該製剤は、有効成分を液体担体または微粉固体担体または双方と、均一かつ緊密に会合させた後、必要であればその生成物を成形することによって調製される。

30

【0189】

本発明の組成物は、限定されるものではないが、錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤および浣腸などの多くの可能な投与形のいずれかへ製剤化することができる。また、本発明の組成物は、水性、非水性または混合媒体中の懸濁液として製剤化することもできる。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランを含む懸濁液の粘度を高める物質をさらに含有し得る。該懸濁液はまた安定剤を含んでもよい。

【0190】

一実施形態では、該医薬組成物は、泡沫として製剤化および使用することができる。医薬泡沫は、限定されるものではないが、エマルション、ミクロエマルシン、クリーム、ゼリーおよびリポソームなどの製剤を含む。

40

【0191】

基本的には天然と同様に、これらの製剤は最終生成物の成分およびコンシステンシーにおいて様々である。このような組成物および製剤の調製に対するノウハウは、製薬および調剤分野の技術者には一般に知られており、本発明の組成物の製剤に適用することができる。

【0192】

一実施形態において、免疫誘導部分は、例えば、局所用点滴剤または軟膏、眼周囲の注射を介して眼へ、体腔内的に前房または硝子体中へ、埋め込みデポ剤を介して、または

50

全身的に注射もしくは経口投与により送達することができる。抗体の使用量は当業者によって容易に決定することができる。

【0193】

治療薬を眼へ送達する従来のアプローチとしては、局所適用、全身投与後の眼への再分布または直接的な眼球内／眼周囲の注射が含まれる[Sultana, et al. (2006), Current Drug Delivery, vol 3: 207-217; Ghate and Edelhauser (2006), Expert Opinion, vol 3: 275-287; および Kaur and Kanwar (2002), Drug Develop Industrial Pharmacy, vol 28: 473-493]。抗 S 1 P または他の抗生物活性脂質抗体治療薬は、これらのいずれの方法とも併用可能であるが、全て、利点と欠点がある程度認識されている。局所点滴剤は便利であるが、主として前眼部へは適用した薬剤の 5 % 未満、後眼部へはその用量のさらに少ない部分しか送達できないことが多い鼻涙排液のために洗い流される。点滴剤に加え、スプレー剤は、局所投与のための別の様式を与える。3 つめの様式は、製剤と眼球表面との接触時間を長くするために使用され得る眼用軟膏またはエマルションであるが、視野のぼやけ、瞼のもつれが問題となり得る。眼球障害を処置するための治療剤の全身投与は、全身を薬剤の潜在毒性に曝すおそれがあるので、このような局所的アプローチが依然として好ましい。

10

【0194】

加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症、後部ブドウ膜炎および緑内障が米国および他の先進国で視力喪失の主因であるため、後眼部の処置は医学上重要である。Myles, et al. (2005), Adv Drug Deliv Rev; 57: 2063-79。後眼部への薬剤送達の最も有効な様式は、扁平部を介した硝子体内注射である。しかしながら、直接的注射は、該送達を達成するために熟練した医療従事者を必要とし、多くの患者において処置を制限する懸念が生じる。眼周囲注射、すなわち結膜下、眼球裏、眼球周辺および後部テノン嚢下注射を含むアプローチは、硝子体内注射よりもいくぶん侵入性が小さい。反復的および長期の硝子体内注射は硝子体出血、網膜剥離または眼内炎などの合併症を引き起こし得る。

20

【0195】

抗生物活性脂質抗体処置は、より新しい眼球送達系の 1 つを用いて行ってもよく[Sultana, et al. (2006), Current Drug Delivery, vol 3: 207-217; および Ghate and Edelhauser (2006), Expert Opinion, vol 3: 275-287]、これには (a) 眼球インサート (可溶性、浸食性、非浸食性またはヒドロゲル系)、角膜シールド、例えば、眼に対する薬剤の制御送達を提供するコラーゲンに基づく眼帯およびコンタクトレンズ、(b) 眼内でゲル形態に変換される点滴剤として投与の簡易性を提供し、これにより眼内の薬剤のある程度の徐放効果を提供する in situ ゲル化系、(c) 標的化送達、生体適合性および視力のぼやけがないという利点を提供するリポソーム、ニオソーム(niosomes)／ディスコーム(discosomes)などの小胞系、(d) 眼内への良好な保持を提供する粘膜付着系、(e) プロドラッグ、(f) 浸透促進剤、(g) 凍結乾燥担体系、(h) 微粒子、(i) サブミクロンエマルション、(j) イオン泳動、(k) デンドリマー、(l) 生体接着性マイクロスフェアを含むマイクロスフェア、(m) ナノスフェアおよび他のナノ粒子、(n) コラソーム(collasome)および(o) 相加的またはさらには相乗的な、有益な効果を提供するために 1 以上の上術の系を組み合わせる薬剤送達系などの徐放性または制御放出系が含まれる。これらのアプローチの大部分は、前眼部を標的とし、前眼部の疾患を標的とするのに有効であり得る。しかしながら、比較的分子量の脂質は眼内での脂質のかんりの移動を許容するようであるので、これらの 1 以上のアプローチは後眼部の生物活性脂質の濃度に影響を与えるのにもやはり有用であり得る。さらに、前眼部に導入された抗体も、Fab フラグメントなどのより低分子量の抗体変異体で製造されれば、眼全域に遊走することができる可能性がある。認可されたものや開発中のものなど (前掲の参考文献を参照)、後眼部に対する徐放性薬剤送達系も使用可能である。

30

40

【0196】

従前に述べたように、後部網膜、脈絡膜および黄斑の疾患の処置は、医学上極めて重要である。これに関して、経強膜的イオン泳動[Eljarrat-Binstock and Domb (2006), Cont

50

rol Release, 110: 479-89]は重要な前進であり、後眼部に抗体を送達する効果的な方法を提供し得る。

【0197】

また、療法の性能を改良するために製剤化した抗体に添加することができる様々な賦形剤は、この療法をより便利にするか、または製剤化した抗体がその意図し、認可された目的のためにのみ使用されることを明らかに保証する。賦形剤の例としては、pHを制御する化学物質、抗菌薬、抗体効力の失効を防ぐための保存剤、眼球使用専用の製剤であることを識別するための染料、製剤中の抗体の濃度を高めるための可溶化剤、浸透促進剤および浸透圧および／または粘度を調節するための薬剤の使用が挙げられる。例えばプロテアーゼの阻害剤は、抗体の半減期を延長するために加えることができる。一実施形態では、抗体は、眼に好適なpHでリン塩緩衝生理食塩水を含む溶液として硝子体内注射によって眼に送達される。

【0198】

また、抗S1P剤（例えば、ヒト化抗体）は、従前に上記した製剤またはデバイスの1つで投与されるプロドラッグが得られるように化学的に修飾することもできる。その後、内在酵素の作用によって活性型の抗体が放出される。本願で考えられる、可能性のある眼球酵素としては、種々のシトクロムp450、アルデヒドレダクターゼ、ケトンレダクターゼ、エステラーゼまたはN-アセチル-β-グルコサミダーゼである。抗体に対する他の化学修飾はその分子量を増加させ、結果として眼における抗体の滞留時間を延長することができる。このような化学修飾の例としては、ジスルフィド[Shaunak, et al. (2006), Nat Chem Biol ; 2:312-3]またはチオール[Doherty, et al. (2005), Bioconjug Chem; 16: 1291-8]などの官能基に一般的または特異的であり得るがある。

【0199】

本明細書の以下の例は、スフィンゴ脂質に対する強力な結合親和性を含む、治療の観点から望ましい特性を有するヒト化および変異体抗スフィンゴ脂質抗体の産生を記載する。特に、本発明はS1Pおよびその変異体について記載され、スフィンゴ-1-リン酸[スフィンゲン-1-リン酸として定義されるS1P自体；D-エリスロースフィンゴ-1-リン酸；スフィンゴ-4-エニン-1-リン酸；(E, 2S, 3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-オクタデク-4-エノキシ]ホスホン酸(AS26993-30-6)、DHS1Pはジヒドロスフィンゴ-1-リン酸[スフィンガニン-1-リン酸と定義される；[(2S, 3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-オクタデクオキシ]ホスホン酸；D-エリスロージヒドロ-D-スフィンゴ-1-リン酸(CAS19794-97-9)；SPCはスフィンゴシルホスホリルコリン、リゾスフィンゴミエリン、スフィンゴシルホスホコリン、スフィンゴホスホリルコリン、エタンアミニウムである；2-(((2-アミノ-3-ヒドロキシ-4-オクタデセニル)オキシ)ヒドロキシホスフィニル)オキシ)-N, N, N-トリメチル-, クロリド、(R-(R*, S*(E)))、2-[[(E, 2R, 3S)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-オクタデク-4-エノキシ]-ヒドロキシ-ホスホリル]オキシエチル-トリメチル-アザニウムクロリド(CAS10216-23-6)を含み得る。

【0200】

抗体の作製と同定

抗体親和性は本明細書の下記の実施例に記載されるように求めることができる。好ましいヒト化または変異体抗体は約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、最も好ましくは約 5×10^{-9} M以下の K_d 値でスフィンゴ脂質と結合するものである。

【0201】

スフィンゴ脂質に対して強い結合親和性を有する抗体の他、治療の観点から他の有益な特性を有するヒト化または変異体抗体を選択することも望ましい。例えば、該抗体は、脈管形成を低下させ、腫瘍進行を変化させるものであり得る。好ましくは、該抗体は、直接結合ELISAアッセイにて測定した場合に約 $10 \mu\text{g/ml}$ 以下、好ましくは約 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下、最も好ましくは約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下の有効濃度(EC50)値を有す

る。好ましくは、該抗体は、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のS1Pの存在下での細胞アッセイで測定した場合に約 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、最も好ましくは約 $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の有効濃度値を有し、例えば、これらの濃度で該抗体はin vitroにおけるスフィンゴ脂質により誘発されたIL-8の放出を少なくとも10%阻害することができる。好ましくは、該抗体は、レーザー火傷後のCNV動物モデルにて測定した場合に約 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、最も好ましくは約 $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の有効濃度値を有し、例えば、これらの濃度で該抗体はin vivoにおいてスフィンゴ脂質により誘発された新血管新生を少なくとも50%阻害することができる。

【0202】

本発明の抗スフィンゴ脂質抗体の活性を測定するためのアッセイとしては、以下の実施例に示されるようなELISAアッセイが含まれる。

【0203】

好ましくは、該ヒト化または変異体抗体は、治療上有効な量の抗体をヒト患者に投与した際に、免疫応答を惹起することができない。免疫応答が惹起される場合、好ましくはこの応答は、その抗体がそれで処置された患者になお治療利益を与えるようなものである。

【0204】

本発明の一実施形態によれば、ヒト化抗スフィンゴ脂質抗体は本明細書で定義されたような「エピトープ」と結合する。着目する抗体が結合するスフィンゴ脂質上のエピトープと結合する抗体（例えば、スフィンゴ脂質に対する抗体の結合を遮断するもの）をスクリーニングするため、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているものなどの慣例の交叉遮断アッセイを行うことができる。あるいは、例えばChampe, et al. [J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)]に記載されているようなエピトープマッピングを行って、その抗体が着目するエピトープと結合するかどうかを決定することができる。

【0205】

本発明の抗体は、式：FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4（式中、「FR1-4」は4つのフレームワーク領域を表し、「CDRH1-3」は抗スフィンゴ脂質抗体重鎖可変ドメインの3つの超可変領域を表す。FR1-4は、下記の例のように「コンセンサス配列」（例えば、ヒト免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のクラス、サブクラスまたはサブグループの最も共通したアミノ酸）に由来してもよく、または個々のヒト抗体フレームワーク領域もしくは異なるフレームワーク領域配列の組合せに由来してもよい。多くのヒト抗体フレームワーク領域配列は、例えばKabat, et al.（前掲）に編集されている。一実施形態では、重鎖可変FRはKabat, et al.（前掲）が編集しているように、ヒト免疫グロブリンサブグループのコンセンサス配列により提供される。好ましくは、ヒト免疫グロブリンサブグループはヒト重鎖サブグループIII（例えば、配列番号16）である。

【0206】

ヒト重鎖可変FR配列は好ましくはその中に1以上の置換を有し、例えば、ヒトFR残基が対応する非ヒト残基により（「対応する非ヒト残基」とは、ヒトおよび非ヒト配列がアラインされた際に着目するヒト残基と同じKabatの位置ナンバリングを有する非ヒト残基を意味するが、非ヒト残基での置換は必ずしも必要ではない。例えば、対応する非ヒト残基以外の置換FR残基をファージディスプレイにより選択することができる。置換可能な重鎖可変FR残基の例としては、FR残基番号：37H、49H、67H、69H、71H、73H、75H、76H、78Hおよび94H（ここではKabatの残基ナンバリングを用いる）のいずれか1以上が含まれる。好ましくは、これらの残基のうち少なくとも2つ、または少なくとも3つ、または少なくとも4つが置換される。FR置換の特に好ましい組合せは、49H、69H、71H、73H、76H、78Hおよび94Hである。重鎖超可変領域については、これらは好ましくは下表2に挙げられているアミノ酸配列を有する。

【0207】

本明細書における好ましい実施形態の抗体は、式：FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4（式中、「FR1-4」は4つのフレームワーク領域を表し、「CDRL1-3」は抗スフィンゴ脂質抗体重鎖可変ドメインの3つの超可変領域を表す）で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する。FR1-4は、下記の例のように「コンセンサス配列」（例えば、ヒト免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のクラス、サブクラスまたはサブグループの最も共通したアミノ酸）に由来してもよく、または個々のヒト抗体フレームワーク領域もしくは異なるフレームワーク領域配列の組合せに由来してもよい。一実施形態では、重鎖可変FRはKabat, et al.（前掲）が編集しているように、ヒト免疫グロブリンサブグループのコンセンサス配列により提供される。好ましくは、ヒト免疫グロブリンサブグループはヒトκ軽鎖サブグループI（例えば、配列番号17）である。

10

【0208】

ヒト軽鎖可変FR配列は好ましくはその中に置換を有し、例えば、ヒトFR残基が対応するマウス残基により置換されるが、非ヒト残基での置換は必ずしも必要ではない。例えば、対応する非ヒト残基以外の置換FR残基をファージディスプレイにより選択することができる。置換可能な軽鎖可変FR残基の例としては、限定されるものではないがF4、Y36、Y49、G64、S67を含むいずれか1以上のFR残基番号が含まれる。

【0209】

CDRについては、これらは好ましくは下表2に挙げられているアミノ酸配列を有する。

20

【0210】

本明細書で着目されるヒト化抗スフィンゴ脂質抗体の作製方法は以下にさらに詳しく述べられる。

【0211】

A. 抗体の調製

非ヒト抗スフィンゴ脂質抗体をヒト化し、抗スフィンゴ脂質抗体の変異体を作製する方法は以下の実施例に記載されている。抗スフィンゴ脂質抗体をヒト化するため、非ヒト抗体出発材料を調製する。変異体を作製する場合には、親抗体を作製する。このような非ヒト抗体出発材料および親抗体を作製する技術例を以下の節に示す。

【0212】

30

(i) 抗原の調製

抗体の調製に用いるスフィンゴ脂質抗原は、例えば完全なスフィンゴ脂質またはスフィンゴ脂質の一部（例えば、「エピトープ」を含むスフィンゴ脂質のフラグメント）であってよい。抗体の作製に有用な他の形態の抗原は当業者には明らかである。抗体の作製に用いられるスフィンゴ脂質抗原は以下に実施例に記載されている。一実施形態では、該抗原はスフィンゴ脂質の誘導体形態であり、担体タンパク質を伴ってもよい。

【0213】

(i i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は好ましくは、関連抗原とアジュバントの複数回の皮下（s c）または腹腔内（i p）注射によって動物で作製される。関連抗原と、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、ウシチログロブリンまたは大豆トリプシン阻害剤などの、免疫される種において免疫原性のあるタンパク質を、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コンジュゲーション）、N-ヒドロキC I Sクシンイミド（リシン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂、またはR¹N=C=NR（式中、RおよびR¹は異なるアルキル基である）を用いてコンジュゲートさせることが有用であり得る。

40

【0214】

動物を、例えば、100 μgまたは5 μgのタンパク質またはコンジュゲート（例えば、それぞれウサギまたはマウス）と3倍容のフロイントの完全アジュバントと合わせ、この溶液を複数の部位に皮内注射することにより、抗原、免疫原性コンジュゲートまたは誘

50

導体に対して免疫する。1か月後、動物に最初の量の0.1～0.2倍のフロイントの完全アジュバント(Freund's complete adjuvant)中ペプチドまたはコンジュゲートで、複数部位に皮下注射することにより追加抗原刺激を行う。7～14日後、動物を放血させ、血清の抗体力価をアッセイする。力価が平衡に達するまで動物に追加抗原刺激を行う。好ましくは、動物を同じ抗原のコンジュゲートで追加抗原刺激するが、異なるタンパク質に、かつ／または異なる架橋試薬を介してコンジュゲートする。また、コンジュゲートは、タンパク質融合物として組換え細胞培養でも作製することができる。また、免疫応答を増強するために、ミョウバンなどの凝集剤を適宜使用することができる。

【0215】

(iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler, et al., Nature, 256:495 (1975)により初めて記載されたハイブリドーマ法を用い、または組換えDNA法を含む他の好適な方法（例えば、米国特許第4,816,567号参照）によって作製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、またはハムスターもしくはマカクザルなどの他の適当な宿主動物が、上記のように、免疫に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、または産生し得るリンパ球を惹起するように免疫される。あるいは、リンパ球をin vitroで免疫してもよい。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。

【0216】

このようにして作製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは融合していない親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1以上の物質を含む好適な培養培地に播種し、増殖させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRRT)を欠く場合には、ハイブリドーマの培養培地は一般に、HGPRT欠損細胞の増殖を阻害する物質であるヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む(HAT培地)。

【0217】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、HAT培地などの培地に感受性のあるものである。これらの中で、好ましい骨髓腫細胞系統は、the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USAから入手可能なMOP-21およびM.C.-11マウス腫瘍、ならびにSP-2またはX63-Ag8-653細胞に由来するものなどのネズミ骨髓腫系統である。また、ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞系統も、ヒトモノクローナル抗体の産生のために記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0218】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生に関してアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などの免疫沈降またはin vitro結合アッセイにより判定する。

【0219】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Scatchard analysis of Munson, et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)によって判定することができる。

【0220】

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性および／または活性の抗体を産生することが確認された後、クローンを制限希釈法によってサブクローニングし、標準的な方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))により増殖させることができる。この目的で好適な培養培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞を動物

10

20

30

40

50

の腹水腫瘍としてin vivoで増殖させることができる。

【0221】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、Aタンパク質—セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーなどの通常の免疫グロブリン精製手順によって培養培地、腹水または血清から適宜分離される。

【0222】

モノクローナル抗体をコードするDNAは通常の手順（例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）を用いて容易に単離および配列決定される。ハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一度単離されれば、そのDNAは発現ベクターに入れることができ、次にこれを、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、シミアン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へトランスフェクトし、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得る。抗体の組換え生産は以下に詳しく記載する。

【0223】

(iv) ヒト化およびアミノ酸配列変異体

下記の実施例12は、抗スフィンゴ脂質抗体のヒト化のための手順が記載している。ヒト化の一般法は例えば、US5861155、US19960652558、US6479284、US20000660169、US6407213、US19930146206、US6639055、US20000705686、US6500931、US19950435516、US5530101、US5585089、US19950477728、US5693761、US19950474040、US5693762、US19950487200、US6180370、US19950484537、US2003229208、US20030389155、US5714350、US19950372262、US6350861、US19970862871、US5777085、US19950458516、US5834597、US19960656586、US5882644、US19960621751、US5932448、US19910801798、US6013256、US19970934841、US6129914、US19950397411、US6210671、US6329511、US19990450520、US2003166871、US20020078757、US5225539、US19910782717、US6548640、US19950452462、US5624821およびUS19950479752に記載されている。ある特定の実施形態では、特にヒト化抗体の結合親和性またはその他の生物学的特性を改良する場合、これらのヒト化抗体のアミノ酸配列変異体を作製することが望ましい場合がある。実施例12は、親抗体よりも親和性が增強された抗スフィンゴ脂質抗体のアミノ酸配列変異体を作製するための方法論を記載している。

【0224】

抗スフィンゴ脂質抗体のアミノ酸配列変異体は、抗スフィンゴ脂質抗体DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することによって、またはペプチド合成によって作出される。このような変異体としては、例えば、本明細書の例の抗スフィンゴ脂質抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／または残基への挿入、および／または残基の置換を含む。最終構築物に到達するために、最終構築物が所望の特徴を持つ限り、欠失、挿入および置換のいずれの組合せを行ってもよい。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置の変化など、ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体の翻訳後過程を変化させてもよい。

【0225】

突然変異誘発の好ましい位置である抗スフィンゴ脂質抗体のある特定の残基または領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)によって記載されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここ

では、アミノ酸とスフィンゴ脂質抗原の相互作用に影響を与えるために、標的残基のある残基または残基群を同定し（例えば、a r g、a s p、h i s、l y sおよびg l uなどの変化した残基）、中性または負電荷を有するアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）で置換する。次に、これらの置換に機能的感受性を示すアミノ酸の位置を、その置換部位に、またはその置換部位に対してさらなる、またはその他の変異体を導入することにより精密化する。従って、アミノ酸配列変異体を導入するための部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定する必要はない。例えば、ある部位における突然変異の性能を分析するためには、その標的コドンまたは領域においてa l aスクランニングまたはランダム突然変異誘発を行い、発現された抗スフィンゴ脂質抗体変異体を所望の活性に関してスクリーニングする。アミノ酸配列の挿入としては、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの長さのアミノ末端および／またはカルボキシル末端融合物、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗スフィンゴ脂質抗体またはエピトープタグと融合された抗体を含む。抗スフィンゴ脂質抗体分子の他の挿入変異体としては、抗スフィンゴ脂質抗体のN末端またはC末端と抗体の血清半減期を延長する酵素またはポリペプチドとの融合物が含まれる。

10

【0226】

別のタイプの変異体として、アミノ酸置換変異体がある。これらの変異体は、抗スフィンゴ脂質抗体分子の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その位置に異なる残基が挿入されている。置換突然変異誘発に関して最も注目される部位としては超可変領域が含まれるが、FR変異も考えられる。保存的置換が好ましい置換である。このような置換が生物活性に変化をもたらす場合には、以下に挙げられている「置換例」と表示されている、またはアミノ酸種に関して以下にさらに記載されているようなさらなる置換変異を導入し、それらの生成物をスクリーニングすることができる。

20

【0227】

【表 1】

表 1：アミノ酸残基置換例

アミノ酸残基(記号)	置換例
Ala (A)	val; leu; ile val
Arg (R)	lys; gln; asn lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln arg
Asp (D)	glu; asn glu
Cys (C)	ser; ala ser
Gln (Q)	asn; glu asn
Glu (E)	asp; gln asp
Gly (G)	ala ala
His (H)	asn; gln; lys; arg arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; leu phe;ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; ile met; ala; phe
Lys (K)	arg; gln; asn arg
Met (M)	leu; phe; ile leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr tyr
Pro (P)	ala ala
Ser (S)	thr thr
Thr (T)	ser ser
Trp (W)	tyr; phe tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; leu ala;ノルロイシン

10

20

【0228】

抗体の生物特性における実質的修飾は、(a)例えばシートまたはらせんコンフォメーションとしての、置換領域におけるポリペプチド主鎖の構造、(b)標的部位における分子の変化または疎水性、または(c)側鎖の嵩、を維持する上でのそれらの作用が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然残基は一般的な側鎖特性：

30

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性親水性：cys、ser、thr；

(3) 酸性：asp、glu；

(4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；

(5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基：gly、pro；および

(6) 芳香族：trp、tyr、phe

に基づいた群に分類される。非保存的置換はこれらのクラスのあるメンバーを他のクラスのものとの交換することを意味する。

40

【0229】

ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体の適切なコンフォメーションの維持に関与しないシステイン残基はいずれも、分子の酸化安定性を向上させるために、また、異常な架橋を防ぐために置換することができる。逆に、その安定性を向上させるために抗体にシステイン結合を付加してもよい（特に、抗体がFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合）。

【0230】

置換変異体の1つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、結果としての、さらなる開発のために選択された変異体は、それらが作出された親抗体よりも生物特性が改良されている。このよう

50

な置換変異体を作成する便宜な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性成熟である。要するに、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を、各部位においてあらゆる可能性のあるアミノ置換を作成するように変異誘発させる。このようにして作出された抗体変異体は、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子IIII産物との融合物としての繊維状ファージ粒子から一価形式でディスプレイされる。次に、これらのファージディスプレイ変異体を本明細書に開示されているようにそれらの生物活性（例えば、結合親和性）に関してスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域を同定するために、アラニンスキニング突然変異誘発を行って、抗原結合に有意に関与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、またはそれに加えて、抗体とスフィンゴ脂質の間の接点を同定するため、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することも有益であり得る。このような接点残基と隣接残基は本明細書において精密化された技術による置換の候補である。このような変異体が一度作出されると、その変異体パネルに対して本明細書に記載されるようなスクリーニングを行い、1以上の関連アッセイにおいて、より優れた特性を有する抗体をさらなる開発のために選択することができる。

10

【0231】

抗体の別のタイプのアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変化させる。変化させるとは、その抗体に見られる1以上の炭水化物部分を欠失させること、および／またはその抗体には存在しない1以上のグリコシル化を付加することを意味する。

【0232】

抗体のグリコシル化は一般に、N-結合および／またはまたはO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖に対する炭水化物部分の結合を示す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（ここで、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖に対する炭水化物部分の酵素的結合のための最も一般的な認識配列である。よって、ポリペプチドにこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在すると、潜在的グリコシル化部位ができる。O-結合グリコシル化とは、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの1つとヒドロキシアミノ酸（最も一般にはセリンまたはトレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンを用いてもよい）の結合を指す。

20

【0233】

抗体に対するグリコシル化部位の付加は、便宜には、1以上の上記トリペプチド配列を含むようにアミノ酸配列を変更することによって達成される（N-結合グリコシル化部位の場合）。この変更はまた、元の抗体の配列に1以上のセリンまたはトレオニン残基を付加、またはそれらに置換することによって行ってもよい（O-結合グリコシル化部位の場合）。

30

【0234】

抗スフィンゴ脂質抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で既知の様々な方法によって作製される。これらの方法としては、限定されるものではないが、天然源からの単離（天然のアミノ酸配列変異体の場合）または抗スフィンゴ脂質抗体の初めに作製された変異体もしくは非変異型のオリゴヌクレオチド媒介（または部位指定）突然変異誘発、PCR突然変異誘発およびカセット突然変異誘発による作製が含まれる。

40

【0235】

(v) ヒト抗体

ヒト化の代わりに、免疫に際して、ヒト抗体を作製することもできる。例えば、今では、内因性の免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体の前レパートリーを産生し得るトランスジェニック動物（例えばマウス）を作成することができる。例えば、キメラおよび生殖細胞系突然変異マウスにおける抗体重鎖接合領域（J_H）遺伝子の同形接合性が欠如すると、内因性の抗体産生の完全な障害が起こることが記載されている。このような生殖細胞系突然変異マウスにおいてヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイを移入すると、抗原投与時にヒト抗体の産生が起こる。例えば、Jakobovits, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits, et al., Nature, 362:255-258(1993); Brugger

50

mann, et al., Year in Immuno., 7:33 (1993);ならびに米国特許第 5, 591, 669 号、同第 5, 589, 369 号および同第 5, 545, 807 号参照。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーに由来してもよい(Hoogenboom, et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks, et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991);ならびに米国特許第 5, 565, 332 号および同第 5, 573, 905 号)。上述のように、ヒト抗体はまた、in vitroで活性化されたB細胞(例えば、米国特許第 5, 567, 610 号および同第 5, 229, 275 号参照)または他の好適な方法によっても作製可能である。

【0236】

(v i) 抗体フラグメント

特定の実施形態では、ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体は、抗体フラグメントである。抗体フラグメントの作製のために種々の技術が開発されている。従来、これらのフラグメントは完全抗体のタンパク質加水分解性消化によって得られてきた(例えば、Morimoto, et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992); およびBrennan, et al., Science 229:81 (1985)参照)。しかしながら、これらのフラグメントは、今では、組換え宿主細胞によって直接生産することができる。例えば、Fab'-SHフラグメントは大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')₂フラグメントを形成させることができる(Carter, et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別の実施形態では、F(ab')₂は、F(ab')₂分子の組み立てを促進するためにロイシンジッパーGCN4を用いて形成される。別のアプローチによれば、Fv、FabまたはF(ab')₂フラグメントは、組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体フラグメントの生産のための他の技術は、当業者には明らかである。

【0237】

(v i i) 多重特異性抗体

いくつかの実施形態では、少なくとも2つの異なるエпитープに対して結合特異性を有する多重特異性(例えば、二重特異性)ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体を作製することが望ましい場合がある。二重特異性抗体の例はスフィンゴ脂質2つの異なるエпитープと結合し得る。あるいは、抗スフィンゴ脂質アームを、異なる分子と結合するアームと組みあわせてもよい。二重特異性抗体は全長抗体または抗体フラグメント(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)として作製することができる。

【0238】

二重特異性抗体を作製するための別のアプローチによれば、1対の抗体分子間の界面を、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にするように操作することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一の抗体分子の界面に由来する1以上の小さなアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。この大きな側鎖と同一または類似した大きさの補償となる「キャビティ」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの(例えばアラニンまたはトレオニン)に置換することによって第二の抗体の分子の界面に作出される。これは、ホモ二量体などの他の望まない副生成物よりもヘテロ二量体の生産を高める機構を提供する。例えば、米国特許第 5, 731, 168 号参照。

【0239】

二重特異性抗体としては、架橋抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体の一方はアビジンと結合させ、他方はビオチンと結合させることができる。ヘテロコンジュゲート抗体はいずれの便宜な架橋法を用いて作製してもよい。好適な架橋剤は当技術分野でよく知られており、例えば米国特許第 4, 676, 980 号に、いくつかの架橋技術とともに開示されている。

【0240】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を作製する技術も文献に記載されている。例えば

、二重特異性抗体は化学結合を用いて作製することができる。Brennan, et al., Science 229:81 (1985)は、完全な抗体がタンパク質加水分解的に切断されてF(a b')₂フラグメントを作製する手順を記載している。これらのフラグメントは、隣接するジチオールを安定化させ、かつ、分子間ジスルフィド形成を防ぐためにジチオール複合体形成剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元させる。作製されたF a b'フラグメントを次にチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体へ変換する。次に、F a b'-TNB誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンで還元することによってF a b'-チオールへ再変換し、等モル量の他のF a b'-TNB誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成させる。作製された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用することができる。なおさらなる実施形態では、大腸菌から直接回収されたF a b'-SHフラグメントをin vitroで化学的に結合させて二重特異性抗体を作製することができる。Shalaby, et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)。

【0241】

組換え細胞培養物から直接二重特異性抗体フラグメントを作製および単離するための種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて作製されている。Kostelny, et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o sおよびJ u nタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のF a b'部分と連結された。抗体ホモ二量体をそのヒンジ領域において還元して単量体を形成させた後、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成された。この方法はまた、抗体ホモ二量体の作製にも利用可能である。Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 90:6444-6448 (1993)により記載されている「ダイアボディー」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するためのもう1つの機構を提供した。これらのフラグメントは、同じ鎖上の2つのドメインの間で対合を可能とするには短すぎるリンカーによって、軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。よって、1つのフラグメントのV_HドメインとV_Lドメインは、別のフラグメントの相補的V_LドメインおよびV_Hドメインと対合して、それにより2つの抗原結合部位を形成することを余儀なくされる。単鎖F v(s F v)二量体を使用によって二重特異性抗体フラグメントを作製するためのもう1つの戦略も報告されている。例えば、Gruber, et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)参照。あるいは、二重特異性抗体は、例えば、Zapata, et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)に記載されているように作製された「線状抗体」であってもよい。

【0242】

また、二価を超える抗体も意図される。例えば、三重特異性抗体が作製可能である。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0243】

1アームにつき1以上の結合部位を含む本発明の抗体(またはポリマーもしくはポリペプチド)またはそのフラグメントは、本明細書において「多価」抗体と呼ばれる。例えば、本発明の「二価」抗体は、F a bまたはそのフラグメント当たり2つの結合部位を含む、本発明の「三価」ポリペプチドはF a bまたはそのフラグメントにつき3つの結合部位を含む。本発明の多価ポリマーにおいて、F a b当たり2以上の結合部位は、同じまたは異なる抗原と結合している可能性がある。例えば、本発明の多価ポリペプチドにおける2以上の結合部位は、同じ抗原、例えば、該抗原の同じ部分もしくはエピトープ、または該抗原の2以上の同じもしくは異なる部分もしくはエピトープに向けられてもよく、かつ/または異なる抗原に向けられてもよく、あるいはその組合せであってもよい。よって、例えば本発明の二価ポリペプチドは2つの同じ結合部位を含んでもよく、抗原の第一の部分もしくはエピトープに向けられた第一の結合部位と、該抗原の同じ部分もしくはエピトープに、または該抗原の別部分もしくはエピトープに向けられた第二の結合部位を含んでなり得るか、あるいは抗原の第一の部分もしくはエピトープに向けられた第一の結合部位と、異なる抗体に向けられた第二の結合部位を含み得る。しかしながら、以上の記載から明らかなように、本発明の多価ポリペプチドが同じまたは異なる抗原に向けられるいずれか

の数の結合部位を含み得るという点で、本発明はそれに限定されない。

【0244】

F a b またはそのフラグメント当たり少なくとも2つの結合部位（ここで、少なくとも1つの結合部位は第一の抗原に向けられ、第二の結合部位は第一の抗原とは異なる第二の抗原に向けられる）を含む本発明の抗体（またはポリマーもしくはポリペプチド）は「多重特異性」とも呼ばれる。例えば、「二重特異性」ポリマーは、第一の抗原に向けられた少なくとも1つの部位と、第二の抗原に向けられた少なくとも1つの第二の部位を含み、「三重特異性」は、第一の抗原に向けられた少なくとも1つの結合部位、第二の抗原に向けられた少なくとも1つのさらなる、および第三の抗原に向けられた少なくとも1つのさらなる結合部位を含むポリマーなどである。よって、それらの最も単純な形態では、本発明の二重特異性ポリペプチドは本発明の二価ポリペプチド（F a b 当たり）である。しかしながら、以上の記載から明らかなように、本発明の多価ポリペプチドが2以上の異なる抗原に向けられるいずれかの数の結合部位を含み得るという点で、本発明はそれに限定されない。

10

【0245】

(v i i i) 他の修飾

ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体の他の修飾も意図される。例えば、本発明はまた、毒素（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的な活性な毒素またはそのフラグメント）または放射性同位元素（例えば、ラジオコンジュゲート）などの細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされた本発明に記載の抗体を含む免疫複合体に関する。コンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（S P D P）、イミノチオラン（I T）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデート H C L など）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トリエン2, 6-ジイソシアネートなど）およびビス-活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど）などの種々の二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製される。

20

【0246】

本明細書で開示される抗スフィンゴ脂質抗体はまた、イムノリポソームとして製剤化することができる。抗体を含むリポソームは、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); および米国特許第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号に記載されているものなどの当技術分野で知られている方法により作製される。循環時が高められたリポソームが米国特許第5, 013, 556号に開示されている。例えば、リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよび P E G-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（P E G-P E）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって作製することができる。リポソームは、所望の径を有するリポソームを得るために所定の孔径のフィルターを通して押し出される。本発明の抗体の F a b ' フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介し、Martin, et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているようなりポソームとコンジュゲートさせることができる。所望により、別の有効成分をリポソーム内に収容してもよい。

30

40

【0247】

酵素またはその他のポリペプチドは、上述のヘテロ二官能性架橋試薬の使用などの当技術分野で周知の技術によって、抗スフィンゴ脂質抗体に共有結合させることができる。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分と結合された本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質を、当技術分野で周知の組換え D N A 技術を用いて構築することができる（例えば、Neuberger, et al., Nature 312:604-608 (1984) 参照）。

【0248】

50

本発明の特定の実施形態では、例えば、標的組織および細胞の浸透性を増強するために、完全抗体よりもむしろ抗体フラグメントを用いる方が望ましい場合がある。この場合、その血清半減期を延長するために、抗体フラグメントを修飾することが望ましい場合がある。これは、例えば、抗体フラグメントへのサルベージ受容体結合エピトープの組み込みにより（例えば、抗体フラグメントの適当な領域の突然変異によるか、またはペプチドタグにエピトープを組み込んだ後、いずれかの末端または中間部で抗体フラグメントと融合させることにより、例えば、DNAまたはペプチド合成により）達成可能である。例えば、米国特許第6,096,871号参照。

【0249】

ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体の共有結合的修飾も本発明の範囲内に含まれる。それらは、適用可能であれば、化学合成により、または抗体の酵素的または化学的切断により作製され得る。該抗体の他のタイプの共有結合的修飾は、抗体の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖またはNもしくはC末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることによって分子に導入される。ポリペプチドの共有結合的修飾の例は、米国特許第5,534,615号に記載されており、出典明示より具体的に本明細書の一部とされる。抗体の共有結合的修飾の好ましいタイプは、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号に示される方法で、種々の非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンの1つに抗体を結合させることを含む。

【0250】

B. ベクター、宿主細胞および組換え法

本発明はまた、ヒト化または変異体抗スフィンゴ脂質抗体をコードする単離された核酸、該核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびに該抗体の産生のための組換え技術も提供する。

【0251】

抗体の組換え生産では、それをコードする核酸単離が、さらなるクローニング（DNAの増幅）のためまたは発現のための複製可能なベクターへ挿入され得る。別の実施形態では、抗体は、米国特許第5,204,244号に記載されているような相同組換えによって作製可能である。モノクローナル抗体をコードするDNAは常法を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離および配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分としては一般に、限定されるものではないが、例えば米国特許第5,534,615号に記載されているように、シグナル配列、複製起点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列の1以上が含まれる。

【0252】

本明細書においてベクターでDNAをクローニングまたは発現するための好適な宿主細胞は、上記の原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的で好適な原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性生物などの真正細菌、例えば、エシェリキア属（例えば、大腸菌）、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ菌属（例えば、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*))、セラチア属（例えば、レイ菌(*Serratia marcescens*)および赤痢菌属、ならびにバチルス属（例えば、枯草菌(*B. subtilis*)および*B. licheniformis*（例えば、*B. licheniformis* 41P））、シュードモナス属（例えば、緑膿菌(*P. aeruginosa*)および放線菌属などの腸内細菌科が含まれる。1つの好ましい大腸菌クローニング宿主は大腸菌294（ATCC 31,446）であるが、大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC 31,537）および大腸菌W3110（ATCC 27,325）などの他の株も好適である。これらの例は限定ではなく例示である。

【0253】

原核生物の他、線維状真菌または酵母などの真核生物も、抗スフィンゴ脂質抗体をコードするベクター好適なクローニングまたは発現宿主である。下等真核生物の宿主微生物の中でサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、または一般的なパン製造酵母が最もよく用いられている。しかしながら、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)；クルイベロミセス属宿主、例えば、*K. ラクチス*(*K. lactis*)、*K. フラギリス*(*K. fragilis*) (A T C C 1 2, 4 2 4)、*K. ブルガリクス*(*K. bulgaricus*) (A T C C 1 6, 0 4 5)、*K. ウィケラミイ*(*K. wickeramii*) (A T C C 2 4, 1 7 8)、*K. ワルチー*(*K. waltii*) (A T C C 5 6, 5 0 0)、*K. ドロソフィラルム*(*K. drosophilarum*) (A T C C 3 6, 9 0 6)、*K. サーモトレランス*(*K. thermotolerans*)および*K. マルキシアヌス*(*K. marxianus*)；ヤロウイア属 (E P 4 0 2, 2 2 6)；ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) (E P 1 8 3, 0 7 0)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア(*Trichoderma reesia*) (E P 2 4 4, 2 3 4)；ニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)；スクワニミセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*)などのスクワニミセス属；例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリブクラジウムおよびアスペルギルス宿主、例えば、*A. ニデュランス*(*A. nidulans*)および*A. ニゲル*(*A. niger*)および繊維状真菌などの他のいくつかの属、種および株も一般に利用でき、本明細書において有用である。

【0254】

グリコシル化抗スフィンゴ脂質抗体の発現のための好適な宿主細胞は多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が含まれる。多くの馬キョロウイルス株および変異体ならびにヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ) およびカイコ(*Bombyx mori*)が確認されている。例えば、オートグラファ・カリフォルニカ(*Autographa californica*) NPVのL-1変異体およびカイコ(*Bombyx mori*) NPVのBm-5株など、トランスフェクションのための様々なウイルス株が公的に入手可能であり、このようなウイルスは、本明細書において、特にヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのために、本発明に従ってウイルスとして使用可能である。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物培養細胞も宿主として利用可能である。

【0255】

しかしながら、脊椎動物細胞における関心が最大であり、培養脊椎動物細胞（組織培養）の増殖は常法となっている。有用な哺乳類宿主細胞系統の例としては、SV40 (COS-7、A T C C C R L 1 6 5 1) により形質転換されたサル腎臓CV1系統；ヒト胚腎臓系統（懸濁培養で増殖させるためにサブクローニングされた293または293細胞、Graham, et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、A T C C C C L 1 0)；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR (CHO、Urlaub, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；サル腎臓細胞 (CV1 A T C C C C L 7 0)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、A T C C C R L-1 5 8 7)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、A T C C C C L 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK、A T C C C C L 3 4)；バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、A T C C C R L 1 4 4 2)；ヒト肺細胞 (W138、A T C C C C L 7 5)；ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065)；マウス乳房腫瘍 (MMT 060562、A T C C C C L 5 1)；TRI細胞(Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；およびヒト肝細胞腫系統 (Hep G2) がある。

【0256】

宿主細胞を抗スフィンゴ脂質抗体生産のための上記の発現またはクローニングベクターで形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜改変された通常の栄養培地で培養する。

【0257】

本発明の抗スフィンゴ脂質抗体を生産するために用いられる宿主細胞は種々の培地で培養することができる。ハムのF10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) およびダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM)、Sigma) などの市販の培地が宿主細胞の培養に好適である。さらに、Ham, et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes, et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4, 767, 704号; 同第4, 657, 866号; 同第4, 927, 762号; 同第4, 560, 655号; または同第5, 122, 469号; WO90/03430; WO87/00195; または米国特許第30, 985号に記載されているいずれの培地も宿主細胞の培養培地として使用可能である。これらの培地はいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび/またはその他の増殖因子 (インスリン、トランスフェリンまたは上皮細胞増殖因子など)、塩類 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩など)、バッファー (HEPESなど)、ヌクレオチド (アデノシンおよびチミジンなど)、抗生物質 (GENTAMYCIN (商標))、微量元素 (通常、マイクロモル範囲の終濃度で存在する無機化合物として定義) およびグルコースまたは等価なエネルギー源を添加してもよい。他の必要ないずれの添加物も当業者に知られている適当な濃度で含めることができる。温度、pHなどの培養条件は発現用に選択された宿主細胞とともにこれまで用いられているものであり、当業者には明らかである。

10

【0258】

組換え技術を用いる場合、抗体を周辺質にて細胞内生産することもできるし、直接培地に分泌させることもできる。抗体が細胞内生産される場合、第一工程として、宿主細胞または溶解フラグメントいずれかの粒子残渣を、例えば遠心分離または限外濾過によって除去する。Carter, et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)は、大腸菌の周辺質空間に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。要するに、細胞ペーストを酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTAおよびフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) の存在下で約30分にわたって解凍する。細胞残渣は遠心分離によって除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合には、このような発現系からの上清を一般にはまず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニット用いて濃縮する。タンパク質分解を阻害するため、前記の工程のいずれにPMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を含めてもよく、偶然の混入物の増殖を防ぐために抗生物質を含めてもよい。

20

30

【0259】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができるが、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。Aタンパク質の親和性リガンドとして妥当性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFcドメインの種およびイソ型に依存する。Aタンパク質は、ヒト重鎖に基づく抗体を精製するのに使用できる (Lindmark, et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。Gタンパク質は全てのマウスイソ型とヒト γ 3に関して奨励される (Guss, et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。親和性リガンドが結合されたマトリックスはほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは流速を速めることができ。アガロースで達成し得るものよりも短い時間処理時間を可能とする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX (商標) 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿法、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース (商標) でのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂 (ポリアスパラギン酸カラムなど) でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGEおよび硫酸沈殿法など、タンパク質精製のためのその他の技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

40

【0260】

50

予備精製工程の後、着目する抗体と夾雑物を含む混合物に対して、pH約2.5～4.5の間で溶離バッファーを用い、好ましくは低塩濃度（例えば約0～0.25M塩）で行われる、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを行えばよい。

【0261】

C. 医薬製剤

本発明の抗体または免疫誘導部分の治療製剤は、所望の純度を有する抗体と任意の生理学上許容される担体、賦形剤または安定剤（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)参照）を、凍結乾燥製剤または水溶液の形で混合することにより、保存向けに調製される。許容される担体、賦形剤または安定剤は用いる用量および濃度でレシピエントに対して無毒であり、リン酸、クエン酸およびその他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類およびその他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

【0262】

本明細書の製剤はまた、処置される特定の適応の必要に応じて1を超える有効化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない補足的活性を有するものを含んでもよい。このような分子は、意図した目的に効果的な量の組合せで適切に存在する。

【0263】

有効成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によるか、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、それぞれ例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンとして捕捉してもよい。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0264】

in vivo投与の用いる製剤は無菌でなければならない。これは、例えば無菌濾過膜をとした濾過によって容易に達成される。

【0265】

徐放性製剤が好ましい場合がある。徐放性製材の好適な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスは、例えばフィルムまたはマイクロカプセルなどの成型品の形である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、Lupron Depot（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100以上分子の放出が可能であるが、ある特定のヒドロゲルはより短い期間だけタンパク質を放出する。カプセル化された抗体が体

内に長時間留まる場合、それらは37℃で水分に曝される結果として変性または凝集する場合があり、その結果、生物活性の低下および免疫原性の変化する可能性がある。合理的な戦略は関与する機構に応じて安定化のために考案することができる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド相互作用を介した分子間S-S結合の形成であることが見出されれば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥させること、水分含量を制御すること、適当な添加剤を使用すること、および特殊なポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成することができる。

【0266】

D. 抗体の非治療的使用

本発の抗体はアフィニティー精製剤として使用可能である。この過程で、抗体は、当技術分野で周知の方法を用い、セファデックス樹脂または濾紙などの固相に固定する。この固定抗体に精製するスフィンゴ脂質を含有するサンプルと接触させ、その後、この支持体を、サンプル中の固定抗体に結合されているスフィンゴ脂質以外の材料を実質的に全て除去する好適な溶媒で洗浄する。最後に、この支持体を、抗体からスフィンゴ脂質を遊離させる、例えばpH3～pH5.0の間の別の好適な溶媒（グリシンバッファーなど）で洗浄する。

【0267】

抗スフィンゴ脂質抗体はまた、例えば、特定の細胞、組織（生検サンプルなど）または体液においてその発現を検出する、スフィンゴ脂質の診断アッセイにも有用であり得る。このような診断方法は、心血管または脳血管疾患または障害の診断に有用であり得る。

【0268】

診断適用では、抗体を一般に検出可能な部分で標識する。多くの標識が利用可能であり、一般に以下のカテゴリーに分類される。

(a) ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H および ^{131}I などの放射性同位元素。抗体は、例えばCurrent Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)に記載されている技術を用いて放射性同位元素で標識することができ、シンチレーション計数を用いて放射活性を測定することができる。

【0269】

(b) 希土類キレート（ユウロピウムキレート）またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッドなどの蛍光標識が利用可能である。これらの蛍光標識は、例えばCurrent Protocols in Immunology, 前掲に開示されている技術を用いて抗体にコンジュゲートさせることができる。蛍光は蛍光計を用いて定量することができる。

【0270】

(c) 種々の酵素-基質標識が利用可能である。例えば、米国特許第4,275,149号には、これらのいくつかの総論が示されている。この酵素は一般に、様々な技術を用いて測定可能な発色基質に化学変化を触媒する。例えば、この酵素は、分光光度的に測定可能な、基質における色の変化を触媒し得る。あるいは、この酵素は、基質の蛍光または化学発光を変化させ得る。蛍光の変化を定量するための技術は上記されている。化学発光基質は化学反応によって電気的に励起状態となった後、測定可能な（例えば、ケミルミノメーターを用いる）光を発し得るか、または蛍光受容器にエネルギーを与え得る。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ（例えば、ホタル・ルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRPO）などのペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ）、複素環オキシダーゼ（ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなど）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。酵素と抗体をコンジュゲートさせ

る技術は、O'Sullivan, et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

【0271】

酵素－基質の組合せの例としては、例えば、下記のものがある。

(i) ヒドロジェンペルオキシダーゼを基質とするセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRPO)、この場合、ヒドロジェンペルオキシダーゼは色素前駆体 (例えば、オルトフェニレンジアミン (OPD) または 3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジンヒドロクロリド (TMB)) を酸化する。

(ii) パラーニトロフェニルホスフェートを発色基質とするアルカリ性ホスファターゼ (AP) および

(iii) 発色基質 (例えば、p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシダーゼ) または蛍光基質 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシダーゼを用いる β-D-ガラクトシダーゼ (β-D-Gal)。

【0272】

当業者には、他の多くの酵素－基質の組合せが利用可能である。これらの一般的な総説としては、米国特許第 4, 275, 149 号および同第 4, 318, 980 後を参照。

【0273】

標識は抗体と間接的にコンジュゲートされる場合もある。当業者ならば、これを達成するための様々な技術が思い浮かぶであろう。例えば、抗体をビオチンとコンジュゲートさせ、上述の 3 つの広いカテゴリーの標識のいずれかをアビジンとコンジュゲートさせることができ、あるいは逆もまた可能である。ビオチンはアビジンと選択的に結合し、従って、この標識はこの間接的方式で抗体とコンジュゲートさせることができる。あるいは、標識と抗体の間接的コンジュゲーションを達成するために、抗体を小ハプテン (例えばジゴキシン) とコンジュゲートさせ、上述の異なる種の標識の 1 つを抗ハプテン抗体 (例えば抗ジゴキシン抗体) とコンジュゲートさせる。このようにして標識と抗体の間接的コンジュゲーションが達成できる。

【0274】

本発明の別の実施形態では、抗スフィンゴ脂質抗体は標識する必要がなく、その存在は、抗スフィンゴ脂質抗体と結合する標識抗体を用いて検出することができる。

【0275】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイなどの既知のいずれかのアッセイ方法で使用可能である。例えば、Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987) 参照。

【0276】

競合結合アッセイは、限られた量の抗体との結合をめぐる、試験サンプル分析物と競合する標識標品の能力によるものである。試験サンプル中のスフィンゴ脂質の量は、抗体と結合するようになった標品の量に反比例する。結合するようになった標品の量の測定を容易にするために、一般に競合前または競合後に抗体を不溶性とし、それにより、抗体と結合した標品および分析物は、結合せずに留まっている標品および分析物から便宜に分離することができる。

【0277】

サンドイッチアッセイは、それぞれ検出するタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープと結合し得る 2 種類の抗体の使用を含む。サンドイッチアッセイでは、試験サンプル分析物は、固相支持体上に固定されている第一の抗体と結合させ、その後、第二の抗体をその分析物と結合させて、不溶性の 3 成分複合体を形成させる。例えば、米国特許第 4, 376, 110 号参照。第二の抗体はそれ自体、検出可能な部分で標識してもよい (直接的サンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい (間接的サンドイッチアッセイ)。例えば、1 つのタイプの

サンドイッチアッセイがE L I S Aアッセイであり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

【0278】

免疫組織化学では、血液または組織サンプル新鮮物であっても凍結品であってもよく、または例えば、パラフィンに包埋したり、ホルマリンなどの保存剤で固定してもよい。

【0279】

抗体はまた、in vivo診断アッセイにも使用可能である。一般に、抗体は放射性核種（ ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S など）で標識され、これにより、結合した標的分子をイムノシンチログラフィーを用いて位置決定することができる。

10

【0280】

E. 診断キット

便宜上、本発明の抗体は、例えば、診断アッセイを行うための説明書とともに所定の試薬の組合せをパッケージングしたキットを提供し得る。抗体を酵素で標識した場合、キットは、その酵素が必要とする基質および補因子（例えば、検出可能な発色団または蛍光団を提供する基質前駆体）を含む。さらに、安定剤、バッファー（例えば、ブロックバッファーまたは溶解バッファー）などの他の添加剤を含んでもよい。種々の試薬の相対量は、そのアッセイの感度を実質的に至適化する試薬の溶液中の濃度を提供するため、幅広く可変である。特に、これらの試薬は、溶解した際に適当な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含め、乾燥粉末（通常は凍結乾燥されたもの）として提供され得る。

20

【0281】

F. 抗体の治療的使用

治療適用では、本発明の抗スフィンゴ脂質抗体は、ボーラスとして、もしくはある時間にわたる持続的注入による静脈投与、筋肉内経路、腹腔内経路、脳脊髄内経路、皮下経路、動脈内経路、滑液包内経路、くも膜下腔内経路、経口経路、局所経路または吸入経路によってヒトに投与し得るものを含む、上述のものなどの薬学上許容される投与形で哺乳類、好ましくはヒトに投与される。

【0282】

疾患の予防または治療のための、抗体の適当用量は、上記で定義したような処置される疾患のタイプ、疾患の重篤度および経過、その抗体が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、それまでの治療、患者の臨床歴および抗体に対する応答、ならびに担当医の判断によって異なる。抗体は1回または一連の処置期間にわたって患者に適宜投与される。

30

【0283】

疾患のタイプおよび重篤度によって、例えば1回以上の分離投与によるものであれ、連続注入によるものであれ、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\sim20\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が患者投与のための初期候補用量となる。典型的な1日または週間用量は、上述の因子によって約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $20\text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上の範囲である。症状によって数日またはそれ以上にわたる反復投与では、疾患症候の所望の抑制が見られるまで処置を繰り返す。しかしながら、他の投与計画も有用であり得る。この療法の進行は、例えばX線写真画像を含む、従来の技術およびアッセイによって容易に監視される。

40

【0284】

本発明の別の実施形態によれば、疾患の予防または治療における抗体の有効性は、抗体を連続的に、または例えば化学療法的抗癌薬など、その目的に有効である別の薬剤と組み合わせることで投与することにより改良することができる。このような他の薬剤は投与される組成物中に存在してもよいし、あるいは別に投与してもよい。抗体は連続的に、または他の薬剤と組み合わせることで適宜投与される。

【0285】

G. 製品

50

本発明の別の実施形態では、上記の障害の処置に有用な材料を含む製品が提供される。該製品は、容器とラベルを含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジおよび試験管が含まれる。これらの容器はガラスまたはプラスチックなどの種々の材料からなってもよい。これらの容器は症状を処置するのに有効な組成物を収容し、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、この容器は静脈溶液バッグまたは皮下注射針が貫通可能なストッパーを備えたバイアルであり得る）。組成物中の有効薬は抗スフィンゴ脂質抗体である。容器上または容器に添付されたラベルは、その組成物が選択された症状の処置に使用されることを示す。この製品はさらに、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液などの薬学上許容されるバッファーを含む第二の容器を含み得る。それはさらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジおよび使用説明の添付文書を含む、商業的および使用者の立場から望ましい他の材料を含んでもよい。

10

【0286】

本発明は、下記の実施例を参照すればより良く理解できる。これらの実施例は単に現在本発明の実施に関して知られている最良の形態を例示することを意図したものである。本発明の範囲はこれに限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0287】

本願は少なくとも1つのカラー図面を含む。カラーの図面を含む本願のコピーは求めに応じ、必要な料金を払えば提供される。各図面の簡単な要約を以下に示す。

【0288】

20

【図1】図1は2つのパネルAおよびBを含む。パネルAは、S1P、SPH、LPA、SPCおよびビオチンコンジュゲート抗S1Pモノクローナル抗体をめぐって競合する構造的に類似するその他の生体脂質に関する競合的ELISA法の結果をグラフで示したものである。これらの結果は、この抗体がS1Pに対して特異的かつ感受性があり、構造的に類似する生物活性脂質を認識しないことを示す。下記実施例1に記載されているように、結合した抗体は、HRPとコンジュゲートしたマウスまたはヒトIgGに特異的な二次抗体によって検出された。発色反応を測定し、光学密度(OD)として報告した。競合に用いられた脂質の濃度はX軸で示す。二次抗体とS1Pコーティングマトリックス単独の相互作用は検出されなかった(データは示されていない)。パネルBは、パネルAに挙げられているS1Pに類似する生物活性脂質の構造を示す。

30

【0289】

【図2】数種のキメラおよび組換えヒト化抗S1P抗体変異体の結合特性を示す。キメラ抗体(pATH10+pATH50)に関するS1Pとの結合をELISA結合アッセイで、ヒト化抗S1Pモノクローナル抗体の2つの変型(pATH201+pATH308)および(pATH201+pATH309)と比較した。pATH308はフレームワーク領域に5つのネズミ復帰突然変異を有するヒト化軽鎖であり、pATH309は3つの復帰突然変異を有するヒト化軽鎖である。ヒト化重鎖(pATH201)はフレームワーク領域にネズミ復帰突然変異を1つだけ含む。

【0290】

【図3】SPHINGOMAはS1Pに特異性が高いことを示すグラフである。このグラフは、競合的ELISA法を用いてデータが作成され、他の生物活性脂質と比べた際のS1Pに対するSPHINGOMABの特異性を示している。SPHINGOMABは、S1Pの直前の代謝前駆体であるスフィンゴ(SPH)またはS1Pと構造的かつ機能的に類似する重要な細胞外シグナル伝達分子であるリゾホスファチジン酸(LPA)と交差反応性はないことを示した。SPHINGOMABは、セラミド-1-リン酸(C1P)、ジヒドロスフィンゴシン(DH-SPH)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)またはスフィンゴミエリン(SM)を含む他の構造的に類似する脂質および代謝産物を認識しなかった。SPHINGOMABはジヒドロスフィンゴ-1-リン酸(DH-S1P)と交差反応し、程度は低いがスフィンゴシルホルルコリン(sphingosylphoryl choline)(SPC)とも交差反応した。SPHINGOMABのS

40

50

1 Pに対する親和性 (Kd) は100 pM未満であり、ほとんどの治療抗体、特に他の分子スポンジよりも遙かに高い。

【0291】

【図4】図4は2つのAおよびBを含む。この図面に示されているデータを得た実験は下記の実施例4に詳説されている。要するに、これらのデータは、SPHINGOMABが眼球の病変におけるCNVおよび瘢痕形成を軽減したことを示す。マウスをSPHINGOMABまたはイソ型適合非特異的モノクローナル抗体で処置した。CNV病変はブルッフ膜のレーザー破膜により誘発した。血管新生に関してはローダミンコンジュゲートヒマ(R. communis)凝集素I (A)で、またはコラーゲン瘢痕形成に関してはまたはマッソン・トリクローム (B)で染色したマッソンの染色した各処置群のグラフと病変の代表的な画像が示されている。図4Aは、ネズミCNV病変形成モデルにおいてSPHINGOMABが、レーザーにより誘発されたブルッフ膜の破膜から14日および28日後に脈絡膜の新血管新生を劇的に緩和することを示す。図4Bは、SPHINGOMABが、レーザーにより誘発されたブルッフ膜の破膜から28日後にCNV病変形成に関連する繊維症を有意に軽減することを示す。

10

【0292】

【図5】図5は2つのパネルAおよびBを含む。パネルAでは、S1PはHUV EC管の形成および遊走の誘導を介して新血管新生を促進し、それがSPHINGOMABによって軽減されることが示されている。パネル5Aは、管の形成を評価するために、マトリゲルに播種され、6時間インキュベートされたHUV ECの4枚の顕微鏡写真を示す。パネル5Bは、マトリゲルインベージョンチャンバーにて6時間、1 μM S1P ± SPHINGOMAB (1 μg/ml)で処置されたHUV ECのデータを示す。マトリゲル膜へ遊走した細胞の数を5つの独立視野で計数した。

20

【0293】

【図6】図6は、SPHINGOMABを用いて行った下記の実施例6に記載されている実験のいくつかの写真(A)およびグラフ(BおよびC)を含む。SPHINGOMABはS1P、VEGFおよびbFGFにより誘発された新血管新生を中和する。図6Aは、マトリゲルプラグ±示された増殖因子の切片のいくつかの代表的なFITC染色血管の写真を示す。図6Bは、S1Pが内皮細胞(EC)の浸潤を刺激することを示す。図6Cは、新血管新生の指標としてVEGFまたはbFGFで刺激されたマトリゲルプラグの相対的蛍光の定量を表す。これらのS1P、VEGFおよびbFGFの作用は、マウスが1または25 mg/kgのSPHINGOMABで全身処置された際に阻害された。

30

【0294】

【図7】図7はA～Eと表示された5つのグラフと2つのpcolorフォトを示す。このデータは抗S1Pモノクローナル抗体SPHINGOMABを用いて作製されたものである。実験詳細については、下記の実施例7を参照。要するに、これらのデータは、SPHINGOMABがS1Pによって刺激された瘢痕形成を中和することを示す。これらの実験では(In these experiments)、繊維芽細胞を血清飢餓状態とした後、0、0.1、0.5または1 μMのS1P + / - 1 μg/mLのSPHINGOMABで12～24時間処置した。これらのデータは、3H-チミジンの組み込みによって測定されるS1Pにより刺激されたSwiss 3T3繊維芽細胞増殖(A)、スクラッチアッセイにおけるネズミ心臓繊維芽細胞の遊走(B)、コラーゲン-GFPを発現するトランスジェニックマウスから単離された心臓繊維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子発現(相対蛍光)(C)および細胞増殖の低下とα-SMA発現の増強によって測定されるWI-38細胞の筋繊維芽細胞への分化(D)を示す。SPHINGOMABはこれらの各S1P作用を中和した。SPHINGOMABはin vivoにおいてネズミ永久心筋梗塞モデルで血管周囲の繊維症を軽減した(E)。

40

【0295】

【図8】図8は3つのパネル8A、8Bおよび8Cを含む。これらのデータは、S1Pは眼球の上皮細胞および繊維芽細胞の、収縮性、瘢痕組織産生筋繊維芽細胞への形質転換を

50

促進することを示す。下記の実施例 8 に記載されているように、いくつかのヒト眼球細胞系統の筋繊維芽細胞形質転換に対する S 1 P の作用を検討した。S 1 P は、ヒト網膜色素上皮細胞 (図 8 A) およびヒト結膜繊維芽細胞 (図 8 B) において α -平滑筋アクチン (α -SMA; 筋繊維芽細胞マーカー) の産生を刺激することが判明した。これらのデータは初めて、S 1 P が眼球の上皮細胞および繊維芽細胞の、収縮性、瘢痕組織産生筋繊維芽細胞への形質転換を促進する因子の 1 つであることを示す。また、ヒト結膜繊維芽細胞におけるプラスミノゲンアクチベーター阻害剤 (PAI-1) の発現に対する S 1 P の作用も検討した。PAI-1 発現の増強が結合組織のタンパク質加水分解性の分解の低下と相関し、瘢痕化の増加を含むいくつかの繊維性疾患に関連してアップレギュレーションされる。図 8 C に示されるように、S 1 P は PAI-1 発現を用量依存的に刺激する。

10

【0296】

【図 9】図 9 は、SPHINGOMAB と呼ばれる抗 S 1 P モノクローナル抗体を用いて作成した実験データを示す 2 つの棒グラフ A および B を示す。SPHINGOMAB は *in vivo* における免疫細胞創傷浸潤を軽減した。マウスに MI を施し、外科術 48 時間後に生理食塩水または 25 mg/kg の SPHINGOMAB で処置し、その後、4 日目に犠牲にした。SPHINGOMAB は、マクロファージ (A) および肥満細胞 (B) の創傷部への浸潤を低下させた。データは生理食塩水処置値の低下倍率として示されている。

【0297】

【図 10】図 10 は、2 つのパネル 10 A および 10 B を含む。各パネルはネズミ抗 S 1 P モノクローナル抗体 V_L および V_H ドメインの発現用のクローニングベクターのマップを示す。図 10 A は、 V_L ドメインのクローニング用の pKN100 ベクターのマップである。図 10 B は、 V_H ドメインのクローニング用の pG1D200 ベクターのマップである。

20

【0298】

【図 11】図 11 は、数種のネズミ、キメラおよび組換えヒト化抗 S 1 P 抗体の結合特性を示すデータを示す。マウス (muMAb S 1 P; 四角のデータポイントから作成した曲線) およびキメラ (chMAb S 1 P; 上向き三角のデータポイントから作成した曲線) に関する S 1 P との結合を ELISA 結合アッセイにてヒト化抗体の第一のバージョン (pATH200 + pATH300; 下向き三角のデータポイントから作成した曲線) と比較した。

30

【0299】

【図 12】図 12 は、数種のヒト化モノクローナル抗体変異体を用いて行った *in vitro* 細胞アッセイからのデータを示すパネル A および B を含む。パネル A は、ヒト化 mAb が、S 1 P がタキソールにより誘発されるアポトーシスから SKOV3 細胞を保護することを回避することができることを示す。下記の実施例 16 に記載されているように、SKOV3 細胞は、1 μ g/mL 濃度の huMAbHCLC₃ (309)、huMAbHCLC₅ (308)、muMAb S 1 P (muMAb) または非特異的 IgG1 (NS) を伴う 500 nM S 1 P の存在下または不在下にて 500 nM タキソール (Tax) で 48 時間処置した。値は各データポイントで 3 回ずつ行った場合の平均値 $\pm$ SEM (n = 3) を表す。「NT」は処置されなかったことを意味し、「Veh」はビヒクル単独を意味する。パネル B は、S 1 P および数種の異なる抗 S 1 P モノクローナル抗体または対照モノクローナル抗体の 1 つで処置した卵巣癌 (OVCAR3) 細胞における IL-8 分泌を示す。下記の実施例 6 に詳細に記載されている実験では、100,000 の OVCAR3 細胞/ウェルを一番飢餓状態とし、1 μ M S 1 P を培養培地に加えるだけか、あるいは 1 μ g/mL の非特異的抗体 (NS)、pATH201 + pATH309 (LC3)、pATH201 + pATH308 (LC5)、pATH207 + pATH309 (cysLC3)、pATH207 + pATH308 (cysLC5) および 0.1 μ g/mL (M0.1)、1 μ g/mL (M1) または 10 μ g/mL (M10) の抗 S 1 P ネズミ抗体とともにプレインキュベートした。インキュベーション 22 時間後に、細胞上清を回収し、IL-8 分泌を、R&D system Quantikine human CXCL

40

50

8/I L-8キットを用いてE L I S Aにより測定した。この図で「N T」は処置されなかった細胞を指す。

【0300】

【図13】図13は、C N V動物モデルにおいて数種のヒトモノクローナル抗体変異体のin vivo有効性をマウス抗S 1 Pモノクローナル抗体および対照と比較して示す。下記の実施例7に記載されているように、これらの実験では、マウスにネズミ(Mu)抗S 1 Pモノクローナル抗体、数種のヒト化抗S 1 Pモノクローナル抗体変異体(すなわち、変異体L C 3、L C 5、H C c y s L C 3およびH C c y s L C 5)または非特異的モノクローナル抗体(N S)硝子体内投与により0.5μgで2回投与した後、ブルッフ膜のレーザー破膜を行った。レーザー術後14日目にマウスを犠牲にした。強膜-R P E-脈絡膜複合体を解剖し、ローダミンコンジュゲートヒマ(R. communis)凝集素I抗体で染色した。C N V病変体積を平均値±S E Mで示す。

【発明を実施するための形態】

【0301】

実施例

実施例1：S 1 Pに対するネズミモノクローナル抗体(S p h i n g o m a b (商標)；L T 1 0 0 2)

あるタイプの治療抗体は、望ましくないスフィンゴ脂質と特異的に結合して、例えば(1)心臓毒性作用、腫瘍形成作用、または脈管形成作用などの望ましくない作用を促進する望ましくない有毒スフィンゴ脂質の有効濃度(および/またはそれらの代謝前駆体の有効濃度)を低下させることなどの有益な作用をもたらす；(2)望ましくない、毒性、腫瘍形成性、または脈管形成性スフィンゴ脂質の細胞受容体への結合を阻害し、その結果、かつ/またはこのような受容体との結合が可能なスフィンゴ脂質の濃度を低下させる。かかる治療効果の例としては、限定されるものではないが、利用可能なS 1 Pの有効in vivo血清濃度を低下させ、それによってS 1 Pの腫瘍形成作用および脈管形成作用ならびにM I後心不全、癌、または繊維形成性疾患(fibronogenic diseases)におけるその役割を遮断または少なくとも制限するための抗S 1 P抗体の使用が挙げられる。

【0302】

S 1 Pの本質的構造的特徴をK L Hなどの担体分子と架橋することができる反応性基を含むように、チオール化S 1 Pを合成した。免疫処置の前に、そのチオールS 1 P類似体を標準的なプロトコルを用いてI O AまたはS M C C架橋を介してタンパク質担体(例えばK L H)とコンジュゲートした。S M C Cは、第一級アミンおよびスルフヒドリル基と反応するヘテロ二官能性架橋剤であり、好ましい架橋剤である。

【0303】

S w i s s W e b s t e rマウスまたはB A L B-Cマウスを、1回の注射当たり50μgの免疫原(チオール化S 1 PとK L HのS M C C促進性コンジュゲート)を用いて2ヶ月かけて4回免疫処置した。第二回目、第三回目および第四回目の免疫処置の2週間後に血清サンプルを採取し、抗S 1 P抗体の存在について直接E L I S Aによってスクリーニングした。次に、抗S 1 P抗体について高力価を示した動物の脾臓を用い、標準的な融合手順によってハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマを密集状態まで増殖させ、その後、E L I S A解析のためにその細胞上清を集めた。免疫処置した55匹のマウスのうち、8匹は良好に応答し、S 1 P反応抗体について著しい血清力価を示した。続いて、これらのマウスの脾臓および骨髓腫細胞を用い、確立された手順に従って融合を行った。次いで、得られた1,500のハイブリドーマを直接E L I S Aによってスクリーニングし、287の陽性ハイブリドーマを得た。直接E L I S Aによってスクリーニングしたこれらの287ハイブリドーマのうち、159のハイブリドーマが著しい力価を示した。次いで、159のハイブリドーマそれぞれを24ウェルプレートに増殖させた。その後、増殖させたハイブリドーマの細胞馴化培地を再スクリーニングして、目的の抗体を分泌することができる安定なハイブリドーマを同定した。60の最大力価安定ハイブリドーマにおいて競合的E L I S Aを実施した。

【0304】

スクリーニングした55匹のマウス、ほぼ1,500のハイブリドーマの中から、性能特性を表示した1つのハイブリドーマを発見し、この性能特性によって限界希釈クローニングが、最終的に真のモノクローナル抗体を作製するのに必要なものとして正当化された。この方法により47のクローンを得、その大部分はS1P抗体の産生について陽性であると判断した。これらの47クローンのうち、6クローンを24ウェルプレートに増殖させ、続いて、競合的ELISAによってスクリーニングした。陽性のままであった4クローンから、1つのクローンを選択して、S1Pモノクローナル抗体の大量生産を開始した。これらの細胞をSCIDマウスに注射し、得られた腹水をAタンパク質精製し(50%収率)、内毒素レベルについて解析した($< 3 \text{ EU/mg}$)。1回の腹水生産では、50匹のマウスに注射し、合計125mLの腹水を生産した。これらの抗体をIgG1 κ とイソ型判定し、HPLCにより $> 95\%$ 純度であると判断した。抗体は150mM塩化ナトリウム含有20mMリン酸ナトリウム(pH7.2)中で調製し、 -70°C で保存した。この抗体をLT1002またはSphingomab(商標)と称する。

10

【0305】

陽性ハイブリドーマクローン(クローン306D326.26と称する)はATCCに寄託した(安全寄託保存番号SD-5362)。このクローンはS1Pに対して向けられた第一のネズミmAbである。このクローンは、「ヒト化」抗体変異体の作製に用いることができる抗体重鎖および軽鎖の可変領域、ならびにキメラ抗体を構築するのに必要な配列情報も含む。

20

【0306】

S1P特異的抗体についての血清および細胞上清のスクリーニングは、抗原としてチオール化S1P類似体を用いた直接ELISAによるものとした。標準的なELISAを、最初のインキュベーション中に50 μL のサンプル(血清または細胞上清)を等量のPBS/0.1% Tween-20(PBST)で希釈したことを除き、下記のように実施した。ELISAは、結合バッファー(33.6mM Na_2CO_3 、100mM NaHCO_3 ; pH9.5)中のBSAとコンジュゲートさせた0.1 μg の化学合成チオール化S1Pでコーティングした96ウェル高結合ELISAプレート(Costar)において実施した。ELISAプレートウェル中でチオール化S1P-BSAを 37°C で1時間、 4°C で一晩インキュベートした。次いで、これらのプレートをPBS(137mM NaCl 、2.68mM KCl 、10.14mM Na_2HPO_4 、1.76mM KH_2PO_4 ; pH7.4)で4回洗浄し、PBSTで室温にて1時間ブロッキングした。最初のインキュベーションステップでは、75 μL のサンプル(測定すべきS1Pを含有する)を、PBSTで希釈した25 μL の0.1 $\mu\text{g/mL}$ 抗S1P mAbとともにインキュベートし、ELISAプレートのウェルに入れた。各サンプルを3連のウェルで実施した。室温で1時間のインキュベーション後、ELISAプレートをPBSで4回洗浄し、各ウェルにつき100 μL の0.1 $\mu\text{g/mL}$ HRPヤギ抗マウス二次物(Jackson ImmunoResearch)とともに室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートをPBSで4回洗浄し、テトラメチルベンジジン(Sigma)に1~10分間曝した。等量の1M H_2SO_4 を加えることによって検出反応を停止させた。EL-X-800 ELISAプレートリーダー(Bio-Tech)を用い、450nmで測定することによってサンプルの光学密度を決定した。

30

40

【0307】

交差反応性については、競合的ELISAを、次の変更を除き、上記のように実施した。最初のインキュベーションは競合物(S1P、SPH、LPAなど)とビオチンコンジュゲート抗S1P mAbで構成した。精製モノクローナル抗体のビオチン化をEZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation kit(Pierce)を用いて実施した。ビオチン取り込みはキットプロトコールによって決定し、1抗体につき7~11個のビオチン分子であった。競合物は次のとおり調製した：脂質ストックを超音波処理し、アルゴン下で乾燥させた後、DPBS/BSA[DPBS(Invitrogen 14040-

50

133) 中 1 mg/ml 脂肪酸フリー BSA (Calbiochem)] で再構成した。必要に応じて、精製抗 S1P mAb を PBS/0.5% Triton X-100 で希釈した。競合物 3 に抗体 1 の割合を作成するように競合物および抗体溶液を一緒に混合した。HRP コンジュゲートストレプトアビジン二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いて、シグナルを作成した。

【0308】

競合的 ELISA データの別の解釈 (図 1、パネル A に示す) では、抗 S1P mAb がチオール化 S1P 類似体と、競合試験で加えた天然 S1P を区別することができないということが示される。この解釈では、二重結合なしに類似体が構築されたことから抗 S1P mAb が酸化生成物を全く認識しないことも示される。室温で 48 時間そのまま存在させ得る二重結合を含む天然物に対しても抗 S1P mAb を検証した。天然 S1P の逆相 HPLC をこれまでに報告されている方法 (Deutschman, et al. (July 2003), Am Heart J., vol. 146(1):62-8) に従って実施し、その結果より保持時間に差がないことが分かった。さらに、このモノクローナル抗体についての、図 1、パネル A に示した様々な脂質との結合特性の比較により、この抗体によって認識されたエピトープは天然 S1P の二重結合の領域に炭化水素鎖を含まないことも示される。一方、このモノクローナル抗体によって認識されたエピトープは、スフィンゴシン塩基骨格にアミノアルコールを含み、その上遊離リン酸を含む領域である。この遊離リン酸がコリンと結合する (SPC と同様に) ならば、抗体結合は幾分か減少した。このアミノ基が脂肪酸とエステル結合する (esterified) (C1P と同様に) ならば、抗体結合は認められなかった。このスフィンゴシンアミノアルコール骨格がグリセロール骨格に置き換えられた (LPA と同様に) ならば、S1P 特異的モノクローナル抗体は結合を示さなかった。これらのエピトープマッピングデータにより、このモノクローナル抗体によって認識された S1P にはただ 1 つのエピトープしかないこと、そしてこのエピトープが S1P の独特の極性頭部基によって定義されることが示される。

【0309】

ELISA 測定を用いる同様の試験では、この抗 S1P モノクローナル抗体がタンパク質担体も架橋剤も認識しないようにするために、好適な対照材料を評価した。例えば、ELISA においてチオール化 S1P を、レイダウン材料 (the laydown material) としての BSA とコンジュゲートする際に、標準の架橋剤 SMCC を IOA と交換した。

【0310】

IOA を用いた場合、抗体の結合特性は、BSA-SMCC-チオール化 S1P を用いた場合とほぼ同じであった。同様に、KLH を、レイダウン材料としてチオール化 S1P と複合体形成するタンパク質としての BSA と交換した。この試験でも、抗体の結合特性に有意な差がなかった。

【0311】

結合速度論: S1P とその受容体または他の部分との結合速度論は、脂質の性質から伝統的に問題があるとされてきた。多くの問題が脂質の不溶性に関連していた。BIAcore 測定では、これらの問題は、S1P を BIAcore チップに直接固定することによって克服された。この後、抗体をチップの表面に流し、光学密度の変化を測定して、抗体と S1P との結合特性を決定した。抗体の二価結合性を回避するために、チップ上に低密度で S1P をコーティングした。加えて、そのチップを様々な密度の S1P (7RU、20RU および 1000RU) でコーティングし、抗体結合データを 1:1 相互作用モデルにグローバルフィッティングを行った。図 2 に示した結果は、3 つの異なる S1P 密度におけるモノクローナル抗体と S1P との結合に起因する光学密度の変化を示している。概して、S1P に対するモノクローナル抗体の親和性は非常に高く、結合データを解析するために一価結合モデルを用いたかまたは二価結合モデルを用いたかによって、およそ 88 ピコモル (pM) ~ 99 nM の範囲にあることが確認された。

【0312】

実施例 2: ELISA アッセイ

10

20

30

40

50

1. 定量的 E L I S A

マイクロタイター E L I S A プレート (Costar、カタログ番号 3 3 6 1) を、1 M 炭酸バッファー (pH 9. 5) で希釈したウサギ抗マウス I g G, F (a b ')₂ フラグメント特異的抗体 (Jackson、3 1 5 - 0 0 5 - 0 4 7) で 3 7 °C で 1 時間コーティングした。プレートを P B S で洗浄し、P B S / B S A / T w e e n - 2 0 で 3 7 °C にて 1 時間ブロッキングした。最初のインキュベーションでは、非特異的マウス I g G またはヒト I g G、全分子 (校正曲線に使用) および測定サンプルの希釈溶液をウェルに入れた。プレートを洗浄し、1 ウェルにつき 1 0 0 μ l の 1 : 4 0, 0 0 0 希釈 H R P コンジュゲートヤギ抗マウス (H + L) (Jackson、カタログ番号 1 1 5 - 0 3 5 - 1 4 6) とともに 3 7 °C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、酵素反応をテトラメチルベンジジン (Sigma、

10

【0 3 1 3】

2. 直接 E L I S A

マイクロタイター E L I S A プレート (Costar、カタログ番号 3 3 6 1) を、1 M 炭酸バッファー (pH 9. 5) で希釈した L P A - B S A で 3 7 °C で 1 時間コーティングした。プレートを P B S (1 3 7 m M N a C l、2. 6 8 m M K C l、1 0. 1 m M N a₂ H P O₄、1. 7 6 m M K H₂ P O₄; pH 7. 4) で洗浄し、P B S / B S A / T w e e n - 2 0 で室温で 1 時間または 4 °C で一晩ブロッキングした。試験するサンプルを、0. 4 μ g / m L、0. 2 μ g / m L、0. 1 μ g / m L、0. 0 5 μ g / m L、0. 0 1 2 5 μ g / m L、および 0 μ g / m L に希釈し、各ウェルに 1 0 0 μ l を加えた。プレートを洗浄し、1 ウェルにつき 1 0 0 μ l の H R P コンジュゲートヤギ抗マウス (1 : 2 0, 0 0 0 希釈) (Jackson、カタログ番号 1 1 5 - 0 3 5 - 0 0 3) とともに室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、酵素反応をテトラメチルベンジジン (Sigma、カタログ番号 T 0 4 4 0) で検出し、1 M H₂ S O₄ を加えることによってその反応を停止させた。光学密度 (O D) を、T h e r m o M u l t i s k a n E X を用いて 4 5 0 n m で測定した。解析のために未加工データを G r a p h P a d ソフトウェアに送った。

20

30

【0 3 1 4】

3. 競合アッセイ

m A b の特異性を E L I S A アッセイにより試験した。マイクロタイタープレート E L I S A プレート (Costar、カタログ番号 3 3 6 1) を、1 M 炭酸バッファー (pH 9. 5) で希釈した 1 8 : 0 L P A - B S A で 3 7 °C で 1 時間コーティングした。プレートを P B S (1 3 7 m M N a C l、2. 6 8 m M K C l、1 0. 1 m M N a₂ H P O₄、1. 7 6 m M K H₂ P O₄; pH 7. 4) で洗浄し、P B S / B S A / T w e e n - 2 0 で 3 7 °C で 1 時間または室温で一晩ブロッキングした。最初のインキュベーションでは、0. 4 μ g / m L 抗 L P A m A b と指定量の (1 4 : 0、1 6 : 0、1 8 : 0、1 8 : 1、1 8 : 2 および 2 0 : 4) L P A、D S P A、1 8 : 1 L P C (リゾホスファチジルコリン)、S 1 P、セラミドおよびセラミド-1-リン酸を E L I S A プレートのウェルに加え、3 7 °C で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、1 ウェルにつき 1 0 0 μ l の H R P コンジュゲートヤギ抗マウス (1 : 2 0, 0 0 0 希釈) (Jackson、カタログ番号 1 1 5 - 0 3 5 - 0 0 3) または 1 : 5 0, 0 0 0 希釈 H R P コンジュゲートヤギ抗ヒト (H + L) (Jackson、カタログ番号 1 0 9 - 0 3 5 - 0 0 3) とともに 3 7 °C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、酵素反応をテトラメチルベンジジンで検出し、1 M H₂ S O₄ を加えることによってその反応を停止させた。光学密度 (O D) を、T h e r m o M u l t i s k a n E X を用いて 4 5 0 n m で測定した。解析のために未加工データを G r a p h P a d ソフトウェアに送った。

40

【0 3 1 5】

50

実施例 3：SPHINGOMAB ネズミ mAb は S 1 P に対して高度に特異的である

競合的 E L I S A により、他の生体活性脂質と比較して、S 1 P に対する S P H I N G O M A B の特異性が示されている。S P H I N G O M A B は、S 1 P の直接代謝前駆体であるスフィンゴシン (S P H)、または S 1 P と構造的かつ機能的に類似している重要な細胞外シグナル伝達分子であるリゾホスファチジン酸 (L P A) との交差反応性は示されていない。S P H I N G O M A B は、構造的に類似している他の脂質および代謝産物、セラミド-1-リン酸 (C 1 P)、ジヒドロスフィンゴシン (D H-S P H)、ホスファチジルセリン (P S)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、またはスフィンゴミエリン (S M) などとを認識しなかった。S P H I N G O M A B は、ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸 (D H-S 1 P) と、そしてより少ない程度に、スフィンゴシルホリルコリン (sphingosylphorylcholine) (S P C) とは交差反応した (図 3)。

10

【0316】

実施例 4：SPHINGOMAB は C N V ネズミモデルにおいて C N V および瘢痕形成を著しく減少させる

雌 C 5 7 B L 6 / J マウスをレーザーによるブルッフ膜破膜に供し、2 μ l の生理食塩水で希釈した 0.5 μ g の S p h i n g o m a b またはイソ型適合非特異的 (N S) 抗体のいずれかを投与した。レーザー破膜の 14 日後および 28 日後にマウスを犠牲にした。

【0317】

C N V 病変を誘導するために、眼科用トロピカミド (0.5%) およびフェニレフリン (2.5%) で瞳孔を散大した。眼の上にカバースリップを置いた。50 μ m のスポットサイズで 150 mW で 100 m 秒のパルスを出すように設定した細隙灯と連結した O c u l l i g h t G L 532 nm (Iridex Corporation, Mountain View, CA) を用いて、9 時、12 時および 3 時の相対位置において、視神経円板からおおよそ 50 μ m の位置にある右眼 4 分の 3 のブルッフ膜を破膜させた。全てのケースにおいて左眼を無傷の対照とした。気泡のない病変または融合状態となった病変は解析から排除した。

20

【0318】

C N V 病変サイズを測定するために、鞏膜-脈絡膜-R P E 複合体の脈絡膜フラットマウントを調製し、血管系 (R. communis 凝集素 I ; 赤色) および周皮細胞 (C D 140 b ; 緑色) について染色した。R G B S p o t 高解像度デジタルカメラおよびレーザー走査共焦顕微鏡 (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA) を備えた落射蛍光 Z e i s s A x i o p l a n 2 を用いて、デジタル画像を取り込んだ。容量分析では、z シリーズキャプチャーを用い、z シリーズ全体にわたる病変領域の合計に z 厚さ (4 μ m) を乗じ、病変体積を得た。

30

【0319】

コラーゲン沈着を評価するために、鞏膜-脈絡膜-R P E 複合体をマッソン・トリクロームで染色した。この鞏膜-脈絡膜-R P E 複合体をパラフィン包埋した後、厚さ 6 μ m の連続切片を作製した。1 病変につきおおよそ 30 の切片を評価した。コラーゲン沈着量の定量を、C N V 病変体積に関して記載した方法と同じように算出した。

【0320】

取り込んだデジタル画像を、I m a g e J ソフトウェア (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて形態学的に評価した。図 4 A は、S P H I N G O M A B が、レーザーによるブルッフ膜破膜の 14 日後および 28 日後に脈絡膜新血管新生を劇的に弱めることを示している。図 4 B は、S P H I N G O M A B が、レーザーによるブルッフ膜破膜の 28 日後に C N V 病変形成と関連している繊維症を著しく減少させることを示している。

40

【0321】

実施例 5：SPHINGOMAB は内皮細胞移動および管形成の阻害を含む複数の機構を通じて新血管新生を阻害する

S 1 P はヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) の移動を促進するが、マトリゲルアッセ

50

イおよび他のアッセイ (in vitroでのデノボBV形成) において; SPHINGOMABはS1Pのこれらの作用を無効にすることができる。Visentin et al. (Cancer Cell 2006 Mar; 9(3): 225-38)によって記載されているように、試験を実施した。図5A中のデータは、GFを引き下げたマトリゲル上に播種したHUV ECはS1Pの存在下では多数の毛細血管様構造を形成し、S1Pの不在下でまたはSPHINGOMABおよびS1Pとともに同時インキュベートした時には毛細血管様構造を形成しなかったことを示唆している。図5B中のデータは、マトリゲルケモインベーションアッセイにおいて0.1~1 μ M S1PがHUV EC移動を、非処置HUV EC、またはSPHINGOMABとともに同時インキュベートしたHUV ECの2~2.5倍刺激する強い能力を示している。まとめると、これらの研究は、SPHINGOMABがECへのS1Pの脈管形成促進作用を効果的に軽減することができることを示している。

10

【0322】

実施例6: SPHINGOMABはin vivoでのS1P、VEGFおよびbFGFの作用の軽減を含む複数の機構を通じて新血管新生を阻害する

S1Pが皮下に埋め込まれたマトリゲルプラグ内への内皮毛細血管成長を増加させることを示したin vivo研究に基づいて、本発明者らは、SPHINGOMABによりin vivoでのデノボBV形成を減少させることができると推測した。このことを調査するために、本発明者らは新血管新生に関しin vivoマトリゲルプラグアッセイを用いた。一連の試験において、マトリゲルに1 μ M S1P、0.5 μ g/mL bFGFまたは1 μ g/mL VEGFのいずれかを添加した後、マウス (n=4) にI.P. 注射した。10日後、それらのマウスをヘパリン処理し、蛍光レクチン、イソレクチン B4-FITCを注射した。この蛍光レクチンは、血管ECによって発現される接着分子と結合し、その接着分子によって増殖しつつあるBVが形作られる。次いで、プラグを切除し、OCT中で凍結させ、切片を作製し、FITC染色されたBVについて考察した。図6A中のデータは、bFGFまたはVEGFを含有するプラグと比較して、S1Pを含有するプラグにおいて膨大な量のFITC染色BVから明らかなように、S1PがbFGFまたはVEGFよりも強力なin vivo新血管新生刺激因子であることを示唆している [Lee, et al., (1999), Biochem Biophys Res Commun., vol 264: 743-50]。

20

【0323】

次いで、プラグの切片を、EC浸潤の評価のためにヘモトキシリンおよびエオジン (hematoxylin & eosin) で染色した (図6B)。ECの浸潤は新血管新生において重要なステップである。S1Pを含有するプラグでは、マトリゲルだけのプラグと比較してEC浸潤が3倍増加した。本発明者らは免疫細胞などの他の細胞種も染色される可能性があることを認識しているが、細胞浸潤はECであると推測される。マウスにSPHINGOMABを48時間おきに全身投与し (プラグ埋め込みの1日前に開始した)、S1Pをマトリゲルプラグに加えたときでさえも減少した量のEC浸潤を示した。これらの結果は、in vivoでのEC浸潤を阻害するSPHINGOMABの能力を示している。

30

【0324】

血液および周囲組織由来の内因性S1Pは創傷に脈管形成促進刺激を与えることができた。創傷において内因性S1Pを減少させるSPHINGOMABの能力を調査した。最適に刺激を与えたプラグ (0.5 μ g/mL bFGFまたは10 μ g/mL VEGFを添加したマトリゲル) をマウスに埋め込んだ。マウスにはマトリゲル埋め込みの1日前に開始し、48時間おきに25 μ g/kg SPHINGOMABまたは生理食塩水のi.p. 注射を行った。各処置群 (マトリゲル、マトリゲルに加えてGFまたはマトリゲルに加えてGFさらにSPHINGOMAB投与) は最低6匹のマウスで構成した。10日後、それらのマウスをヘパリンで処理し、イソレクチン B4-FITCを注射し、プラグを切除し、OCT包埋し、媒質を凍結させ、切片を作製した。図6Cに示されるように、微小血管密度をレクチン-FITC染色された血管により定量評価した。BV染色は対照 (未処置) プラグにおいて散発的であるが、一方、bFGFまたはVEGFを含有するプラグは血管新生の有効な証拠を示した。SPHINGOMABで処置したマウスからの

40

50

プラグは、生理食塩水処置マウスからのbFGFまたはVEGFプラグと比較して、BV形成の著しい減少を示した。染色血管の定量により、生理食塩水処置動物と比較して、SPHINGOMABで処置した動物からのVEGF-またはbFGF含有プラグそれぞれの新血管新生の5～8.5倍減少は明白であった(図6C)。この評価は、微小血管新生を促進する内因性血清および組織S1Pの能力、さらに内因性S1Pの脈管形成促進作用を無効にするSPHINGOMABの能力をさらに示している。

【0325】

実施例7：SPHINGOMABはin vivoでの癒痕形成を阻害する

S1Pは、繊維芽細胞移動、増殖およびコラーゲン産生を活性化することにより創傷治癒に大きく貢献し；SPHINGOMABは、これらの作用を無効にする。様々なタイプの繊維芽細胞を用いたいくつかの研究により創傷治癒を促進するS1Pの能力が裏付けられる：1) 標準的な方法を用いて³H-チミジン取り込みによって測定されるように、S1PはSwiss-3T3繊維芽細胞増殖を増加させ(図7A)；2) 標準的な搔傷治癒アッセイにおいて、S1Pは心臓繊維芽細胞の移動を促進し(図7B)；3) 免疫蛍光顕微鏡によって示されるように、S1Pはコラーゲン1α-GFPリポーターを有するトランスジェニックマウスから単離された心臓繊維芽細胞によるコラーゲン発現を促進し(図7C)；そして4) イムノブロット解析を用いて筋繊維芽細胞マーカータンパク質である平滑筋アクチンの発現の増加によって示されるように、S1PはW1-38肺繊維芽細胞の筋繊維芽細胞(癒痕リモデリングにおいて作用する細胞)への分化を誘導した(図7D)。これらのアッセイそれぞれにおいて、SPHINGOMABはS1Pの作用を無効にした。眼繊維芽細胞はS1PおよびSPHINGOMABに対して同じように反応すると思われる。心血管疾患とAMDの新生血管病変(癒痕リモデリングおよびその後の不適合繊維組織形成を含む)との類似点が指摘されており(Vine, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112: 2076-80およびSeddon and Chen (2004), Int Ophthalmol Clin, vol 44: 17-39)；そのため、SPHINGOMABは、心血管系において証明された作用と同様に、眼新血管新生および癒痕化においても作用があると思われる。

【0326】

研究により、マウスにおいて冠動脈左下行枝の結紮による永久的心筋梗塞(MI)後に心臓癒痕形成を減少させるSPHINGOMABの有効性を評価した。手術の48時間後に25mg/kg SPHINGOMABまたは生理食塩水の全身投与を開始した。リモデリング初期に起こる正常な修復癒痕形成を可能にし、かつMI直後に有益な、S1P刺激による脈管形成を可能にするように48時間時点での抗体投与を選択した。梗塞の2週間後に、マウスを犠牲にし、心臓組織のMasson's trichrome染色によって繊維症を評価した。SPHINGOMAB処置を受けた動物は血管周囲の繊維症のほぼ完全な排除を示した(図7、写真)。非特異的創傷治癒反応の対照として、シャム動物に冠動脈結紮を行わない開胸術を行った(図7E)。

【0327】

実施例8：S1Pは眼上皮細胞および繊維芽細胞の、収縮性のある癒痕組織産生筋繊維芽細胞への転換を促進する

病理組織の繊維症(癒痕形成)は、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、増殖性硝子体網膜症および緑内障手術の影響を含む多数の眼障害における第一要因である。

【0328】

これらの障害の多くでは、循環増殖因子およびケモカインが、正常眼細胞の、「筋繊維芽細胞」と呼ばれている、繊維収縮性癒痕組織産生細胞への転換を促進する。通常、筋繊維芽細胞は外傷後、創傷治癒反応の一部として組織修復に関与する。しかしながら、筋繊維芽細胞の数および機能の変化は、肝臓、皮膚、肺、腎臓、心臓および眼における病理的癒痕組織形成を特徴とする疾患に関係している。眼において、網膜色素上皮(RPE)細胞の筋繊維芽細胞表現型への転換は、網膜剥離、その後の視力障害の原因となる繊維収縮性膜の形成につながる。加えて、眼外傷後、眼繊維芽細胞の筋繊維芽細胞への転換が異常

瘢痕組織産生をもたらし、このことが後に視力喪失につながる可能性がある。筋繊維芽細胞を促進する眼の循環タンパク質因子の多くは同定されているが、このプロセスにおけるS1Pなどのリゾ脂質の役割に関しては何も分かっていない。そのため、本発明者らはいくつかのヒト眼細胞系統の筋繊維芽細胞転換に対するS1Pの作用を調べた。図8にて示されるように、S1Pはヒト網膜色素上皮細胞（図8A）およびヒト結膜繊維芽細胞（図8B）における α -平滑筋アクチン（ α -SMA；筋繊維芽細胞マーカー）の産生を刺激する。これらのデータによって、S1Pが、眼上皮細胞および繊維芽細胞の、網膜剥離、眼繊維症およびその後の視力障害につながる可能性がある収縮性のある瘢痕組織産生筋繊維芽細胞への転換を促進する循環化学因子環境の1つであることが初めて示される。

【0329】

10

これらの試験では、 α -SMA発現を促進するS1Pの能力が網膜色素上皮細胞と結膜繊維芽細胞との間で濃度依存的に異なっていた。示したように、上皮細胞では0.001 μ M濃度で α -SMA発現の著しい増加が認められ、10 μ M濃度で基礎レベルまで減少した。これに対して、結膜繊維芽細胞では10 μ M濃度でのみ α -SMA発現の著しい増加が認められた。この違いは、繊維芽細胞と比較して、上皮細胞で増加したS1P受容体発現に起因すると思われる。S1P受容体発現レベルの増加により、網膜色素上皮細胞は低濃度でS1Pに対する感受性がより高いと思われる。その一方で、高S1PレベルではS1P受容体は感作されるかまたは場合によっては内在化され、S1Pによる刺激は減少する。

【0330】

20

コラーゲンは、体内の全ての組織を支える一次構造タンパク質の1つであり、瘢痕組織の主成分の1つである。非病的状況では、組織内の全コラーゲン含量は、繊維芽細胞によるコラーゲン産生とある特定の酵素による分解とのバランスによって維持される。瘢痕組織レベルの増加を伴う多数の障害は、瘢痕形成に必要なコラーゲンの分解を阻害する生理学的プロセスおよび分子プロセスに一部起因する。瘢痕組織形成を促進するS1Pの能力は、コラーゲン分解を阻害し、それによって器官内の瘢痕組織の純増加をもたらすその能力によって生じ得るという仮説を立てた。そこで、ヒト結膜繊維芽細胞におけるプラスミノゲン活性化因子阻害剤（PAI-1）の発現に対するS1Pの作用を調べた。PAI-1発現の増加は、結合組織のタンパク質加水分解の減少と相関し、瘢痕化の増加を伴ういくつかの繊維症に関連してアップレギュレートされる。図8Cにて示されるように、S1PはPAI-1発現を用量依存的に刺激する。これらのデータは、その分解を阻害するタンパク質の発現を刺激することによって瘢痕組織形成も促進し得ることを示しており、これにより、S1Pは、眼疾患と関連している病理的瘢痕化を促進および維持する複数の機構経路を通じて機能することが示唆される。

30

【0331】

実施例9：SPHINGOMABは炎症細胞および免疫細胞浸潤を阻害する

炎症はリモデリングプロセスにおける初期反応である。炎症は、虚血によっても細胞損傷によっても誘発され、死細胞の貪食のためにそして炎症性応答をさらにアップレギュレートするためにマクロファージおよび好中球の外傷部位への移動を刺激するサイトカイン発現のアップレギュレーションをもたらす[Jordan, et al. (1999), Cardiovasc Res, vol 43: 860-78]。肥満細胞は炎症性応答の重要な細胞メディエーターでもある。肥満細胞から放出されるS1Pは、炎症実験動物モデルにおいて見られる有害反応の多くに関与する[Jolly, et al (2004), J Exp Med, vol 199: 959-70およびJolly et al (2005), Blood, vol 105: 4736-42]。

40

【0332】

CNVおよびCVDにおける免疫応答および炎症性応答の類似性に基づいて、AMD中のこれらの損傷の軽減におけるSPHINGOMABの潜在的作用の指標として、ネズミ梗塞モデルにおいて創傷への免疫細胞浸潤を軽減するSPHINGOMABの有効性を評価した[Vine, et al.(2005), Ophthalmology, vol 112: 2076-80;およびSeddon and Chen(2004), Int Ophthalmol Clin, vol 44: 17-39]。MIの4日後、危険性がある領域内

50

でマクロファージおよび肥満細胞浸潤をそれぞれMAC-1抗体およびMCG35抗体を用いて評価した。SPHINGOMABは、炎症性マクロファージ（図9A）および肥満細胞（図9B）の密度を劇的に弱め、これにより、SPHINGOMABがAMD中に免疫損傷および炎症性損傷を回避し得ることが示唆される。

【0333】

実施例10：S1Pネズミモノクローナル抗体（LT1002；Sphingomab）の可変ドメインのクローニングおよび特性解析

この実施例では、S1Pに対するネズミmAbのクローニングを報告する。全体的な戦略は軽鎖（VL）および重鎖（VH）両方のネズミ可変ドメインのクローニングで構成した。306D VHのコンセンサス配列は定常領域フラグメントが γ 2bイソ型と一致することを示している。ネズミ可変ドメインを、軽鎖（CL）の定常ドメインと、そして重鎖（CH1、CH2およびCH3）の定常ドメインとともにクローニングし、結果としてキメラ抗体構築物を得た。

【0334】

1. ネズミmAbのクローニング

抗S1Pハイブリドーマ細胞株306D326.1（ATCC番号SD-5362）由来のクローンを、GlutaMAX（商標）I、4500mg/L D-グルコース、ナトリウムプルベート（Sodium Puruvate）；Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA、111-035-003）、10% FBS（Sterile Fetal Clone 1、Perbio Science）および1Xグルタミン／ペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco/Invitrogen）を含むDMEM（ダルベッコの改変イーグル培地（Dulbecco's Dulbecco's Modified Eagle Medium））中で増殖させた。全RNAをRNeasy Mini kit（Qiagen, Hilden Germany）に基づいた手順を用いて 10^7 ハイブリドーマ細胞から単離した。このRNAを用いて、製造業者のプロトコールに従って一本鎖cDNAを作製した（1st strand synthesis kit、Amersham Biosciences）。

【0335】

免疫グロブリン重鎖可変領域（VH）cDNAを、MHV7プライマー（MHV7：5'-ATGGGATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT-3' [配列番号1]）をIgG2b定常領域プライマーMHCG1/2a/2b/3混合物（MHCG1：5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3' [配列番号2]；MHCG2a：5'-CAGTGGATAGACCGATGGGGC-3' [配列番号3]；MHCG2b：5'-CAGTGGATAGACTGATGGGGG-3' [配列番号4]；MHCG3：5'-CAAGGGATAGACAGATGGGGC-3' [配列番号5]）と組み合わせ用いてPCRによって増幅した。この反応産物を、TOPO-TA cloning（登録商標）kitおよび配列を用いてpCR2.1（登録商標）-TOPO（登録商標）vector（Invitrogen）に連結した。次いで、重鎖の可変ドメインをこのベクターからPCRによって増幅し、Hind IIIおよびApa Iフラグメントとして挿入し、HCMVプロモーター、リーダー配列および γ -1定常領域を含む発現ベクターpG1D200（米国特許第7,060,808号参照）またはpG4D200（同文献）に連結して、プラスミドpG1D200306DVH（図10）を作製した。306D_{VH}のコンセンサス配列（下記に示す）は定常領域フラグメントが γ 2bイソ型と一致することを示した。

【0336】

同様に、免疫グロブリン κ 鎖可変領域（VK）を、MKV20プライマー（5'-GTCCTGATTCTAGGCA-3' [配列番号6]）を κ 定常領域プライマーMKC（5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' [配列番号7]）と組み合わせ用いて増幅した。この反応産物を、TOPO-TA cloning（登録商標）kitおよび配列を用いてpCR2.1（登録商標）-TOPO（登録商標）vectorに連結した。次いで、軽鎖の可変ドメインをPCRによって増幅した後、Bam HIおよびHind IIIフラグメントとしてHCMVプロモーター、リーダー配列およびヒ

トκ定常ドメインを含む発現ベクターpKN100（米国特許第7,060,808号参照）に挿入し、プラスミドpKN100306DVKを作製した。

【0337】

重鎖および軽鎖プラスミド pG1D200306DVHとpKN100306DVKをDH4a細菌に形質転換させ、グリセロールに入れてストックした。製造業者（Qiagen、endotoxin-free MAXIPREP（商標）kit）によって記載されているように、大量のプラスミドDNAを調製した。Qiagen社のQIAprep Spin Miniprep KitまたはEndoFree Plasmid Mega/Maxi Kitを用いて精製したDNAサンプルを、ABI 3730x1自動シーケンサーを用いて配列決定した、このシーケンサーは蛍光シグナルをそれらの対応する核酸塩基配列への変換も行う。5'および3'末端において、得られた配列がオーバーラップするようにプライマーを設計した。プライマーの長さは18～24塩基であり、好ましくは、それらはGC含量50%でありかつ推定二量体または二次構造を含まないものとした。Sphingomab（商標）のマウスV_HおよびV_Lドメインのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号8および9である（表2）。表2ではCDR残基（Kabat, EA (1982), Pharmacol Rev, vol. 34: 23-38参照）に下線を施し、下の表3において個別に示している。

【0338】

【表2】

表2：ネズミmAb、Sphingomab（商標）のV_HおよびV_Lドメイン

ネズミV _H ドメイン	QAHQQSDAELVKPGASVKISCKVSGFIFIDHTIHWMKQRPEQGLEWIGCIS	配列番号8
	PRHDITKYNEMFRGKATLTADKSSSTAYIQVNSLTFFEDSAVVFCA <u>RGGFYGSTIWFDFWGQGTTLTVS</u>	
ネズミV _L ドメイン	ETTVQSPASLSMAIGEKVTHRCITTTDIDDMMWFQKPTGPTNLLISEGNILRP ^{WT} SRPSSSG	配列番号9
	YGTDFLFTIENMLSE ^W ADVYCLQSDNLPFTTGGSGTKLEIK	

【0339】

【表3】

表3：マウスSphingomab（商標）マウスV_HおよびV_LドメインのCDR配列

VL CDR	CDR
ITTTDIDDMM（配列番号10）	CDR1
EGNILRP（配列番号11）	CDR2
LQSDNLPFT（配列番号12）	CDR3
VH CDR	
DHTIH（配列番号13）	CDR1
CISPRHDITKYNEMFRG（配列番号14）	CDR2
GGFYGSTIWFDF（配列番号15）	CDR3

【0340】

表4においていくつかのキメラ抗体可変（V_HおよびV_L）ドメインのアミノ酸配列を比較している。これらの変異体を、発現ベクター中へ、生殖系列リーダー配列の後ろにクローニングした。pATH200（最初の19アミノ酸）およびpATH300配列（最初の22アミ

ノ酸) 上の生殖系列リーダー配列には、表 4 において下線が引かれている。CDR は太字で示されている。表 4 における重鎖および軽鎖配列の各々の C 末端に続くアミノ酸は、イタリック体で示されている。これらは定常ドメインの最初の数アミノ酸であり、可変ドメインの一部ではない。pATH200 および pATH300 シリーズの番号は通常、特定の可変ドメイン変異体の配列を含むベクターを指すが、便宜のため、本明細書において、この命名法は該変異体の可変ドメイン自体を指すため、および区別するために用いられ得ることに注意すべきである。ネズミ V_H および V_L ドメインの配列を用いて、どのフレームワーク残基をヒト化抗体に組み込むべきかを確認するための分子モデルを構築した。

【 0 3 4 1 】

【表 4 - 1】

表 4: ヒト化抗S1P 抗体変異体のヒト化 VH (pATH200 シリーズ) および VL (pATH300 シリーズ) ドメインのアミノ酸配列。
リーダーには下線が引かれ、CDR は太字で示される。

VH 変異体	
pATH200 配列番号: 16	<u>mgstailallavlggvcseqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgyifidhtihwvrqmpggglewmgcisprhdkyn</u>
pATH201	m.....
pATH202	f.....i.....
pATH203	i.....
pATH204	f.....
pATH205	f.....m.....i.....
pATH206	a.....f.....m.....i.....
pATH207	m.....a.....
配列続き:	
pATH200 続き	emfrgqv tisadkssstaylqwsslkasdtamfcar ggfygsti wdfwgqgtmtvssastkqps
pATH201	
pATH202	
pATH203	
pATH204	
pATH205	a.l.....
pATH206	a.l.....
pATH207	

10

20

30

40

【表 4 - 2】

表 4 続き	
VL 変異体	
pATH300 (配列番号: 17)	mdmrvpagllgllllwlpgarcttltqspstlsasvgdrvtitcitttddidddmnnwyqqepgkapklliyegnilrpgv
pATH301	S.....
pATH302	f.....
pATH303	v.....S.....
pATH304	f.....S.....
pATH305	v.....f.....S.....
pATH306	v.....f.....S.....
pATH308	v.....f.....S.....
pATH309	S.....
配列続き	
pATH300 続き	psrfsgsgsgtdftltisklqpeditatyyclqsdnlpftfgggtkleikrewip
pATH301	
pATH302	
pATH303	-
pATH304	
pATH305	--
pATH306	s.....--
pATH308	s..y.....
pATH309	s..y.....

【 0 3 4 4 】

2. キメラ抗体の発現および結合特性

10

20

30

40

50

pG1D200306DVHとpKN100306DVKの両方の重鎖および軽鎖プラスミドをDH4a細菌に形質転換させ、グリセロールに入れてストックした。製造業者 (Qiagen、endotoxin-free MAXIPREP (商標) kit カタログ番号12362) によって記載されているように、大量のプラスミドDNAを調製した。

【0345】

非ヒト哺乳類系での抗体発現では、各プラスミド10 µgを用いたエレクトロポレーション (10⁷ 細胞/mlで0.7 ml) により、プラスミドをアフリカミドリザル腎臓繊維芽細胞系統COS-7にトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を8 mlの増殖培地中で4日間培養した。キメラ306DH1x306DVK-2抗体を1.5 µg/mlで、一過性同時トランスフェクトCOS細胞馴化培地中で発現させた。この抗体とS1Pとの結合を、S1P ELISAを用いて測定した。

【0346】

キメラ抗体の発現レベルを定量的ELISAにより次のとおり決定した。マイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp immunoplate、Invitrogen) を、100 µl アリコートの0.4 µg/ml PBS希釈ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Sigma, St. Louis, MO) でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。次いで、これらのプレートを200 µl/ウェルの洗浄バッファー (1x PBS、0.1% TWEEN) で3回洗浄した。各希釈血清サンプルまたは融合上清の200 µl アリコートを毒素コーティングプレートに移し、37℃で1時間インキュベートした。洗浄バッファーで6回洗浄した後、ヤギ抗ヒトκ軽鎖ペルオキシダーゼコンジュゲート (Jackson Immuno Research) を1:5000希釈で各ウェルに加えた。室温で1時間反応を行い、プレートを洗浄バッファーで6回洗浄し、各ウェルに150 µlのK-BLUE substrate (Sigma) を加え、暗所で室温で10分間インキュベートした。50 µlのRED STOP solution (SkyBio Ltd.) を加えることによってこの反応を停止させ、Microplate Reader 3550 (Bio-Rad Laboratories Ltd.) を用いて655 nmで吸収を測定した。抗体結合アッセイの結果は図11に示している。

【0347】

3. 293F発現

重鎖および軽鎖プラスミドをTop 10大腸菌 (One Shot Top 10 chemically competent E. coli cells (Invitrogen、C4040-10)) に形質転換させ、グリセロールに入れてストックした。製造業者 (Qiagen、endotoxin-free MAXIPREP (商標) kit カタログ番号12362) によって記載されているように、大量のプラスミドDNAを調製した。

【0348】

ヒト系での抗体発現では、293fectin (Invitrogen) を用い、培養に293F-FreeStyle Media (Invitrogen) を用いて、プラスミドをヒト胎児腎臓細胞系統293F (Invitrogen) にトランスフェクトした。軽鎖および重鎖プラスミドをいずれも0.5 g/mlでトランスフェクトした。トランスフェクションは細胞密度10⁶ 細胞/mlで実施した。トランスフェクションの3日後、1100 rpmで25℃で5分間の遠心分離により上清を集めた。発現レベルは定量的ELISAにより定量し (上記実施例参照)、キメラ抗体については約0.25~0.5 g/mlであった。

【0349】

4. 抗体精製

培養上清をAタンパク質/Gカラム (Pierce、カタログ番号53133) に0.5 ml/分で通すことによって、培養上清からモノクローナル抗体を精製した。移動相は1X Pierce社製IgG binding Buffer (カタログ番号21001) および0.1 Mグリシン pH 2.7 (Pierce、Elution Buffer、カタログ番号21004) で構成した。0.1 Mグリシン中の抗体収集物を1 Mリン酸バッファー、pH 8.0で10% (v/v) 希釈して、pHを中和した。IgG₁ 収集物をプールし、1X PBSに対して徹底的に透析した (Pierce社製Slide-A-Lyzer Cas

sette、3, 500 MWCO、カタログ番号66382)。溶出液をCentricon YM-3 (10,000 MWCO Amicon カatalog番号4203)を用いて2, 500rcfで1時間の遠心分離により濃縮した。抗体濃度は標準として市販の骨髓腫IgG₁ストック溶液を用いて上記のように定量的ELISAにより決定した。重鎖タイプのmAbを、Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Sigma、ISO-2)を用いてELISAにより決定した。

【0350】

5. 抗体変異体のS1Pに対する比較結合

下記表5では変異株とキメラ抗体との比較分析を示している。マウスまたはヒトIgGに対して特異的な、HRPとコンジュゲートされた二次抗体によって結合抗体を検出して、これらの結果を得た。発色反応を測定し、光学密度(OD)として報告した。抗体パネルの濃度は0.1µg/mlであった。S1Pコーティングマトリックス単独との二次抗体の相互作用は全く検出されなかった。

【0351】

【表5】

表5: キメラ抗S1P抗体の変異体におけるS1Pに対する比較結合

可変ドメイン	突然変異	プラスミド	結合
HC	キメラ	pATH50 + pATH10	1.5
	CysAla	pATH50 + pATH11	2
	CysSer	pATH50 + pATH 12	0.6
	CysArg	pATH50 + pATH14	0.4
	CysPhe	pATH50 + pATH16	2
LC	MetLeu	pATH53 + pATH10	1.6

【0352】

6. 表面プラズモン共鳴(SPR)による結合速度論の測定

Biacore 2000 optical biosensor (Biacore AB, Uppsala Sweden)において全結合データを収集した。マレイミドCM5センサーチップにS1Pを結合させた。まず、CM5チップをNHSEDCの等量混合物で7分間活性化し、続いてエチルジアミンでの7分のブロックングステップを行った。次に、その表面にsulfo-MBS (Pierce Co.)を、HBSランニングバッファー(10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% p20、pH7.4)中濃度0.5mMで通した。S1PをHBSランニングバッファー中に濃度0.1mMまで希釈し、異なる時間の長さで注入し、2つの異なる密度のS1P表面(305RUおよび470RU)を作成した。次に、マウス、201308、201309および207308抗体それぞれについて16.7nM、50.0nM、50.0nM、16.7nMおよび16.7nMからの3倍希釈系列を用いてmAbの結合データを収集した。

【0353】

各濃度を二反復で試験した。表面を50mM NaOHで再生した。全データを25℃で収集した。参照表面ならびにブランク注入を用いて反応データを加工した。データセット(2回試験した2表面と各変異体の反応を相互作用モデルに当てはめ、結合パラメーターを得た。異なるmAb濃度のデータを、1:1(マウス)または1:2(変異体)相互作用モデルを用いてグローバルフィッティングを行い、見かけの結合速度定数を決定した。括弧内の数字は下1桁の誤差を示す。

【0354】

実施例11 S1Pに対するキメラmAb

本明細書において、「キメラ」抗体(または「免疫グロブリン」とは、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属す抗体における対応配列と同一ま

たは相同な重鎖および／または軽鎖を含むが、残りの鎖は別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属す抗体における対応配列と同一または相同である分子、ならびに所望の生物活性を示す限り、このような抗体のフラグメントを指す(Cabilly et al., 前掲; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851 (1984))。

【0355】

S1Pに対するキメラ抗体は、特定のハイブリドーマ(ATCC safety deposit storage number SD-5362)由来のネズミ抗体の活性S1P結合領域をヒトIgG1免疫グロブリンのFc領域とともに含む可変領域(Fv)を用いて作製された。これらのFc領域は、ヒト抗体のCL、CHLおよびCH3ドメインを含んだ。特定の方法に限定されるものではなく、キメラ抗体はまたヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAまたはIgMのFc領域からも作製されている。当技術分野では言うまでもないことであるが、「ヒト化」抗体は、ネズミ抗S1P mAbの相補性決定領域(CDR、例えば、CDR1～4)をIgG1のフレームワーク領域などのヒト抗体フレームワーク領域(例えば、Fr1、Fr4など)とともにグラフトすることにより作製可能である。図11は、レイダウン材料としてチオール化S1Pを用いる、直接的ELISA測定におけるキメラおよび完全ネズミmAbの結合を示す。

【0356】

図11に示されている直接的ELISA実験は、S1Pに対するキメラ抗体の結合特性は完全ネズミモノクローナル抗体に対する結合特性と同等であった。ELISAは、結合バッファー(33.6mM Na₂CO₃、100mM NaHCO₃; pH9.5)中、BSAにコンジュゲートさせた0.1μgの化学合成チオール化S1Pでコーティングした96ウェルhigh-binding ELISAプレート(Costar)で行った。このチオール化S1P-BSAをELISAプレートで37℃にて1時間または4℃にて一晩インキュベートした。次に、プレートをPBS(137mM NaCl、2.68mM KCl、10.14mM Na₂HPO₄、1.76mM KH₂PO₄; pH7.4)で4回洗浄し、PBSTで室温にて1時間ブロッキングした。一次インキュベーション工程では、75μLのサンプル(測定するS1Pを含む)を、PBSTに希釈した0.1μg/mL抗S1Pモノクローナル抗体25μLとともにインキュベートし、ELISAプレートのウェルに加えた。サンプルにつき3反復のウェルで行った。室温で1時間インキュベートした後、ELISAプレートをPBSで4回洗浄し、ウェル当たり100μlの0.1μg/mL HRPヤギ抗マウス二次抗体(Jackson Immunoresearch)とともに室温で1時間インキュベートした。その後、プレートをPBSで4回洗浄し、テトラメチルベンジジン(Sigma)に1～10分間曝した。この検出反応を、等量の1M H₂SO₄を加えることで停止させた。これらのサンプルの光学密度を、EL-X-800 ELISAプレートリーダー(Bio-Tech)を用い、450nmで測定することにより決定した。

【0357】

同様に、免疫動物の血清またはハイブリドーマなどの抗体産生細胞の細胞馴化培地(たとえば、上清)の抗体力価を測定する好ましい方法は、BSAなどのタンパク質担体と共有結合された標的リガンド(例えば、S1P、LPAなどのチオール化類似体)でELISAプレートをコーティングすることを含む。

【0358】

特定の方法または例に限定されるものではなく、キメラ抗体は、LPA、セラミド、スルファチド、セレブロシド、カルジオリピン、ホスホチジルセリン、ホスホチジルイノシトール、ホスファチジン酸、ホスホチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、エイコシノイド、およびその他のロイコトリエンなどのような他の脂質標的に対しても作製することができる。さらに、これらの脂質の多くは、所望によりグリコシル化および／またはアセチル化することもできる。

【0359】

実施例12：ヒト化抗S1Pモノクローナル抗体LT1009 (Sonepcizumab)の作製および特性解析

10

20

30

40

50

S 1 Pと特異的に結合するネズミ抗S 1 Pモノクローナル抗体3 0 6 D (L T 1 0 0 2 ; S p h i n g o m a b (商 標)) は、様々な動物モデルにおいて脈管形成および腫瘍成長を強く抑制することが証明されている。以下に記述するように、L T 1 0 0 2 を、ネズミC D Rをグラフトするヒトフレームワークの配列同一性および相同性検索といくつかのフレームワーク逆突然変異を導くコンピューター処理モデルを用いてヒト化した。2つの変異体、H u M A b H C L C ₃ (L T 1 0 0 4) (軽鎖に3つの逆突然変異を含む) およびH u M A b H C L C ₅ (L T 1 0 0 6) (軽鎖に5つの逆突然変異を含む) はナノモル範囲で結合親和性を示した。ヒト化変異体の生物物理学的特性および生物学的特性を向上させる目的で、さらなる工学的処理を行った。H C D R 2 中のフリーステイン残基がアラニンで置き換えられたヒト化変異体 H u M A b H C C y s A l a L C ₃ (L T 1 0 0 7) およびH u M A b H C C y s A l a L C ₅ (L T 1 0 0 9) はピコモル範囲で結合親和性を示した。全てのヒト化変異体に加齢性黄斑変性症 (A M D) の脈絡膜新血管新生 (C N V) モデルにおいて脈管形成を阻害し、H u M A b H C C y s A l a L C ₅ (L T 1 0 0 9) は、親ネズミ抗体と比較して、優れた安定性およびin vivo有効性を示した。この変異体 h u M A b H C C y s A l a L C ₅ (L T 1 0 0 9) をS o n e p c i z u m a b (商 標) と称した。

10

【0360】

a. 抗S 1 P抗体のヒト化設計

ネズミmAb L T 1 0 0 2 (S p h i n g o m a b (商 標)) の可変ドメインをC D R グラフティングによってヒト化した (Winter 米国特許第5, 2 2 5, 5 3 9 号) 。 K a b a t et al. 1991によって記載されているように、C D R残基を配列超可変性に基づいて同定した。

20

【0361】

この研究では、構造アライメントプログラム (S R v 7 . 6) を用いたI M G TおよびK a b a t データベース内のヒト抗体の相同性検索に基づいて、好適なアクセプター構造を選択した。最初のステップは、これらのヒト重鎖可変 (V H) および軽鎖可変 (V L) 配列データベース (these human heavy variable (V H) and light variable (V L) sequence databases) にL T 1 0 0 2 V HおよびV Lタンパク質配列それぞれについて問い合わせること、バーニア残基 (Foote, J. & Winter, G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499 (1992)) 、カノニカル残基 (Morea, et al., Antibody modeling: implications for engineering and design, Methods 20, 267-279 (2000) およびV H - V L界面残基 (Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R., & Karplus, M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663 (1985))) において、F R内に高い配列同一性を有し、かつ同一カノニカルクラスおよび／または長さのC D Rを有するヒトフレームワーク (F R) を同定することである。このライブラリーの各メンバーの、マウス抗体の個別アライン残基に対する同一性を、前記プログラムを用いて計算した。マウスF Rと最も同一性の高いF R配列を有するヒト配列を同定し、ヒト「アクセプター」配列の最初のショートリストを作成した。バーニア残基、カノニカル残基およびV H - V L界面 (V C I) 残基においてマウス抗体と最も同一性の高い配列も計算した。ヒトとマウスとの間でのこれらの位置における相違は、保存的置換と非保存的置換に分類され、L T 1 0 0 2との非保存的V C Iの相違が最低値であることを最良のフレームワーク選択とした。L T 1 0 0 2のC D Rループ L 3およびH 1はカノニカル構造に分類することができた。これらのL 3およびH 1構造を用いて、同一カノニカル構造を有するヒト抗体F Rを選択した。分類されないC D Rについては、C D R長さがマウス抗体と同一であるヒトフレームワークを選択するよう試みた。この理論的解釈は、C D Rループ構造が、C D Rループ配列自体だけでなく、その基礎となるフレームワーク残基 (カノニカル残基) にも依存しているということである。そのため、マッチするカノニカルC D R構造および／またはC D R長さを有するヒトフレームワークは、グラフトしたマウスC D Rを、抗原結合親和性を維持するのに最も適した配向で保持する可能性が高い。C D

30

40

50

R H 3を除く全てのC D Rでは、これはヒトフレームワーク配列の選択によって行われた。加えて、可能であれば、普通でないシステインまたはプロリン残基を有するフレームワークを排除した。重鎖および軽鎖配列についてはこれらの計算を別々に実施した。最後に、最良にマッチする配列におけるフレームワーク領域全体での個別配列の相違を比較した。上記比較計算結果に最良にフィットするヒト抗体のうち、抗体 A Y 0 5 0 7 0 7 および A J 0 0 2 7 7 3 を、軽鎖および重鎖それぞれについて最も適したヒトフレームワークとして選択した。A Y 0 5 0 7 0 7 フレームワークは、van den Brink らによって記載されており(Blood, 15 April 2002, Vol. 99, No. 8, pp 2828-2834)、その配列は Genbank を介して入手可能である(受入番号 AY050707; Homo sapiens clone WR3VL immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds; 2001年11月13日提出, 最新の改訂は2002年4月8日)。同様に、A J 0 0 2 7 7 3 抗体フレームワークは Snow らによって記載されており[Eur. J. Immunol. 28 (10), 3354-3361 (1998)]、その配列は Genbank を介して入手可能である(受入番号 AJ002772; Homo sapiens mRNA for variable region 5 of immunoglobulin G4 heavy chain patient 2,2; 1998年11月6日提出, 最新の改訂は2006年10月16日)。AY050707(軽鎖)およびAJ002773(重鎖)の配列の両者とも、ヒトおよび他の脊椎動物種の免疫グロブリン(IG)および T 細胞受容体(TR)のヌクレオチド配列の総合データベースである IMGT/LIGM においても見出される。このデータベースは、Marie-Pau le Lefranc, LIGM, Montpellier, France によって1989年に作成され、1995年7月以降、オンラインで利用可能となっている。

10

【0362】

20

第二ステップは、L T 1 0 0 2 の可変領域の分子モデルを作成すること、および抗原結合に作用する可能性があるがバーニア残基、カノニカル残基および界面残基のグループには含まれない F R 残基を同定することであった。様々な F R 残基がどのように C D R ループのコンホメーションに影響を及ぼすのか(またはその逆の場合も)をよりよく理解するために、グラフトドナーおよびアクセプター可変ドメインの多くの構造的特徴を調べた。バーニアおよびカノニカル定義(上記参照)から、C D R に影響を及ぼす可能性が高い L T 1 0 0 2 中の非保存 F R 残基を同定し、そしてヒト F R のいくつかの残基を原初のネズミアミノ酸に復帰させた(逆突然変異させた)。

【0363】

b. 突然変異誘発

30

可変ドメイン配列内の突然変異を、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene、カタログ番号 200524)を用いて作出した。個別反応は、50 ng の二本鎖 DNA 鋳型、2.5 U の PfuUltra HF DNA ポリメラーゼおよびその対応するバッファー (Stratagene、カタログ番号 200524)、10 mM dNTP mix ならびに 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 0.1 mM EDTA に再懸濁した 125 ng の各突然変異誘発オリゴヌクレオチドを用いて実施した。最初の変性を 95°C で 30 秒間行い、続いて 16 サイクルの増幅: 95°C 30 秒間、55°C 60 秒間および 68°C 8 分間を行った。温度サイクル後、最終反応物を DpnI digest で 37°C で 1 時間消化して、メチル化親 DNA を除去した。得られた変異株を competent XL1-Blue E. coli に形質転換させ、50 μg/ml アンピシリン含有 LB 寒天にプレーティングした。その後、コロニーを配列決定によりチェックした。次いで、各変異株を 1 l 振盪フラスコで培養し、Qiagen 社製、カタログ番号 12362 の EndoFree Plasmid Purification Kit を用いて精製した。

40

【0364】

c. ヒト化抗体変異体の作製

全長抗体を哺乳類細胞内で発現させるために、L T 1 0 0 2 の可変ドメインを κ 鎖および重鎖のヒト定常領域を含むベクターにクローニングすることによりマウス-ヒトキメラ抗体 (chMAb S1P) を構築した。L T 1 0 0 2 V_H の K a b a t C D R 1、2 および 3 を、A J 0 0 2 7 7 3 のアクセプターフレームワーク内へグラフトすること

50

によりヒト化重鎖を得た。A J 0 0 2 7 7 3 に最も近い生殖細胞遺伝子は V H 5 - 5 1 であり、このリーダー配列をリーダー配列としてヒト化重鎖変異体に組み込んだ。V H 5 - 5 1 リーダー配列を有する、第一ヒト化型 L T 1 0 0 2 V_H である p A T H 2 0 0 のタンパク質配列を表 4 に示している。L T 1 0 0 2 の V_H ドメインの場合では、2 位、2 7 位、3 7 位、4 8 位、6 7 位および 6 9 位の残基はバーニア残基であるかまたは V_H および V_L ドメインの界面にあり、C D R 配向に影響を及ぼす可能性が高い。3 7 位は V_H ドメインと V_L ドメインとの界面に重要であるように思われた。ヒトフレームワーク内のこれらの位置にある残基を、対応する位置に見られるネズミ残基で逆突然変異させた。突然変異、V 3 7 M、M 4 8 I および Y 2 7 F を個別に試験した。1 つの型 (p A T H 2 0 5) は 3 つ全ての突然変異とともに、V 6 7 A と、さらに I 6 9 L を含み、別の型 (p A T H 2 0 6) は 5 つ全ての突然変異と V 2 A を含んだ。

10

【0365】

L T 1 0 0 2 V_L の K a b a t C D R 1、2 および 3 を、A Y 0 5 0 7 0 7 のアクセプターフレームワーク内へグラフトすることによりヒト化軽鎖を得た。A Y 0 5 0 7 0 7 に最も近い生殖細胞遺伝子は L 1 1 であり、このリーダー配列をヒト化軽鎖構築物に組み込んだ。p A T H 3 0 0 (L T 1 0 0 2 軽鎖) のタンパク質配列は、表 4 に示される。V_L の場合では、4 つの非保存バーニア位置 4 位、3 6 位、4 9 位、6 4 位は C D R ループの構造の支持に関与するため、ネズミ残基の逆突然変異のためにそれらの位置を選択した。L T 1 0 0 2 の分子モデルの検討により、T y r 6 7 が C D R 表面に近く、抗原結合面に向かって配向しており、S 1 P と相互作用することができる示唆された。そのため、後のヒト化型に S 6 7 Y 逆突然変異も追加した。2 つの突然変異を別々に導入して、Y 4 9 S または Y 3 6 F のいずれかを含む 2 つの型を作製した。次の突然変異組合せを用いていくつかの型を作出した：(Y 4 9 S、F 4 V)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V)、(Y 4 9 S、G 6 4 S)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V、G 6 4 S)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V、G 6 4 S、S 6 7 Y)、(Y 4 9 S、G 6 4 S、S 6 7 Y)。

20

【0366】

d. ヒト化リード候補の選択

基本グラフト型 (p A T H 2 0 0 および p A T H 3 0 0) 可変領域および逆突然変異を含む全ての変異体をヒト V_H または V_L 定常領域を含む発現ベクターにクローニングした。キメラ (c h M A b) 抗体と同じ条件下で哺乳類細胞において全てのヒト化変異体を作製し、E L I S A により S 1 P との結合について試験した。この際の収率はヒト化変異体についておよそ 1 0 ~ 2 0 m g / l、c h M A b S 1 P について 0. 3 ~ 0. 5 m g / l であった。還元条件下での S D S - P A G E では、軽鎖および重鎖の推定質量と一致する 2 5 k D a および 5 0 k D a において高純度 (> 9 8 %) の 2 つのバンドが現われた。非還元条件下では推定質量約 1 5 0 k の単一バンドが観察された。c h M A b は、親マウス抗体と同じ可変領域を含み、ヒト化抗体と同じ定常領域を有し、そのため同じ E L I S A プロトコルを用いて検出することができるため、c h M A b をヒト化抗体結合アッセイにおいて標準として用いた。

30

【0367】

6 つのネズミ C D R が未変異ヒトフレームワーク内にグラフトされた最初のヒト化抗体は、S 1 P との検出可能な結合を全く示さなかった (図 1 1)。4 つの逆突然変異 (Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V および G 6 4 S) を含む κ 軽鎖は、キメラ重鎖を伴い、E L I S A によって示されるように、S 1 P との次善の結合を示した。Y 6 7 位置へさらなる突然変異を組み込むことで、その結合が著しく改善した。逆突然変異 Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V、G 6 4 S および S 6 7 Y を含む p A T H 3 0 8 型および逆突然変異 Y 4 9 S、G 6 4 S および S 6 7 Y を含む p A T H 3 0 9 型は、キメラ重鎖を伴い、いずれも、E L I S A によって確認されるように、キメラ抗体と同様の S 1 P と結合した抗体を生じた。2 つの突然変異 Y 3 6 F および F 4 V は、S 1 P 結合の観点から必要な逆突然変異とはみなされなかった。活性を回復させるためには、V L フレームワーク内に 3 つ ~ 5 つの逆

40

50

突然変異を工学的処理することが必要であった。

【0368】

重鎖のヒトフレームワーク内へのバーニア逆突然変異 V37Mの組み込みは、キメラ軽鎖を伴い、キメラ抗体と同様の結合挙動を回復させるのに十分であった(図11)。

【0369】

要約すれば、LT1002 V_Hドメインのヒト化にはネズミフレームワーク配列の1つのアミノ酸しか必要でなかったが、一方、ネズミ親LT1002と同等の結合を得るために、ネズミV_Lフレームワークドメイン、3つまたは5つのネズミ残基を保持する必要があった。

【0370】

e. ヒト化リード候補の最適化

ネズミ抗S1P抗体は、重鎖のCDR2内に遊離システイン残基(Cys50)を含み、この残基は抗体分子を多少不安定にさせる可能性があった。部位特異的突然変異誘発を用いて、システイン残基を、アラニン(huMAbHC_{CysAla}LC₃)(pATH207)、グリシン(huMAbHC_{CysAla}LC₃)、セリン(huMAbHC_{CysSer}LC₃)およびフェニルアラニン(huMAbHC_{CysPhe}LC₃)と置換することによりpATH201変異体を作出した。また、システイン変異株の重鎖を、5つの逆突然変異を含むヒト化軽鎖(pATH308)(huMAbHC_{CysAla}LC₅=LT1009)を用いて試験した。これらの変異体を哺乳類細胞で発現させた後、in vitroアッセイのパネルで特性解析した。重要なことには、ヒト化変異体の発現率はchMAb S1Pの場合よりも著しく高かった。

【0371】

f. ヒト化リード候補の詳細特性解析

i. 特異性

S1Pおよびいくつかの他の生体脂質(several other biolipids)に対する競合的ELISAアッセイ(図1)により、ヒト化変異体を特異性について試験した。このアッセイには、エピトープマッピングが可能であるという付加利益がある。ヒト化抗体LT1009は、S1Pの直接代謝前駆体であるスフィンゴシン(SPH)、またはS1Pと構造的かつ機能的に類似している重要な細胞外シグナル伝達分子であるLPA(リゾホスファチジン酸)との交差反応性は示されていない。さらに、rhMAb S1Pは、構造的に類似している他の脂質および代謝産物、セラミド(CER)、セラミド-1-リン酸(C1P)などを認識しなかった。しかしながら、予想どおりLT1009は、スフィンゴシルホスホコリン(sphingosylphosphocholine)(SPC)(S1Pの遊離リン酸基がコリン残基と結合している脂質)とは交差反応した。重要なことには、全てのヒト化変異体はマウス抗体に匹敵する特異性プロフィールを示した。

【0372】

ii. 結合親和性 S1PコーティングチップへのIgG結合についてのBiacore測定により、変異体 LT1004またはLT1006が、図11にて示されるように、chMAb S1Pと同様の低ナノモル範囲で結合親和性を示すことがわかった。システイン残基がアラニンで置き換えられたヒト化変異体 LT1007およびLT1009は、ネズミ親LT1002(Sphingomab(商標))と同様のピコモル範囲で結合親和性を示した。

【0373】

iii. 安定性 ヒト化変異体を高温でのチャレンジ後の安定性について試験した。各ヒト化変異体について、上清を60~74℃の範囲の温度に供することによって熱変性転移の近似中心点(T_M)を決定した。これらの温度は、幅広い範囲の温度の間 50~80℃間での温度刺激の後にネズミ抗体分子で見られた変性プロフィールに基づいて選択した。各変異体の結合特性を温度刺激の前後に決定した。ネズミ抗体はT_M65℃を示した。変異体 huMAbHC_{CysAla}LC₅(LT1009)は、他の全ての変異体と比較して、優れたT_Mを示した。表6ではリードヒト化候補とそれらの特性を示している。

【0374】

表6：リードヒト化S1P mAb候補と特性

重鎖および軽鎖中の突然変異の数を示している。種類欄に重鎖および軽鎖の識別を記載する。

【0375】

【表6】

表6：リードヒト化S1P mAb候補と特性

重鎖および軽鎖中の突然変異の数を示している。種類欄に重鎖および軽鎖の識別を記載する。

mAb	種類	重鎖中の突然変異		軽鎖中の突然変異		In vitro 活性	
		CDR	フレームワーク	CDR	フレームワーク	結合親和性 (K _{DI})	特異性 (ELISA)
LT1002	ネズミ mAb Sphingomab	N/A	N/A	N/A	N/A	0.026 ± 0.000 nM	高い
LT1004	HuHCLC ₃ pATH201HC pATH309LC	0	1	0	3	1.060 ± 0.010 nM	高い
LT1006	HuHCLC ₅ pATH201HC pATH308LC	0	1	0	5	0.690 ± 0.010 nM	高い
LT1007	HuHC _{CysAla} LC ₃ pATH207HC pATH309LC	1	1	0	3	0.0414 ± 0.0004 nM	
LT1009	HuHC _{CysAla} LC ₅ pATH207HC pATH308LC	1	1	0	5	0.056 ± 0.001 nM	高い

【0376】

i v. 配列

天然に存在する抗体と同様に、LT1009は、1抗体分子に含まれる2つの軽鎖ポリペプチドそれぞれと2つの重鎖ポリペプチドそれぞれに3つの相補性決定領域（それぞれ「CDR」）を含む。これらの6つのCDRそれぞれのアミノ酸配列を直下に記載する（「VL」は免疫グロブリン軽鎖の可変領域を示し、一方「VH」は免疫グロブリン重鎖の可変領域を示す）：

CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [配列番号10]

CDR2 VL: EGNILRP [配列番号11]

CDR3 VL: LQSDNLPFT [配列番号12]

CDR1 VH: DHTIH [配列番号13]

CDR3 VH: GGFYGSTIWFD [配列番号15]

CDR2 VH: AISPRHDI TKYNEMFRG [配列番号18]

【0377】

LT1009の重鎖および軽鎖ポリペプチドについてのヌクレオチドおよびアミノ酸配

列を直下に記載する：

LT1009 HC 可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 19]：

【化1】

```

1  mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51 htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvtis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdfw gqgtmvtvss

```

10

LT1009 LC可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 20]：

【化2】

```

1  msvptqvlgl lllwltdarc ettvtqspfs lsasvgdrvt itcitttdid
51 ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygtd ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtkleik

```

重鎖および軽鎖可変ドメインをコードする対応するヌクレオチド配列を直下に示す。リーダー配列(Lonza社のGS発現ベクターからの)には下線が引かれており；該リーダーに先行する配列は、HindIII 切断部位(aagctt) および翻訳過程の開始において主要な役割を果たす Kozak コンセンサス配列(gccgccacc)であり；CDR は太字で示される：

20

LT1009 HC可変ドメインのヌクレオチド配列 [配列番号 21]：

【化3】

```

1  aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc
51 cgtgaccaca ggcgtgcatt ctgaggtgca gctgggtgcag tctggagcag
101 aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga
151 tacatcttta tcgaccatac tattcactgg atgcgccaga tgcccgggca
201 aggcctggag tggatggggg ctattttctcc cagacatgat attactaaat
251 acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc
301 agcaccgcct acttgcaagt gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat
351 gtattttctgt gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttca

```

30

40

LT1009 LC可変ドメインのヌクレオチド配列 [配列番号 22]：

【化 4】

```

1  aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
51  gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgcag cagtctccat
101 ccttcctgtc tgcattctga ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa
201 agcccctaag ctctctgatct ccgaaggcaa tattcttctgt cctgggggtcc
251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactgtt tgacagagtga 10
351 taacttacca ttcaactttcg gccaaaggac caagctggag atcaaa

```

LT1009 の完全長 HC スクレオチド(cDNA)配列（配列番号 2 3）；CDR は太字で示され、リーダー領域に下線が引かれており、ヒンジ領域はイタリック体である。リーダーに先行する配列は、HindIII 切断部位(aagctt) および Kozak 配列(gccgccacc)である：

【化 5】

```

aagcttgccgccaccatggaatggagctgggtgttcctgttctttctgtccgtgaccacaggcgtg
cattctgaggtgcagctgggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtcctctgaagatc
tctgtcagagttttggatacatctttatcgaccatactattcactggatgcgccagatgcccggg
caaggcctggagtggatgggggctatcttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttc
agggggccaggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgcagtggagcagcctg
aaggcctcggacaccgccatgtatcttctgtgcgagagggggggttctacggtagtactatctggttt
gacttttggggccaagggaatggtcacctgtctcttcagcctccaccaaggggcccatcggtcttc
ccctggcaccctctccaagagcacctctgggggacacagcgccctgggctgctgtgtaaggac
tacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttc
ccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagc
ttgggcaaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggg
ggaccgtcagtccttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgag
gtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg
gtcagcgtcctcacctgctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctcc
aaciaagccctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaacca
caggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaac
tacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtg
gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac
cactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatag

```

リーダー(下線付き)を有し、ヒンジ領域を有さない LT1009 HCアミノ酸配列。CDR は太字で示される。〔配列番号 2 4〕：

【化 6】

1 mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
 51 **htihwmrqmp** ggglewmgai **sprhditkyn** **emfrgqvtis** adkssstayl
 101 qwsslkasdt amyfcarggf **ygstiwfdfw** gggtmvtvss astkgpsvfp
 151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv htftpavlqss
 201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
 251 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr
 301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpapi ektiskakgq
 351 prepqvytlp psreemtknq vsltclvkgtf ypsdiavewe sngqpennyk
 401 ttppvldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls
 451 lspgk

10

LT1009 LC 完全長ヌクレオチド配列 [配列番号 2 5] ; リーダーに下線が引かれ、CDR が太字で示される ; リーダーに先行する配列は、HindIII 切断部位(aagctt) および Kozak 配列(gccgccacc)である :

【化 7】

1 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
 51 gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgcag cagtctccat
 101 ccttcctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataaacc
 151 **accactgata ttgatgatga tatgaactgg** ttccagcagg aaccagggaa
 201 agcccctaag ctccctgatct ccgaaggcaa **tattcttctgt** cctgggggtcc
 251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagattttcac tctcaccatc
 301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactgtt **tgcagagtga**
 351 **taacttacca ttcactttcg** gccaaaggac caagctggag atcaaacgta
 401 cgggtggctgc accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg
 451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
 501 agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact
 551 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
 601 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
 651 cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct
 701 tcaacagggg agagtgttag

20

30

40

下線付きのリーダーおよび太字の CDR を有する、LT1009 LCアミノ酸配列 [配列番号 2 6] :

【化 8】

```

1  msvptqvlgl lllwltdarc ettvtqspsf lsasvgdrvt itcitttddid
51  ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygtf ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtkleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta
151 svvcllnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
201 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

```

10

リーダー配列を有さない（かつ、先行するヌクレアーゼ切断部位および Kozak 配列を有さない）LT1009 重鎖および軽鎖の配列は、以下の通りである。CDR は太字で示される。

LT1009 HC の可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 27]:

【化 9】

```

evqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgyifidhtihwmrqmpggglewmgaisprhditkyn
emfrgqvttisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggfygstiwfdfwgqgtmvtvss

```

20

該可変ドメインをコードする、対応する LT1009 HC のヌクレオチド配列 [配列番号 28]

:

【化 10】

```

gaggtgcagctggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagcccgaggagtcctctgaagatctcctgt
cagagttttggatacatctttatcgaccatactattcactggatgcgccagatgcccgggcaaggc
ctggagtggtggtgggggctatttctccagacatgatattactaaatacaatgagatggttcaggggc
caggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgagtgaggagcagcctgaaggcc
tcggacaccgccatgtatttctgtgcgagagggggggttctacggtagtactatctgggttgacttt
tggggcccaagggaacaatgggtcacggtctcttca

```

30

LT1009 LC の可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 29]:

【化 11】

```

ettvtqspsf lsasvgdrvtitcitttddidddmnwfqqepgkapkllisegnilrpgvps
rfsssgygtf ftltisklqp edfatyyclqsdnlpftfgggtkleik

```

40

該可変ドメインをコードする、対応する LT1009 LC のヌクレオチド配列 [配列番号 30]

【化 1 2】

gaaacgacagtgacgcagtcctccatccttctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcact
 tgcataaccaccactgatattgatgatgatatgaactgggttccagcaggaaccagggaaagccct
 aagctcctgatctccgaaggcaatattcttcgtcctgggggtcccatcaagattcagcagcagtgga
 tatggcacagatcttccactctcaccatcagcaaattgcagcctgaagattttgcaacttattactgt
 ttgcagagtgataacttaccattcacttttcggccaagggaccaagctggagatcaaaa

10

リーダーを有さない完全長の LT1009 重鎖および軽鎖のアミノ酸配列は、以下の通りである (CDR は太字で示される):

リーダーを有さず (かつ、先行するヌクレアーゼ切断部位および Kozak 配列を有さず)、かつ、ヒンジ (下線) を含む、LT1009 の完全長重鎖アミノ酸配列。 (配列番号 3 1)

【化 1 3】

evqlvqsgaevkpkgeslkiscqsfgyifidhtihwmrqmpggglewmga**aisprhdi**tkynemfrg
 qvtisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarg**gfygsti**wfdfwgqgtmvtvssastkgpsvfpl
 apsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssslg
 tqtyicnvnhkpsntkvdkrve**pks**cdktht**cp**pcpapellggpsvflfpkpkdltlmisrtpevt
 cvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk
 alpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyk
 ttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg

20

30

リーダーを有さない LT1009 の完全長軽鎖アミノ酸配列。 [配列番号 3 2]:

【化 1 4】

ettvtqspsfllsasvgdrvtitc**it**tttdiddmwnwfqqepgkapkllis**egnilr**pgvpsrffsssg
 ygtdfthltisklqpedfatyy**clqsdnl**pftfgggtkleikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasv
 vc1lnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltliskadyekkhkvyacevth
 qglsspvtksfnrgec

40

対応するヌクレオチド配列 (リーダーまたは先行するヌクレアーゼもしくは Kozak 部位を有さない) は、以下の通りである。遺伝コードの縮重のため、代替のヌクレオチド配列もまた、事実上あらゆる所与のアミノ酸配列をコードし得ることが理解される。

LT1009 の完全長重鎖ヌクレオチド (cDNA) 配列 [配列番号 3 3]:

【化 1 5】

gaggtgcagctggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagccgggggagtcctctgaagatctcctgt
cagagttttggatacatctttatc**gaccatactattcact**ggatgcgccagatgccggggcaaggc
ctggagtggtatgggg**gctat**ttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcaggggc
caggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgcagtgaggcagcctgaaggcc
tcggacaccgccatgtatcttctgtgcgagag**gggggggttctacggtagtactatctggtttgacttt**
tggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctg
gcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttc
cccgaaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccttgaccagcggcgtgcacaccttccccgct
gtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttgag
cccaaactcttgtagacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctgggggggaccg
tcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgacccttgaggtcaca
tgctgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaa
gccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctggtcaaa
ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaag
accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcacctgggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac
acgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatag

10

20

30

LT1009 の完全長軽鎖ヌクレオチド配列 [配列番号 3 4]:

【化 1 6】

gaaacgacagtgacgcagtcctccatccttctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcact
 tgcataaccaccactgatattgatgatgatatgaactgggttccagcaggaaccagggaagccctt
 aagctcctgatctccgaaggcaatattcttctgctcctgggggtcccatcaagattcagcagcagtgg
 tatggcacagatttctactctcaccatcagcaaattgcagcctgaagattttgcaacttattactgt
ttgcagagtgataacttaccattcacttttcggccaagggaccaagctggagatcaaacgtacgggtg
 gctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctc
 caatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc
 agcacccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat
 cagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgttag

10

LT1009 の重鎖上の C 末端リジンは、成熟した重鎖タンパク質上に常に存在するわけではない。

20

LT1009 重鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、タンパク質の最後の(最も C 末端側の)アミノ酸残基としてリジンを示しているが、例えば CHO 細胞クローン LH1 275 において発現する場合、LT1009 は C 末端リジンを含まない。この事はペプチドマッピングによって示され、理論に束縛されることなく、哺乳類の系におけるタンパク質の翻訳後修飾の結果として生じると考えられる。また、理論に束縛されることなく、他の発現系、特に非哺乳類の系においては、成熟した LT1009 重鎖上に C 末端リジンが存在すると考えられる。

CHO 細胞において発現する LT1009 重鎖のアミノ酸配列（即ち、リーダーを有さず、かつ、C 末端リジンを有さない）を以下に示す（CDR は太字で示され、ヒンジはイタリック体で示される）[配列番号 3 5]:

30

【化 1 7】

evqlvqsgaevkpkgeslkiscqsfgyifidhtihwmrqmpggglewmgaisprhditkynemfrg
 qvtisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggfygstiwwdfwgqgtmvtvssastkgpsvfl
 apsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslg
 tqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfpkpkdltlmisrtpevt
 cvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk
 alpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennyk
 ttpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsisp

40

このアミノ酸配列をコードすることができるヌクレオチド配列の例を、以下に配列番号 3 6 として示す。遺伝コードの縮重により、複数のヌクレオチド配列が同じアミノ酸配列をコードし得ることが理解され、そのため、アミノ酸配列をコードするものとして本明細

50

書に示されるこれらのおよび他のヌクレオチド配列は、例示を目的とするものであると認められる。CDR は太字で示され、ヒンジ領域はイタリック体で示される：

【化 1 8】

gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccgaggagctctgaagatctcctgt
cagagttttggatacatctttatc**gaccatactattcact**ggatgcgccagatgcccgggcaaggc
ctggagtgatgggg**gctatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcaggggc**
caggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgcagtgaggcagcctgaaggcc
tcggacaccgccatgtatttctgtgcgaga**ggggggttctacggtagtactatctggtttgacttt**
tggggccaagggaacaatggtcacctctcttcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctg
gcacctctctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgctgggtcaaggactacttc
cccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggct
gtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtgggt
gagaggccagcacagggaggagggtgtctgctggaagccaggctcagcgctcctgcctggacgca
tccccggtatgcagtcccagtcaggggcagcaaggcaggccccgtctgcctcttccccggaggcc
tctgccccccccactcatgctcaggagaggggtcttctggctttttccccaggctctgggcaggca
caggctaggtgccccctaaccaggccctgcacacaaaggggcagggtgctgggctcagacctgcaa
gagccatatccgggaggaccctgccctgacctaaagccaccccaaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaa
atcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccaggttaagccagcccaggcctcgccctccag
ctcaaggcgggacaggtgccctagagttagcctgcatccaggggacaggccccagccgggtgctgaca
cgtccacctccatctcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttcccc
caaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtgacgtga
gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaa
caaagccgaggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgctctcaccgtctgcacc
aggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagccccatcg
agaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacccgtgggggtgcgagggccacatggacagaggccgg
ctcgggccaccctctgccctgagagtgaaccgtgtaccaacctctgtccctacagggcagccccga
gaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgctgtgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag
aacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctc
accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg
cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggttag

10

20

30

【0 3 7 8】

実施例 1 3：ヒト化 S 1 P m A b の生産および精製

この実施例では、生体活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S 1 P) と高親和性で結合する組換えヒト化モノクローナル抗体 (L T 1 0 0 9；S o n e p c i z u m a b (商標)) の生産を記載する。L T 1 0 0 9 は、2つの同一軽鎖と2つの同一重鎖からなる、全分子量 1 5 0 k D a の全長 I g G 1 k イソ型抗体である。重鎖はN結合型グリコシル化部位を含む。オリゴ糖構造の性質はまだ決定されていないがコアフコースを含む複雑な二分岐構造であると予想されている。現在のところ主要であろう糖型の性質は分かっていない。多少のC末端不均質性は、重鎖の定常ドメイン内にリジン残基が存在することによると思われる。2つの重鎖は、2つの鎖間ジスルフィド結合を通じて互いに共有結合しており、これはヒト I g G 1 の構造と一致している。

40

【0 3 7 9】

L T 1 0 0 9 は、もともと、S 1 P で免疫処置したマウスから作製したハイブリドーマ

50

を用いて生産したネズミモノクローナル抗体（L T 1 0 0 2；S p h i n g o m a b（商標））から得られた。ネズミ抗体のヒト化では、ネズミ親抗体とのその構造類似性で選択されるヒト抗体フレームワークのC D Rの代わりに6つのネズミC D Rの挿入を必要とした。ヒト化抗体を工学的処理するために、フレームワーク内で一連の置換を行った。これらの置換は逆突然変異と呼ばれ、ヒト残基を、抗体と抗原との相互作用において重要な役割を果たすネズミ残基と置換する。最終的なヒト化型は、重鎖の可変ドメインのヒトフレームワーク内に1つのネズミ逆突然変異と軽鎖の可変ドメインのヒトフレームワーク内に5つのネズミ逆突然変異を含む。加えて、重鎖のC D R # 2内に存在する1つの残基もアラニン残基へと置換した。この置換は、抗体分子の安定性および効力を増加させることが分かった。

10

【0380】

ヒト化可変ドメイン（重鎖および軽鎖の両方）をLonza社のG S遺伝子発現系にクローニングして、プラスミド p A T H 1 0 0 9を作製した。該Lonza社のG S発現系は、抗体遺伝子の定常ドメインを有する発現ベクターと、選択マーカーであるグルタミンシンセターゼ（G S）とからなる。G Sは、グルタミン酸とアンモニアからのグルタミン合成に関与する酵素である。抗体遺伝子と選択マーカーの両方を有するベクターを、細胞が外因性グルタミンなしに生存するのに十分なグルタミンを供給した無血清培地中での増殖に適したプロプライエタリーチャイニーズハムスター卵巣宿主細胞系統（C H O K 1 S V）にトランスフェクトする。加えて、ベクターによって提供されるG S活性を有する細胞系統だけが生存し得るように内因性G Sの活性を阻害するために、この培地に特異的G S阻害剤であるメチオニンスルホキシミン（M S X）を添加する。その結果得られる、p A T H 1 0 0 9を用いてトランスフェクトされたC H O細胞系統をL H 1と命名する。

20

上記の実施例に記載される天然の生殖系列遺伝子のリーダー配列が、プラスミド p A T H 1 0 0 9を作成するために用いられるG S発現ベクター骨格中のリーダー配列によって置換されることに注意すべきである。後者のリーダー配列は、L T 1 0 0 9重鎖（配列番号19および24）のN末端における“mewswv”で始まる19個のアミノ酸として見出すことができ、LCのリーダーは、“msvpt”で始まる20個のアミノ酸（配列番号20および26のN末端に示される）である。

トランスフェクトされたC H O L H 1細胞を、M S Xの存在下でグルタミンフリー培地中で増殖するそれらの能力について選択し、分離株（クローン）を活性L T 1 0 0 9の高レベル分泌について選択した。L H 1 2 7 5とは、L T 1 0 0 9抗体生産物の全てのロットの生産のためのマスター細胞バンク(Master Cell Bank)(MCB)の作成のために選択された、p A T H 1 0 0 9ベクターを含むL H 1 C H O細胞系統のリードクローンに与えられた名称である。こうして、毒性学および臨床開発に毒性学研究および臨床開発のための材料がもたらされた。

30

【0381】

A T C C寄託：p A T H 1 0 0 9プラスミドを含む大腸菌S t B 1 2は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nに寄託した（寄託番号 P T A - 8 4 2 1）。p A T H 1 0 0 9ベクターを含むC H O細胞系統 L H 1 2 7 5もA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nに寄託した（寄託番号 P T A - 8 4 2 2）。A T C Cは、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209に所在する。

40

【0382】

実施例14：ヒト化m A bの製造

一般に、生産プロセスには3段階ある：播種トレイン、接種トレインおよび生産培養。全ての段階で無血清試薬と低タンパク質細胞培養増殖培地を用いる。播種トレインを開始するために、w o r k i n g c e l l b a n kの細胞を用い；細胞を3～4日おきに継代培養し、播種トレイン培養下で指定期間の後に接種トレインを開始する。生産段階への導入に向けて細胞を増殖させるために、非選択培地（M T Xフリー培地(MTX-free medium)）を好ましくは用いる。細胞を漸増容量の容器への連続継代培養により増殖させる。

50

接種トレイン中の一定の日数時点において、生産段階を開始する。生産培養は200L、400L、2000L、または20000L容量のバイオリアクター内で実施する。バイオリアクターの一例を以下に記載する。

【0383】

バイオリアクター例：2Lバイオリアクターからのスケールアップでは、まず、Applikon 15L攪拌タンクへ移し、その後、50Lバイオリアクター、200Lバイオリアクター、最後に2000Lバイオリアクターへと順次移す（全て同じスケールで生産）。これらのタンクの特徴は次のとおりである：

【0384】

製造業者：ABEC, Inc.

10

【0385】

ASME, Section VIII Pressure Vessel Code規格製品。接触面は316L SSである。

【0386】

ボトムオフセットドライブ、ABEC設計

【0387】

低剪断インペラー 316L SS、15～20マイクロインチに研磨、不動態化済。直径 容器直径の約1/2。

【0388】

制御機器：Allen Bradley社製Control Logic PLC、Versa viewオペレーターインターフェイス装備。

20

【0389】

攪拌：Allen Bradley社製センサー、RPM制御のためのVFI出力についてのA-B PLC control

【0390】

温度：デュアルコントロール100オーム白金RTDセンサー、A-B PLC control 加熱、冷却および蒸気弁 w/再循環ポンプ。バイオリアクターエンプティ時に自動滅菌サイクル。

【0391】

pH：Ingold社製センサー、CO2スパージについてのゲル充填加圧式A-B PLC control。

30

【0392】

溶存酸素：Ingold社製ポーラログラフ電極センサー、O2スパージについてのA-B PLC control。

【0393】

空気およびガス流：センサーは空気、O2、N2およびCO2スパージングについての4台のBrooks社製熱質量流量計であり、空気オーバーレイのためにBrooksサーマルマス(a Brooks thermal mass)も供給する、A-B PLCを通過する全ガス流のpH自動、DO自動または手動制御のためのガス流についてのA-B PLC control。

40

【0394】

容器圧：センサーはRosemount社製サニタリーダイヤフラム型変換器であり、制御は背圧制御弁を備えた変換器のA-B PLC controlである。

【0395】

プログラマブル論理制御装置（PLC）：示したプロセスの連続ループ制御のためのAllen Bradley社製Control Logix System。ソフトウェア：PLCプログラミングにはRockwell Software(Allen Bradley)社製RS Logix 5000を利用する。

【0396】

ヒューマンマシンインターフェース（HMI）：ローカルオペレーターインターフェイ

50

スは、イーサネット（登録商標）によって P L C と通信する一体型 F P D / タッチスクリーン入力方式の Allen Bradley 社製 H M I V e r s o V i e w 工業用コンピューターに備わっている。ソフトウェアは Rockwell Software 社製 R S V i e w 3 2 である。

【0397】

生産プロセス例

【0398】

温度、溶存酸素および p H の制御を行うステンレス製攪拌式バイオリアクター。

【0399】

播種密度は最適収量が得られるように決定する。

【0400】

一般に無血清培地を利用する。

【0401】

一般に流加法。

【0402】

一般に温度変化を伴う。

【0403】

バイオリアクター内での培養期間は 8 ～ 1 4 日と予測された。

【0404】

収穫時の生存力を明らかにする。

【0405】

収穫物は濾過により清澄化する。

【0406】

清澄化後および精製まで収穫物を 2 ～ 8 ℃ で保存する。

【0407】

実施例 15：ヒト化 m A b の大量精製

製剤原料精製プロセスは一般に 4 ステップからなる：A タンパク質クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー（Q セファロース）、陽イオン交換クロマトグラフィー（CM セファロース）および限外濾過／透析濾過（U F / D F）。アフィニティークラムは一般に収穫および清澄化後の第一ステップである。このカラムには一般に固定化した A タンパク質樹脂を利用する。このアフィニティステップでは宿主細胞タンパク質および D N A に対する抗体を精製する。潜在するウイルスを不活性化するために、一般に溶出液をウイルス不活性化プロセスに供し、続いて、宿主細胞タンパク質、D N A、A タンパク質および潜在するウイルスを減らすために陰イオン交換クロマトグラフィーステップを行う。次に、一般に陽イオン交換クロマトグラフィーステップを用いて、宿主細胞タンパク質および抗体凝集物の残留量をさらに減らす。最後に、そのプールを透析濾過し、さらに濃縮する。

【0408】

代表的な精製プロセス：

A タンパク質カラムの前に収穫物を濃縮し、バッファー交換してよい。本プロセスの次のステップは A タンパク質カラムアフィニティークロマトグラフィーである。結合した抗体を低 p H バッファーで溶出する。この A タンパク質溶出液は、ウイルスを不活性化するために一時的にを保持する。

【0409】

本プロセスの次のステップは、Q（+）カラムにおける、抗体産物が流出し、D N A および宿主細胞タンパク質などの混入物がカラム樹脂と結合する条件下でのイオン交換クロマトグラフィーであり得る。

【0410】

本プロセスの次のステップは、S（-）カラムにおける、混入物がカラムから流出する条件下での第二回目のイオン交換クロマトグラフィーであり得る。S（-）カラムステップの代わりに疎水性相互作用カラムステップを用いてもよい。本プロセスの次のステップ

は、DV20またはPlanovaフィルターを用いたナノフィルトレーションウイルス除去ステップである場合が多い。抗体産物はフィルターから流出する。本プロセスの最終ステップは、最終的な製剤原料処方バッファーへの透析濾過と目的のタンパク質濃度を得るための限外濾過である。

【0411】

実施例16：ネズミ抗S1P抗体のヒト化変異体の生物活性

In vitro細胞アッセイ

図12にて示されるように、ヒト化抗体を、化学療法薬の存在下で腫瘍細胞生存を変更するそれらの能力について試験した。SKOV3腫瘍細胞を、アポトーシス実行体であるカスパーゼ3の活性化によって腫瘍細胞死を誘導する化学療法薬であるタキソールに曝露した。S1Pは、対照非処置細胞と比較して、タキソールによって誘導されるカスパーゼ3活性化および／または細胞死を減少させることができた。アポトーシスアッセイを製造業者(Promega、カタログ番号G7792)の推奨するとおりに実施した。簡潔には、処置の前に、A549細胞(1ウェルにつき2500個の細胞)を96ウェルプレート中に播種し、80%密集状態まで増殖させた。次いで、これらの細胞をマッコイ培地中、0.1~1 μMパクリタキセル(Sigma、カタログ番号T7409)、0.1~1 μM S1Pおよび1 μg/mLの抗S1P mAbを用いてまたは用いないで48時間処置した。48時間後、これらの細胞にカスパーゼアッセイバッファーを加えた。上清のカスパーゼ3活性を、Apo-One Homogeneous Caspase-3/7 Assay kit (Promega、カタログ番号G7792)により製造業者のプロトコールに従って測定した。カスパーゼ3/7活性はビヒクル処置細胞に対する蛍光シグナルの増加倍数として表す。

【0412】

カスパーゼ3活性化は、S1Pの存在下で抗S1P mAbを加えることによって増加し、この抗体によるS1Pの選択的吸収によってS1Pの保護的抗アポトーシス作用が除かれることが示唆された。ヒト化抗体変異体、huMAbHCLC₃(LT1004)およびhuMAbHCLC₅(LT1006)の両方が、LT1002と比較して優れた活性を示した。同時に、全ての変異体を、癌細胞からのS1P誘発性サイトカイン放出に対するそれらの作用について試験した。S1Pは、癌細胞からの細胞馴化培地への著しいIL-8放出を引き起こすことが分かっている。マウス対照抗S1P mAbを加えることによって卵巣癌細胞からのIL-8放出が濃度依存的に減少した。2つのヒト化変異体 huMAbHCLC_{CysAla}LC₃(LT1007)およびhuMAbHCLC_{CysAla}LC₅(LT1009)は、HuMAbHCLC₃(LT1004)およびhuMAbHCLC₅(LT1006)よりも大きなIL-8放出の減少を示した。

【0413】

実施例17：新血管新生動物モデルにおいてヒト化mAb(Sonepcizumab)と対比したネズミmAb(Sphingomab)のin vivo有効性

脈絡膜新血管新生(CNV)とは、眼においてブルッフ膜の破壊を通じて脈絡膜から網膜下色素上皮(sub-RPE)または網膜下腔内へと生じる新血管の成長を指す。CNVは、黄斑変性および他の眼症状における視力喪失の主な原因である。この実施例ではS1Pに対するmAbの評価のためにCNVマウスモデルを用いる。

【0414】

ヒト化抗体変異体とネズミ抗体を、図13にて示されるように、AMDのCNV動物モデルにおいて新血管新生を阻害するそれらの能力について比較した。マウスにネズミ(Mu; LT1002)、ヒト化変異体[LC3(LT1004)、LC5(LT1006)、HCcysLC3(LT1007)およびHCcysLC5(LT1009)]または非特異的mAb(NS) 0.5 μgを2回(第0日および第6日)硝子体内投与により投与した後、ブルッフ膜のレーザー破膜に供した。レーザー手術の14日後にマウスを犠牲にした。対照マウスを水性バッファー(PBS)またはイソ型適合非特異的抗体で処置した。ヒト化変異体の3つは、CNV領域の測定によって評価されるように、ネズミ抗

体と本質的に同等に脈管形成を阻害した。C N V病変体積は平均 $\pm$ S E Mとして表す。軽鎖に5つの逆突然変異を含み、重鎖のC D R 2内にシステイン突然変異を有するヒト化変異体 (h u M A b H C c y s L C ₅ ; L T 1 0 0 9) は新血管新生を顕著に抑制した。この差は高度に統計的に有意であった。

【0415】

C N Vの誘導では、マウスに滅菌生理食塩水中のケタミン (14 m g / k g) とキシラジン (30 m g / k g) の混合物で麻酔をかけ、体重20 g 当たり5 μ Lの用量で腹膜内投与した。次いで、眼科用トロピカミド (0.5%) およびフェニレフリン (2.5%) それぞれの各1滴でそれらの瞳孔を散大した。相対的9時、12時および3時位置において、視神経円板からおよそ50 μ mの位置にある右眼4分の3のブルッフ膜を破膜させるために、50 μ mのスポットサイズで150 m Wで100 m秒のパルスを出すように設定した細隙灯と連結したアルゴングリーン眼科用レーザー (O c u l i g h t G L 532 n m, Iridex Corporation, Mountain View, CA) を用いる。全てのケースにおいて左眼を無傷の対照とした。

【0416】

C N V病変の形態および体積を次のとおり測定した。C N Vレーザー誘導の2週間後、これまでに記載されているように (Sengupta et al., 2003)、過剰量のケタミン-キシラジン混合物により動物を安楽死させた後、心穿刺により6 m l P B S中4%パラホルムアルデヒド、p H 7.5 (固定液) の全身灌流を行う。次いで、眼球を摘出し、辺縁後方1 m mに27 g 針を刺し、固定液中に室温で1時間浸漬した後、P B S中に30分間浸漬することにより2 X洗浄する。さらに、眼球を切開して、網膜色素上皮、脈絡毛細管板および鞏膜からなる後部を取り出す。次に、これまでに記載されているように (Sengupta et al., 2003; Sengupta et al., 2005)、この組織を透過処理し、ローダミンコンジュゲート R. communis凝集素 I (Vector Laboratories, Burlingame, CA) と反応させて、C N V病変を検出した。さらに、R G B S p o t 高解像度デジタルカメラおよびレーザー走査共焦顕微鏡 (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA) を備えた落射蛍光 Z e i s s A x i o p l a n 2によりデジタル画像を取り込むために、この後部カップを4~7の放射状スライスで切断し、V e c t a s h i e l d a n t i f a d e m e d i u m (Vector Laboratories, Burlingame, VT) を1滴加えた顕微鏡用スライド上に平らに装着した。

【0417】

取り込んだデジタル画像を、I m a g e Jソフトウェア (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて形態学的に評価した。赤色および緑色チャネルの解析のために、画像を独立したR G Bチャネルに次のとおり分解した：1) 特定の対象と顕微鏡の較正を適用して、画素と長さの比を設定し；2) O t s uアルゴリズムを用いて閾値を適用し；3) 画像を二値画像にし；4) 病変領域全体を含むように関心領域 (R O I) を描き；5) 粒子分析を実施して、R O I内の閾値レベルを超える画素領域を定量した。容量分析では、zシリーズキャプチャーを用いたことを除き、上記と同様の方法とした。この際、zシリーズ全体にわたる病変領域の合計にz厚さ (一般に4 μ m) を乗じ、病変体積を得た。

【0418】

このモデルで試験した製剤は、L T 1 0 0 2 (S 1 Pに対するネズミ m A b ; S p h i n g o m a b (商標)) ; L T 1 0 0 4 (ヒト化 m A b) 、L T 1 0 0 6 (ヒト化 m A b) 、L T 1 0 0 7 (ヒト化 m A b) および L T 1 0 0 9 (ヒト化 m A b ; S o n e p c i z u m a b (商標)) であった。生理食塩水ビヒクルおよび非特異的抗体 (N S A) 対照も含めた。図13にて示されるように、ネズミ m A b L T 1 0 0 2 (S p h i n g o m a b (商標)) およびヒト化 m A b L T 1 0 0 9 (S o n e p c i z u m a b (商標)) はいずれもこのC N Vマウスモデルにおいて病変サイズを有意に減少させた。試験した全ての m A b が病変サイズのおよそ80~98%減少を示し、これは全てのケースにおいて有意であった ($p < 0.001$ 生理食塩水との対比)。加えて、L T 1 0 0 7 および

LT1009はまた、非特異的抗体対照と比較しても有意な阻害 ($p < 0.05$) を示した。病変サイズの阻害率は、LT1002 (ネズミ) ではおよそ80%、LT1004 (ヒト化) では82%、LT1006では81%、LT1009では99%であった。このように、LT1009はこのin vivo新血管新生モデルにおいて最も活性の高いヒト化mAb変異体であった。

【0419】

実施例18: Sonepcizumab用量反応の測定

レーザーによるブルッフ膜破膜の1日前に、マウス ($n = 10$) に漸増用量の sonepcizumab ($0.05 \mu\text{g}/\text{眼}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{眼}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{眼}$ もしくは $3.0 \mu\text{g}/\text{眼}$) または高用量非特異的 (NS) 抗体 ($3.0 \mu\text{g}/\text{眼}$) の両側性硝子体内注射を1回行った。レーザー破膜の14日後、マウスに麻酔をかけ、フルオレセイン標識デキストランをを灌流させ、CNV病変サイズの解析のために脈絡膜フラットマウントを調製した。

【0420】

この研究では、CNV阻害に対する sonepcizumab 投与量および投与間隔の影響を、CNV領域を定量する別の有効な方法を用いて調べた。この方法では犠牲にする直前に、動物にフルオレセイン標識デキストランを灌流させた。SonepcizumabはCNV領域の用量依存的な減少をもたらし、 $3.0 \mu\text{g}/\text{眼}$ の用量においておよそ50%の最大阻害を得た。この減少は有意であった ($p < 0.0001$ 対応のないt検定を用いた非特異的抗体対照との比較)。投与回数の研究では、14日の研究中、単一時点 (第0日) においてまたは複数の時点 (第0日および第7日) において Sonepcizumab で処置した群間では同様の有効性が観察された。

【0421】

Sonepcizumab 処置 ($3.0 \mu\text{g}/\text{眼}$) で見られたおよそ50%の最大阻害は、同じモデルにおいて、同じ研究者によって行われたVEGFトラップ ($4.92 \mu\text{g}/\text{眼}$) によるCNV領域の減少を示すこれまでに公開されたデータと比べてまさるとも劣らない。Saishin, et al. J Cell Physiol, 2003. 195(2): p. 241-8。「トラップ」(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)は、2つの異なる受容体成分とFc領域と呼ばれる抗体分子のFc領域との融合物であり、VEGFトラップは、眼疾患および癌用にRegeneron社で購入されている。これらの2つの独立した研究の比較により、SonepcizumabによるCNV病変サイズの減少がVEGFトラップで観察されたものよりも20%ポイント大きいことが分かる。よって、これらのデータは、CNVネズミモデルにおいて病変形成を減少させる抗S1P療法の能力に関する本発明者らの予備調査結果を裏付けるだけでなく、CNV病変形成を阻害するヒト化抗体、sonepcizumabの有効性の増加も示し、抗透過性作用を理解する上での手掛かりともなる。

【0422】

実施例19: 未熟児網膜症ネズミモデルにおける網膜新血管新生の発生を減少させる Sonepcizumabの有効性

C57BL/6マウス ($n = 7$) を生後7日に75%酸素中に置き、生後12日に大気に戻し、片側の眼に $3 \mu\text{g}$ の sonepcizumab の、反対側の眼にビヒクルの眼内圧注射を行った。これらのマウスに第17日目にFITC標識抗PECAM抗体の眼内圧注射を行い、8時間後に、マウスを安楽死させ、眼球を摘出し、PBS緩衝ホルマリン中に室温で5時間固定した。網膜を切開し、0.25% Triton X-100含有リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、全てを装着した。Nikon社製蛍光顕微鏡を用いてスライドを観察し、画像解析により1網膜当たりの網膜NV領域を測定した。

【0423】

ネズミレーザー破膜モデルで観察されたCNVの減少と一致するように、本発明者らは未熟児網膜症 (ROP) ネズミモデルにおいてCNVの劇的な減少も観察した。Sonepcizumab ($3.0 \mu\text{g}/\text{眼}$) の硝子体内投与では、生理食塩水対照と比較して、網膜新血管新生のほぼ4倍の減少が生じた。これらのデータは、ブルッフ膜の虚血による

ものであれ、破膜によるものであれ、網膜血管床および脈絡膜血管床の両方における病理的眼脈管形成を阻害する *sonepcizumab* の有効性を裏付けている。

【0424】

実施例20：マトリゲルプラグアッセイでの VEGF 誘発性脈管形成に対する *Sonepcizumab* の作用

Staton, et al., Int J Exp Pathol, 2004. 85(5): p. 233-48に記載のとおり、GFR マトリゲルプラグアッセイを用いて *in vivo* 新血管新生を実施した。4～6週齢の *nu/nu* マウスに左脇腹に 500 μ L の氷冷 GFR マトリゲルを注射した。GFR マトリゲルは、単独で（対照）または 100 μ g/ml ヘパリンを添加した 10 μ g/ml VEGF の添加後に注射した。対照および *sonepcizumab* 処置に関し、3動物で群を構成した。GFR マトリゲル移植の1日前に生理食塩水または *sonepcizumab* (10mg/kg) で動物を処置し、試験期間は72時間おきに *i. p.* 投与した。12日後に動物を犠牲にし；プラグを切除し、すぐに亜鉛およびホルマリンフリーの固定液中に一晩固定し、パラフィン包埋し、切片を作製した (5 μ m)。次いで、パラフィン包埋切片を CD31 (Pharmingen) について染色した。デジタルカメラにより 20x 倍率で画像 (1切片につき9画像、1プラグにつき3切片) を撮影し、PhotoShop 6.0 プログラムにより CD31 陽性染色を定量し、ImageJ により脈管形成スコア (ピクセル²) として表した。

【0425】

このマトリゲルプラグアッセイでは *sonepcizumab* の抗脈管形成作用は明らかであった。予想どおり 10 μ g/ml VEGF を添加したマトリゲルプラグでは、広範囲に及ぶ新血管新生 (VEGF または *sonepcizumab* を受けない未処置対照で見られるもののおよそ 5.75x) が誘導された。重要なことには、マトリゲル注射前の *sonepcizumab* での全身的 *i. p.* 処置により、細胞充実性および微細血管密度のこの VEGF 刺激による増加のほぼ 80% が妨げられた。この減少は有意であり ($p < 0.05$ VEGF 単独との比較)、動物に全身投与したときの *sonepcizumab* の強力な抗脈管形成活性を裏付け、*sonepcizumab* が VEGF 誘発性脈管形成を有意に阻害し得ることを強く示唆している。この発見は、ネズミ同所性乳癌モデルにおいて S1P 抗体がいくつかの脈管形成因子 (VEGF を含む) の血清レベルを減少させた *Lpath* のオンコロジープログラムのデータと一致する。

【0426】

AMD に伴う血管成長の主要素は、成長しつつある内皮管を鞘で覆いかつ支える周皮細胞の補充である。Jo, et al., Am J Pathol, 2006. 168(6): p. 2036-53。トランスジェニックマウス研究により、VEGF および PDGF-B が周皮細胞の浸潤および分化を刺激し、血管成熟および安定化につながる主要な要因であることが分かった。Guo, et al., Am J Pathol, 2003. 162(4): p. 1083-93; Benjamin, L. E., I. Hemo and E. Keshet, Development, 1998. 125(9): p. 1591-8。重要なことには、S1P は VEGF および PDGF のトランス活性化を促進する。そのため、これらの増殖因子を間接的に無効にする *sonepcizumab* の能力は、AMD 中に異常な血管成長を妨げることができることを示唆している。

【0427】

実施例21：*Sonepcizumab* はブルッフ膜のレーザー破膜後の血管漏出を著しく減少させる

ブルッフ膜レーザー破膜ネズミモデルにおいて、(上記に示したように新血管新生を阻害することに加えて) 血管漏出を阻害するために投与した *sonepcizumab* の有効性を評価した。

【0428】

C57BL/6 マウス ($n = 10$) に各眼3箇所ブルッフ膜のレーザー破膜を行い、片側の眼に 3 μ g の *sonepcizumab* の、反対側の眼にビヒクルの眼内圧注射を行った。。レーザー破膜後1週間の時点において、これらのマウスに 12 μ l/g 体重

の1%フルオレセインナトリウムの腹腔内注射を行い、5分後に安楽死させた。眼球を摘出し、PBS緩衝ホルマリン中に室温で5時間固定した。次に、網膜を切開し、洗浄し、一次抗PECAM-1とともにインキュベートした。次いで、網膜を洗浄し、二次抗体（ローダミンとコンジュゲートしたヤギ抗ラットIgG）とともにインキュベートした後、平らに装着した。

【0429】

CNV病変領域の定量を、PECAM-1染色により測定する。血管漏出の定量を、フルオレセインナトリウム染色により測定する。CNVからの漏出領域全体 = CNV + 漏出（緑色） - CNV領域（赤色）。値は $n = 10$ マウス/群の平均 $\pm$ SEMである。脈絡膜新血管新生領域（PECAM-1により染色されている）は、LT1009で処置した動物ではおよそ 0.015 mm^2 、生理食塩水処置対照動物ではおよそ 0.03 mm^2 であった。これは新血管新生の50%減少である（ $p = 0.018$ ）。脈絡膜新血管新生からの漏出領域（フルオレセインにより染色されている）は、LT1009で処置した動物ではおよそ 0.125 mm^2 、生理食塩水処置対照動物ではおよそ 0.2 mm^2 であった。これは血管漏出のおよそ38%減少（ $p = 0.017$ ）である。

【0430】

3.0 μg /眼のSonopcizumabまたはPBS対照で処置したマウスにおける脈絡膜新血管新生および血管漏出の減少についての代表的な免疫組織化学画像は、これらの結果と一致する。このように、sonopcizumabは、CNVの減少に加えて、ブルッフ膜レーザー破膜後の血管漏出、すなわち視力喪失の主な原因であり、(i) AMDにおける脈絡膜新生血管系漏出および(ii)糖尿病における血液-網膜関門の破壊：と関連している網膜浮腫を著しく減少させた。Gerhardt, H. and C. Betsholtz, Cell Tissue Res, 2003, 314(1): p. 15-23 Sonopcizumabは、眼における病理的血管形成だけでなく網膜浮腫をもたらし血管漏出も減少させた。これらの発見は、マウスにフルオレセイン標識デキストラン灌流させたCNV領域定量試験から得たデータと一致する。この方法によるCNV定量が血管透過性の影響を受けることは確かである。非常に好都合な結果は、脈絡膜血管床における抗透過性作用を立証している。これらのデータを前提に、本発明者らはsonopcizumabには単剤療法となる可能性があると考ええる。現行の汎VEGF-A遮断薬との相乗作用の可能性もある。

【0431】

実施例22：S1Pに対する抗体での処置後の網膜におけるマクロファージ浸潤の減少

加齢性黄斑変性症（AMD）は、シャープな中心視野を徐々に破壊する加齢に伴う疾患である。黄斑変性には2つの主要なタイプがある。AMD症例の85~90%を占めている乾燥型または萎縮型および異常な血管の成長を特徴とする湿潤型AMD。乾燥型黄斑変性は、ドルーゼとして知られている黄色がかった斑点が主に斑領域の悪化する組織の沈殿物または残屑から蓄積し始めた場合に診断される。徐々に中心視野の喪失が起こり得る。最も多く見られる萎縮（乾燥）型AMDには有効な処置はない。萎縮性AMDは、光受容細胞の下に位置し通常はこれらの光感受性細胞に不可欠の代謝支援を提供する網膜色素上皮（RPE）の異常によって引き起こされる。RPE機能障害に続発する斑のある桿状体および円錐体の変性し、不可逆的視力喪失につながる。酸化的ストレス、虚血、ドルーゼの形成、脂褐素の蓄積、局所炎症および反応性神経膠症は、萎縮性AMDの病因に関係している病理学的プロセスである。これらのプロセスのうち、炎症は組織損傷の重要な一因として現われる。乾性AMD患者の斑へのマクロファージ浸潤は、損傷性炎症性応答の重要な要素であることが証明されている。そのため、マクロファージ浸潤の阻害によって斑のある組織の損傷が軽減される可能性があることから、マクロファージ浸潤を軽減することができる作用物質は有益な治療用物質であろう。かかる作用物質は乾性AMDが湿性AMDへと変わる速度も低下させ得る。

【0432】

虚血性および炎症性網膜症モデルでは、これまでに、抗S1P抗体での処置後にマクロファージ浸潤の55%阻害が示されている。これらのデータは十分に確立されたネズミ酸

10

20

30

40

50

素誘発性網膜症モデル（未熟児網膜症（R O P）モデルとしても知られている）を用いて得られた。具体的には、C 5 7 B L / 6 マウスを生後 7 日に 7 5 % 酸素中に置き、生後 1 2 日に大気に戻し、片側の眼に 3 μ g のヒト化抗 S 1 P 抗体（L T 1 0 0 9、S o n e p c i z u m a b（商標））の、他側の眼にビヒクルの眼内圧注射を行った。これらのマウスに生後 1 7 日目に F 4 / 8 0（汎マクロファージマーカー）に対する F I T C 標識抗体の眼内圧注射を行い、8 時間後に、マウスを安楽死させた。眼球を摘出し、P B S 緩衝ホルマリン中に室温で 5 時間固定した。網膜を切開し、0. 2 5 % T r i t o n X - 1 0 0 含有リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、全てを装着した。Nikon 社製蛍光顕微鏡を用いてスライドを観察し、網膜マクロファージを定量した。これらの結果を下記の表 7 に示す。

【0 4 3 3】

【表 7】

表 7：S 1 P に対するヒト化モノクローナル抗体での処置による

網膜におけるマクロファージ浸潤の減少

1 網膜あたりのマクロファージ数		マクロファージ密度の減少率%	
生理食塩水対照	S 1 P 抗体	生理食塩水対照	S 1 P 抗体
2513 $\pm$ 115	1136 $\pm$ 33	100 $\pm$ 0.5	55.4 $\pm$ 1.3
P<0.001		P<0.0001	

【0 4 3 4】

これらのデータと乾性 A M D の病因におけるマクロファージの既知の役割に基づいて、抗 S 1 P 抗体は乾性 A M D の処置に有効な治療薬であると考ええる。

【0 4 3 5】

実施例 2 3：2 5 ~ 7 5 m g / k g L T 1 0 0 9 での、単独および A a v a s t i n またはパクリタキセルと組み合わせての処置に対する、ヌード N C r マウスにおける S C C O L O 2 0 5 結腸直腸腫瘍異種移植片の反応

この研究の目的は、L T 1 0 0 9 の、単独および他の抗癌薬と組み合わせての有効性を判定すること、雌 N c r (n u / n u) マウスに皮下移植 (s c) し、定着したヒト結腸直腸 (C O L O 2 0 5) 癌腫瘍の進行を遅らせることであった。

【0 4 3 6】

ヌードマウスに 1 マウスにつき in vivo 継代の C O L O 2 0 5 腫瘍 1 断片を右脇腹付近に s c 埋め込みを行った。各試験の 6 0 匹のマウスにおよそ 1 0 0 ~ 2 0 0 m m 3 のサイズの腫瘍が定着した日に全ての処置を開始した。その際、マウス (1 群当たり n = 1 0) を 2 5 m g / k g の L T 1 0 0 9 か、5 0 m g / k g L T 1 0 0 9 か、4 0 m g / k g A a v a s t i n か、5 0 m g / k g L T 1 0 0 9 と 4 0 m g / k g A a v a s t i n か、1 5 m g / k g パクリタキセルかまたはビヒクル (生理食塩水) で処置した。試験期間中 2 5 m g / k g または 5 0 m g / k g L T 1 0 0 9 および生理食塩水は、0. 1 m L / 2 0 g 体重の量で q 3 d で 1 回 (o n c e q 3 d) i p 投与した。A a v a s t i n は、4 0 m g / k g / 投与の投与量で q 7 d スケジュールで i v 投与し、0. 1 m L / 2 0 g 体重の量で注射した。パクリタキセル (陽性対照) は、1 5 m g / k g / 投与の投与量で q 1 d x 5 スケジュールで i v 投与し、0. 1 m L / 1 0 g 体重の量で注射した。研究期間中、第 2 1 日目に、2 5 m g / k g L T 1 0 0 9 の用量を 7 5 m g / k g L T 1

009へと増加した。

【0437】

毎日死亡率について動物を観察した。処置第1日目から開始して研究終了日を含め、週2回、腫瘍寸法および体重を採取した。各研究においてビヒクル処置対照群の腫瘍中央値がおよそ4, 000mgに達したときに、研究を終了した。各動物の腫瘍を採取し、湿重量を記録し、CD-31染色による微小血管密度(MVD)の測定のために腫瘍を処理した。腫瘍重量(mg)は、楕円球の方程式 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$ (式中、lおよびwは、各測定において採取した長径および短径を意味する)を用い、単位密度($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$)を仮定して計算した。

【0438】

10

【表8】

表8：研究の結果の数値概要—C o 1 o 2 0 5

処置	最終腫瘍重量 (mg)	ビヒクル処置マウスに対する減少率%
ビヒクル	3047.25	—
50 mg/kg LT1009	2071.17	32%
25/75 mg/kg LT1009	2465.60	20%
アバスタチン	1967.90	35%
アバスタチン + 50 mg/kg LT1009	1614.40	48%
パクリタキセル	0	100%

20

【0439】

最終腫瘍重量によって測定されたように、50mg/kg LT1009は、腫瘍進行を実質的に阻害し($p < 0.018$)、生理食塩水処置動物の腫瘍と比較したときには32%阻害した。25/75mg/kg LT1009も最終腫瘍重量を20%減少させるのに有効であった；しかしながら、この減少は統計的に有意ではなかった。50mg/kg LT1009は、最終腫瘍重量の減少においてAavastinと同様の作用があった(それぞれ32%減少と35%減少)。LT1009とAavastinの組合せは、いずれかの薬剤単独よりも効果的であり、生理食塩水処置動物と比較したときには腫瘍重量の48%減少を示した。このように、LT1009とAavastinの作用は相加的であるように思われる。陽性対照、パクリタキセルは、事前定着腫瘍を完全に排除した。

30

【0440】

実施例24：50mg/kg LT1009での、単独ならびにAavastinおよび5-FUと組み合わせての処置に対する、ヌードNCrマウスにおけるSC HT29結腸直腸腫瘍異種移植片の反応

この研究の目的は、LT1009の、単独および他の抗癌薬と組み合わせての抗腫瘍作用を、雌無胸腺NCr-nu/nuマウスにsc埋め込みを行ったヒトHT29結腸腫瘍異種移植片に対して評価することである。

40

【0441】

ヌードマウスに1マウスにつきin vivo継代のHT29腫瘍1断片を右脇腹付近にsc埋め込みを行った。各試験の60匹のマウスにおよそ100~200mm³のサイズの腫瘍が定着した日に全ての処置を開始した。1処置群を10匹のマウスとした。試験期間中、50mg/kg LT1009および生理食塩水は、0.1mL/20g体重の量でq2dでip投与した。75mg/kg 5-FUおよび20mg/kg Aavastinはそれぞれ、75mg/kg/投与および20mg/kg/投与の投与量でq4dでipおよびiv投与し、0.1mL/10g体重の量で注射した。LT1009の初回投与は、iv投与により100mg/kgであった。

50

【0442】

毎日死亡率について動物を観察した。処置第1日目から開始して研究終了日を含め、週2回、腫瘍寸法および体重を採取した。各研究においてビヒクル処置対照群の腫瘍中央値がおよそ4, 000 mgに達したときに、研究を終了した。各動物の腫瘍を採取し、湿重量を記録し、CD-31染色によるMVDの測定のために腫瘍を処理した。腫瘍重量 (mg) は、楕円球の方程式 $(l \times w^2) / 2 = \text{mm}^3$ (式中、lおよびwは、各測定において採取した長径および短径を意味する) を用い、単位密度 ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$) を仮定して計算した。

【0443】

【表9】

10

表9：最終腫瘍重量—HT29

処置	最終腫瘍重量 (mg)	有意性 (P-値)	ビヒクル処置マウスに対する減少率%
ビヒクル	2723.67	—	—
LT1009	2390.63	1.00	13%
アバスチン	1927.44	0.39	30%
LT1009 + アバスチン	1624.90	0.001	41%
5-FU	1963.71	0.099	28%
LT1009 + 5-FU	1948.00	0.049	29%

20

【0444】

腫瘍重量によって測定されたように、50 mg/kg LT1009は、生理食塩水処置動物の腫瘍と比較したときに腫瘍進行を13%抑制し、一方、Aavastinは腫瘍重量を30%減少させた。LT1009とAavastinの組合せは、いずれかの薬剤単独よりも効果的であり、生理食塩水処置動物と比較したときには統計的に有意な、腫瘍重量の41%減少を示した。5-FUでの処置では腫瘍重量が28%減少した。5-FUはLT1009とわずかな相加作用を示し、最終腫瘍重量の29%抑制を示した。

30

【0445】

実施例25：50 mg/kg LT1009での、単独またはAavastinもしくはパクリタキセルと組み合わせての処置に対する、ヌードNCrマウスにおけるSC DU145前立腺腫瘍異種移植片の反応

この研究の目的は、LT1009の、単独および他の抗癌薬と組み合わせての有効性を判定すること、雌Ncr (nu/nu) マウスに皮下移植 (sc) し、定着したヒト前立腺 (DU145) 癌腫瘍の進行を遅らせることであった。

【0446】

ヌードマウスに1マウスにつきin vivo継代のDU145腫瘍1断片を右脇腹付近にsc埋め込みを行った。各試験の60匹のマウスにおよそ100~200 mm³のサイズの腫瘍が定着した日に全ての処置を開始した。その際、マウス (1群当たりn=10) を50 mg/kgのLT1009か、20 mg/kg Aavastinか、7.5 mg/kg パクリタキセルか、50 mg/kg LT1009と20 mg/kg Aavastinか、50 mg/kg LT1009と7.5 mg/kg パクリタキセルかまたはビヒクル (生理食塩水) で処置した。試験期間中、50 mg/kg LT1009および生理食塩水は、0.1 mL/20 g体重の量でq2dでip投与した。パクリタキセルおよびAavastinはそれぞれ、7.5 mg/kg/投与および20 mg/kg/投与の投与量でq1d x 5およびq4dでivおよびip投与し、0.1 mL/10 g体重の量で注射した。LT1009の初回投与は、iv投与により100 mg/kgであった。

40

【0447】

50

研究期間中、s c 腫瘍を三つの座標軸上で測定し、体積を計算することによって、腫瘍成長モニタリングした。研究終了時に最終腫瘍重量および体積を測定し、その後、マウスを犠牲にし、腫瘍を採取した。そして、C D-31 染色により腫瘍の微小血管密度 (M V D) を測定した。

【0448】

【表10】

表10：研究の結果の数値概要-DU145

処置	最終腫瘍重量 (mg)	有意性 (P-値)	ビヒクル処置マウスに対する減少率%
ビヒクル	2703	-	-
LT1009	2242	0.00	28%
アバスタチン	578	0.00	79%
LT1009 + アバスタチン	676	0.00	75%
パクリタキセル	539	0.00	80%
LT1009 + パクリタキセル	373	0.00	84%

10

【0449】

最終腫瘍重量によって測定されたように、50 mg/kg LT1009は、腫瘍進行を有意に ($p < 0.00$) 28%抑制した。A v a s t i nおよびパクリタキセルも、生理食塩水処置動物の腫瘍と比較したときに最終腫瘍重量を有意に ($p < 0.00$) 80%減少させた。最終腫瘍体積によって測定されたように、LT1009は、A v a s t i nまたはパクリタキセルの抗腫瘍活性を有意に増加させなかった。

20

【0450】

実施例26：25 mg/kgまたは50 mg/kg LT1009での、単独およびボルテゾミブと組み合わせての処置に対する、C B 17 S C I DマウスにおけるR P M I 8226 ヒト骨髄腫腫瘍異種移植片の反応

この研究の目的は、LT1009の、単独および抗癌薬ボルテゾミブと組み合わせての抗腫瘍作用を、雌C B 17 S C I Dマウスにs c埋め込みを行ったヒトR P M Iヒト骨髄腫腫瘍異種移植片に対して評価することである。

30

【0451】

ヌードマウス (C B 17 S C I D、4~5週齢、体重18~22 g、Harlan社から入手した雌マウス) に組織培養物から採取したR P M I 8226細胞 (約 1×10^7 細胞/マウス) をs c注射した。腫瘍がおおよそ100 mm³のサイズに成長したときに、動物を腫瘍サイズにより処置群と対照群 (1群当たり10匹のマウス) にペアマッチングした。初回投与はペアマッチング後第1日目に開始した。全ての群の動物に体重により投与した (1 g当たり0.01 ml; 10 ml/kg)。ビヒクル中のLT1009は、研究終了まで3日に1回 (終了までQ3D) 腹腔内 (I P) 注射により投与した。ボルテゾミブは、3日に1回、6回処置 (Q3D x 6) で尾静脈経由での静脈内注射により投与した。陰性対照とするために、LT1009ビヒクル (0.9%生理食塩水) は、終了までQ3DのスケジュールでI P投与した。

40

【0452】

個体および群の平均腫瘍体積±S E Mを第1日目から研究終了まで週2回記録する。研究終了時に各群の最終平均腫瘍体積±S E Mを記録する；部分的もしくは完全腫瘍退縮が起こった動物または技術的な死もしくは薬物関連死が起こった動物はこれらの計算から検閲する。

【0453】

【表 1 1】

表 1 1 : 最終腫瘍体積－RPMI

処置	最終腫瘍重量 (mg)	ビヒクル処置マウスに 対する減少率%
ビヒクル	2083	0
ボルテゾミブ	1664	20%
25 mg/kg LT1009	1860	11%
50 mg/kg LT1009	1978	5%
50 mg/kg LT1009 + ボルテゾミブ	1832	12%

10

【0 4 5 4】

本明細書において記載し、主張する組成物および方法の全ては、本開示内容に照らして過度の実験を行うことなく、作り、実行することができる。本発明の組成物および方法については好ましい実施形態に関して記載してきたが、該組成物および方法に変形を加えてもよいことは当業者には明らかである。添付の特許請求の範囲によって定義されるように、当業者には明らかなかかる全ての同様の代替物および修飾は本発明の精神および範囲内であると考えられる。

20

【0 4 5 5】

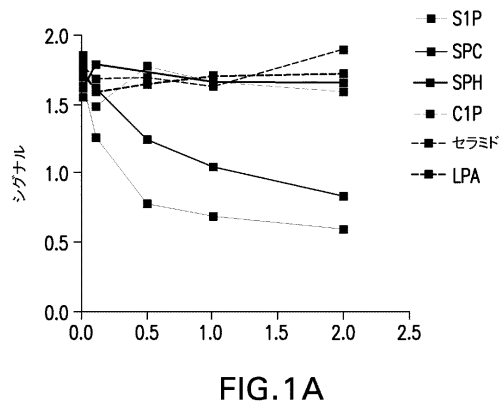
本明細書に記載した全ての特許、特許出願および刊行物は、本発明が属する分野の技術者のレベルを示している。全ての特許、特許出願および刊行物（優先権または別の利益を主張するものを含む）は、個々の刊行物が具体的かつ個別に引用することにより本明細書の一部とされることが示されたのと同程度に引用することにより本明細書の一部とされる。

【0 4 5 6】

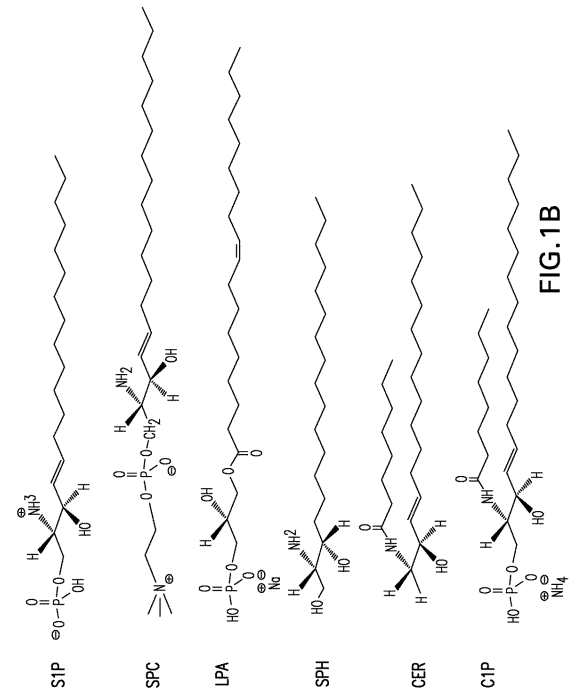
本明細書において例示的に記載した本発明は、本明細書において具体的に開示されていない任意の要素の不在下でも適切に実施し得る。よって、例えば、本明細書におけるいずれの場合においても、用語「含んでなる (comprising)」、「から本質的になる (consisting essentially of)」および「からなる (consisting of)」はいずれも、残る 2 つの用語のいずれかと置き換えてよい。使用した用語および表現は、限定ではなく説明の言葉として用いられ、かかる用語および表現の使用において、示し、記載した特徴の等価物またはその部分を排除する意図はなく、主張した本発明の範囲内で様々な修飾が可能であることは認識されている。従って、本発明を好ましい実施形態によって具体的に開示してきたが、当業者ならば本明細書に開示した概念の任意選択の特徴、修飾および変形を用い得ること、そして添付の特許請求の範囲によって定義されるように、かかる修飾および変形は本発明の精神および範囲内であると考えられることは理解すべきである。

30

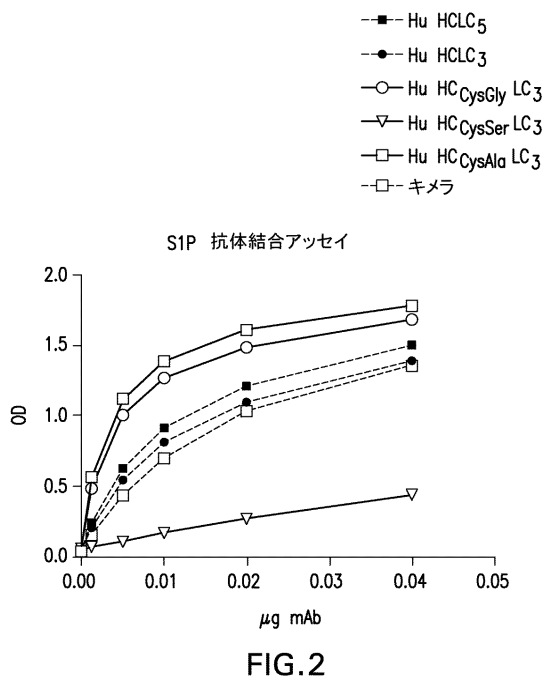
【図 1 A】



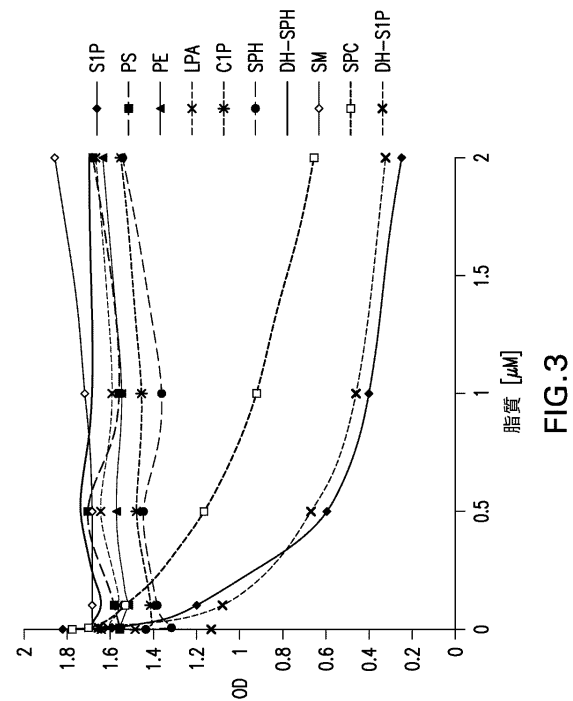
【図 1 B】



【図 2】



【図 3】



【図 4 A】

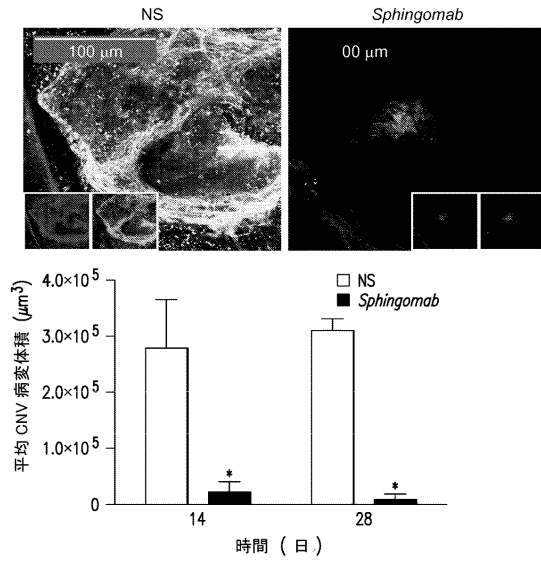


FIG.4A

【図 4 B】

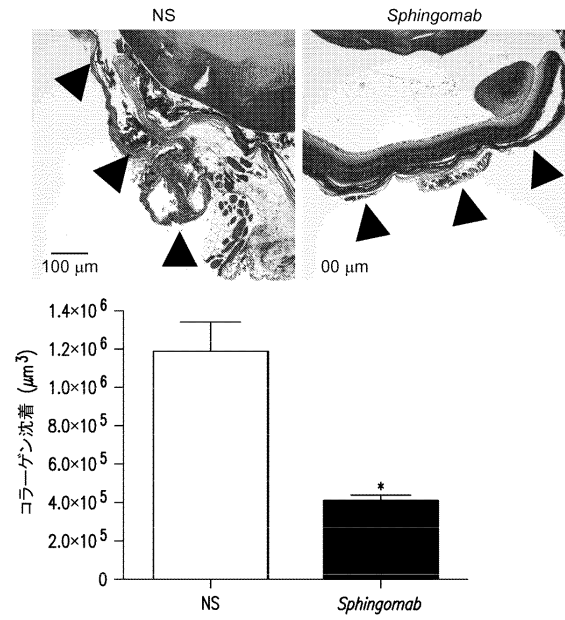


FIG.4B

【図 5 A】

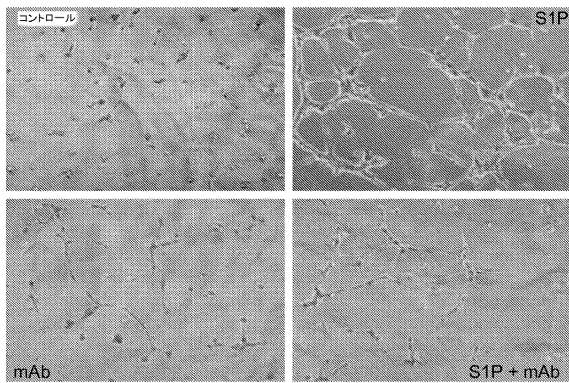


FIG.5A

【図 6 A】

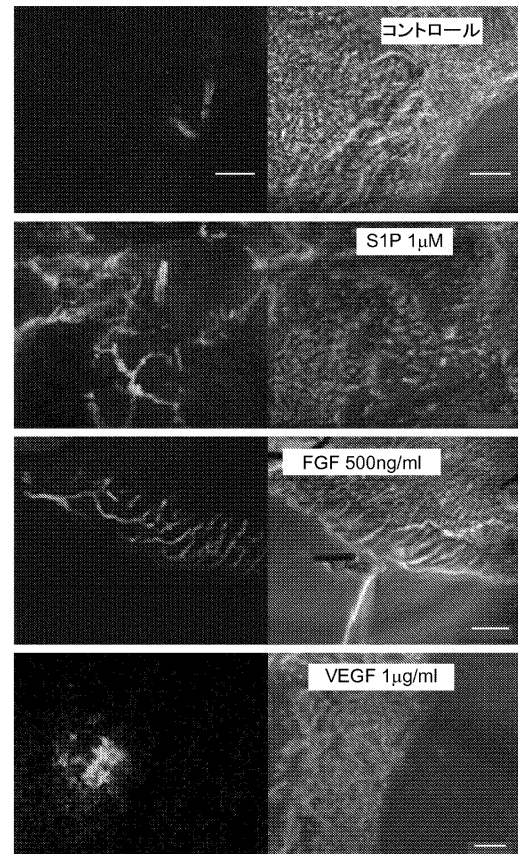


FIG.6A

【図 5 B】

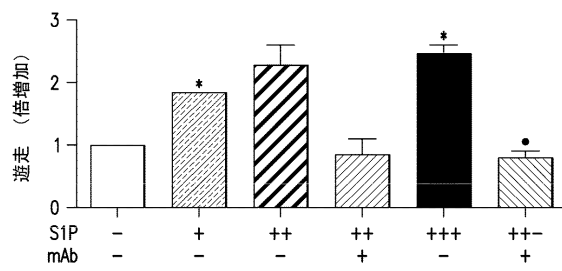


FIG.5B

【図 6 B】

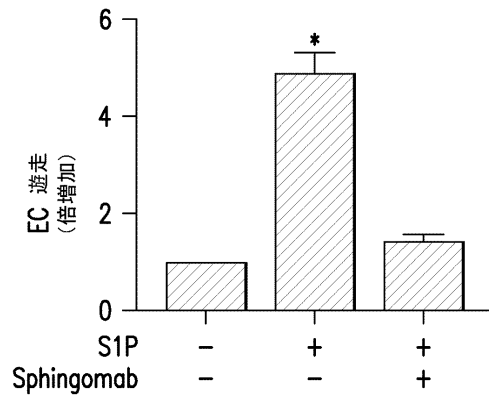


FIG.6B

【図 6 C】

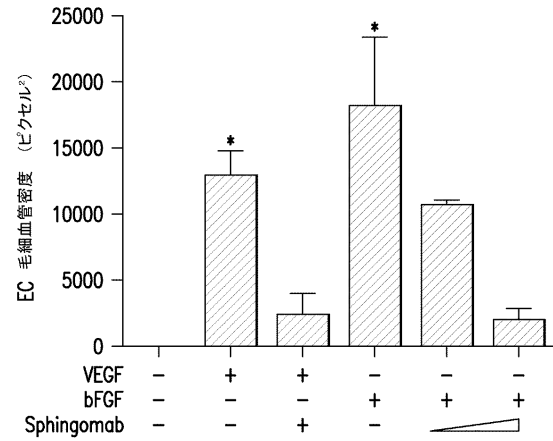


FIG.6C

【図 7 A】

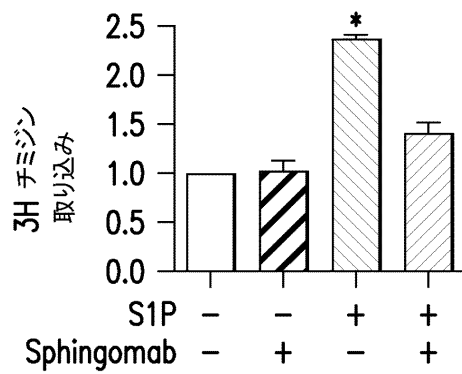


FIG.7A

【図 7 B】

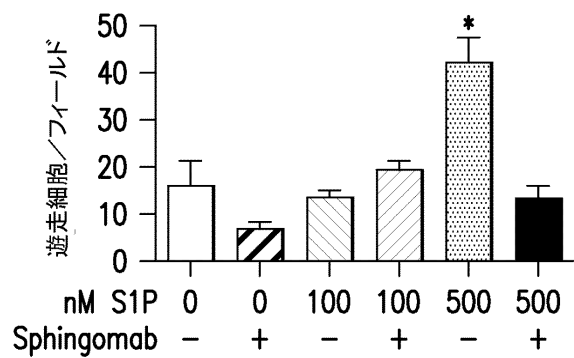


FIG.7B

【図 7 C】

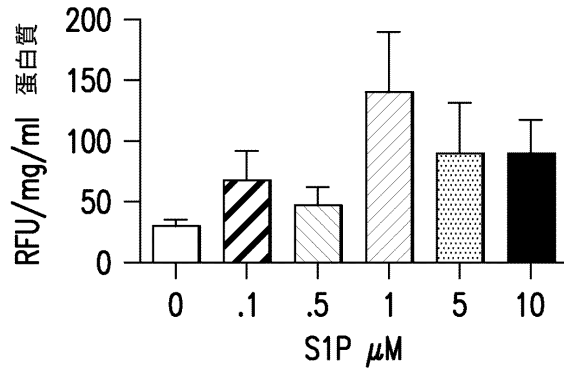


FIG.7C

【図 7 D】

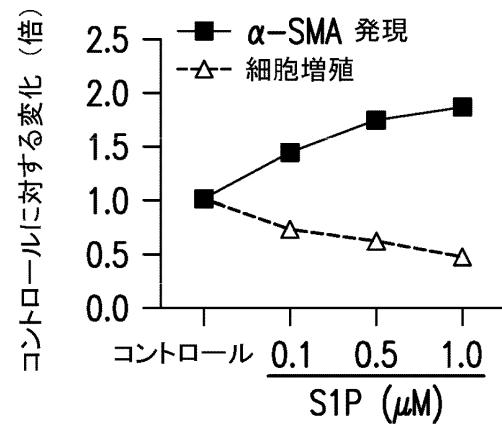


FIG.7D

【図 7 E】

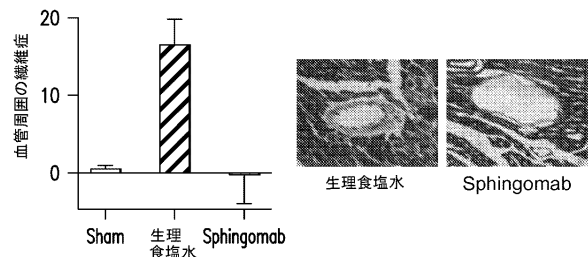


FIG.7E

【図 8 A】

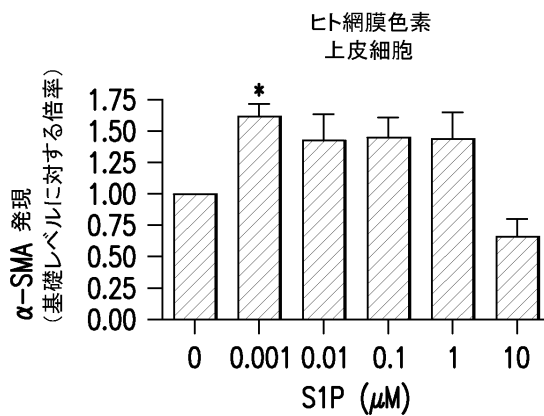


FIG.8A

【図 8 B】

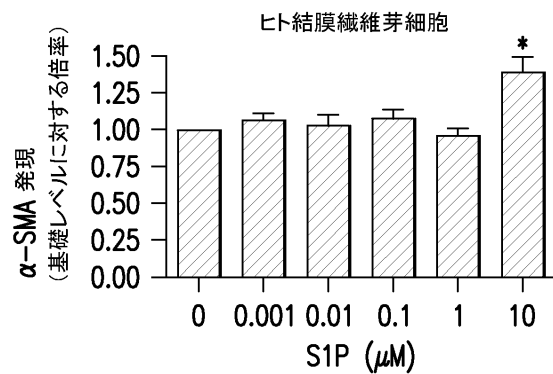


FIG.8B

【図 8 C】

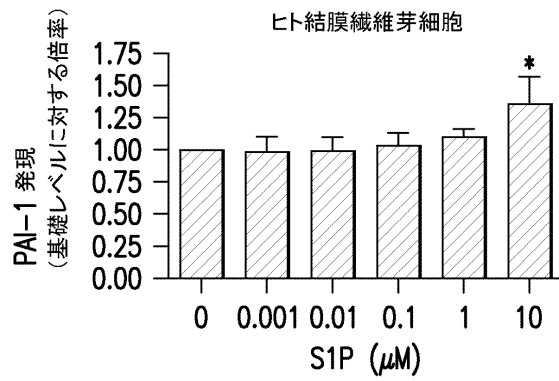


FIG.8C

【図 9 A】

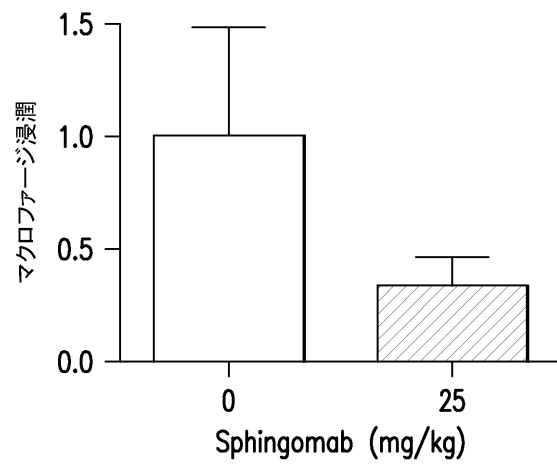


FIG.9A

【図 9 B】

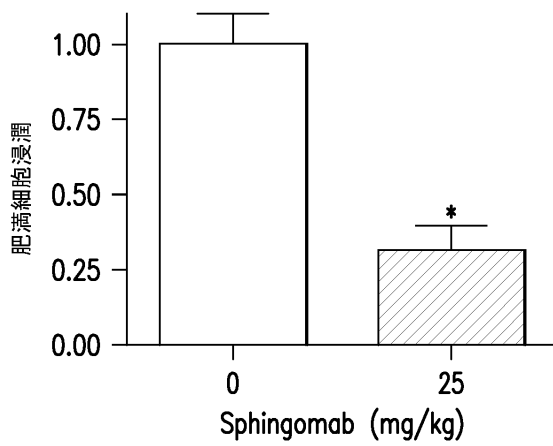


FIG.9B

【図 10 A】

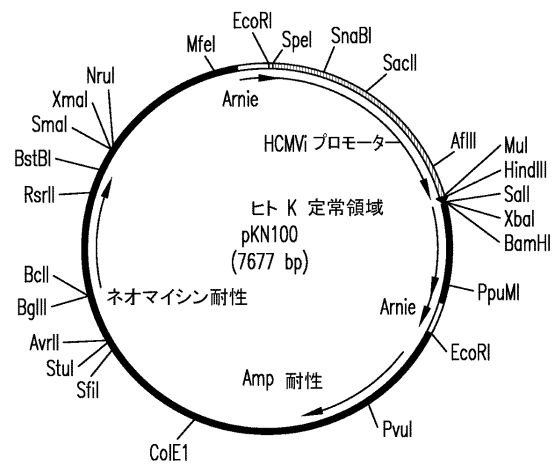


FIG.10A

【図 10 B】

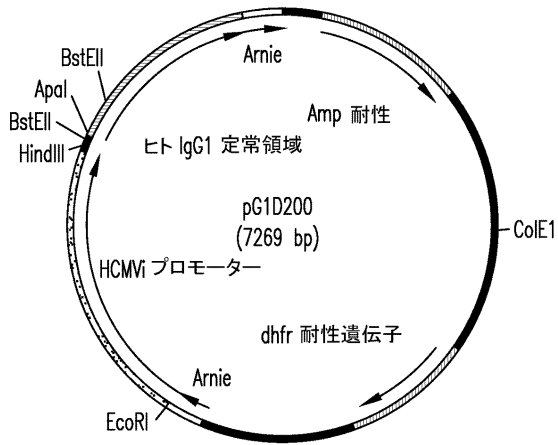


FIG.10B

【図 11】

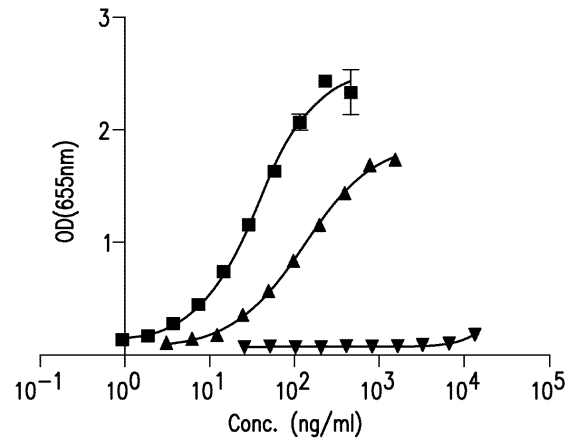


FIG.11

【図 12 A】

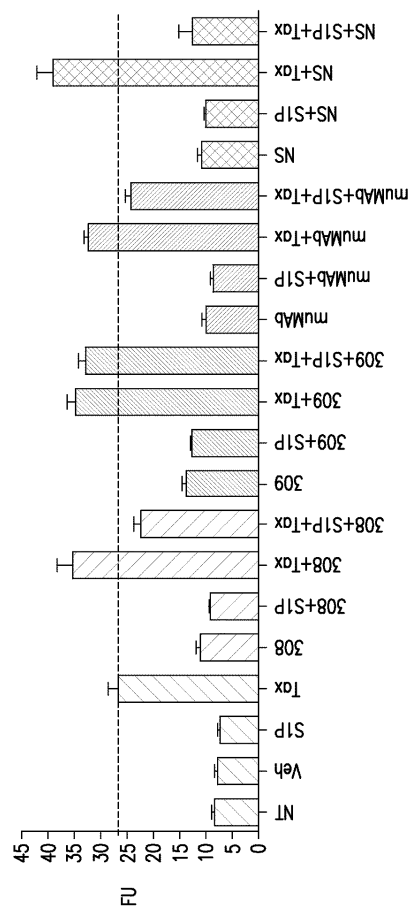


FIG.12A

【図 12 B】

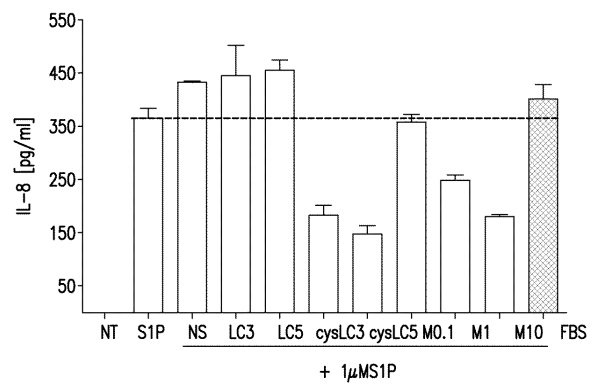
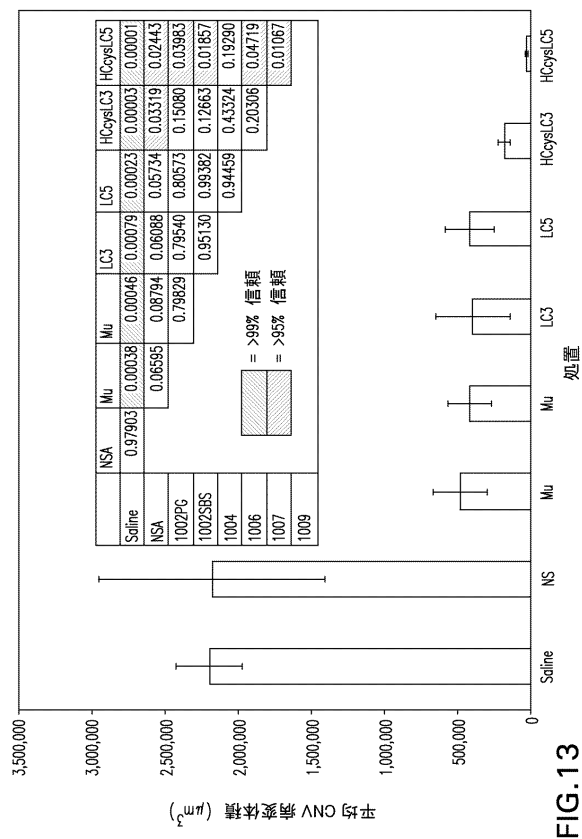


FIG.12B

【図 13】



【配列表】

0005732182000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ウィリアム・エイ・ガーランド

アメリカ合衆国 9 2 6 7 2 カリフォルニア州サン・クレメント、ピア・コリブリ 3 1 0 番

(72)発明者 グレン・エル・ストラー

アメリカ合衆国 1 1 5 7 6 ニューヨーク州ロング・アイランド、ザ・サーペンタイン 8 8 番

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 7 8 3 3 6 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 3 / 0 4

A 6 1 P 7 / 0 2

A 6 1 P 9 / 0 0

A 6 1 P 9 / 0 4

A 6 1 P 9 / 0 8

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 1 5 / 0 0

A 6 1 P 1 7 / 0 2

A 6 1 P 2 7 / 0 2

A 6 1 P 2 7 / 0 6

A 6 1 P 3 1 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 2 2

A 6 1 P 3 3 / 0 2

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 4 4

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)