

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5600252号  
(P5600252)

(45) 発行日 平成26年10月1日(2014.10.1)

(24) 登録日 平成26年8月22日(2014.8.22)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C07F 9/10 (2006.01)</b>	C07F 9/10 CSPB
<b>A61K 47/24 (2006.01)</b>	A61K 47/24
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 J
<b>A61K 47/42 (2006.01)</b>	A61K 39/395 B
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A61K 47/42

請求項の数 9 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-513443 (P2009-513443)  
 (86) (22) 出願日 平成19年5月31日(2007.5.31)  
 (65) 公表番号 特表2009-541215 (P2009-541215A)  
 (43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/070013  
 (87) 国際公開番号 W02007/140431  
 (87) 国際公開日 平成19年12月6日(2007.12.6)  
 審査請求日 平成22年5月31日(2010.5.31)  
 (31) 優先権主張番号 60/810,185  
 (32) 優先日 平成18年5月31日(2006.5.31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/835,569  
 (32) 優先日 平成18年8月4日(2006.8.4)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な生物活性脂質誘導體、それに対して反応性がある免疫により誘導される物質 ( i m m u n e - d e r i v e d m o i e t y ) およびその生産および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

極性頭部基と 1 つの炭化水素鎖を有する生物活性リゾ脂質を含む誘導體化生物活性リゾ脂質であって、

生物活性リゾ脂質の炭化水素鎖内の炭素原子が保護されていてもよいペンダントスルフィド基で誘導體化されており、

生物活性リゾ脂質は、リゾホスファチジン酸、リゾホスファチジルイノシトールおよびリゾホスファチジルコリンからなる群から選択される、誘導體化生物活性リゾ脂質。

【請求項 2】

担体部分とコンジュゲートされた請求項 1 に記載の誘導體化生物活性リゾ脂質を含む、誘導體化生物活性リゾ脂質コンジュゲートであって、該担体部分がポリエチレングリコール、金コロイド、アジュバント、シリコーンビーズ、および担体タンパク質からなる群から選択され、該担体タンパク質がキーホールリンペットヘモシアニンおよびアルブミンからなる群から選択される、誘導體化生物活性リゾ脂質コンジュゲート。

【請求項 3】

抗体産生を惹起するのに十分な量の請求項 2 に記載の誘導體化生物活性リゾ脂質コンジュゲートを免疫適格非ヒト動物に投与し、それによる該動物において抗体産生を惹起することを含む、抗体産生を惹起する方法、ここで

免疫適格非ヒト動物は哺乳動物であり、

該方法はさらにモノクローナル抗体としての抗体を産生する細胞系統を作出することを含み、

該モノクローナル抗体を産生する細胞系統は、免疫適格非ヒト哺乳類宿主から該誘導体化生物活性リゾ脂質コンジュゲートの生物活性リゾ脂質と特異的に反応性がある抗体産生細胞を単離、同定することにより得られ、

該同定は、誘導体化生物活性リゾ脂質コンジュゲートの誘導体化生物活性リゾ脂質で修飾した支持体を用いて、生物活性リゾ脂質と特異的に反応性がある抗体を産生する細胞を検出することを含む、

方法。

【請求項 4】

(a) ヒト化抗体およびキメラ抗体からなる群から選択されるモノクローナル抗体の誘導体を作成すること (b) モノクローナル抗体またはその誘導体を単離することのうち少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

生物活性リゾ脂質と特異的に反応性がある抗体を単離する方法であって、請求項 1 に記載の誘導体化生物活性リゾ脂質で修飾された支持体を用いて、誘導体化生物活性リゾ脂質の生物活性リゾ脂質と特異的に反応性がある抗体を溶液から単離し、それにより抗体を単離することを含む、方法。

【請求項 6】

前記溶液が体液、組織サンプルおよび組織ホモジネートからなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

生物活性リゾ脂質と特異的に反応性がある抗体を検出する方法であって、請求項 1 に記載の誘導体化生物活性リゾ脂質で修飾された支持体を用いて、誘導体化生物活性リゾ脂質の生物活性リゾ脂質と特異的に反応性がある抗体を試料から検出し、それにより抗体を検出することを含み、抗体が自己抗体、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体からなる群から選択される、方法。

【請求項 8】

生物活性リゾ脂質がリゾホスファチジン酸である、請求項 1 に記載の誘導体化生物活性リゾ脂質または請求項 2 に記載の誘導体化生物活性リゾ脂質コンジュゲート。

【請求項 9】

生物活性リゾ脂質がリゾホスファチジン酸である、請求項 3 ~ 7 いずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の支援

本発明は、助成金申請 N C I 2 R 4 4 C A 1 1 0 2 9 8 - 2 に従い、米国政府が支援する基金に少なくとも一部基づいている。従って、米国政府は本明細書に記載されている発明において一定の権利を有し得る。

【0002】

関連出願

本特許出願は、2006年5月31日出願の米国仮特許出願第60/810,185号(弁理士整理番号LPT-3100-PV)、2006年8月4日出願の米国仮特許出願第60/835,569号(弁理士整理番号LPT-3100-PV2)および2007年4月16日出願の米国仮特許出願第60/923,644号(弁理士整理番号LPT-3100-PV3)の優先権を主張するものである。これらの出願は、その目的を問わず出典明示によりそのまま本明細書の一部とされる。

【0003】

技術分野

10

20

30

40

50

本発明は、モノクローナル抗体、およびヒトおよび/または動物の疾病においてシグナル伝達分子としての役割を果たす生物活性脂質分子を含む免疫原に対する抗体を作製する方法に関する。本発明に従って取り組むことができるシグナル伝達生物活性脂質の1つの特定種がリゾ脂質である。特に好ましいシグナル伝達リゾ脂質はスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)および種々のリゾホスファチジン酸(LPA)である。本発明の抗体は、それを、中和免疫応答を惹起することなく、ヒトを含む特定の動物種での使用に好適となるようにさらに修飾することができる。このような抗体、ならびにその誘導体および変異体は、単独で、または他の治療薬および/または処置と組み合わせて、このような抗体を含む医薬組成物の送達によって、種々の疾病または障害の治療および/または予防に使用することができる。さらに、これらの抗体はまた、生体サンプルにおいて生物活性シグナル伝達脂質を検出するために使用することができ、それにより、限定されるものではないが、疾病の診断および/または予後ならびに特定の標的脂質の産生および/または作用を改変する新たな治療法の発見および開発を含む、多くの目的のために有用な情報が得られる。本発明の組成物によって影響を受ける疾病または症状としては、限定されるものではないが、過剰増殖、脈管形成、炎症、繊維症および/またはそれらに基礎にある病理の一部としてのアポトーシスを有する疾病が含まれる。

10

#### 【背景技術】

#### 【0004】

#### 発明の背景

##### 1. 緒論

20

以下の記載は本発明を理解する上で有用な情報を含む。このような情報は本明細書で特許請求される発明の先行技術である、または関連のものであること、あるいは明示的または暗示的に引用される刊行物はいずれも本明細書で特許請求される発明の先行技術である、または特に関連のものであることを認めるものではない。

#### 【0005】

##### 2. 背景

#### A. 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、可溶化剤、ビタミンやホルモンとしての飼料、または酸化、解糖もしくは他の代謝プロセスのエネルギー源としてではなく、医学的研究の重要な対象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疾病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はもっぱら構造的役割を果たしているが、それらのうちの少数のものは細胞外刺激を細胞へ中継することに関与している。「脂質シグナル伝達」とは、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含む、第1または第2のメッセンジャーとして生物活性脂質を用いるいくつかの細胞シグナル伝達経路のいずれをも指す。脂質シグナル伝達経路は、増殖因子から炎症性サイトカインにわたる種々の細胞外刺激により活性化され、アポトーシス、分化および増殖などの細胞運命の決定を調節する。生物活性脂質シグナル伝達に対する研究は、ますます多くの生物活性脂質が同定され、それらの作用が特定されるにつれ、めざましい科学研究分野となっている。

30

#### 【0006】

40

生物活性脂質の例としては、アラキドン酸に由来するエイコサノイド(HEPE、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などのエイコサノイド代謝産物を含む)、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(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)、およびカルジオリピン、ならびにリゾリン脂質(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)など)が含まれる。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、セラミド、セラミド-1-リン酸、スフィンゴシン、スフィンガニン、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)およびスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)などのスフィンゴ脂質が含まれる。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

50

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に相当する。生物活性シグナル伝達脂質の他の例としては、ホスファチジルイノシトール ( P I )、ホスファチジルエタノールアミン ( P E A )、ジアシルグリセリド ( D G )、スルファチド、ガングリオシドおよびセレブロシドが含まれる。

【 0 0 0 7 】

予期されるように、生物脂質 ( すなわち、天然、特に生物体内に存在する脂質 ) は一般に非免疫原であるか、または免疫原性が極めて弱い。脂質はそれ自体、従来、抗体に基づく治療および診断 / 予後のアプローチの標的としてはあまり考えて来られなかった。文献には、担体タンパク質とコンジュゲートされた誘導体化形態のホスファチジルセリン ( P S ) を標的とするモノクローナル抗体の報告が含まれている。ホスファチジルセリンは原形質膜のアミノリン脂質である。膜脂質面の欠如、特に、細胞表面におけるホスファチジルセリンの出現は、細胞の機能を変調し、細胞とその環境との相互作用に影響を及ぼす表面特性の変化の発現をもたらす [Zwaal and Schroit, (1997) Blood, 89:1121-1132]。例えば、P S はアポトーシス中に、細胞膜の内葉 ( その正常な位置 ) から外葉に再分配する。

10

【 0 0 0 8 】

Diaz, Balasubramanian and Schroit [Bioconj. Chem. (1998) 9:250-254] は、P S に対して特異的免疫応答を惹起する脂質抗原の生産を開示している。脂質の脂肪アシル側鎖を介した P S とタンパク質担体 ( B S A ) との共有結合は、エピトープとして完全な P S 頭部基 ( head group ) を保存する。Schroit ( 米国特許第 6 , 3 0 0 , 3 0 8 号、米国特許第 6 , 8 0 6 , 3 5 4 号 ) は、ホスファチジルセリン ( P S ) もしくはホスファチジルコリン ( P C ) / ポリペプチドまたは P S / ポリペプチドコンジュゲートと特異的に結合する、動物に P S / ポリペプチドコンジュゲートまたは P C / ポリペプチドコンジュゲートを投与することによって作製された抗体を開示している。P S、P C / ポリペプチドまたは P S / ポリペプチドコンジュゲートを検出する方法もまた開示されている。P S / ポリペプチドコンジュゲート組成物を含む医薬組成物を動物に投与することにより、P S と特異的に結合する抗体を作製するための方法も開示されており、そのコンジュゲートが投与される ( すなわち、癌ワクチンとして ) 動物において癌を処置する方法も同様である。また、動物を 2 - 糖タンパク質 I / 脂質複合体 ( すなわち、非共有結合的に結合された脂質および糖タンパク質 ) で免疫化することにより、癌治療のために自己免疫を誘発することも開示されている。これらの筆者らは、数種の自己免疫応答が 2 - 糖タンパク質 I / 脂質複合体に対して向けられていると断言しており ( 引用、Schousboe, (1979) Biochim. Biophys. Acta, 579:396-408 )、従って、抗複合体応答の生起は癌治療における実質的な進展と言える。

20

30

【 0 0 0 9 】

Thorpe, Schroitらは、血清または血清タンパク質 2 - 糖タンパク質 I ( 2 - G P I ) の存在下で陰イオン性リン脂質と結合するモノクローナル抗体 ( 3 G 4 ) を記載している。Luster et al., J. Biol. Chem. 281: 29863-29871。当初、陰イオン性リン脂質を特異的に標的とすることが記載され、この抗体はマウスの腫瘍の血管内皮細胞に局在する。Ran et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:1551-1562。次に、この抗体は腫瘍血管上の陰イオン性リン脂質と 2 - G P I の複合体と結合し、従って、P S と結合する抗体は 2 - G P I に依存することが示された。Huang et al (2005) Cancer Res. 65:4408-4416。この抗体は 2 G P I の二量体形成を介して 2 - G P I と内皮細胞の結合を促進する。実際、人工的な 2 - G P I 二量体は、抗体が存在しなくても内皮細胞膜と結合することができる。Luster et al., J. Biol. Chem. 281: 29863-29871。ヒト化型の 3 G 4 ( タルバシン ( Tarvacin )、バビツキシマブ ( Baviximab ) ) は癌およびウイルス疾病の治療のために臨床試験下にある。

40

【 0 0 1 0 】

Thorpeら ( W O 2 0 0 4 / 0 0 6 8 4 7 ) は、P S と競合し、P S との結合をめぐる抗体 3 G 4 と競合する抗体、そのフラグメントまたは免疫複合体を開示している。Thorpe

50

ら (US 6, 818, 213、US 6, 312, 294 および US 6, 783, 760) は、アミノリン脂質と結合し、治療薬が付着された治療用コンジュゲートを開示している。

【0011】

Baldoら (米国特許第 5, 061, 626 号) は、抗体作製のために用いられる血小板活性化因子 (PAF)、PAF 類似体に対する抗体ならびに PAF または PAF 類似体を用いるイムノアッセイを開示している。PAF は、グリセロールの C - 2 (sn2) 位が長鎖脂肪酸の代わりにアセチル基でエステル化されているコリンプラスマロゲンである。

【0012】

Vielhaberらは、セラミドに特異的であると思われる2つの抗体試薬(一方は、IgM 高密度ポリクローナルマウス血清、他方は、IgM モノクローナル抗体)の特徴を報告している。モノクローナルの方はスフィンゴミエリンに特異的であることが分かり、抗血清の方は種々のセラミド種とナノモル範囲で反応することが分かった。Vielhaber, G. et al., (2001) *Glycobiology* 11:451-457。また、セラミドに対する市販の抗体試薬がないことも挙げられ、Krishnamurthyらは最近、セラミドに対するウサギ IgG の生成を報告している(*J. Lipid Res.* (2007) 48:968-975)。

【0013】

B. リゾ脂質

リゾ脂質は、可能性のあるアシル化位置の一方または双方にアシル基が存在しないために、極性頭部基 (polar head group) と一本の炭化水素主鎖を含む低分子量脂質である。極性頭部基が sn - 3 にあるのに対し、炭化水素鎖は sn - 2 位および / または SN - 1 位に存在し得る(「リゾ」とは、もともと溶血と呼ばれており、IUPAC が脱アシル化を指すために再定義したものである)。“Nomenclature of Lipids, [www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/lip1n2.html](http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/lip1n2.html)” 参照。これらの脂質はシグナル伝達生物活性脂質を代表するものであり、それらの生物学および医学的重要性は、治療、診断 / 予後、または研究目的で脂質シグナル伝達分子を標的とすることにより何が達成できるかということを強調している(Gardell, et al. (2006), *Trends in Molecular Medicine*, vol 12: 65-75)。医学的に重要なリゾ脂質の2つの特定の例として、LPA (グリセロール主鎖) および S1P (スフィンゴイド主鎖) がある。他のリゾ脂質としては、スフィンゴシン、リゾホスファチジルコリン (LPC)、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)、セラミド、セラミド - 1 - リン酸、スフィンガニン (ジヒドロスフィンゴシン)、ジヒドロスフィンゴシン - 1 - リン酸および N - アセチル - セラミド - 1 - リン酸が含まれる。これに対し、C - 1 (sn1) に O - アルキル (- O - CH<sub>2</sub> - ) または O - アルケニルエーテルを、また、C - 2 にアシルを含むプラスマロゲンは、リゾ脂質属から除外される。

【0014】

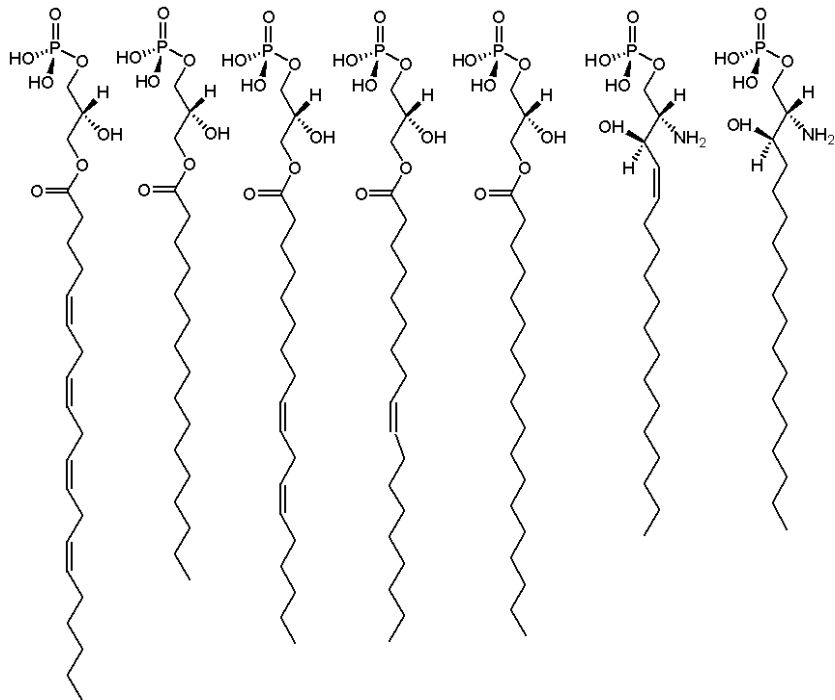
選択された LPA、S1P およびジヒドロ S1P の構造を以下に示す。

10

20

30

## 【化1】



LPA (20:4) LPA (16:0) LPA (18:2) LPA (18:1) LPA (18:0) S1P ジヒドロ-S1P

10

20

## 【0015】

LPAは単一の分子存在ではなく、長さおよび飽和度の異なる脂肪酸を含む内在的構造変異体の集合体である(Fujiwara, et al. (2005), J Biol Chem, vol. 280: 35038-35050)。LPAの構造主鎖はホスファチジルコリン(PC)またはホスファチジン酸(PA)などのグリセロールに基づくリン脂質に由来している。S1Pなどのリゾスフィンゴ脂質の場合、sn-2のセラミド主鎖の脂肪酸は存在しない。S1P、ジヒドロS1P(DHS1P)およびスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)の構造主鎖はスフィンゴシンに基づき、スフィンゴミエリンに由来している。

## 【0016】

LPAおよびS1Pは、同じクラスの複数のトランスメンブランドメインGタンパク質共役(GPCR)受容体と結合することにより種々の細胞シグナル伝達経路を調節する(Chun J, Rosen H (2006), Current Pharm Des, vol. 12: 161-171, およびMoolenaar, WH (1999), Experimental Cell Research, vol. 253: 230-238)。S1P受容体はS1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>3</sub>、S1P<sub>4</sub>およびS1P<sub>5</sub>(以前には、EDG-1、EDG-5/AGR16、EDG-3、EDG-6およびEDG-8)と呼ばれ、LPA受容体はLPA<sub>1</sub>、LPA<sub>2</sub>、LPA<sub>3</sub>(以前には、EDG-2、EDG-4およびEDG-7)と呼ばれている。このファミリーの4番目のLPA受容体がLPA(LPA<sub>4</sub>)として同定されており、これらのリゾリン脂質に対する他の推定受容体も報告されている。

## 【0017】

## C. リゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid)(LPA)

LPAは、真核細胞および原核細胞の双方でリン脂質の生合成の前駆体として知られているが、LPAは活性化細胞、特に血小板により急速に産生され、放出され、特定の細胞表面受容体に作用することにより標的細胞に影響を及ぼすシグナル伝達分子として最近になってはじめて明らかになってきた(例えば、Moolenaar, et al. (2004), BioEssays, vol. 26: 870-881, およびvan Leewen et al. (2003), Biochem Soc Trans, vol 31: 1209-1212)。小胞体において合成され、より複雑なリン脂質へと処理される他、LPAは細胞の活性化後、既存のリン脂質の加水分解により生成され得、例えば、SN-2位は一般に、脱アシル化のために脂肪酸残基を欠いており、脂肪酸へとエステル化されたsn-1ヒドロキシルだけが残る。さらに、LPAの産生における鍵酵素である自己毒素(リゾP

30

40

50

LD/NPP2)は、多くの腫瘍種が自己毒素をアップレギュレーションしていることから、癌遺伝子の産物であり得る(Brindley, D. (2004), J Cell Biochem, vol. 92: 900-12)。ヒト血漿および血清中のLPA濃度が、高感度かつ特異的LC/MS手順を用いてなされた測定値を含めて報告されている(Baker, et al. (2001), Anal Biochem, vol 292: 287-295)。例えば、新しく調製したヒト血清を25℃で1時間放置したものでは、LPA濃度はおよそ1.2 μMであると見積もられ、LPA類似体16:0、18:1、18:2および20:4が優勢種であった。同様に、新しく調製したヒト血漿を25℃で1時間放置したものでは、LPA濃度はおよそ0.7 μMであると見積もられ、18:1および18:2 LPAが優勢種であった。

#### 【0018】

LPAは、細胞増殖の誘導から、細胞移動の刺激および神経突起の退縮、ギャップ結合の閉塞、さらには粘菌の走化性に至るまで、広範囲の生物応答に影響を及ぼす(Goetzl, et al. (2002), Scientific World Journal, vol. 2: 324-338)。LPAの生物学についての知識体系は、ますます多くの細胞系がLPA応答性に関して試験されるにつれ増え続けている。例えば、現在、LPAは、細胞の成長および増殖を刺激する他、創傷修復および再生における重要な事象である細胞張力および細胞表面フィブロネクチン結合を促進することが知られている(Moolenaar, et al. (2004), BioEssays, vol. 26: 870-881)。最近、抗アポトーシス活性もLPAに帰され、ペルオキシソーム増殖受容体 がLPAの受容体/標的であることが最近報告されている(Simon, et al. (2005), J Biol Chem, vol. 280: 14656-14662)。

#### 【0019】

LPAは抗体産生のためには難しい標的であることが分かっているが、LPAに対するポリクローナルネズミ抗体の産生の科学文献において報告がある(Chen et al. (2000) Med Chem Lett, vol 10: 1691-3)。

#### 【0020】

#### D. スフィンゴシン - 1 - リン酸

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かうのか、アポトーシスから保護されるのかを決定するレオスタット機構となる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。

#### 【0021】

S1Pは、高レベルのSPHKを含み、S1P分解のための酵素を欠く血小板で豊富に生成され、貯蔵されている。血小板が活性化されると、S1Pが分泌される。さらに、例えば肥満細胞などの他の細胞種も、S1Pを分泌し得ると考えられている。ひと度、分泌されれば、S1Pは血清アルブミンおよびリポタンパク質などの担体タンパク質上に高濃度で結合されると考えられる。S1Pは、血漿中に高濃度で見られ、0.5~5 μMの範囲の濃度が報告されている。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)。

#### 【0022】

細胞表面S1P受容体の広範囲な発現により、S1Pは、増殖、接着、収縮、運動性、形態形成、分化および生存を含む広域の細胞応答に影響を及ぼすことが可能となる。この応答範囲は細胞および組織系内のS1P受容体の重複した、または異なる発現パターンに依存することが明らかである。さらに、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞

10

20

30

40

50

増殖因子 ( V E G F ) および繊維芽細胞増殖因子 ( b F G F ) を含む、S 1 P と増殖因子シグナル伝達経路の間のクロストークも最近報告されている ( 例えば、Baudhuin, et al. (2004), FASEB J, vol. 18: 341-3 )。S 1 P を含む種々の細胞プロセスの調節は、中でも、ニューロンのシグナル伝達、血管緊張、創傷治癒、免疫細胞輸送、生殖および心血管機能に特に影響を有する。これらの系内の S 1 P の内在レベルの変化は有害な影響を持ち、癌、心不全、感染性疾患および自己免疫疾患を含む数種の病的状態を誘発する。

#### 【 0 0 2 3 】

Sabbadini 博士により発明された癌治療のための最近の新しいアプローチには、単独で、またはアントラサイクリンなどの化学療法薬の投与を含む従来の抗癌処置と組み合わせ、S 1 P の生体利用可能なレベルを引き下げることを含む。この目的で、S 1 P に特異的な抗体の生成が記載されている。例えば、自己の米国特許出願第 1 0 / 8 2 0 , 5 8 2 号参照。このような抗体は、血清から S 1 P を選択的に吸収することができ、細胞外 S 1 P を中和するための分子スポンジとして働く。自己の米国特許第 6 , 8 8 1 , 5 4 6 号および同第 6 , 8 5 8 , 3 8 3 号および米国特許出願第 1 0 / 0 2 8 , 5 2 0 号、同第 1 0 / 0 2 9 , 3 7 2 号および同第 1 1 / 1 0 1 , 9 7 6 号も参照。また、S 1 P は脈管形成促進性であることも示されているので、この抗体の有効性に対する付加的利益は、血液供給の制限によって増殖中の腫瘍の栄養素および酸素を枯渇させるその能力である。

#### 【 0 0 2 4 】

この抗 S 1 P アプローチに関して特に独特なのは、S P H K などの、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抗癌戦略が提案されているが、脂質性メディエーター S 1 P それ自体は、大きくはこの脂質標的を直接弱めることが困難なために、特に、第一に、S 1 P などの脂質標的に対する抗体を生成すること、第二に、実際に S 1 P 標的に対して作製された抗体を検出することが困難なために、これまでは強調されて来なかった。すでに述べたように、他の脂質標的に向けられた治療および診断アプローチに関しても同様の難点が存在する。本発明は、特許性のある方法、特に生物活性脂質に対するモノクローナル抗体の生成を提供することにより、これら双方のジレンマに対する有効な解決法を提供する。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 2 5 】

### 3 . 定義

#### 【 0 0 2 6 】

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。これらの用語の他のものは、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。

#### 【 0 0 2 7 】

「抗 S 1 P 抗体」とは、S 1 P と結合するいずれの抗体または抗体由来分子も指す。

#### 【 0 0 2 8 】

「生物活性脂質」とは、脂質シグナル伝達分子を指す。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、移動、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 P C R または酵素または因子 ( 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、酵素などの細胞内成分、イオンチャネルまたはアクチンなどの構造要素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、L P A および S 1 P がある。

## 【 0 0 2 9 】

生物活性脂質の例としては、セラミド、セラミド - 1 - リン酸、スフィンゴシン、スフィンガニン、スフィンゴシルホスホリルコリン ( S P C ) およびスフィンゴシン - 1 - リン酸 ( S 1 P ) などのスフィンゴ脂質が含まれる。スフィンゴ脂質ならびにそれらの誘導体および代謝産物はスフィンゴイド主鎖 ( スフィンゴミエリンに由来する ) を特徴とする。スフィンゴ脂質ならびにそれらの誘導体および代謝産物は、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である。これらにはスルファチド、ガングリオシドおよびセレプロシドが含まれる。他の生物活性脂質は、グリセロールに基づく主鎖を特徴とし、例えば、リゾリン脂質 ( リゾホスファチジルコリン ( L P C ) および種々のリゾホスファチジン酸 ( L P A ) など )、ならびにホスファチジルイノシトール ( P I )、ホスファチジルエタノールアミン ( P E A )、ホスファチジン酸、血小板活性化因子 ( P A F )、カルジオリピン、ホスファチジルグリセロール ( P G ) およびジアシルグリセリド ( D G ) がある。さらに他の生物活性脂質として、アラキドン酸に由来するものがあり、これらにはエイコサノイド ( H E T E、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などのエイコサノイド代謝産物を含む )、非エイコサノイドカンナビノイドメディエーターが含まれる。リン脂質およびそれらの誘導体を含む他の生物活性脂質も本発明に従って使用可能である。

10

## 【 0 0 3 0 】

本発明のいくつかの実施形態では、スフィンゴシンに基づく生物活性脂質 ( スフィンゴシンおよび S 1 P などのスフィンゴイド主鎖を有するもの ) とは対照的に、酵素産生のためにグリセロールに基づく生物活性脂質 ( L P A などのグリセロールに基づく主鎖を有するもの ) を標的とすることが好ましいと考えられる。他の実施形態では、抗体生成のためにアラキドン酸由来の生物活性脂質を標的とすることが望ましく、他の実施形態では、スフィンゴイド由来の生物活性脂質ではなく、アラキドン酸由来およびグリセロール由来の生物活性脂質が好ましい。これらのアラキドン酸由来およびグリセロール由来の生物活性脂質と一緒に、本発明の文脈で、「非スフィンゴイド生物活性脂質」と呼ぶことがある。

20

## 【 0 0 3 1 】

本発明の生物活性脂質種から明らかに除外されるものは、主として細胞膜の内葉および / または外葉の構造材として機能するホスファチジルコリンおよびホスファチジルセリン、ならびにそれらの代謝産物および誘導体である。

30

## 【 0 0 3 2 】

「バイオマーカー」とは、それを疾病の進行または処置の効果を評価するために有用なものとする特定の分子的特徴を有する体内の特定の生化学物質である。例えば、S 1 P はある種の過剰増殖性症状および / または心血管症状のバイオマーカーである。

## 【 0 0 3 3 】

「担体」とは、ハプテンとコンジュゲートし、それによりハプテンを免疫原性とするのに適した部分を指す。代表的な、非限定クラスの担体はタンパク質であり、その例としては、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トキソイドが挙げられる。本発明に従って使用するのに好適な他のクラスの担体および例は当技術分野で公知である。これらだけでなく、後に発見または発明される天然または合成担体も、本発明の適用に好適であり得る。

40

## 【 0 0 3 4 】

「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、DNA 傷害薬および DNA 合成を阻害する薬剤：アントラサイクリン ( ドキソルピシン ( doxorubicin )、ドノルピシン ( donorubicin )、エピルピシン ( 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 )、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 )

50

)、ヘキサメチルメラミン(hexamethylmelamine)、イフォスファミド(ifosphamide)、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(mytomycin)、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)、ならびにトポイソメラーゼ阻害剤(カンプトサー(Camptosar))；カペシタビン(capecitabine)、クロ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、ara-CMP)、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-DFUR、ゲムシタビン(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)などの抗代謝産物；抗脈管形成剤(ベバシズマブ(bevacizumab)、サリドマイド(thalidomide)、サニチニブ(sunitinib)、レナリドミド(lenalidomide)、TNP-470、2-メトキシエストラジオール、ラニビズマブ(ranibizumab)、ソラフェニブ(sorafenib)、エルロチニブ(erlotinib)、ボルテゾミブ(bortezomib)、ペガプタニブ(pegaptanib)、エンドスタチン(endostatin))；血管障害剤(フラボノイド/フラボン、DMXAA、コンブレタスタチン誘導体(例えば、CA4DP、ZD6126、AVE8062Aなど)；抗体(ヘルセプチン(Herceptin)、アバスチン(Avastin)、パノレックス(Panorex)、リツキシリン(Rituxin)、ゼバリン(Zevalin)、マイロターグ(Mylotarg)、キャンパス(Campath)、ベキサール(Bexxar)、エルビタックス(Erbix))などの生物製品；内分泌療法：アロマターゼ阻害剤(4-ヒドロアンドロステンジオン(4-hydroandrostendione)、エキセメスタン(exemestane)、アミノグルテヒミド(aminoglutehimide)、アナストラゾール(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)；免疫調節剤：サイトカイン(IFN-およびIL2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；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(スベロイルアニリドヒドロキサム酸など)；イマチニブ(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；17-N-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシンなどの熱ショックタンパク質阻害剤；全てのトランスレチノイン酸などのレチノイド；増殖因子受容体または増殖因子自体の阻害剤；タキソイド(パクリタキセル(paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、タキソテル(taxotere)、BAY59-8862)、ナベルピン(navelbine)、ビンブラスチン(vinblastine)、ビנקリスチン(vincristine)、ビンデシン(vindesine)およびビノレルピン(vinorelbine)などの抗有糸分裂化合物および/またはチューブリン脱重合薬；COX阻害剤および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ーゼ阻害剤などの抗炎症薬が含まれる。

【0035】

「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と組合せた、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。2種類以上の化学的に異なる有効成分の投与という場合、これらの有効成分は同じ組成物の一部として、または異なる組成物として投与することができる。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違う時間に、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。

10

20

30

40

50

## 【0036】

「誘導体化生物活性脂質コンジュゲート」とは、担体と共有結合的にコンジュゲートされている誘導体化生物活性脂質を指す。担体はタンパク質分子であってもよいし、あるいはポリエチレングリコール、金コロイド、アジュバントまたはシリコンビーズなどの部分であってもよい。誘導体化生物活性脂質コンジュゲートは本発明に従って抗体応を生じするために免疫原として使用することができ、同じまたは異なる生物活性脂質コンジュゲートを、このようにして産生された抗体を検出するための検出試薬として使用することもできる。いくつかの実施形態では、誘導体化生物活性脂質コンジュゲートは、検出のために使用する場合、固体支持体に結合されている。

## 【0037】

「エピトープ」または「抗原決定基」とは、抗体に由来する抗体抗原結合部分と反応する抗原の部分を指す。

## 【0038】

「ハプテン」とは、非免疫原であるが、抗体または抗体に由来する抗原結合部分と反応することができる物質である。言い換えれば、ハプテンは抗原性の特性を有し、免疫原性の特性は持たない。

## 【0039】

「過剰増殖性障害」とは、限定されるものではないが、癌および良性腫瘍を生じる器官および組織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病および障害を指す。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病、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（すなわち、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瘢痕（すなわち、繊維症）、外科術または損傷の結果として通常起こるものなどの過剰な創傷治癒、ケロイド、ならびに繊維性腫瘍およびステント留置が含まれる。

## 【0040】

「免疫原」とは、免疫原が投与された動物において特異的免疫応答、特に抗体応答を誘導し得る分子である。本発明では、免疫原は担体とコンジュゲートされた誘導体化生物活性脂質、すなわち、「誘導体化生物活性脂質コンジュゲート」である。免疫原として用いる誘導体化生物活性脂質コンジュゲートは、免疫原に反応して生成される抗体の検出のための捕捉材料として使用することができる。よって、免疫原はまた検出試薬としても使用可能である。あるいは、捕捉材料として用いられる誘導体化生物活性脂質コンジュゲートは、免疫原におけるものとは異なるリンカーおよび/または担体部分を有し得る。

## 【0041】

生物学的現象に関して「阻害する」ことは、低下させる、抑制する、または遅延させることを意味する。例えば、「腫瘍形成の阻害」をもたらす処置は、腫瘍を全く形成しないこと、または非処置対照の場合よりもゆっくり形成する、もしくは数が少ないことを意味し得る。

## 【0042】

本発明に関して、「液体組成物」とは、製造者からエンドユーザー（例えば、医師または看護師）へ供給される充填済みの最終形態において、固体とは対照的に、液体または溶液であるものを指す。ここで、「固体」とは、液体または溶液でない組成物を指す。例えば、固体としては、リオフィライゼーション、凍結乾燥、沈殿および同様の手法によって調製された乾燥組成物が含まれる。

## 【0043】

「単剤療法」とは、一回量としての投与であれ、経時的に数回量の投与であれ、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。

## 【0044】

10

20

30

40

50

「新生物」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、侵襲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。侵襲性とは、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、リンパ系または血液循環系による腫瘍細胞の播種を指す。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移動を指す。転移の過程を通じた、腫瘍細胞の身体の他の部位への移動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。

【0045】

本発明の「特許性のある」組成物、方法、機械または製品とは、その対象が、分析が行わ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、新規性または非自明性などに関しては、その後の研究により、1以上のクレームが新規性、非自明性などを無効にするような1以上の実施形態を包含することが明らかになれば、「特許性のある」実施形態とに定義によって制限されるクレームは具体的にその非特許性の実施形態を排除する。また、本明細書に添付されるクレームは、最も広い合理的範囲を示すとともに、それらの有効性を保持するように解釈されるべきである。さらに、特許性に関する1以上の法定要件が補正される場合、または特許性に関する特定の法定要件が、本願が出願または特許として発行された時から1以上の補正クレームの有効性が疑問視されるまで満たされているかどうかを評価するためにその標準が変化する場合には、これらのクレームは、(1)それらの有効性を保持し、(2)その状況下で最も広い合理的解釈を与えるように解釈されるべきである。

【0046】

「医薬上許容される塩」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る。医薬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、医薬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。医薬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。

【0047】

「複数」とは、1を超えることを意味する。

【0048】

「分離された」、「精製された」、「単離された」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る、または取り出されている、あるいは1以上の他のサンプル成分の存在が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。

【0049】

本明細書において「種」とは、例えば、化学療法薬の特定種など、様々な文脈で用いられる。各文脈で、この用語は、特定の文脈で用いられる種類の化学的に区別されない分子集団を指す。

【0050】

「特異的に会合する (specifically associate)」および「特異的に結合する」などは、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。抗体はその標的抗原のエピトープと「結合する」または「相互作用する」(または同等に「に対して反応性がある」と言うことができる。抗体は当技術分野で一般に、抗体の抗原との結合に関して、それらの抗原「に対して

10

20

30

40

50

」または短く「に」と記載される。

【0051】

本明細書において「安定な」とは、2つの分子（例えば、ペプチドとTLR分子）が所望の目的または操作のために維持され得るのに十分安定である2分子間の相互作用を指す。例えば、ペプチドとTLR分子の間の「安定な」相互作用は、そのペプチドが、所望の効果を達成するのに十分な期間、TLR分子と結合し、かつ、結合を維持するものを指す。

【0052】

「対象」または「患者」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）などの動物が特に好ましい例である。

10

【0053】

「サロゲートマーカー」とは、病態に対する処置の効果を間接的に示す、体内の生物活性の検査指標を指す。過剰増殖性症状および/または心血管症状に関するサロゲートマーカーの例としては、SPHKおよび/またはS1PRが含まれる。

【0054】

「治療上有効な量」（または「有効量」とは、そのような処置を必要とする対象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、特定の癌に関連する1以上の遺伝子の発現の増強または低減、腫瘍負荷の低減、癌細胞の溶解、生体サンプル（例えば、生検、および全血、血漿、血清、尿などの体液のアリコート）における1以上の癌細胞死マーカーの検出、誘導型アポトーシスまたは他の細胞死経路の誘導などを含む、癌細胞の生存または代謝に関連する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。

20

30

【0055】

「処置」または「処置する」とは、疾病または障害に対する防止または保護（すなわち、臨床徴候の発症を引き起こさない）；疾病または障害の阻害（すなわち、臨床徴候の発症の阻止、遅延または抑制）；および/または疾病または障害の緩和（すなわち、臨床徴候の回復を生じる）を含む、疾病または障害の処置を意味する。当然のことながら、「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るか、または隠れているために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、「保護」には「予防」が含まれる。

40

【0056】

「治療計画」とは、化学療法薬および細胞傷害性薬剤、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、抗脈管形成療法、免疫療法、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病または障害の処置を意味する。

【0057】

発明の概要

本発明の目的は、動物、特に哺乳類、特にヒトにおいて疾病プロセスに関連、関与またはそうでなければ関連づけられている生物活性脂質と反応性がある特許性のある組成物ならびに抗体、特にモノクローナル抗体、およびその誘導体を作製する方法を提供すること

50

である。

【0058】

よって、本発明の一態様は、特許性のある生物活性脂質反応性抗体を生起するために使用可能な特許性のある免疫原を製造するために用いられる特許性のある中間体に関する。この特許性のある化合物種は、各々、極性頭部基と少なくとも1つの炭化水素鎖を有する生物活性脂質を含み、その炭化水素鎖内の炭素原子が、保護されていてもされていなくてもよいペンダント反応性基〔例えば、スルフヒドリル(チオール)基、カルボン酸基、シアノ基、エステル、ヒドロキシ基、アルケン、アルキン、酸塩化物基またはハロゲン原子〕で誘導体化されている、誘導体化生物活性脂質を含む。代表的な生物活性脂質としては、リゾ脂質、例えば、スフィンゴ脂質およびスフィンゴ脂質代謝産物、例えば、セラミド、セラミド-1-リン酸、N-アセチル-セラミド-1-リン酸、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)、スフィンゴシン、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)、ジヒドロスフィンゴシンおよびジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸が含まれる。他の生物活性脂質としては、リゾホスファチジン酸(LPA)などのリゾ脂質、ならびにリゾホスファチジルイノシトール(LPI)またはリゾホスファチジルコリン(LPC)などのリゾホスファチジン酸代謝産物または前駆体が含まれる。LPAに関して、反応性基の位置の例としては、炭化水素鎖内の炭素原子またはリゾホスファチジン酸部分のグリセロール主鎖のSN-1位への反応性基の付加が含まれる。特に好ましい誘導体化生物活性脂質としては、LPAおよびS1Pのスルフヒドリル誘導体が含まれる。

10

【0059】

本発明の関連の態様は、本発明の誘導体化生物活性脂質から産生される免疫原に関する。一般に、このような免疫原は、担体に共有結合されている誘導体化生物活性脂質を含む。好適な担体部分の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)およびアルブミンなどの担体タンパク質、ポリエチレングリコール、金コロイド、アジュバントまたはシリコーンビーズが挙げられる。本発明の免疫原の好ましい実施形態としては、KLHまたはアルブミンに共有結合されているLPAのスルフヒドリル誘導体が含まれる。スフィンゴ脂質に基づく免疫原の例としては、好ましい免疫原実施例としては、KLHまたはアルブミンに共有結合されているS1Pのスルフヒドリル誘導体が含まれる。

20

【0060】

本発明の免疫原は、誘導体化生物活性脂質と担体部分を、その担体と生物活性脂質の間の共有結合がペンダント反応性基を介して生じ、特定種の生物活性脂質-担体免疫原を産生することを可能とする条件下で反応させることにより製造される。次に、このような免疫原を好ましくは単離または精製した後、所望の免疫原の1回または数回の投与(典型的には注射による)を含み得る免疫化手順の一部として宿主動物に投与する。この態様の好ましい実施形態において、誘導体化生物活性脂質のペンダント反応性基は好適な保護基で保護され、これは担体と生物活性脂質を共有結合させるのに用いられる化学法の前または化学法の一部として除去され、この誘導体化生物活性脂質は「脱保護」される。

30

【0061】

上述のように、本発明の別の態様は、生物活性脂質に対して反応性があるモノクローナル抗体を作製する方法に関する。このような方法では、免疫適格宿主動物(例えば、マウス、ラット、モルモットまたはウサギなどの齧歯類)を本明細書に記載の生物活性脂質免疫原で免疫化する。免疫化の後、この宿主はその生物活性脂質に対する抗体応答を生じ、その結果、その免疫原中に存在する特定の生物活性脂質に反応性がある抗体を産生する。生じる抗体はポリクローナルであってもよいが、好ましくは、モノクローナルである。モノクローナル抗体に関しては、所望の抗体を産生する細胞系統を好ましくはクローニングし、所望の脂質特異的抗体を所望の量で産生させるように不死化する。好ましい実施形態では、所望のモノクローナル抗体、例えば、LPAに対して反応性があるモノクローナル抗体を用いて、キメラまたはヒト化抗体または抗体フラグメントなどの抗体誘導体を作製する。いくつかの実施形態では、完全ヒト化抗体は、適格ヒト系のいくつか、または全てを含むように操作された動物、例えば、マウスまたはラットを免疫化することにより、作

40

50

製することができる。

【0062】

脂質は一般に、抗体産生に特に従いにくい分子種であることが知られている。本発明の一面は、この問題が、少なくとも一部には、特定の標的脂質種に対して反応性がある抗体を検出することが困難であることにあるという認識の上にある。しかしながら、この問題は、リゾ脂質またはスフィンゴ脂質またはスフィンゴ脂質代謝産物などの特定の標的生物活性脂質の誘導体化形態を用いることで精緻に克服することができる。

【0063】

ある好ましい実施形態では、このような誘導体化生物活性脂質は、検出される抗体を製するために用いた免疫原中に存在する特定の生物活性脂質のエピトープに対して反応性がある抗体を同定するために使用可能である。この役割を果たすため、特定の誘導体化生物活性脂質または誘導体化生物活性脂質コンジュゲートを固体支持体、好ましくは、ELISAプレート、Biacoreチップなどのアッセイデバイスの固相に結合させることができる。固体支持体に結合させることで、抗体の結合および検出中に生物活性脂質が洗い流される可能性が最小となる。

10

【0064】

本発明の別の態様は、担体と、本発明の単離された免疫により誘導される物質、例えば、モノクローナル抗体もしくは抗体フラグメント、変異体または誘導体とを含む医薬組成物または獣医薬組成物に関する。好ましい担体としては、特に、その組成物がヒトにおける治療的使用を意図する場合には、医薬上許容されるものが含まれる。非ヒト治療適用（例えば、同伴動物、家畜、魚類または家禽類の処置）では、獣医学用に許容される担体を使用することができる。

20

【0065】

本発明の関連の態様は、防止または予防的処置および投与を含む、使用または処置方法に関する。このような方法は一般に、治療的処置または予防的処理を必要とする対象（例えば、哺乳類、特にヒト患者）に、所望の処置を達成するのに有効な量の、生物活性脂質標的に対して反応性がある免疫により誘導される物質（immune-derived moiety）を投与することを含む。いくつかの実施形態では、生物活性脂質標的は非スフィンゴイド生物活性脂質である。治療上有用な免疫により誘導される物質の1つの好ましい例は、LPAなどのリゾ脂質に対して反応性があるヒト化モノクローナル抗体である。好ましくは治療組成物の一部としての、本発明の免疫により誘導される物質の投与経路は、局所的処置が望まれるか、全身処置が望まれるかによって、また、処置される領域によって異なる。投与は局所（経皮、眼内および粘膜（腔、子宮内および直腸送達）、肺送達、気管内、鼻腔内および上皮送達）、経口または非経口であり得る。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または注入；または頭蓋内、例えばくも膜下腔内または心室内投与が含まれる。

30

【0066】

本発明の他の態様は、種々の診断、予後および/または研究を可能とする方法に関する。このような態様の1つは、動物由来または抗体ライブラリー由来の体液または組織サンプル中の、天然生物活性脂質に対する自己抗体の存在を検出するための誘導体化脂質類似体の使用を含む。別のこのような態様は、スフィンゴ脂質またはその代謝産物以外の標的生物活性脂質を検出する方法に関する。一般に、このような方法は、免疫により誘導される物質とそれが反応性を持つ標的生物活性脂質の結合を含む。結合の検出は、例えば、標的生物活性脂質を含むことが分かっている、または含むことが疑われるサンプル（例えば、生検、または体液もしくは液体サンプル、例えば、血液、血清、血漿、尿、唾液、涙、脳脊髄液、細胞培養液など）を免疫により誘導される物質に、その免疫により誘導される物質と、もしサンプル中に存在すれば、標的生物活性脂質の結合を可能とする条件下で曝すことにより果たすことができる。

40

【0067】

このような診断方法を行うためには試薬が必要であり、本発明の誘導体化脂質を用いた

50

診断試薬は本発明の別の態様に相当する。このような試薬が得られれば、このような試薬を用いた診断アッセイが作製され得る。

【0068】

本発明のこれら、また、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。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】本発明の免疫原の鍵成分、ならびにELISAおよびBiaCoreアッセイのレイダウン材料(laydown material)の鍵成分として使用された典型的なチオール化S1P類似体を製造するための有機合成スキーム。

10

【図2】図3のチオール化LPA類似体の合成に用いるチオール化脂肪酸を製造するための有機合成スキーム。

【図3】本発明の免疫原の鍵成分、ならびにELISAおよびその他のアッセイのレイダウン材料の鍵成分であるチオール化LPA類似体を製造するための有機合成スキーム。

【図4】抗S1P mAbはS1Pに特異的であり、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。パネルA プレート上での、S1P、SPH、LPA、SPCおよびmAb結合をめぐってS1Pと競合する他の構造的に類似する生体脂質を用いた競合的ELISA。遊離型のS1PまたはDH-S1Pだけが結合に関して競合し、このことは抗S1P mAbの特異性を証明する。SPCはわずかだけ結合に関して競合する。パネルB 特異性の評価に用いた生物活性脂質の構造。

20

【図5】抗S1P mAbと、Biacoreマレイミド表面CM5センサーチップにつなぎ止められたチオ-S1Pとの結合速度のBiacore分析。センサーグラムを作製するために、種々の希釈率の抗S1P mAbをフローセルに適用した。

【図6】ネズミSphingomab(商標)のマウスV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列。CDR残基が四角で囲まれている。

【図7】ネズミSphingomab(商標)のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列。

【図8】ネズミSphingomab(商標)およびネズミSphingomab(商標)に由来するキメラS1P-結合抗体の結合研究のELISA結果を示すグラフ。

【図9】実施例6に記載のように、チオール化S1P類似体でコーティングされたELISAプレートへのネズミおよびキメラmAbの結合を示す直接的ELISA。データは、キメラmAb(c-S1P IgG)は、完全ネズミmAb(m-S1P IgG)に比べて、高くはないにしても同等の結合性能を有していることを示す。

30

【0070】

当業者ならば分かるであろうが、以下の記載は本発明のある特定の好ましい実施形態を詳細に記載し、従って、単に代表例であって、本発明の実際の範囲を表すものではない。本発明を詳細に記載する前に、記載されている特定の分子、系および方法論は変更可能であるので、本発明はこれらに限定されるものではないと理解される。また、本明細書で用いる用語は単に特定の実施形態を記載するためのものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものではないと理解される。

40

【0071】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトおよび/または動物の疾病において、シグナル伝達分子としての役割を果たす生物活性脂質分子に対する抗体を作製および同定する組成物および方法に関する。本発明はまた、これらの抗体自体、ならびにそれらの治療的、診断的および研究試薬としての使用方法に関する。

【0072】

1. 抗体を産生および同定するための方法

脂質は一般に、抗体産生に特に従いにくい分子種であることを知られている。抗体産生は一般に動物において所望の抗体応答を生じる好適な免疫原が準備されなければならない

50

ことと、生じた抗体（存在する場合）が検出可能でなければならないことの2つに分かれたプロセスとして表すことができる。

【0073】

上述のように、有効な抗体産生には抗体生成と抗体検出の双方が必要である。以下の実施例に開示されるように、特定の生物活性脂質に対する抗体の生成は、誘導体化生物活性脂質を免疫原として用いて達成された。これらの実施例では、チオール化生物活性脂質（例えばS1P）類似体がキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と、または脂肪酸不含ウシ血清アルブミン（BSA）と、製造者が推奨するプロトコルを用い、SMCC（Pierce, Rockford IL）によってコンジュゲートされた。SMCC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機能性架橋剤であり、好ましい架橋剤に相当する。また、マレイミド活性化タンパク質には、ヨードアセトアミド（IOA）も使用可能である。

10

【0074】

しかしながら、当技術分野で公知の他の免疫原および抗体作製法を使用することもできる。例えば、リン脂質種に対する抗体が、リポソームを用いた免疫化(Maneta-Peyret et al., 1988, 1989; Benerji and Alving, 1990)または単量体リン脂質の、タンパク質への吸着(Tamura et al., 1971; Maneta-Peyret et al., 1989)、細菌への吸着(Umeda et al., 1989)、アクリルアミドへの吸着(Maneta-Peyret et al., 1988, 1989)および金への吸着[Tomii et al., (1991) Jpn J. Med Sci. Biol. 44:75-80]によって作製されている。多くの場合、生物活性脂質の、エマルションまたはリポソーム複合体としての提供は、IgGに比べて特異性、感受性および/または生物活性の限定されたIgMをもたらした。例えば、セラミドに特異的であると思われる2つの市販の試薬（一方は、IgM富化ポリクローナルマウス血清、他方は、IgMモノクローナル抗体）が同定されている。モノクローナルの方はスフィンゴミエリンに対して特異的であることが分かり、抗血清の方は種々のセラミド種とナノモル範囲で反応することが分かった。Vielhaber, G. et al., (2001) Glycobiology 11:451-457。これとは異なるアプローチで、Ran et al. [(2005) Clin. Cancer Res. 11:1551-1562]は、過酸化剤で処理した（細胞の内面に陰イオン性リン脂質の輸送を生じさせることを意図する）b. End 3 内皮細胞を免疫原として用いて、陰イオン性リン脂質に特異的な抗体の生成を惹起した。このように、所望の抗原性標的に対する抗体応答を惹起させ得る多くの方法が知られており、得られる抗体が検出可能であり、かつ、所望の生物活性脂質と反応性があることが示される限り、これらのうちのいずれを本発明で用いてもよい。

20

30

【0075】

抗体の生成は、もちろん必要であるが、抗体が検出できなければ十分ではない。よって、本発明の一面は、生物活性脂質に対する抗体を産生するための他のこれまでの不都合が少なくとも検出工程における欠点に帰することができるという認識の上にある。この検出の問題は、以下の実施例で、誘導体化生物活性脂質を用いることで精緻に克服することができる。誘導体化生物活性脂質は、検出される抗体を作製するために用いた免疫原中に存在する特定の生物活性脂質のエピトープに対して反応性がある抗体を検出および同定するために使用され、検出のために誘導体化形態で用いられる生物活性脂質は、抗体が作製されたものと同じエピトープを含む。この役割を果たすため、誘導体化脂質を、ELISAプレート、Biacoreチップなどのアッセイデバイスの固相に結合させることができる。いくつかの実施形態では、誘導体化生物活性脂質は固体支持体に直接、共有結合的にコンジュゲートされる。例としては、誘導体化脂質を、以下の実施例に記載されるように、活性化Biacoreチップに共有結合的にコンジュゲートさせることができる。他の実施形態では、誘導体化生物活性脂質は、担体部分に共有結合的にコンジュゲートされ、「誘導体化生物活性脂質コンジュゲート」とし、次にこれを固体支持体に結合させる。一例として、以下の実施例に記載されるように、BSAに共有結合的にコンジュゲートされた誘導体化脂質はELISA用のレイダウン材料（捕捉材料）として用いられる。いずれかの実施形態で、誘導体化生物活性脂質と固体支持体との結合は、いくつかの検出法のリス

40

50

クと同様に、洗い流されにくい安定な検出手段を提供する。抗体の検出は、種々の方法で達成することができる。本発明の好ましい実施形態では、検出はE L I S A、B i a c o r e (商標) 標識不含相互作用分析、または誘導体化生物活性脂質が固体支持体に結合される、他の固相に基づく慣例の検出手段による。他の固体支持体の例としては、限定されるものではないが、アフィニティカラム、ガラスまたは合成ビーズ、マルチウェルプレートなどが挙げられる。

#### 【0076】

検出工程で用いられる誘導体化生物活性脂質コンジュゲートは、免疫原として用いるものと同じ誘導体化生物活性脂質コンジュゲートであってもよいし、あるいは誘導体化生物活性脂質を、免疫原として用いるコンジュゲートのものとは異なる担体とコンジュゲート 10  
させてもよい。いくつかの実施形態では、例えば、E L I S A用のレイダウンとして、検出工程では、交差反応性を最小にするために、免疫原として用いるものとは異なる誘導体化生物活性脂質コンジュゲートを使用することが好ましい。例としては、この担体はB S A (特に検出工程では好ましくは脂肪酸不含)、K L Hまたは当技術分野で公知の他の担体であり得る。誘導体化生物活性脂質とタンパク質担体をコンジュゲートさせるのに用いる架橋剤は、例えば、S M C CまたはI O Aであり得る。1つの好ましい実施形態では、免疫原はS 1 P - I O A - K L Hであり、S 1 P - S M C C - B S A (脂肪酸不含B S A) がE L I S Aの捕捉レイダウン材料であり、ここで、S 1 Pとは、架橋剤(この場合、I O AまたはS M C C)と反応して、タンパク質担体(この場合、K L HまたはB S A) 20  
との共有結合を形成する誘導体化S 1 Pを指す。

#### 【0077】

### 2. 化合物

「抗体」(「A b」)または「免疫グロブリン」(I g)とは、抗原またはエピトープと結合し得る免疫グロブリン遺伝子に由来する、またはその後のモデリングされた、またはそれによって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その断片を指す。例えば、Immunobiology, Fifth Edition, C. A. Janeway, P. Travers, M., Walpo 30  
rt, M.J. Shlomchik ed. Garland Publishing (2001)参照。抗体分子または免疫グロブリンは、通常、2つの異なる種のポリペプチド鎖からなる、分子量およそ150 k D a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」(H)鎖と呼ばれ、およそ50 k D aである。他方のポリペプチドは「軽」(L)鎖と呼ばれおよそ25 k D a 30  
である。各免疫グロブリン分子は通常、2本の重鎖と2本の軽鎖からなっている。この2本の重鎖はジスルフィド結合により互いに連結され、その数は異なる免疫グロブリンイソ型間では異なっている。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に連結されている。ある天然抗体分子では、2本の重鎖と2本の軽鎖は同一であって、2つの同じ抗原結合部位持っており、従って、二価である、すなわち、2つの同じ分子と同時に結合する能力を持っていると言える。

#### 【0078】

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( )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 40  
 / 比は、マウスでは20 : 1、ヒトでは2 : 1、ウシでは1 : 20である。

#### 【0079】

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(I g M)、免疫グロブリンG(I g G)、免疫グロブリンA(I g A)および免疫グロブリンE(I g E)である。I g Gは最も多いイソ型であり、数種のサブクラス(ヒトでは、I g G 1、2、3および4)を有する。F c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。 50

## 【0080】

本明細書において「抗体フラグメント」およびその文法的変形は、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、CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>およびCH<sub>4</sub>）を欠いていてもよい。あるいは、定常重鎖ドメイン（例えば、CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>およびCH<sub>4</sub>）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')<sub>2</sub>、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（CH<sub>1</sub>）も含む。

10

## 【0081】

「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）。

20

## 【0082】

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）。

30

## 【0083】

「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。

40

## 【0084】

「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、CH<sub>1</sub>ドメイン、CH<sub>2</sub>ドメイン、CH<sub>3</sub>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。

50

## 【0085】

「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(P E G)、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。

10

## 【0086】

「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。

## 【0087】

「モノクローナル抗体」(m A b)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D N A法によって作製することができる。

20

## 【0088】

「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))。

30

## 【0089】

「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(C D R)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C D R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C D R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F R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(F c)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; Neube

40

50

rger, et al., WO 86 / 0 1 5 3 3 ; Neuberger, et al., 欧州特許第 0 , 1 9 4 , 2 7 6 B 1 号 ; Winter, 米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ; Winter, 欧州特許第 0 , 2 3 9 , 4 0 0 B 1 号 ; Padlan, et al., 欧州特許出願第 0 , 5 1 9 , 5 9 6 A 1 号 ; Queen, et al. (1989), Proc. Nat ' l Acad. Sci. USA, vol. 86:10029-10033参照。

【 0 0 9 0 】

「完全ヒト」抗体とは、免疫原とともに提供された際に、必ずしもCDRグラフトを必要としないヒト抗体を産生し得る遺伝的に操作された(すなわち、トランスジェニック)マウス(例えば、Medarexから)で産生された抗体を指し得る。これらの抗体は、非ヒト抗体遺伝子が抑制され、ヒト抗体遺伝子発現と置換されているマウスなどの動物に由来する完全ヒト型(100%ヒトタンパク質配列)である。出願者らは、これらの遺伝的に操作されたマウスまたは関連のCDRのヒトフレームワークを生成し得る他の動物に提供された際に生物活性脂質に対して抗体が生成され得ると考えている。

10

【 0 0 9 1 】

「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る。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。

20

【 0 0 9 2 】

「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。

30

【 0 0 9 3 】

「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。

【 0 0 9 4 】

「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。

40

【 0 0 9 5 】

「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

50

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。

【0096】

「ベクター」または「プラスミド」または「発現ベクター」とは、1以上の組換え遺伝子の発現を果たすために細胞内で一時的または安定的に維持可能な核酸を指す。ベクターは単独、または他の化合物と複合体を形成した核酸を含み得る。ベクターは所望により、ウイルスまたは細菌核酸および/またはタンパク質、および/または膜を含み得る。ベクターは、限定されるものではないが、DNA断片を結合させ、複製可能となるレプリコン（例えば、RNAレプリコン、バクテリオファージ）を含む。よって、ベクターは、限定されるものではないが、RNA、自律的自己複製環状または直鎖DNAまたはRNAを含み、発現プラスミドおよび非発現プラスミドの双方を含む。「プラスミド」は、商業的に入手可能であり、制限無く、公的に入手可能であるか、または公開されているプロトコールで報告されているように入手可能なプラスミドから構築することができる。さらに、発現ベクターはまた、真核細胞培養ではジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性など、あるいは大腸菌(*E. coli*)ではテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性など、形質転換宿主細胞の選択のための表現型形質を提供するための遺伝子も含み得る。

10

【0097】

「プロモーター」は、細胞内でコード配列の転写を駆動し得る全ての配列を含む。よって、本発明の構築物用いるプロモーターは、遺伝子シス転写の時期および/または速度の調節または変調に関与する作用転写制御エレメントおよび調節配列を含む。例えば、プロモーターは、転写調節に関与する、エンハンサー、プロモーター、転写ターミネーター、複製起点、染色体組込み配列、5'および3'非翻訳領域、またはイントロン配列を含む、シス作用転写制御エレメントであり得る。本発明での使用に好適な転写調節領域としては、限定されるものではないが、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期エンハンサー/プロモーター、SV40初期エンハンサー/プロモーター、大腸菌*lac*または*trp*プロモーター、および原核生物のまたは真核細胞またはそれらのウイルスにおいて遺伝子発現を制御することが知られている他のプロモーターが含まれる。

20

【0098】

#### A. スフィンゴ脂質に対する抗体

本発明は、スフィンゴ脂質を含む、特定の生物活性脂質に対して抗体を作製する方法を提供する。「スフィンゴ脂質」とは、<http://www.lipidmaps.org>によって定義されているようなスフィンゴ脂質を指し、次のものが含まれる：スフィンゴイド塩基[スフィンゴ-4-エニン(スフィンゴシン)、スフィンガニン、4-ヒドロキシスフィンガニン(フィトスフィンゴシン)、スフィンゴイド塩基ホモログおよび変異体、スフィンゴイド塩基1-リン酸、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；N-メチル化スフィンゴイド塩基およびスフィンゴイド塩基類似体を含む]；セラミド[N-アシルスフィンゴシン(セラミド)、N-アシルスフィンガニン(ジヒドロセラミド)、N-アシル-4-ヒドロキシスフィンガニン(フィトセラミド)、アシルセラミドおよびセラミド1-リン酸を含む]；ホスホスフィンゴ脂質[セラミドホスホコリン(スフィンゴミエリン)、セラミドホスホエタノールアミンおよびセラミドホスホイノシトールを含む]；ホスホスフィンゴ脂質；中性グリコスフィンゴ脂質[単純Glc系(GlcCer、LacCerなど、GalNAc b1-3Gal a1-4Gal b1-4Glc-(Globos系)、GalNAc b1-4Gal b1-4Glc-(Ganglio系)、Gal b1-3GlcNAc b1-3Gal b1-4Glc-(Lacto系)、Gal b1-4GlcNAc b1-3Gal b1-4Glc-(Neolacto系)、GalNAc b1-3Gal a1-3Gal b1-4Glc-(Isoglobo系)、GlcNAc b1-2Man a1-3Man b1-4Glc-(Mollu系)、GalNAc b1-4GlcNAc b1-3Man b1-4Glc-(Arthro系)、Gal-(Gala系)または他の中性グリコスフィンゴ脂質を含む]；酸性グリコスフィンゴ脂質[ガングリオシド、スルホグリコスフィンゴ脂質(スルファチド)、グルクロンスフィンゴ脂質、ホス

30

40

50

ホグリコスフィンゴ脂質および他の酸性グリコスフィンゴ脂質；塩基性グリコスフィンゴ脂質；両性グリコスフィンゴ脂質；砒素スフィンゴ脂質および他のスフィンゴ脂質。

【0099】

抗スフィンゴ脂質抗体は、以下にさらに詳細に記載されるように、過剰増殖性障害および心血管または脳血管疾患および障害などの障害の処置または予防に有用である。特定の実施形態では、本発明は、S1PおよびS1Pそれ自体を含むその変異体{スフィンゴシン-1-リン酸[スフィンゲン-1-リン酸；D-エリスロ-スフィンゴシン-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}(CAS 26993-30-6)として定義}、またはDHS1P{ジヒドロスフィンゴシン-1-リン酸[スフィンガニン-1-リン酸；[(2S, 3R)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-オクタデクオキシ]ホスホン酸；D-エリスロ-ジヒドロ-D-スフィンゴシン-1-リン酸}(CAS 19794-97-9)として定義}に対する抗体を作製する方法に向けられる。また、SPC{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-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(CAS 10216-23-6)]として定義}に対する抗体も有用であり得る。

10

20

【0100】

1. 精製抗S1Pモノクローナル抗体

特異的モノクローナル抗S1P抗体(抗S1P mAb)を記載する。この抗体はS1Pを選択的に吸収し、それによりこの脈管形成促進、繊維形成促進性および腫瘍促進性の因子の有効in vivo細胞外濃度を低下させるための治療用分子スポンジとして使用することができる。この結果、腫瘍体積および転移能の低下、ならびに、そうでなければ成長中の腫瘍に供給が可能な新血管形成の同時遮断をもたらす得る。この抗体(および同等の活性を有する分子)はまた、例えば、加齢性黄斑変性ならびに多くの癌で見られるような望ましくない内皮細胞の増殖を含む、S1Pにより影響を受ける他の過剰増殖性障害を処置するためにも使用可能である。さらに、このS1Pの、アポトーシスから細胞を保護する能力は、標準的なアポトーシス誘導化学療法薬の効力の増強をもたらす抗体などの薬剤によって回復させることができる。

30

【0101】

B. 他の生物活性シグナル伝達脂質に対する抗体

本明細書に記載の方法は、スフィンゴ脂質の範囲を超えた多くのさらなる細胞外および細胞内生物活性脂質(例えば、SPC、セラミド、スフィンゴシン、スフィンガニン、S1Pおよびジヒドロ-S1P)に対するモノクローナル抗体を作製するために使用することができる。他の生物活性脂質クラスとしては、ロイコトリエン、エイコサノイド、エイコサノイド代謝産物(HEETE、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など)、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體(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)、カルジオリピン、およびリゾリン脂質(リゾホスファチジルコリン(LPC)およびリゾホスファチジン酸(LPA)など)が含まれる。要するに、本発明は、重要な細胞プロセスに対して多面発現作用を有する所望の細胞外および/または細胞内シグナル伝達生物活性脂質のいずれに適用するためにも適合させることができる。生物活性脂質の他の例としては、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルエタノールアミン(PEA)、ジアシルグリセリド(DG)、スルファチド、ガングリオシド、グロボシドおよびセレブロシドが含まれる。

40

【0102】

C. コンジュゲート

50

## 【0103】

本明細書に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントはin vitroにおいて単独で使用することもできるし、あるいは非誘導体化または非コンジュゲート形態を対象に投与することもできる。他の実施形態では、このような抗体、誘導体および変異体は誘導体化することもできるし、または1以上の分子存在と結合させることができる。他の分子存在としては、天然、組換えまたは合成ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質、非ペプチド性化学化合物、例えば、同位体、小分子治療薬などが含まれる。好ましい小分子としては、放射性標識、蛍光薬剤および小分子化学療法薬が含まれる。好ましいタンパク質としては、増殖因子、サイトカインおよび抗体（同一の抗体およびそのような抗体の誘導体または変異体を含む）が含まれる。これらの有効成分は、他の因子の中でも有効成分および意図する適用を考慮し、好適ないずれかの方法によって連結することができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合または他の好適なアプローチによって他の分子と機能的に連結させることができる。

10

## 【0104】

よって、本発明は、本発明の1以上のモノクローナル抗体またはその変異体もしくは誘導体と他の有効成分との間で形成されるコンジュゲートを意図する。このようなコンジュゲートは共有結合性であっても非共有結合性であってもよく、リンカーを介して、または有効成分間で直接的に生じるものでもよい。このようなコンジュゲートの例としては、本発明の1以上のモノクローナル抗体（またはその抗原結合ドメイン）が、同じまたは異なるクラスの別の治療用モノクローナル抗体と連結されたものを含む。あるいは、本発明のモノクローナル抗体または抗体誘導体もしくは変異体は、例えば、小分子化学療法薬または放射性同位元素などの違うクラスの治療薬と連結させることもできる。いくつかの実施形態では、2種類以上の異なる治療薬（そのうち少なくとも1つは本発明の化合物である）の各々1以上が多価スキャフォールドによって連結させることができる。

20

## 【0105】

コンジュゲートの代わりに、本発明のモノクローナル抗体または抗体誘導体もしくは変異体を1以上の異なる治療薬と単純に結合させることもできる。一例として、本発明のモノクローナル抗体は、例えばリポソーム、ミセル、ナノ粒子など、対象に投与するのに好適な送達ビヒクル中に、1以上の他種治療薬と組み合わせることができる。

30

## 【0106】

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体または抗体誘導体もしくは変異体、例えば特定の標的生物活性脂質に対して反応性がある1以上のCDRをタンパク質またはポリペプチドとコンジュゲートさせることを意図する。一例として、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変領域に由来する1以上のCDRをモノクローナル抗体にグラフトすることができる。

## 【0107】

## 3. 適用

本発明は、癌、繊維症および脈管形成などの過剰増殖性障害、ならびに心血管疾患、心疾患および他の疾患、障害または身体傷害、および/または脳血管疾患および障害を処置または予防するための組成物および方法に向けられ、そこで、治療薬は、望ましくない、有毒なおよび/または生物活性のある脂質、またはその前駆体もしくは代謝産物の活性または濃度が変化した患者へ投与される。本発明の治療方法および組成物は、ある特定の望ましくないまたは有毒な脂質の吸収、相対的および/または利用濃度および/または活性を変化させることにより作用する。ここで、「有毒」とは、例えばシグナル伝達分子としてなど、疾病プロセスにおける特定の脂質の関与を指す。

40

## 【0108】

特定の理論に縛られるものではないが、LPAなどの脂質および/またはそれらの代謝産物の不適切な濃度は、心疾患、神経因性疼痛、癌、脈管形成、炎症および脳血管疾患（脳卒中様内耳障害を含む）を含む種々の疾病および障害を引き起こす、またはその発症に

50

寄与すると考えられている（例えば、Scherer, et al. (2006), Cardiovascular Research, vol. 70; 79-87参照）。本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L P Aの有効in vivo濃度を低下させることにより、これらの疾病および障害を処置するために使用可能である。本発明に従って処置され得るいくつかの疾病種を以下に記載する。

#### 【0109】

A. 過剰増殖性疾患および障害

##### i. 癌

1つの癌療法は、単独で、またはアントラサイクリンなどの化学療法薬の投与を含む従来の抗癌処置と組み合わせて、腫瘍プロモーターS 1 Pのレベルを低下させることである。この目的で、S 1 Pに特異的であり、血清からS 1 Pを選択的に吸収し、細胞外S 1 Pを中和するための分子スポンジとして働き得るモノクローナル抗体(m A b)を開発した。S 1 Pは脈管形成促進性であることが示されているので、増殖中の腫瘍の血液供給を断つ抗体の能力から、抗体の有効性に対して付加利益を引き出すことができる。よって、別のスフィンゴ脂質に基づく抗新生物戦略は、C E RおよびS P H産生の既知のアクチベーター(ドキシソルピシンおよび関連のアントラサイクリングリコシド、放射線療法など)を、S 1 Pレベルを低下させる戦略と組み合わせることを含む。

#### 【0110】

S P H Kなどの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抗癌戦略が提案されているが、S 1 P自体は、主としてこの標的および関連の標的を攻撃することが困難であるために強調されて来なかった。本明細書に記載されているように、生理学的範囲でS 1 Pを認識し、分子組合せによってS 1 Pを中和することができる、S 1 Pに特異的に高いモノクローナル抗体が作製された。この抗体(およびその誘導体)の使用は増殖中の腫瘍細胞から重要な増殖因子および生存因子を取り上げる。さらに、このような抗体に基づく癌療法の使用はまた、外科術、放射線療法および/または細胞傷害性抗癌薬の投与などの従来の癌治療と組み合わせた場合にも有効であり得る。細胞傷害性薬剤の例としては、例えば、アントラサイクリン系の薬剤、ピンカアルカロイド、マイトマイシン、プレオマイシン、細胞傷害性ヌクレオシド、タキサン、エポチロン、ディスコデルモリド(discodermolide)、プテリジン系の薬剤、ダイネン(diyne)およびポドフィロトキシン(podophyllotoxin)が挙げられる。これらのクラスのメンバーとしては、例えば、ドキシソルピシン(doxorubicin)、カルミノマイシン(carminomycin)、ダウノルピシン(daunorubicin)、アミノプテリン(aminopterin)、メトトレキサート(methotrexate)、メトプテリン(methopterin)、ジクロロメトトレキサート(dichloromethotrexate)、マイトマイシンC(mitomycin C)、ポルフィロマイシン(porphiromycin)、5 - フルオロウラシル、6 - メルカプトプリン、ゲムシタピン(gemcitabine)、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシンまたはポドフィロトキシン誘導体(エトポシド、エトポシドリン酸またはテニオシドなど)、メルファラン(melphalan)、ピンブラスチン(vinblastine)、ピンクリスチン(vincristine)、ロイロシジン(leurosidine)、ビンデシン(vindesine)、ロイロシン(leurosine)、パクリタキセルなどが挙げられる。他の抗悪性腫瘍薬としては、エストラムスチン(estramustine)、シスプラチン(cisplatin)、カルボプラチン(carboplatin)、シクロホスファミド、プレオマイシン、ゲムシチピン(gemcitabine)、イフォスファミド(ifosamide)、メルファラン、ヘキサメチルメラミン、チオテパ(thiotepa)、シタラビン(cytarabine)、イダトレキサート(idatrexate)、トリメトトレキサート、ダカルバジン(dacarbazine)、L - アスパラギナーゼ、カンプトテシン(camptothecin)、C P T - 1 1、トポテカン(topotecan)、a r a - C、ピカルタミド(bicalutamide)、フルタミド(flutamide)、ロイプロリド(leuprolide)、ピリドベンゾインドール誘導体、インターフェロンおよびインターロイキンが挙げられる。他の細胞傷害性薬剤も当該技術分野でよく知られている。抗体の単独投与も疾病の進行の遅延に有効性を有し得るが、抗体に基づく併用療法は、それらの有毒副作用を最小限にしつつ細胞をアポトーシスに感受性とすることによって、化学療法薬の有効性を高めることができる。実際、抗S 1 P m A bの、ヒト癌のマウスモデルおよび

10

20

30

40

50

同種移植マウスモデルで腫瘍進行遅延させる能力は、ヒトおよび動物双方の腫瘍の処置において抗S1P抗体アプローチの有用性を実証している。さらに、異種移植モデルで数種のヒト癌（例えば、卵巣癌、乳癌、肺癌および黒色腫）が処置可能であるという発見は、これらの抗S1P抗体アプローチがある癌細胞種または癌組織種に限定されないことを証明する。

#### 【0111】

LPAは、細胞増殖、分化、脈管形成および運動を含む複数の細胞応答を媒介する。多数の一連の実験的知見が、細胞外LPAが、腫瘍細胞の増殖、生存、侵入を刺激することにより、また、脈管形成および転移を誘発することにより、数種のヒト癌の進行に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、LPAは種々の腫瘍細胞種をアポトーシスから保護する。LPAは卵巣癌および乳癌に以前から関連づけられており[Fang, X., et al., (2002) Biochim Biophys Acta, 1582: 257-64]、患者の血液および腹水の双方でLPAレベルの上昇が見られており、腫瘍の進行、脈管形成および転移能との相関が見出されている。さらにまた、主としてLPAの産生を担う酵素である自己毒素(ATX)は、黒色腫、肺癌、神経芽腫、肝細胞癌および多形性膠芽腫を含むヒト腫瘍の転移および浸潤特性との相関が見出されている。よって、LPAは癌療法の革新的かつ有望な標的であると認識されている[Mills, G.B. and W.H. Moolenaar (2003) Nat Rev Cancer, 3: 582-91]。

10

#### 【0112】

LPAを抗LPA抗体（本明細書に記載のものなど）で中和することは、癌処置における新規な抗脈管形成的および抗転移的治療アプローチとなると考えられている。LPAに対するモノクローナル抗体は、LPAと選択的に結合し、それによりLPAの有効in vivo細胞外レベルを低下させる「スポンジ」として働くと考えられる。これにより腫瘍形成および腫瘍増殖ならびに血管形成および転移能の同時遮断がもたらされると考えられる。さらに、LPAの、細胞をアポトーシスから保護する能力は、おそらく抗体中和の結果として消失すると思われ、従って、標準的なアポトーシス誘導化学療法薬の有効性が高まる。

20

#### 【0113】

##### ii. 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。今日、腫瘍増殖は新血管新生に依存していることが科学的に十分受け入れられているので、現在、固形腫瘍および循環腫瘍に関連する脈管形成は腫瘍形成の重要な成分であると考えられている。S1PおよびLPAは双方とも脈管形成プロセスに重要であると思われる。

30

#### 【0114】

LPAは、その脈管形成促進作用によって腫瘍形成に寄与すると考えられる癌遺伝子GROの主要なレギュレーターである(Lee, et al (2006), Cancer Res, vol. 66: 2740-8)。LPAはまた、脈管形成プロセスの基礎にある細胞移動において認識されている作用因子であるマトリックスメタロプロテイナーゼ-2の発現も増強する(Wu, et al. (2005), Endocrinology, vol. 146: 3387-3400)。

#### 【0115】

S1Pは、ヒト静脈内皮細胞(HUVEC)のDNA合成および走化性運動を刺激すると同時に、初期血管形成に不可欠な多細胞構造の分化を誘導する。S1Pはまた、骨髄由来内皮細胞前駆体の、新血管新生部位への移動も促進し、S1P受容体を過剰発現する細胞は抗脈管形成薬、サリドマイド(thalidomide)およびネオバスタット(neovastat)に耐性がある。よって、S1P、および特にS1受容体は脈管形成および新血管新生に必要である。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との間でクロストークが起こる。例えば、S1PはEGF受容体とVEGF2受容体をトランス活性化し、VEGFはS1P受容体の発現をアップレギュレーションする(Igarashi, et al. (2003), PNAS (USA), vol. 100: 10664-10669)。

40

#### 【0116】

50

言うまでもないが、脈管形成の臨床対照は、癌、および加齢性黄斑変性（AMD）および子宮内膜症などの他の脈管形成依存疾患の処置の重要な成分である。また、腫瘍の脈管形成に關与している血管内皮細胞は癌細胞ほど容易には突然変異しないので、抗脈管形成治療薬も特に有望であり、結果として、血管内皮細胞は、長期療法に対して癌細胞よりも耐性を獲得しにくく、それらを有用な治療標的とする。

#### 【0117】

S1Pは、腫瘍の脈管形成に重要であり得る、可能性のある脈管形成促進性増殖因子であることを示唆する数系統の証拠があり、これには、HUVECを用いた種々のin vitroアッセイにおいて抗S1P抗体が、S1Pにより誘発された管形成、血管内皮細胞の移動および細胞死からの保護を中和できること；高いレベルのS1Pを発現する乳癌MCF-7細胞の、ヌードマウスの乳房脂肪体への注射が、対照細胞を用いた場合よりもより大きく、より多い脈管形成依存性腫瘍の増加をもたらすこと；正所性ネズミ黒色腫同種移植モデルにおいて、抗S1P抗体が腫瘍関連脈管形成を劇的に減らし得ること；S1Pがマウスに移植したマトリゲル(Matrigel)プラグへの新しい毛細血管の成長を高め、この作用が抗S1P抗体の全身投与によって中和可能であること；ネズミマトリゲルプラグアッセイにおいて、抗S1P抗体のin vivo投与が、脈管形成促進性増殖因子により誘導された脈管形成（例えば、bFGFおよびVEGFによる）を完全に中和できること；S1Pがin vitroおよびin vivoにおいて腫瘍からのbFGFおよびVEGFの放出を刺激し、この作用が抗S1P抗体によって回復可能であること；S1Pが、多形性膠芽腫細胞を含む、多数の異なる癌細胞種のin vitroにおいて運動性および浸潤を高めること；および抗S1P抗体が、AMDの動物モデルに関連する新血管新生を有意に低下させることが含まれる。

#### 【0118】

このような脈管形成依存性腫瘍におけるS1Pの重要性から、S1Pは癌処置の優れた標的となる。実際、細胞外S1Pの抗体中和は、腫瘍増殖を支えるのに必要な栄養素および酸素の同時的欠乏による血管形成の阻害の結果として、ヒトを含む哺乳類における癌の進行顕著な低下をもたらす。よって、抗S1P抗体は、（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ぐ間接的な抗脈管形成作用を含むいくつかの作用機序を有する。従って、抗S1P抗体はまた、抗脈管形成療法に加え、抗転移治療薬としても役立つ。

#### 【0119】

脈管形成の制御は、加齢性黄斑変性、未熟児網膜症、糖尿病性網膜症、子宮内膜症および関節リウマチなど、癌以外の他の脈管形成依存性疾患の処置の重要な成分である(Carmeliet, P. (2005), Nature, vol. Vol. 438(15): 932-6)。

#### 【0120】

抗脈管形成治療薬はまた、腫瘍脈管形成に關与する血管内皮細胞は癌細胞ほど容易には突然変異しないので、抗脈管形成治療薬も特に有望であり、結果として、血管内皮細胞は、長期療法に対して癌細胞よりも耐性を獲得しにくく、それらを有用な治療標的とする。S1P抗体およびその誘導体はまた、AMDに関連する脈管形成とともに見られるような、異常な内皮細胞増殖により引き起こされるものなど、S1P活性に関連する他の過剰増殖性障害の処置に有用であり得る。

#### 【0121】

iii. 繊維形成および癒痕形成

##### (a) S1P、繊維芽細胞およびリモデリングプロセス

心臓繊維芽細胞、特に筋繊維芽細胞は、心筋梗塞(MI)の細胞死および炎症に回答した癒痕形成における重要な細胞エレメントである。筋繊維芽細胞コラーゲン遺伝子発現はリモデリングを証明するものであり、癒痕形成に必要である。その他の活性に加え、S1Pは、血小板の活性化、脈管形成の刺激および平滑筋機能の増進の他、繊維芽細胞の移動および増殖を活性化させることによって創傷治癒に絶大な寄与を果たす炎症性メディエー

10

20

30

40

50

ターでもある。よって、おそらく損傷を受けた心筋によって局部的に産生される S 1 P は、特に心臓の筋繊維芽細胞を活性化させることにより、心臓のリモデリングおよび不全に関連する不適応性創傷治癒の一因となり得る。

#### 【 0 1 2 2 】

細胞の、S 1 P に対する一般的応答には、細胞死からの保護；増殖の刺激；および移動性応答の促進の3つがある。よって、S 1 P の活性または特定の障害、細胞系統などとの関与は、この種のアッセイをこの目的に適合させることにより評価することができる。繊維芽細胞は創傷治癒を促進する3つ全ての方法でS 1 P に応答するという証拠がある。例えば、以下の実施例の節のいくつかの例で、S 1 P は、心筋繊維芽細胞の活性（増殖、移動およびコラーゲン遺伝子発現）を促進することによってリモデリングに寄与することを示す証拠が提示されている。

10

#### 【 0 1 2 3 】

抗 S 1 P 抗体または抗体誘導体はまた、外科術に伴う過剰な癒痕形成を防止する。損傷または外科術後の過剰な癒痕形成は、胎児皮膚組織では問題とならず、成体では問題となり (Adzick and Lorenz (1994), Ann Surg, vol. 220: 10-18)、損傷後の成体皮膚組織における過剰な T G F -  $\beta$  に起因する。S 1 P は、強力なアクチベーターとして T G F -  $\beta$  シグナル伝達経路に関連づけられている。よって、抗 S 1 P 抗体は損傷または外科術後の過剰な癒痕形成を制限すると予想される。

#### 【 0 1 2 4 】

#### ( b ) L P A および S 1 P による細胞死からの保護

20

L P A は、アポトーシスから癌細胞を保護する因子である。よって、上記で詳しく述べたように、L P A に対する抗体は例えば、癌細胞を化学療法に対してより感受性とする。このことは実際に、新たに開発された抗 L P A モノクローナル抗体を用いた以下の実施例で証明された。

#### 【 0 1 2 5 】

多くの細胞種の場合と同様に、繊維芽細胞は S 1 P の添加によってアポトーシスから直接保護され、アポトーシスは S P H K の阻害剤によって促進され、S 1 P はシトクロム C の放出、および結果としてのカスパーゼの活性化を遮断する。さらに、S P H K 1 でトランスフェクトされた繊維芽細胞はアポトーシスからの保護を示し、この作用は原形質膜への S P H K 1 の輸送に依存している可能性がある。S P H K 1 は A k t をアップレギュレーションし、それにより B c l - 2 ファミリーメンバーを調節し、アポトーシスから保護するということは十分確立されている。また、S 1 P <sub>3</sub> はマウス胚繊維芽細胞 ( M E F ) における A k t のリン酸化に必要である。また、S P H K のアップレギュレーションと結果としての S 1 P レベルの上昇は心臓繊維芽細胞をアポトーシスから保護する。

30

#### 【 0 1 2 6 】

S 1 P の上流代謝産物であるセラミドは、細胞死を誘導するミトコンドリアタンパク質の転写を増強するとともに、ミトコンドリアの膜電位を低下させる。レオスタット機構のために、S 1 P は反対の作用を有し、心筋繊維芽細胞（すなわち、心臓の完全に分化した繊維芽細胞）をアポトーシスから保護する。実際に、S 1 P は保護機構としての自食作用を活性化させることすらある。これらの作用は中和抗 S 1 P 抗体（または S 1 P と結合して、それを隔離する働きをする他の分子）によって逆転され得る。

40

#### 【 0 1 2 7 】

#### B . 疼痛

生物活性脂質は、神経因性疼痛および化学療法に関連する疼痛を含む、疼痛の病因に重要な役割を果たすと考えられている。

#### 【 0 1 2 8 】

神経因性疼痛の発生における L P A シグナル伝達の重要な役割は、L P A 1 受容体を欠いたマウスの使用を含む、種々の薬理学的および遺伝学的アプローチを用いて確立されている（例えば、Ueda, et al. (2006), Pharmacol Ther, vol. 109: 57-77; Inoue, et al. (2004), Nat Med., vol. 10: 712-8参照）。神経損傷を有する野生型動物は、背根の脱

50

髄および脊髄背角内のタンパク質キナーゼCイソ型と背根神経節中の21カルシウムチャネルサブユニット双方の発現上昇と並行して拳動性異痛症および痛覚過敏症を発症する。LPAのくも膜下腔内注射は神経結紮後に見られたものと同様の拳動的、形態的および生化学的变化を誘発した。これに対し、Rho-Rhoキナーゼ経路を活性化する単一のLPA受容体(LPA-1、EDG-2とも呼ばれる)を欠いたマウスは、末梢神経損傷後に神経因性疼痛に徴候を発症しない。RhoおよびRhoキナーゼの阻害剤も、これらの神経因性疼痛徴候を防いだ。これらの結果は、神経因性疼痛の誘発には受容体により媒介されるLPAシグナル伝達が重要であること、およびLPAに対する抗体はこの症状を患う個体において神経因性疼痛を緩和し得ることを意味する[Moulin, DE (2006), Pain Res Manag, vol. 11, Suppl A: 30A-6A]。

10

## 【0129】

他の疼痛に関して、化学療法に関連するものとして、主要な用量制限毒性の多くの小分子化学療法薬がある。実際、化学療法誘導性疼痛の多くの場合が報告されている。例えば、タイハイヨウイチTaxus brevifoliaに由来する抗新生物薬パクリタキセル(タキソール)は、卵巣癌、乳癌および非小細胞肺癌を含む種々の癌を処置するために用いられる。しかしながら、パクリタキセルの有効性は、しびれや灼熱痛などの重篤な有痛性末梢神経障害高い二次的発生により制限されている。このような疼痛に関連する生物活性脂質、例えばLPAに対するモノクローナル抗体(またはその脂質結合部分を含むこのような抗体の誘導体)を、化学療法薬に関連する疼痛を軽減するために、パクリタキセルと組み合わせて投与することができる。このようなモノクローナル抗体または抗体誘導体と組み合わせて用いる場合、この用量制限毒性を緩和する結果として、投与するパクリタキセルの量はいっそう高く(従って、いっそう有効に)することができる。いくつかの実施形態では、化学療法薬(または他の薬剤)は、例えば、小分子化学療法薬と抗体を共有結合させることにより、小分子化学療法薬と多価スクフォールドを結合させ、またこれと、標的生物活性脂質に対して特異的に反応性のあるモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの生物活性脂質結合ドメインを結合させるなど、抗体または抗体誘導体とコンジュゲートまたはそうでなければ結合させることができる。

20

## 【0130】

## C. 心血管疾患および障害

虚血性心疾患は米国の主要な死因である。毎年およそ1500万人が心臓発作(心筋梗塞)を被り、その約3分の1(すなわち、約500,000人)が死に至っている。さらに、約675万人の米国人が心虚血の最も多い発現である狭心症を患っている。米国だけで、虚血性心疾患で生きている患者は総計、1300万人を超える。「虚血」は、一般には、供給を行う血管の収縮または遮断によって引き起こされる、身体のある部分への酸素を含んだ血液の流れが不十分になることに伴う症状である。虚血は、血流が臨界レベル下回った時に起こる。この血流の低下は、(i)塞栓(血餅)による血管の遮断;(ii)アテローム性動脈硬化症による血管の遮断;(iii)血管の破れ(出血性脳卒中);(iv)急性血管収縮による血管の遮断;(v)心筋梗塞(心停止時に器官への血流が低下し、虚血が起こる);(vi)外傷;(vii)外科術の目的を達成するために、組織または器官への血流を低下または停止させる必要がある外科術(例えば、血管形成術、心肺/心臓移植);(viii)ドブタミン(dobutamine)またはアデノシンなどの特定の薬剤に対する曝露(Lagerqvist, et al.(1992), Br. Heart J., vol. 68:282-285);または(ix)心臓毒性のあるドキソルピシンなどの抗新生物薬および他の化学療法薬から起こり得る。

30

40

## 【0131】

血液の流量(容量/時間)がたとえ十分であっても、虚血は低酸素症、すなわち、血液の酸素含量が罹患領域の通常の細胞酸素要求を満たすのに不十分である状態によって起こる場合もある。低酸素血液は、定義上、酸素正常状態の血液、すなわち、酸素含量が通常の細胞酸素要求を満たすのに十分である血液とは明確に異なる。低酸素症状は、限定されるものではないが、高血圧症、不整脈、敗血性ショック、外傷、心筋症およびうっ血性心

50

疾患などの心臓のポンプ機能に悪影響を及ぼす心不全の形態から起こり得る。

【0132】

心筋虚血障害は、心血流が制限された場合（虚血）、および/または心筋への酸素供給が悪くなり（低酸素症）、心臓の酸素要求が供給に見合わない場合に起こる。動脈硬化症、特にアテローム性動脈硬化症から起こる冠動脈疾病（CAD）は、虚血の最も多い原因であり、安定または不安定狭心症などの症候を有する。CADは急性心筋梗塞（AMI）および心性突然死を招き得る。心不全が起こる虚血症状の範囲は、急性冠動脈症候群（ACS）と呼ばれる。再灌流は、特に、抗凝集薬、血小板溶解薬または抗狭心症薬を用いた場合、または血管形成術または冠動脈グラフトによって心血管が外科的に開口された場合に、虚血の結果として起こる場合が多い。

10

【0133】

現在のところ、急性心筋梗塞および他の心疾患の処置としては、限定されるものではないが、機械的デバイスとそれに不随する、例えば冠動脈血管形成術などの処置；ストレプトキナーゼ、tPAおよびその誘導体などの血小板溶解薬が含まれる。これらの療法に対するアジュバントとしては、遮断薬、アスピリンおよびヘパリン、および糖タンパク質（GP）IIb/IIIa阻害剤が含まれる。GP IIb/IIIa阻害剤は血小板凝集および血栓形成を軽減する。例としては、モノクローナル抗体（例えば、アブシキマブ（abciximab））、環状ペプチド（例えば、エプチフィバチド（eptifibatid））および非ペプチドペプチドミメティクス（例えば、チロフィビアン（tirofiban）、ラミフィバン（lami-  
ifiban）、キセミロフィバン（xemilofiban）、シブラフィバン（sibrafiban）およびレフダラ  
フィビアン（lefradafiban））が挙げられる。

20

【0134】

予防的処置としては、例えば、食事管理および薬理的介入などによって患者のコレステロールレベルを低下させるものが含まれる。スタチン類は、コレステロールレベルを低下させるために用いられる薬剤の一種である。スタチン類は、HMG-CoAレダクターゼの活性を阻害し、肝臓のコレステロール受容体の産生を増強することによって作用すると考えられている。肝臓のコレステロール受容体はコレステロールと結合し、血液からこれを除去する。このような薬剤としては、ロバスタチン（lovastatin）、シンバスタチン（simvastatin）、プラバスタチン（pravastatin）およびフルバスタチン（fluvastatin）が含まれる。これらの、またその他のスタチン類は冠動脈疾患の進行を遅くし、患者のアテローム  
斑の退縮を誘発するが、このような薬剤の使用からの副作用の範囲は完全には理解されて  
いない。

30

【0135】

言うまでもないが、生物活性脂質に対して反応性があるモノクローナル抗体および誘導体、ならびにその他のフラグメントおよび変異体は、心臓療法を達成するために、単独または薬剤および/または外科術による処置を含む他の治療アプローチと組み合わせて使用することができる。ここで、「心臓療法」とは、虚血、AMI、CADおよびACSを含む心筋の疾患、障害、または物理的外傷、ならびに介入性心臓病学、または哺乳類、特にヒトにおいて虚血もしくは虚血/再灌流傷害を引き起こし得る他の外科的もしくは医学的  
処置もしくは療法の際またはその結果として起こり得る外傷または心臓細胞および組織の  
損傷の予防および/または治療を指す。

40

【0136】

心臓および脳の他、抗S1Pアプローチはまた、種々の内耳病態などの血管に基づく、脳卒中様の症状にも適用することができる（Scherer, et al. (2006), Cardiovasc Res, vol. 70:79-87）。

【0137】

D. 脳血管疾患および障害

脳虚血を受けた患者は多くの場合、一時的な神経障害から不可逆的な傷害（脳卒中）または死に至るまでの障害を被る。脳虚血、すなわち、脳神経系への血流の低下または停止は局部的または全体的のいずれかとして特徴付けることができる。局部的脳虚血は、頭蓋

50

内または頭蓋外の脳血管の部分的または完全な閉塞から起こる脳血管内の血流の停止または低下を指す。このような閉塞は一般に、脳神経系の局所的関与を反映する、少なくとも24時間持続し、脳循環の障害の結果である、神経障害の急性発生を特徴とする症候群である。局所的脳虚血の他の原因としては、くも膜下出血または医原性介入による血管攣縮が含まれる。

【0138】

全脳虚血とは、全身循環不全から起こる脳血管内の血流の低下を指し、これは即座に組織への酸素および栄養の低下をもたらす。よって、全脳虚血は心臓性能の重大な低下から起こり、AMIにより起こることが最も多いが、厄介な原因としては、急性心筋炎または心停止もしくは長期間の心肺バイパス後の心筋収縮性の低下から起こるポンプ不全；重篤な弁膜症性狭窄、大量の大動脈または僧帽弁逆流、および急性後天性心室中隔欠損などの機械的異常；ならびに心室細動などの心不整脈、または頸動脈血管形成術、ステント留置、動脈内膜切除術、心臓カテーテル法、電気生理学的研究および血管形成術などの介入法が含まれる。

10

【0139】

脳卒中および/またはMI後の虚血傷害は一般に、重要な細胞の脱分極による細胞死をもたらすが、細胞内 $Na^+$ および $Ca^{++}$ が上昇した後、細胞死が起こる。このプロセスを制御する1つのチャネルが、非電圧依存性チャネルTransient Receptor Potential Proteinであり、最近、S1PがGPCR依存性機構を介したこのチャネルのアクチベーターとして同定された。さらに、Transient Receptor Potential Protein、スフィンゴシキナーゼ1およびスフィンゴキナーゼ2は、心血管病理生物学を調節すると考えられている重要なマスタースイッチEgr-1 (Khachigian, LM (2006), Circ Res, vol. 98: 186-91)および神経細胞の細胞死に重要な役割を果たす転写因子Sp1 (Simard, et al. (2006), Nat Med., vol. 12: 433-40)とプロモーター領域を共有している。これらの知見に基づけば、S1Pに対する抗体は、虚血後低酸素症によって引き起こされる細胞死を軽減するものと予測される。

20

【0140】

当業者ならば、脳卒中を有している、または脳卒中、脳虚血、頭部外傷または癲癇のリスクを有している患者を容易に特定することができる。例えば、脳卒中のリスクのある患者としては、高血圧症を有する、または大手術を受けている患者が含まれる。従来、急性虚血性脳卒中の救急管理は、主として一般支持療法、例えば、水分補給、神経学的状態の監視、血圧管理および/または抗血小板または抗凝固療法からなる。脳卒中患者にヘパリンが投与されてきたが、有効性は限定され、一貫したものではない。場合によっては、循環中に吸収されたり、または数日かかって断片化され、遠位に運ばれたりする血栓もあるため、虚血それ自体は経時的に消散する。組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)は急性脳卒中を処置するために認可されているが、このような全身処置は脳内出血および他の出血性合併症のリスクの上昇に関連づけられている。血小板溶解薬およびヘパリンの投与の他、現在、閉塞性局所的脳虚血を受けている患者向けに市販されている治療選択肢はない。血管攣縮は血管拡張薬に部分的に応答する可能性がある。損傷部を物理的に除去するために頸動脈内に侵襲性が最小限のデバイスを置くことを含む、神経血管術の新たな開発分野は、将来的にこれらの患者の治療選択肢を提供するかもしれないが、この種の操作はそれ自体血管攣縮をもたらすことがある。

30

40

【0141】

言うまでもないが、生物活性脂質に対する抗体、抗体誘導体および他の免疫により誘導される物質は、脳血管療法を果たすために、単独で、または薬剤処置および/または外科術を含む他の治療アプローチと組み合わせて用いることができる。ここで、「脳血管療法」は、脳虚血および/または低酸素症に関連する疾病および障害の予防および/または処置に向けた療法を指す。特に注目されるのは、心疾患から起こる全虚血による脳虚血および/または低酸素症、ならびに哺乳類、特にヒトにおいて虚血性または虚血/再灌流脳血管傷害を引き起こし得る外傷または外科的もしくは医学的処置もしくは療法である。

50

## 【 0 1 4 2 】

## E. 生物活性脂質と結合する抗体の診断適用およびセラノスティック(theranostic)適用

疾病における種々の生物活性脂質の役割が解明されるにつれ、診断およびセラノスティックにおける生物活性脂質の抗体結合剤の新たな役割も考えられる。本発明によれば、固体支持体に結合された誘導体化脂質を用い、生物活性脂質の検出を高めるための方法が提供される。抗体の生産および同定ならびに研究におけるこれらの方法の使用の他、生物活性脂質の高い検出は、生物活性脂質に関連する疾病の価値ある診断アプローチも提供し得る。他の技術と組み合わせると、最適な患者の処置をデザインするためのセラノスティックアプローチが提供される。1つの非限定例は、癌のバイオマーカーとしてのS 1 Pの役割に関する診断およびセラノスティック法における抗S 1 P抗体の使用である。L P Aまたは他の生物活性脂質に対する抗体を用い、他の疾病適応のための診断法およびセラノスティック法も考えられる。

10

## 【 0 1 4 3 】

最近、科学文献が、S 1 Pが、腫瘍細胞から放出される可能性ある強力な腫瘍形成性増殖因子であること、およびS 1 Pが初期段階の癌検出の新規なバイオマーカーであり得ることを示唆した。S 1 Pの産生を担う酵素であるS P H Kは、様々な癌種において有意にアップレギュレーションされている(French, Schrecengost et al. 2003)。S P H K活性は、悪性乳癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌、胃癌、子宮癌、腎臓癌および直腸癌では、隣接する正常組織に比べて2~3倍アップレギュレーションされている。これらの研究者らはまた、S P H Kの発現は患者ごとに異なることを示したが、これは幾人かの患者の腫瘍が、同じ腫瘍種を有する他の患者のものよりもS 1 Pに対する依存性が大きい可能性があることを示唆する。市販のゲノミクスデータベース(ASCENTA, Genelogic Inc., Gaithersburg MD)を検索すると、S P H Kの相対的発現が一般に多種の悪性腫瘍で有意に上昇していることが確認される。

20

## 【 0 1 4 4 】

最近の刊行物はまた、S 1 Pが新規な癌バイオマーカーであり得ることも示唆している[Xu, Y. et al., (1998) JAMA 280: 719-723; Shen, Z. et al., (2001) Gynecol Oncol 83: 25-30; Xiao, Y.J. et al., (2001) Anal Biochem 290(2): 302-13; Sutphen (2004) Cancer Epidemiology 13(7) 1185-91]。例えば、Sutphenらは、初期段階の卵巣癌患者で血清S 1 Pレベルが上昇していることを示している(Sutphen 2004)。これらのデータから、乳癌患者でもそれらのS 1 P依存性においていくらかの変動を示すことが推定される。考え合わせると、これらの予備知見は、患者の生検組織、血液、尿またはその他の組織または体液サンプルがS 1 Pレベルの上昇を示せば、個々の患者に対する抗S 1 P療法、例えば抗S 1 P m A b療法の成功が予測され得る。

30

## 【 0 1 4 5 】

体液におけるS 1 Pの使用の可能性は次の特許で開示されており、これらは全て、本願と同一譲渡人に譲渡されたものである。US 6, 534, 323、US 6, 534, 322; US 6, 210, 976; US 6, 858, 383; US 6, 881, 546; US 7, 169, 390およびUS 6, 500, 633。

## 【 0 1 4 6 】

たとえヒト化抗体の毒性が低く、治療係数が大きいとしても、患者や医療提供者にとって極めてコストが高い。よって、抗S 1 P m A b治療薬に応答する可能性の高い患者にこのような処置の有用性を向けると、リスクが低くなり、コストが最小となるとともに、最適な患者利益が提供される。

40

## 【 0 1 4 7 】

以下に、改良された疾病管理のための生体脂質診断薬および治療薬のいくつかの提案される適用の概略を示す。

1. S 1 Pは、特にスフィンゴ脂質に基づくゲノミクスと組み合わせた場合、個々の患者の治療効力を推定するためのバイオマーカーとして使用可能である。最近の知見に基づけば、本発明者らは、S 1 Pの豊富な血清供給源に加え、S 1 P依存性腫瘍がそれら固有の

50

S 1 Pを産生し得ることを予測している。急速進行性腫瘍はそれら固有の増殖因子を産生する戦略を利用しており、本発明者らは、S 1 Pがその増殖因子の1つであると提案する。よって、個々の患者からの全S 1 Pの血清、血漿または尿測定は、患者の転帰の1つの予測因子となる。さらに、S 1 Pの産生は、腫瘍それ自体および腫瘍の微小環境（例えば、間質液）に集中される。以下の実施例11は、腫瘍それ自体によるS 1 P産生を評価するための腫瘍切片の免疫組織化学的方法における抗S 1 P m A bの使用を記載している。S P H Kのアプレギュレーションは有用であることが分かるが、キナーゼは酵素であることから、S 1 P産生によって測定されたシグナルは、キナーゼそれ自体のR N Aまたはタンパク質発現による場合よりもはるかに高いと考えられる。さらに、腫瘍がS 1 P - 受容体およびS P H K発現のアプレギュレーションを示す患者は、増殖因子としてのS 1 Pに頼る腫瘍を有する可能性が高いと仮定される。これらの患者は本発明者らの推定抗S 1 P m A b療法から最も利益を受けると考えられる。従って、S 1 P受容体およびS P H Kの相対的発現に関する定量的P C Rによって分析された生検組織からのバイオアッセイは強力なセラノスティックプラットフォームを提供する。このセラノスティックプラットフォームは、疾病のサロゲートマーカーとしてのS 1 P関連タンパク質マーカーのゲノミクスまたはプロテオミクス定量と組み合わせた血清S 1 Pマーカー分析からなる。この新規なマルチマーカー分析は、抗S 1 P m A b (SPHINGOMAB (商標))に基づく療法に対する個々の応答性を推定するための極めて強力なプラットフォームを提供する。

10

## 【0148】

2. S 1 Pは、治療計画の用量漸増を行うためのサロゲートマーカーとして使用可能である。抗S 1 P m A bで処置される患者の血清S 1 Pの濃度は、処置コースを評価するためのサロゲートマーカーとして使用される可能性を有する。患者の血清、血漿または尿サンプルを用いたE L I S Aに基づくプラットフォームにより、S 1 Pバイオマーカーレベルの正確な測定および個体の抗S 1 P m A b投与計画のより厳密な決定が可能となる。サロゲートマーカーレベルは、医療計画の有効性を決定するために、標準的な臨床エンドポイントと組み合わせて使用することができる。

20

## 【0149】

3. S 1 Pは、癌の早期検出のためのスクリーニングツールとして使用可能である。癌の早期検出は、進行段階と療法の成功の強い関連のために着目される。病期Iの卵巣癌は、患者の大多数が無症候であるという事実のために検出が極めて困難である。卵巣癌と診断された時には、ほとんどの患者がこの疾病の最終病期である。初期段階での検出は患者の転帰に明らかな利益を示す。上記のように、卵巣癌患者の血清はS 1 Pの2倍の上昇を含み、この上昇は本発明者らの現行のE L I S Aプラットフォームで容易に検出することができる。卵巣癌を含む多くの固形腫瘍種はS P H K発現の上昇を示すことから、これらの癌を有する患者の多くは、疾病進行の初期に臨床家が介入可能な血中および/または尿のS 1 P上昇を示すと予測される。

30

## 【0150】

本明細書に記載される誘導体化生物活性脂質はまた、患者の体液または組織サンプル中に抗体レベルを検出するためにも使用することができる。以下のものに限定されるものではないが、血中の抗スフィンゴ脂質抗体の存在を検出するこのようなイムノアッセイは、慢性虚血症状、癌または多発性硬化症などの自己免疫疾患を有する患者におけるスフィンゴ脂質の上昇に関する間接的試験のために使用することができる。このアッセイは、結腸直腸癌を有する患者に見られる抗ラクトシルスフィンゴシン抗体(Jozwiak W. & J. Koscielak, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18:617-621, 1982)およびらい病患者的の血清中で検出される抗ガラクトセレプロシド抗体(Vemuri N. et al., Leprosy Rev. 67:95-103, 1996)との類似により、スフィンゴ脂質の血中レベルの上昇の結果として患者が抗スフィンゴ脂質抗体を産生するという仮定に基づくものである。

40

## 【0151】

## F. 研究

本発明の生物活性シグナル伝達脂質標的は、所望の活性を有する、例えば、所望でない

50

生物活性シグナル伝達脂質を産生する反応を触媒する酵素を阻害する、または生物活性シグナル伝達脂質とその受容体との結合を遮断するものを同定するための候補化合物をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイでの使用に容易に適合させることができる。このようにして同定された化合物は従来の「リード化合物」として役立つか、あるいはそれら自体、治療薬として使用することができる。本発明のスクリーニング法は、多様な分子のライブラリーから所望の活性を有する1以上の化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを用いることを含む。「スクリーニングアッセイ」は、予め選択された活性を有するコレクション内の化合物を同定する、単離する、かつ/またはその構造を決定するようデザインされた選択アッセイである。このコレクションは、当技術分野で公知の方法に従って作製される従来のコンビナトリアルライブラリーであってよく、あるいは潜在的生物活性シグナル伝達活性に関して予め選択された広範囲の有機構造または構造であり得る。「同定する」とは、所望の活性を有する化合物が単離され、その化学構造が決定される(限定されるものではないが、核酸およびポリペプチドの、それぞれヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の決定を含む)、その上に、またはその代わりに、スクリーニングされた活性を有する化合物を精製することを意味する。タンパク質-タンパク質相互作用、酵素触媒、小分子-タンパク質結合から細胞機能に至るまでの範囲の広範な系における活性に関して試験するための生化学アッセイおよび生物学アッセイがデザインされる。

10

【発明を実施するための形態】

【0152】

20

以下、詳細な実施例を参照して、本発明をさらに説明する。これらの実施例は本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0153】

実施例1 S1Pの代表的チオール化類似体を作製するための合成スキーム

本実施例に記載する合成アプローチは、主として従来の有機化学を用い、構造要素を順次付加することによって抗原の産生をもたらす。本実施例に記載されるアプローチのスキームは図1に示され、以下の合成説明の化合物番号は図1の符番された構造を指す。

【0154】

この合成アプローチは市販の15-ヒドロキシルペンタデシン1で開始し、ヒドロキシル置換を促進するために15-ヒドロキシ基を塩化メチルスルホニルにより活性化させてスルホネート2を生成した。このスルホネートをt-ブチルチオールで置換して保護されたチオエーテル3を得、これをガーナー(Garner)のアルデヒドと縮合させて4を生成した。このアルキン部分をアルケン(5)へ穏やかに還元した後、このオキサゾリデン環を、酸を触媒として開環し、S保護およびN保護されたチオール置換スフィンゴシン6を得た。この最終工程では、酸を触媒とする開環中のN-BOC基の損失を軽減するために二炭酸ジ-t-ブチルによる際誘導体化を用いた。

30

【0155】

言うまでもないが、化合物6はそれ自体、スフィンゴシンに対する抗体を作製するためのハプテンを調製するための抗原として、あるいはチオール化S1P類似体を調製するための2つの異なる合成アプローチのための出発材料として使用することができる。1つのアプローチでは、化合物6をリン酸トリメチルでリン酸化して化合物7を生成した。化合物7を臭化トリメチルシリルで処理し、リン酸塩からメチル基、および第一級アミンからt-ブチルオキシカルボニル基の双方を除去すると、硫黄上に唯一の保護基としてt-ブチル基を有する化合物8が得られた。この基を除去するために、このt-ブチル基をNBSで置換してジスルフィド9を形成し、次にこれを還元してチオール化S1P類似体10を形成した。

40

【0156】

別のアプローチは、化合物6をNBSClで直接処理してジスルフィド11を形成し、次にこれを還元してN保護チオール化S1P類似体12を形成した。この化合物を弱酸で

50

処理してチオール化スフィンゴシン類似体 13 を得、これを例えばスフィンゴシンキナーゼで酵素的にリン酸化してチオール化 S 1 P 類似体 10 を得ることができる。

【 0 1 5 7 】

示されている合成アプローチは、特に、保護および脱保護試薬の選択、例えば、チオールを脱保護するための、実施例 3 に記載のトリメチルジスルフィドトリフレートの使用に関して、改変が可能である。

【 0 1 5 8 】

化合物 2 1 ( 1 0 . 3 g、4 5 . 8 9 m m o l ) を入れた 5 0 0 m L R B フラスコに D C M ( 4 0 0 m L ) を加え、得られた溶液を 0 に冷却した。次に、T E A ( 8 . 3 4 g、8 2 . 6 0 m m o l、9 . 5 m L ) を全て一度に加えた後、M s C l ( 7 . 8 8 g、6 8 . 8 4 m m o l、5 . 3 m L ) を 1 0 分かけて滴下した。この反応物を室温で 0 . 5 時間、すなわち、出発材料が消失するまで (  $R_f = 0 . 6 5$ 、5 : 1 ヘキサン : E t O A c ) 攪拌した。反応を N H <sub>4</sub> C l ( 3 0 0 m L ) でクエンチし、D C M で抽出した ( 2 × 2 0 0 m L )。有機層を M g S O <sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させて固体とした ( 1 3 . 8 6 g、収率 9 9 . 8 % )。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 4.20 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.98 (s, 3H), 2.59 (td, J = 7 Hz, 3H, 2H), 1.917 (t, J = 3 Hz, 1H), 1.72 (四重線, J = 7.5 Hz, 2H), 1.505 (四重線, J = 7.5 Hz, 2H), 1.37 (br s, 4H), 1.27 (br s, 14H)。<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (CDCl<sub>3</sub>-) 85.45, 70.90, 68.72, 46.69, 38.04, 30.22, 30.15, 30.14, 30.07, 29.81, 29.76, 29.69, 29.42, 29.17, 26.09, 19.06, 9.31

化合物 2 の H R M S 分析 ( E S - T O F ) で見られた主要イオンは  $m/z = 325.1804$  であった ( C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> S : M + N a <sup>+</sup> の理論値は 3 2 5 . 1 8 0 8 )。

【 0 1 5 9 】

化合物 3 三口 1 L R B フラスコに t - ブチルチオール ( 4 . 5 4 g、5 0 . 4 0 m m o l ) および T H F ( 2 0 0 m L ) を入れた後、氷浴中に置いた。n - B u L i ( ヘキサン中 1 . 6 M を 3 1 . 5 m L ) を 3 0 分かけて加えた。次に、T H F ( 1 0 0 m L ) に溶かした化合物 2 ( 1 3 . 8 6 g、4 5 . 8 2 m m o l ) を 2 分かけて加えた。この反応物を 1 時間、すなわち、出発材料が消失するまで (  $R_f = 0 . 7$ 、1 : 1 ヘキサン / E t O A c ) 攪拌した。反応を飽和 N H <sub>4</sub> C l ( 5 0 0 m L ) でクエンチし、E t O <sub>2</sub> ( 2 × 2 5 0 m L ) で抽出し、M g S O <sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させて黄色油状物を得た ( 1 1 . 6 7 g、収率 8 6 % )。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 2.52 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.18 (td, J = 7 Hz, 2.5 Hz, 2H), 1.93 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 1.55 (四重線, J = 7.5 Hz, 2H), 1.51 (四重線, J = 7 Hz, 2H), 1.38 (br s, 4H), 1.33 (s, 9H), 1.26 (s, 14H)。<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (CDCl<sub>3</sub>-) 85.42, 68.71, 68.67, 54.07, 42.37, 31.68, 30.58, 30.28, 30.26, 30.19, 30.17, 29.98, 29.78, 29.44, 29.19, 29.02, 19.08

【 0 1 6 0 】

化合物 4 化合物 3 ( 5 . 0 g、1 6 . 8 5 m m o l ) を入れた 2 5 0 m L シュレンクフラスコを排気し、3 回窒素を充填した後、乾燥 T H F ( 1 5 0 m L ) を加えた。得られた溶液を - 7 8 に冷却した。次に、n - B u L i ( ヘキサン中 1 . 6 M を 1 0 . 5 m L ) を 2 分かけて加え、この反応混合物を - 7 8 で 1 8 分間攪拌した後、2 0 分間冷却浴を外した。1 5 分後、乾燥 T H F ( 1 0 m L ) 中、ガーナーのアルデヒド (aldehyde) ( 3 . 3 6 g、1 4 . 6 5 m m o l ) を 5 分かけて加えた。2 0 分後、冷却浴を外した。2 . 7 時間後の薄層クロマトグラフィー ( T L C ) は、ガーナーのアルデヒドが消失したことを示す。反応を飽和 N H <sub>4</sub> C l 水溶液 ( 3 0 0 m L ) でクエンチし、E t <sub>2</sub> O ( 2 × 2 5 0 m L ) で抽出した。合わせた E t <sub>2</sub> O 相を N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させて粗化合物 4 とその s y n ジアステレオマー ( 図 1 には示されていない ) を黄色油状物として得た ( 9 . 0 6 g )。次に、この材料をそれ以上の精製を行わずに次の工程で用いた。

【 0 1 6 1 】

化合物5 化合物4中の三重結合を還元するため、この油状物を窒素下、乾燥Et<sub>2</sub>O (100 mL)に溶かした。得られた溶液に室温で、RED-AL (トルエン中65%を20 mL)を、水素ガス(H<sub>2</sub>)の発生を制御するためにゆっくり加えた。この反応物を室温で一晩、すなわち、TLCが発見材料の消失を示すまで(1:1 EtOAc:ヘキサン中、R<sub>f</sub> = 0.6)攪拌し、冷MeOHまたはNH<sub>4</sub>Cl水溶液を、H<sub>2</sub>の発生を制御するためにゆっくりクエンチした。得られた白色懸濁液をセライトパッドで濾過し、濾液をEtOAc (2 × 400 mL)で抽出した。合わせたEtOAc抽出物をMgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させて粗化合物5とそのsynジアステレオマー(図1には示されていない)を黄色油状物として得た(7.59 g)。

【0162】

化合物6 化合物5を含む油状物をMeOH (200 mL)に溶かし、PTSA水和物(0.63 g)を加え、この溶液を室温で1日、次いで、50 °Cで2日攪拌し、この時点でTLCは全ての発見材料(5)が消失したことを示した。しかしながら、極性材料がいくらか存在し、酸がBOC基を一部切断したことが示唆される。この反応を飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(400 mL)を加えることで後処理し、エーテル(3 × 300 mL)で抽出した。合わせたエーテル相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発乾固させると、5.14 gの油状物が得られた。アミンが生じたら再保護するために、粗生成物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL)に溶かし、これにBOC<sub>2</sub>O (2.44 g)およびTEA (1.7 g)を加えた。TLC (1:1ヘキサン/EtOAc)がベースラインに材料が残っていないことを示したら、飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(200 mL)を加え、有機相を分離した後、混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL)で抽出した。合わせた抽出物をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、濾液を濃縮乾固させて黄色油状物(7.7 g)を得、ヘキサン/EtOAc勾配(1:1まで)を用いたシリカカラムでのクロマトグラフィーに付し、ジアステレオマーを分離した。1:1PE/EtOAcを用いたTLCにより、anti異性体化合物6のR<sub>f</sub>は0.45であった。syn異性体(図1には示されていない)ではR<sub>f</sub>は0.40であった。化合物6の収量は2.45 g (ガーナーのアルデヒドに基づき全体で39%)であった。

anti異性体の<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.26 (br s, 20H), 1.32 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.56 (四重線, 2H, J = 8 Hz), 2.06 (q, 2H, J = 7 Hz), 2.52 (t, 2H, J = 7 Hz), 2.55 (br s, 2H), 3.60 (br s, 1H), 3.72 (ddd, 1H, J = 11.5 Hz, 7.0 Hz, 3.5 Hz), 3.94 (dt, 1H, J = 11.5 Hz, 3.5 Hz), 4.32 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 5.28 (br s, 1H), 5.54 (dd, 1H, J = 15.5 Hz, 6.5 Hz), 5.78 (dt, 1H, J = 15.5 Hz, 6.5 Hz)。<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (CDCl<sub>3</sub>) 156.95, 134.80, 129.66, 80.47, 75.46, 63.33, 56.17, 42.44, 32.98, 31.70, 30.58, 30.32, 30.31, 30.28, 30.20, 30.16, 30.00, 29.89, 29.80, 29.08, 29.03

【0163】

分析 C<sub>27</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Sの理論値理: C, 66.48; H, 10.95; N, 2.87。側定値: C, 65.98; H, 10.46; N, 2.48。

【0164】

化合物7 乾燥ピリジン(2 mL)に溶かしたアルコール化合物6(609.5 mg、1.25 mmol)の溶液に、CBr<sub>4</sub>(647.2 mg、1.95 mmol、1.56当量)を溶かした。このフラスコを氷浴中で冷却し、P(OMe)<sub>3</sub>(284.7 mg、2.29 mmol、1.84当量)を2分かけて滴下した。4分後、氷浴を外し、12時間後、混合物をエーテル(20 mL)で希釈した。得られた混合物をHCl水溶液(10 mL、2 N)で洗浄してエマルションを形成させ、これを水(20 mL)で希釈して分離させた。水相をエーテル(2 × 10 mL)、次いでEtOAc(2 × 10 mL)で抽出した。エーテル抽出液と最初のEtOAc抽出液を合わせ、HCl水溶液(10 mL、2 N)、水(10 mL)および、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(10 mL)で洗浄した。最後のEtOAc抽出液を、これらの水性洗液を逆抽出するための用いた。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、濾液を濃縮すると粗生成物(1.16 g)が残り、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、次いでCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOAc(1:20、1:6、1:3および1:1-生成物

が溶出しはじめたら、6 : 4、7 : 3) を用いたシリカ (3 × 22 cm カラム) でのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。初期の画分に 56.9 mg の油状物が含まれていた。後の画分が無色透明な油状物としての生成物 (化合物 7、476.6 mg、64%) が提供された。

## 【0165】

分析  $C_{29}H_{58}NO_7PS$  (595.82) の理論値: C, 58.46; H, 9.81; N, 2.35。測定値: C, 58.09; H, 9.69; N, 2.41。

## 【0166】

化合物 8 化合物 7 (333.0 mg、0.559 mmol) と攪拌子を入れたフラスコを排気し、窒素を充填した。アセトニトリル (4 mL、 $CaH_2$  から蒸留) をシリンジで注入し、この時、溶液の入ったフラスコを氷浴中で冷却した。シリンジを用い、 $(CH_3)_3SiBr$  (438.7 mg、2.87 mmol、5.13 当量) を 1 分かけて加えた。35 分後、アセトニトリル (1 mL) を追加してフラスコの上部をすすぎ、氷浴を外した。さらに 80 分後、アリコートを取り出し、溶液をその上に窒素ガスを吹き入れて乾燥させ、残渣を  $CDCl_3$  にて  $^1H$  NMR で分析したところ、 $P-OCH_3$  部分に起因するピークの痕跡だけが示された。20 分後、この反応混合物に水 (0.2 mL) を加えた後、この  $CDCl_3$  溶液を、アリコートを分析するのに用い、混合物をロータリーエバポレーターでおよそ 0.5 mL 量まで濃縮した。アセトン (3 mL) を少量ずつ使用し、残渣を、風袋を計った試験管に移し、淡褐色溶液を形成させた。水 (3 mL) を少量ずつ加えた。0.3 mL を加えた後、曇りが見られた。計 1 mL の後、粘稠な沈殿が生じた。さらに 0.6 mL の水を加えたところ、より曇りの多いガム質が分離したが、最後の水を追加しても混合物の外観に変化はないようであった。全体として、この方法は数時間にわたって達成された。試験管を遠心分離し、上清をピペットで除去した。固体 (もはや粘稠ではない) を  $P_4O_{10}$  で真空乾燥させると、化合物 8 (258.2 mg、95%) が一水和物として残った。

## 【0167】

分析  $C_{22}H_{46}NO_5PS+H_2O$  (485.66) の理論値: C, 54.40; H, 9.96; N, 2.88。測定値: C, 54.59; H, 9.84; N, 2.95。

## 【0168】

化合物 9 グローブボックス内で攪拌子の入った試験管に化合物 8 (202.6 mg、0.417 mmol) を加え、乾燥 THF (3 mL) および氷 HOAc (3 mL) を加えた。NBSCl (90 mg、0.475 mmol、1.14 当量) を加え、0.5 時間後、透明な溶液が得られた。計 9 時間後、アリコートを蒸発乾固させ、残渣を  $CDCl_3$  にて  $^1H$  NMR により分析した。 $CH_2StBu$  および  $CH_2SSAr$  に相当するピークは、反応が約 75% 完了したことを示し、 $CDCl_3$  中の純粋な NBSCl の場合と比較したところ、反応物中に試薬の残存はないことが示された。従って、追加 (24.7 mg、0.130 mmol、0.31 当量) を行った後、3 時間後にさらに追加を行った (19.5 mg、0.103 mmol、0.25 当量)。さらに 1 時間後、すすぎのために THF (2 mL) を用い、混合物を新しい試験管に移し、水 (1 mL) を加えた。

## 【0169】

化合物 10 上記の化合物 9 の透明な溶液に、 $PMe_3$  (82.4 mg、1.08 mmol、塩化 2-ニトロベンゼンスルフェニルの添加総量の 1.52 倍) を加えた。この混合物は温かくなり、曇りが出、経時的に沈殿が生じた。4.5 時間後、メタノールを加え、この試験管を遠心分離した。この沈殿は安定させるのが難しく、試験管の底 1 cm を占めていた。透明な黄色の上清をピペットで取り出した。メタノール (5 mL、窒素で酸素を除去) を加え、この試験管を遠心分離し、上清をピペットで除去した。このサイクルを 3 回繰り返した。濃縮し、最終のメタノール洗浄を行ったところ、4.4 mg の残渣だけが残った。この嵩のある固体残渣を  $P_4O_{10}$  で真空乾燥させると、化合物 10 (118.2 mg、68%) が一塩酸塩として残った。

## 【0170】

分析  $C_{18}H_{38}NO_5S+HCl$  (417.03) の理論値: C, 51.84; H, 9.43; N, 3.36。測定値: C, 52.11; H, 9.12; N, 3.30。

【0171】

化合物11 化合物6 (1.45 g、2.97 mmol) を  $AcOH$  (20 mL) に溶かし、 $NBSCl$  (0.56 g、2.97 mmol) を全て一度に加えた。この反応物を3時間、すなわち、 $TLC$  [生成物  $R_f = 0.65$ 、出発材料  $R_f = 0.45$ 、1:1  $EtOAc$  / ヘキサン] により出発材料が消失し、生成物の出現が見られるまで攪拌した。この反応物を高真空系で濃縮乾固させ、残渣を  $THF/H_2O$  (10:1 100 mL) に溶かした。

【0172】

化合物12 化合物11 を含んだ上記の溶液に、 $Ph_3P$  (0.233 g、8.91 mmol) を全て一度に加え、この反応物を3時間、すなわち、出発材料が消失するまで攪拌した。この粗反応混合物を高真空系で濃縮乾固させると、化合物12 を含んだ残渣が残った。

【0173】

化合物13 化合物12 を含む上記の残渣を  $DCM$  (50 mL) および  $TFA$  (10 mL) に溶かした。この混合物を室温で5時間攪拌し、濃縮乾固させた。この残渣をシリカゲルカラムにのせ、純粋な  $DCM$ 、次いで5%  $MeOH$  を含有する  $DCM$ 、その後、10%  $MeOH$  を用いてクロマトグラフィーに付し、最終生成物の化合物13 を粘稠な白色固体として得た (0.45 g、5 から 46% 収率)。

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ) 1.27 (s), 1.33 (br m), 1.61 (p, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 2.03 (br d, 2H,  $J = 7$  Hz), 2.53 (q, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 3.34 (br s, 1H), 3.87 (br d, 2H,  $J = 12$  Hz), 4.48 (br s, 2H), 4.58 (br s, 2H), 5.42 (dd, 1H,  $J = 15$  Hz, 5.5 Hz), 5.82 (dt, 1H,  $J = 15$  Hz, 5.5 Hz), 7.91 (br s, 4H)。  $^{13}C\{^1H\}$  NMR ( $CDCl_3$ ) 136.85, 126.26, 57.08, 34.76, 32.95, 30.40, 30.36, 30.34, 30.25, 30.19, 30.05, 29.80, 29.62, 29.09, 25.34。

【0174】

実施例2 チオール化脂肪酸を製造するための合成スキーム

本実施例に記載する合成アプローチは、タンパク質または他の担体とさらに複合体形成が可能であり、かつ、免疫応答を惹起するために動物に投与することができる、より複雑な脂質構造に組み込まれるチオール化脂肪酸の製造を詳説する。このアプローチでは、通常の有機化学を用いる。本実施例でとるアプローチを示すスキームは図2に示され、以下の合成説明の化合物番号は図2の符番された構造を指す。

【0175】

2種類の合成を記載する。最初の合成は、C-12チオール化脂肪酸に関し、市販の12-ドデカン酸、化合物14で始める。次に、臭素を *t*-ブチルチオールで置換し、保護されたC-12チオール化脂肪酸、化合物15を得る。もう一つの合成は、C-18チオール化脂肪酸に関し、市販の9-ブロモ-ノナノール(化合物16)で始める。化合物16のヒドロキシル基を、ジヒドロピラン基(dihydroxyran group)を加えることで保護し、得られた化合物17を、グリニャール反応によりこの臭素化材料の半分の活性化によって二量体化した後、もう半分を加えた。酸を触媒としたこのジヒドロピラン保護基の除去を行った後に生じた18-ヒドロキシオクタデカノール(化合物18)を選択的に一臭素化して化合物19を形成させる。この反応中、そのアルコール基の約半数が、メタンスルホン酸エステル形成による求核置換のために活性化される。次に、このアルコールを酸化させて18-ブロモカルボン酸、化合物20を形成し、その後これを *t*-ブチルチオールで処理し、臭素を脱離させて、保護されたチオール化C-18脂肪酸、化合物21を生成させる。

【0176】

これらの保護されたチオール化脂肪酸である各 *t*-ブチルチオエーテルを複合脂質に組み込み、例えば、実施例1および3に記載の脱保護アプローチを用いて保護基を除去する

10

20

30

40

50

ことができる。得られた遊離チオールを用いて、次に、タンパク質または他の担体と複合体を形成させることができ、その後、このハプテンを動物に接種する。

【0177】

A . C - 1 2 チオール化脂肪酸の合成

化合物 1 5 t - ブチルチオール ( 1 2 . 9 3 g 、 1 4 3 m m o l ) を乾燥したシュレンクフラスコに加え、この系を窒素下に置くためにシュレンク法を用いた。乾燥、脱気した T H F ( 2 5 0 m L ) を加え、このフラスコを氷浴中で冷却した。n - B u L i ( ヘキサン中 2 . 5 M を 5 5 m L 、 1 3 7 . 5 m m o l ) をシリンジで 1 0 分かけてゆっくり加えた。この混合物を 0 で 1 時間攪拌した。このプロモ酸、化合物 1 4 ( 1 0 g 、 3 6 m m o l ) を固体として加え、この反応を加熱し、6 0 で 2 4 時間攪拌した。この反応を 2 M H C l ( 2 5 0 m L ) でクエンチし、エーテル ( 2 × 3 0 0 m L ) で抽出した。合わせたエーテル相を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濾液を回転蒸発により濃縮し、チオエーテル酸、化合物 1 5 ( 1 0 g 、 収率 9 9 % ) をベージュの固体として得た。

$^1\text{H NMR}$  (  $\text{CDCl}_3$  , 500 MHz ) 1.25-1.35 (br s, 12 H), 1.32 (s, 9 H), 1.35-1.40 (m, 2 H), 1.50-1.60 (m, 2H), 1.60-1.65 (m, 2 H), 2.35 (t, 2 H, J = 7.5 Hz), 2.52 (t, 2 H, J = 7.5 Hz)

H R M S ( E S - T O F ) において主要イオンは  $m/z$  3 1 1 . 2 0 2 0 、  $M + \text{Na}^+$  の理論値 3 1 1 . 2 0 1 5 に見られた。

【0178】

B . C - 1 2 チオール化脂肪酸の合成

化合物 1 7 乾燥シュレンクフラスコに化合物 1 6 ( 5 0 g 、 2 2 4 . 2 m m o l ) を入れ、ナトリウム/ベンゾフェノンから蒸留した乾燥、脱気した T H F ( 2 5 0 m L ) に溶解した。フラスコを氷浴中に冷却した後、P T S A ( 0 . 5 g 、 2 . 6 m m o l ) を加えた。次に、乾燥、脱気した D H P ( 3 6 g 、 4 2 . 8 m m o l ) を 5 分かけてゆっくり加えた。この混合物を室温まで温め、一晚攪拌し、プロモアルコールのスポットの完全消失によって反応が行われたと思われるまで、T L C ( 1 0 : 1 P E : E t O A c ) によりモニタリングした。次に、T E A ( 1 g 、 1 0 m m o l ) を加えて、P T S A をクエンチした。次に、この混合物を冷重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、E t O A c で抽出した ( 3 × 2 5 0 m L ) 。その後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、6 8 . 2 g の粗生成物を得、カラムクロマトグラフィー ( 1 0 : 1 P E : E t O A c ) により精製し、6 0 g ( 収率 9 9 % ) の無色の油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$  (  $\text{CDCl}_3$  , 500 MHz ) 1.31 (br s, 6 H), 1.41-1.44 (m, 2 H), 1.51-1.62 (不明瞭な多重線, 6 H), 1.69-1.74 (m, 1 H), 1.855 (四重線, J = 7.6 Hz, 2 H), 3.41 (t, J = 7 Hz, 2 H), 3.48-3.52 (m, 2 H), 3.73 (dt, 2 H, J = 6.5 Hz), 3.85-3.90 (m, 2 H), 4.57 (t, 2 H, J = 3 Hz)

【0179】

化合物 1 8 マグネシウム切削屑 ( 2 . 9 8 g 、 1 2 5 m m o l ) を火炎乾燥させたシュレンクフラスコにヨウ素の結晶とともに加えた。次に、ナトリウムから蒸留した乾燥 T H F ( 2 0 0 m L ) を加え、この系を、シュレンク法を用いて脱気した。次に、化合物 1 7 ( 3 0 g 、 9 7 m m o l ) をマグネシウムに 1 0 分かけてゆっくり加え、この溶液を 6 5 の油浴中に置き、一晚攪拌した。反応は、T L C により、アリコートのアセトンでクエンチし、1 0 : 1 P E : E t O A c 混合物にて R F の変化を観察することによって完了したものと思われた。次に、このグリニャール溶液をカニューレにより、窒素下にさらなる化合物 1 7 ( 3 0 g 、 9 7 m m o l ) を含む三口フラスコに移した。次に、この得られた混合物の入ったフラスコを氷浴中で 0 に冷却した後、L i <sub>2</sub> C u C l <sub>4</sub> 溶液 ( 1 M を 3 m L ) をシリンジで加えた。反応混合物は数分内に濃青色に変わった。この混合物を一晚攪拌した。翌朝、T L C ( 1 0 : 1 P E : E t O A c ) により反応は完了したものと思われ、飽和 N H <sub>4</sub> C l 溶液でクエンチした後、エーテル ( 3 × 2 5 0 m L ) で抽出した。エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮して粗生成物 ( 4 0 g ) を得、これを M e O H に溶かした。次に、濃 H C l ( 0 . 5 m L ) を加えたところ、白色エマルジョン

が形成し、これを3時間攪拌した。次に、白色エマルジョンを濾過し、16g(収率58%)の純粋なジオール、化合物18を得た。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) 1.26 (br s, 24 H), 1.41-1.42 (m, 4 H), 1.51-1.68 (m, 4 H), 3.65 (t, 4 H,  $J = 6.5$  Hz)

【0180】

化合物19 窒素下、乾燥シュレンクフラスコに対称ジオール、化合物18(11g、38.5mmol)を加えた後、ナトリウムから蒸留した乾燥THF(700mL)を加えた。この系を脱気し、フラスコを氷浴中に置いた。ジイソプロピルエチルアミン(6.82mL、42.3mmol)をシリンジで加えた後、 $\text{MsCl}$ (3.96g、34.4mmol)をゆっくり加え、この混合物を1時間攪拌した。反応を飽和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液(300mL)でクエンチした後、 $\text{EtOAc}$ (3×300mL)で抽出した。次に、有機層を合わせ、 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、濃縮し、ジオール、一メシル酸塩および二メシル酸塩の混合物14gを得た。 $\text{NMR}$ は、 $\text{CH}_2\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}$ プロトンの1:0.8混合物を示した。次に、この混合物を乾燥THF(500mL)に溶かし、酸素を除去し、それに $\text{LiBr}$ (3.5g、40.23mmol)を加えた。この混合物を一晩還流させたところで、反応を水(150mL)でクエンチし、 $\text{EtOAc}$ (3×250mL)で抽出した。次に、有機層を $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、濃縮して臭素化生成物の混合物を得、これを次にフラッシュクロマトグラフィー(DCM)により精製し、化合物19(3.1g、収率25%)を白色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.26 (br s, 26 H), 1.38-1.46 (m, 2 H), 1.55 (四重線, 2 H,  $J = 7.5$  Hz), 1.85 (四重線, 2 H,  $J = 7.5$  Hz), 3.403 (t, 2 H,  $J = 6.8$  Hz), 3.66 (t, 2 H,  $J = 6.8$  Hz)

【0181】

化合物20 丸底フラスコに化合物19(2.01g、5.73mmol)を入れ、固体を試薬級アセトン(150mL)に溶かした。同時に、ジョーンズ試薬を、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ (4mL)に $\text{CrO}_3$ (2.25g、22mmol)を溶かした後に10mLの冷水をゆっくり加え、この溶液を10分間攪拌することで作製した。この冷ジョーンズ試薬を丸底フラスコに5分かけてゆっくり加え、その後、この溶液を1時間攪拌した。得られた橙色の溶液は数分以内に緑色になった。次に、この混合物を水(150mL)でクエンチし、エーテル(3×150mL)で2回抽出した。次に、エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、化合物20(2.08g、収率98%)を白色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) 1.27 (br s, 26 H), 1.58-1.71 (m, 2 H), 1.77-1.97 (m, 2H), 2.36 (t, 2 H,  $J = 7.4$  Hz), 3.42 (t, 2 H,  $J = 7$  Hz)

【0182】

化合物21 乾燥シュレンクフラスコにt-ブチルチオール(11.32g、125mmol)を加え、ナトリウムから蒸留した乾燥THF(450mL)を加えた。窒素を通じてこの溶液の酸素を除去した後、フラスコを氷浴中に置いた。次に、ヘキサン中、n-BuLiの溶液(1.6Mを70mL)をシリンジで10分かけてゆっくり加えた。この混合物を1時間攪拌した後、化合物20(5.5g、16.2mmol)を加え、溶液を60で一晩還流させた。翌朝、アリコートの後処理し、 $\text{NMR}$ で分析したところ、反応は完了したものと思われた。反応を $\text{HCl}$ (2Mを200mL)でクエンチし、エーテル(3×250mL)で抽出した。次に、エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濾液を濃縮し、生成物化合物21を白色固体として得た(5g、収率90%)。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) 1.26 (br s, 26 H), 1.32 (br s, 9 H), 1.48-1.70 (m, 4 H), 2.35 (t, 2 H,  $J = 7.3$  Hz), 2.52 (t, 2 H,  $J = 7.3$  Hz)。 $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  24.69, 28.35, 29.05, 29.21, 29.28, 29.39, 29.55, 29.89, 31.02(3C), 33.98, 41.75, 179.60。

【0183】

実施例3 LPAのチオール化類似体を製造するための合成スキーム

本実施例に記載する合成アプローチにより、チオール化LPAの沈殿が得られる。この

L P A 類似体を次に、さらに例えばタンパク質担体などの担体と複合体を形成させ、これをその後、L P A に対して免疫応答を惹起するために動物に投与することができる。このアプローチでは有機化学と酵素反応の双方を用い、合成スキームを図3に示す。以下の合成説明の化合物番号は図3の符番された構造を指す。

#### 【0184】

出発材料は実施例2の化合物15および鏡像異性体的に純粋なグリセロホスホコリン(化合物22)であった。エステル化を促進するためにDCCを用い、これらの2種類の化学物質を合わせると、ジ-アセチル化生成物、化合物23が得られた。1つの合成プロセスの変形形態では、得られたジ-アシル化グリセロホスホコリンをまずホスホリパーゼ-A2で処理して、グリセロール主鎖のSN-2位の脂肪酸を除去し、化合物24を得た。この物質をさらに別の酵素、ホスホリパーゼ-Dで処理してコリンを除去し、化合物26を形成させた。もう1つの合成プロセスの変形形態では、ホスホリパーゼ-D処理の後にホスホリパーゼ-A2処理を行って化合物25を得、その後、化合物25をホスホリパーゼ-Dで処理して化合物26を得る。両変形形態とも同じ生成物ホスファチジン酸誘導体、化合物26が得られる。次に、化合物26のt-ブチル保護基を、まず、トリメチルスルフィドトリプレートを用いて除去して化合物27を得た後、ジスルフィドを還元して所望のL P A 誘導体、化合物28を得る。当業者には分かるであろうが、実施例1に記載されている一連のニトロベンジルスルフェニル反応を用いて化合物28を得ることもできる。

#### 【0185】

化合物23 火炎乾燥させたシュレンクフラスコにチオエーテル酸、化合物15(10g、35.8mmol)、化合物22(グリセロホスホコリン-CdCl<sub>2</sub>複合体、4.25g、8.9mmol)、DCC(7.32g、35.8mmol)およびDMAP(2.18g、17.8mmol)を加え、その後、このフラスコを排気し、窒素を充填した。最少量の乾燥、脱気したDCM(100mL)を加えると、曇りのある混合物となった。このフラスコをホイルで覆った後、TLC(シリカ、10:5:1 DCM:MeOH:濃NH<sub>4</sub>OH)により完了するまで攪拌した。化合物16が不溶性であった場合はそのTLCによるモニタリングをやめたが、Rf0.1の生成物スポットが強度を増さないと判断された際に反応を停止した。これには一般に3~4日を要し、場合によってはDCCおよびDMAPを追加した。完了したところで、反応混合物を濾過し、濾液を濃縮し、黄色油状物を得、上記の溶媒系を用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N-、-CH<sub>2</sub>StBuおよび-CH<sub>2</sub>COO-部分のピーク積分との比較から見積もったところ、化合物23とさらなるアシル化生成物の5:1比の混合物を含んだ3.6g(収率50%)の透明なワックスを得た。HRMS(ESI-TOF)によるこの油状物の分析により、m/z 820.4972、M+Na<sup>+</sup>=C<sub>40</sub>H<sub>80</sub>NNaO<sub>8</sub>PS<sub>2</sub><sup>+</sup>の理論値820.4960に主要イオンが得られた。

#### 【0186】

##### A. 合成変異体1-ホスホリパーゼ-A2処置

化合物24 上記のような化合物23とさらなるアセチル化生成物の混合物(3.1g、3.9mmol)をEt<sub>2</sub>O(400mL)およびメタノール(30mL)に溶かした。ホウ酸塩バッファー(100mL、pH7.4 0.1M、CaCl<sub>2</sub>中0.072mM)、次いで、ホスホリパーゼ-A2(ミツバチ毒液由来、130単位、Sigma)を加えた。得られた混合物を10時間攪拌し、この時点でTLC(シリカ、MeOH:水 4:1-従前の溶媒系10:5:1 DCM:MeOH:濃NH<sub>4</sub>OHは効果的でないことが分かった)は、出発材料(Rf=0.7)は存在せず、新しいスポット(Rf=0.2)が出現したことを示した。有機層と水層を分離し、水層をエーテル(2x250mL)で洗浄した。生成物を水層からDCM:MeOHの混合物(2:1、2x50mL)で抽出した。次に、有機層を回転蒸発により濃縮して生成物を白色ワックス(1.9g、収率86%)として得、NMRは純粋な生成物(化合物24)であることを示した。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 1.25-1.27 (br s, 12 H), 1.31 (s, 9 H), 1.35-1.45 (m,

10

20

30

40

50

2 H), 1.52-1.60 (m, 4 H), 2.31 (t, 2 H, J = 7.5 Hz), 2.51 (t, 2 H, J = 7.5 Hz), 3.28 (br s, 9 H) 3.25-3.33 (br s, 2 H), 3.78-3.86 (m, 1 H), 3.88-3.96 (m, 2 H), 4.04-4.10 (m, 2 H), 4.26-4.34 (m, 2 H)。

H R M S ( E S I - T O F ) によるこのワックスの分析により、 $m/z$  550.2936、 $M + Na^+$ の理論値550.2943 ( $C_{24}H_{50}NNaO_7PS_2^+$ )、および $m/z$  528.3115、 $MH^+$ の理論値528.3124 ( $C_{24}H_{51}NO_7PS_2^+$ )に主要イオンが得られた。

【0187】

分析  $C_{24}H_{50}NO_7PS + 2 H_2O$  (563.73) の理論値: C, 51.13; H, 9.66; N, 2.48。測定値: C, 50.90; H, 9.37; N, 2.76。

【0188】

化合物26 リゾ化合物24 (1.5 g、2.7 mmol) を sec-ブタノール (5 mL) と Et<sub>2</sub>O (200 mL) の混合物に溶かし、得られた曇りのある混合物を曇りが消えるまで音波処理を施した。バッファー (200 mL、pH 5.8、0.2 M NaOAc、0.08 M CaCl<sub>2</sub>)、次いで、キャベツ抽出液 (9 mg タンパク質/mL を含むサボイキャベツからの抽出液 80 mL (ホスホリパーゼ-D 含有)) を加えた。この反応物を1日攪拌し、TLC (C<sub>18</sub> RP SiO<sub>2</sub>、5:1 ACN:水) によりモニタリングし、出発材料と生成物の R<sub>f</sub> はそれぞれ 0.3 および 0.05 であった。この反応を完了させるため、必要に応じて、キャベツ抽出液 (50 mL) を追加し、反応物をさらに1日攪拌した。変換が完了するよう、必要に応じてこの過程をさらに2回繰り返した。反応が完了したところで、混合物をロータリーエバポレーターで濃縮してエーテルを除去した後、EDTA 溶液 (0.5 M、25 mL) を加え、生成物を MeOH:DCM の 5:4 混合物 (300 mL) に抽出した。有機層を濃縮した後、DCM およびアセトンから残渣を再結晶させ、純粋な生成物を得た (0.9 g、収率 75%)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) 1.25-1.27 (br s, 12 H), 1.33 (s, 9 H), 1.52-1.60 (m, 4 H), 2.34 (t, 2 H, J = 7.5 Hz), 2.52 (t, 2 H, J = 7.5 Hz), 3.6-3.8 (br s, 1 H), 3.85-3.97 (br s, 2 H), 4.02-4.18 (m, 2 H)

【0189】

化合物27 保護サンプル LPA、化合物26 (0.150 g、0.34 mmol) をメタノール洗浄し、グローブボックス内のバイアルに加えた。次に、これを AcOH:THF 混合物 (1:1、10 mL) に懸濁させたが、これは1時間の音波処理を行った後でも完全に溶けなかった。その後、固体 [Me<sub>2</sub>SSMe]OTf (0.114 g、0.44 mmol) を加えた。これを18時間攪拌した。反応は、アリコートを取り出し、それを真空下で濃縮乾固させ、その残渣を、硫黄に最も近い CH<sub>2</sub> ピークの <sup>1</sup>H NMR シフトを観察するために CD<sub>3</sub>OD に再溶解または懸濁させることによりモニタリングした。出発材料は 2.52 ppm にピークを持っていたが、この連結で生じた不斉ジスルフィドは 2.7 ppm 前後にピークを持っていた。この材料 (化合物27) は、それ以上単離または特性決定しなかった。

【0190】

化合物28 化合物27 を含有する混合物を水 (100 μL) で、またその直後に PMe<sub>3</sub> (0.11 g、1.4 mmol) で処置した。3時間攪拌した後、溶媒を真空除去し、不溶性の白色固体を得た。メタノール (5 mL) を加え、この混合物を遠心分離し、母液をデカントした。真空濃縮を行い、120 mg (収率 91%) の化合物28 をベージュの固体として得た。化合物28 は、ジスルフィド結合の形成によって例えば、アルブミンまたは KLH などの担体とコンジュゲート可能なチオール化 LPA ハブテンである。化合物28 の特性: <sup>1</sup>H NMR (1:1 CD<sub>3</sub>OD:CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 500 MHz) 1.25-1.35 (br s, 12 H), 1.32-1.4 (m, 2 H), 1.55-1.6 (m, 4 H), 2.34 (t, 2H, J = 7), 2.47 (t, 2H, J = 8.5), 3.89-3.97 (br s, 2 H), 3.98-4.15 (m, 2 H), 4.21 (m, 1H)。メタノールに溶解したサンプルの陰イオン ES は、 $m/z = 385.1$  に主要イオンを生じた。

【0191】

10

20

30

40

50

#### 実施例 4 S 1 P に対する抗体

治療抗体の 1 種は、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、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、有毒な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濃度を低下させる ; ( 2 ) 望ましくない、有毒な、腫瘍形成性または脈管形成性スフィンゴ脂質とそれらの細胞受容体との結合を阻害する、および / またはそのような受容体との結合に利用可能なスフィンゴ脂質の濃度を低下させる、などの有益な作用を達成する。このような治療作用の例としては、限定されるものではないが、利用可能な S 1 P の *in vivo* 血清濃度を低下させ、これにより、S 1 P の腫瘍形成作用および脈管形成作用ならびに *post* - M I 後心不全、癌または繊維形成疾患 ( fibrogenic 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 抗体の使用がある。

10

##### 【 0 1 9 2 】

チオール化 S 1 P ( 図 1 の化合物 1 0 ) は、S 1 P の不可欠な構造的特徴と K L H などの担体部分を架橋することができる反応性基 ( すなわち、スルフヒドリル基 ) を含むように合成された。免疫化に先立ち、標準的なプロトコールを用い、このチオ - S 1 P 類似体を、タンパク質担体 ( 例えば、K L H ) と架橋する I O A または S M C C を介してコンジュゲートさせた。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機能性架橋剤であり、好ましい架橋剤に相当する。

##### 【 0 1 9 3 】

S w i s s W e b s t e r または B A L B - C マウスに、2 か月にわたって 4 回、5 0  $\mu$  g の免疫原 ( S M C C を補助としたチオール化 S 1 P と K L H のコンジュゲート ) を注射により感作させた。2 回目、3 回目および 4 回目の感作の 2 週間後に血清サンプルを採取し、抗 S 1 P 抗体が存在するかどうか直接的 E L I S A によりスクリーニングした。次に、この抗体が高力価を示した動物の脾臓を用い、標準的な融合手順で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するまで増殖させた後、E L I S A 分析のために細胞上清を採取した。感作させた 5 5 匹のマウスのうち、8 匹が良好な応答個体であり、S 1 P に反応性のある抗体の有意な血清力価を示した。次に、確立された手順を用い、これらのマウスの脾臓と骨髓腫細胞を行った。得られた 1 , 5 0 0 のハイブリドーマを次に、直接的 E L I S A によりスクリーニングしたところ、2 8 7 の陽性ハイブリドーマが得られた。直接的 E L I S A によりスクリーニングされたこれら 2 8 7 ハイブリドーマのうち、1 5 9 が有意な力価を示した。この 1 5 9 の各ハイブリドーマを次に、2 4 ウェルプレートに拡張した。拡張したハイブリドーマの細胞馴化培地を次に、目的の抗体を分泌し得る安定なハイブリドーマを特定するために再スクリーニングした。6 0 の最大力価の安定なハイブリドーマに対して競合的 E L I S A 法を行った。

20

30

##### 【 0 1 9 4 】

5 5 匹のマウスおよびほぼ 1 , 5 0 0 のハイブリドーマのうち、1 個のハイブリドーマが、最終的に真のモノクローナル抗体を生成するのに必要とされるような、制限希釈クローニングを正当化した性能特徴を示したことが分かった。このプロセスで 4 7 のクローンが得られ、その大部分が S 1 P 抗体産生陽性であると思われた。これらの 4 7 クローンのうち、6 クローンを 2 4 ウェルプレートに拡張し、その後、競合的 E L I S A 法によりスクリーニングした。陽性を維持していた 4 クローンから、1 クローンを選択し、S 1 P モノクローナル抗体の大規模生産を開始した。S C I D マウスにこれらの細胞を注射し、得られた腹水をタンパク質 A 精製し ( 収率 5 0 % ) 、内毒素レベルを分析した ( < 3 E U / m g ) 。1 回目の腹水生産では、5 0 匹のマウスに注射を行い、計 1 2 5 m L の腹水が得られた。これらの抗体のイソタイプは I g G 1 カッパと分類され、H P L C により純度 > 9 5 % であると推定された。抗体を、1 5 0 m M 塩化ナトリウム ( p H 7 . 2 ) を含む 2 0 m M ナトリウムリン酸中に調製し、- 7 0 ° C で保存した。

40

##### 【 0 1 9 5 】

この陽性ハイブリドーマクローン ( クローン 3 0 6 D 3 2 6 . 2 6 と呼称 ) を A T C C に寄託し ( セーフティ - デポジット - ストレージ - ナンバー S D - 5 3 6 2 ) 、S 1 P

50

に対する最初のネズミ mAb に相当する。このクローンはまた、「ヒト化」抗体変異体の作製に使用可能な抗体重鎖および軽鎖の可変領域、ならびにキメラ抗体の構築に必要な配列情報を含んでいる。

#### 【0196】

S1P 特異的抗体の血清および細胞上清のスクリーニングは、抗体として実施例 1 に記載のチオール化 S1P 類似体（すなわち、化合物 10）を用い、直接的 ELISA によって行った。標準的な ELISA は、一次インキュベーションの際に、50  $\mu$ l のサンプル（血清または細胞上清）を等量の PBS / 0.1% Tween-20 (PBST) に希釈すること以外は、下記のように行った。ELISA は、結合バッファー（33.6 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、100 mM  $\text{NaHCO}_3$ ；pH 9.5）中、BSA とコンジュゲートした化学合成化合物 10 0.1  $\mu$ g をコーティングした 96 ウェル high binding ELISA プレート (Costar) 内で行った。このチオール化 S1P - BSA をこれらの ELISA プレートウェル中で、37  $^{\circ}$ C にて 1 時間、4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。次に、これらのプレートを PBS（137 mM  $\text{NaCl}$ 、2.68 mM  $\text{KCl}$ 、10.14 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ；pH 7.4）で 4 回洗浄し、室温で 1 時間、PBS でブロッキングした。一次インキュベーション工程では、75  $\mu$ l のサンプル（測定する S1P を含む）を、PBST に希釈した 0.1  $\mu$ g / mL の抗 S1P mAb 25  $\mu$ l 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 100  $\mu$ l の 0.1  $\mu$ g / 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 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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、450 nm で測定することにより決定した。

#### 【0197】

交差反応性については、次の変更以外は上記と同様にして競合的 ELISA 法を行った（図 4）。一次インキュベーションは、競合因子（S1P、SPH、LPA など）およびビオチンコンジュゲート抗 S1P mAb からなつた。精製モノクローナル抗体のビオチン化は、EZ-Link Sulfonamide-NHS-ビオチン化キット (Pierce) を用いて行った。ビオチンの組み込みは、キットプロトコールに従って行い、抗体当たりのビオチン分子が 7 ~ 11 個の範囲とした。競合因子は次のように調製した：脂質ストックを音波処理し、アルゴン下で乾燥させた後、DPBS / BSA [DPBS (Invitrogen 14040-133) 中 1 mg / mL 脂肪酸不含 BSA (Calbiochem)] で再構成した。精製抗 S1P mAb を必要に応じて PBS / 0.5% Triton X-100 で希釈した。競合因子および抗体の溶液を、1 部の抗体に対して 3 部の競合因子となるようにともに混合した。シグナル生成のために HRP コンジュゲートストレプトアビジン二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いた。

#### 【0198】

図 4 に示される競合的 ELISA 法データのもう 1 つの側面は、抗 S1P mAb がチオール化 S1P 類似体（化合物 10）と、この競合実験に加えられた天然 S1P を区別することができないということである。このことはまた、この類似体が二重結合を用いずに構築されていることから（実施例 3 に記載の LPA 類似体に関しても同様であるように）、この抗体が酸化生成物を認識しないことを示す。また、この抗 S1P mAb を、室温で 48 時間静置した、二重結合を含む天然産物に対しても試験した。天然 S1P の逆相 HPLC は、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) に従って行ったところ、これらの結果は保持時間に違いはないことを示した。さらに、図 4 に示されている種々の脂質に対するモノクローナル抗体の結合特性を比較すると、この抗体により認識されるエピトープが、天然 S1P の二重結合の領域に炭化水素鎖を含まないことが示された。一方、モノクローナル抗体により認識される

エピトープは、遊離リン酸を伴うスフィンゴシン塩基主鎖上にアミノアルコールを含む領域である。この遊離リン酸がコリンと結合していれば（S P Cの場合）、この結合はいくらも低下する。このアミノ基が脂肪酸へとエステル化されていれば（C 1 Pの場合）、抗体結合は見られない。スフィンゴシンアミノアルコール主鎖がグリセロール主鎖に置換されていれば（L P Aの場合）、S I P特異的モノクローナルは結合を示さない。これらのエピトープマッピングデータは、モノクローナル抗体により認識されるS 1 P上にはただ1つのエピトープが存在すること、およびこのエピトープはS 1 Pの独特な極性頭部基によって定義されることを示す。

#### 【0199】

E L I S A測定を用いた同様の実験で、好適な対照材料を、この抗S 1 Pモノクローナル抗体がタンパク質担体または架橋剤をいずれも認識しなかったことを確認するために評価した。例えば、通常の架橋剤S M C Cは、E L I S Aのレイダウン材料としてのチオール化S 1 PとB S AのコンジュゲーションにおいてI O Aと交換した。I O Aを用いた場合、抗体の結合特性はB S A - S M C C - チオール化S 1 Pを用いた場合とほぼ同一であった。同様に、K L Hはレイダウン材料としてのチオール化S 1 Pと複合体を形成させたタンパク質としてB S Aと交換した。この実験において、抗体の結合特性において有意な違いはなかった。

#### 【0200】

結合速度：S 1 Pとその受容体の結合速度は、脂質の性質のために問題視されてきた。多くの問題が、脂質の不溶性に関連するものであった。B I A c o r e測定では、これらの問題を、S 1 PをB I A c o r eチップに直接固定することで克服した。次に、抗体をチップの表面に流し、光学密度の変化を測定し、抗体とS 1 Pの結合特性を決定した。この抗体の二価結合の性質を回避するため、S 1 Pをチップ上に低密度でコーティングした。さらに、このチップを種々の密度のS 1 P（7、20および1000RU）でコーティングし、抗体結合データを1：1相互作用モデルに包括的に当てはめた。図5は、3種類の異なるS 1 P密度での、モノクローナル抗体とS 1 Pの結合による光学密度の変化を示している。全体として、S 1 Pに対するモノクローナル抗体の親和性は、結合データを分析するために一価結合モデルが用いられたか二価結合モデルが用いられたかによって、およそ88ピコモル（pM）～99nMの範囲で極めて高いと判定された。

#### 【0201】

### 実施例5 S 1 Pモノクローナル抗体の可変ドメインのクローニングおよび特性決定

#### A．導入

生体産物の産生は複雑であり、それは1つにはタンパク質それ自体の変動に関連した複雑性のためである。モノクローナル抗体（mAb）では、変動はタンパク質主鎖またはこれらのグリコシル化タンパク質に結合している炭水化物部分に局在している可能性がある。例えば、ヘテロ性は、選択的ジスルフィド対の形成、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とピログルタメートの環化、ならびに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よるものであり得る。一方、細胞培養中に導入される炭水化物のヘテロ性としては、フコース付加の違い、選択的マンノース分枝結合、および末端シアリル化の存在の違いが含まれる。さらに、グリコシル化パターンを変更するための突然変異誘発を行うことができる。また、酸化も問題の源となる。例えば、組換えヒト化モノクローナル抗体H E R 2は液体組成中で、強い光および高温に曝された際に酸化を受ける。興味深いことに、このような酸化は組成に依存することが報告されており（Lam, et al. (1997), Pharm. Sci., vol. 86: 1250-1255）、組成中にN a C lが存在すれば、充填工程中にステンレス鋼容器またはステンレス鋼部品に接触した後に、高温で酸化の増加が起こるとされている。Fc領域の255番のメチオニン残基が酸化の主要部位であると決定された。組成中の金属イオンおよび過酸化不純物の存在により生じたフリーラジカルにより引き起こされる酸化は、培地にメチオニンおよびチオスルフェートを添加することで消失した。これらの理由で、異種系での発現の増強、プロテアーゼ耐性、凝集の軽減および安定性の増強などの

10

20

30

40

50

それらの特性を改良するため、一般にプロセスエンジニアリングを抗体に適用する。

#### 【0202】

この実施例は、S1Pに対するネズミmAbのクローニングを報告する。この抗体はSphingomab(商標)と呼ばれ、IgG1モノクローナル抗体である。全体的な戦略は、軽鎖(VL)および重鎖(VH)双方のネズミ可変ドメインのクローニングからなる。306D<sub>VH</sub>のコンセンサス配列は、この定常領域フラグメントが2bイソ型に一致することを示す。このネズミ可変ドメインを軽鎖(CL)の定常ドメインと、また、重鎖(CH1、CH2、and CH3)の定常ドメインとともにクローニングし、キメラ抗体構築物を得た。また、Sphingomab(商標)は、CDR2領域の重鎖上の50番のFab領域に遊離システイン残基が存在するために独特である。この残基の置換は、処方および製造工程を大幅に助けるとともに、収率を向上させることができる。実際、抗体分子の生物物理学的特性を改良する試みにおいて、50番のシステイン残基のアミノ酸残基パネルでの置換を、所望の置換を含む一連の構築物を作成することによって行った。これらの構築物を次に、哺乳類細胞で発現させ、種々の抗体変異体をELISAアッセイにおいてS1Pとの結合に関して比較した。キメラ抗体と比較したところ、得られた置換Cys50SerおよびCys50Argを含む突然変異体は、S1Pに対する結合の若干の低下を示したが、CysをPheまたはAlaで置換した場合には、S1Pに対する結合は変化しなかった。

10

#### 【0203】

##### B. 材料および方法

20

##### 1. 抗体遺伝子のクローニング

抗S1Pハイブリドーマ細胞系統306D326.1(ATCC#SD-5362)由来のクローンをDMEM(Glutamax(商標)I、4500mg/L D-グルコース、ピルビン酸ナトリウム; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA、111-035-003)、10%FBS(無菌胎児クローンI、Pebio 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)を含むダルベッコの改変イーグル培地で増殖させた。10<sup>7</sup>ハイブリドーマ細胞から全RNAを、RNeasy Miniキット(Qiagen, Hilden Germany)に基づく手順を用いて単離した。このRNAを用い、製造者のプロトコール(1<sup>st</sup> strand synthesis kit, Amersham Biosciences)に従い、第1鎖cDNAを作製した。

30

#### 【0204】

免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)cDNAを、MHV7プライマー(MHV7: 5'-ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT-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])と組み合わせて用いるPCRにより増幅した。この反応生成物を、TOPO-TAクローニング(登録商標)キットおよび配列を用い、pCR2.1(登録商標)-TOPO(登録商標)ベクター(Invitrogen)に連結した。次に、このベクターから重鎖の可変ドメインをPCRにより増幅し、HindIIIおよびApaIフラグメントとして挿入し、HCMViプロモーター、リーダー配列および-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(同参照)に連結し、プラスミドpG1D200306DVHを作製した。306D<sub>VH</sub>のコンセンサス配列(図6; 配列番号6)は、定常領域フラグメントは、この定常領域フラグメントは2bイソ型と一致していることを示した。

40

#### 【0205】

同様に、免疫グロブリンカップ鎖可変領域(VK)は、MKV20プライマー(5'-GTCTCTGATTCTAGGCA-3'[配列番号7])を定常領域プライマーM

50

KC (5' - ACTGGATGGTGGGAAGATGG - 3' [配列番号8]) と組み合わせて用いて増幅した。この反応生成物を、TOPO-TAクロニング(登録商標)キットおよび配列を用い、pCR2.1(登録商標)-TOPO(登録商標)ベクターに連結した。次に、この軽鎖の可変ドメインをPCRにより増幅した後、BamHIおよびHindIII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定常ドメイン発現ベクター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。

#### 【0206】

重鎖および軽鎖プラスミドpG1D200306DVHおよびpKN100306DVKをDH4a細菌に形質転換し、グリセロール中で保存した。大規模プラスミドDNAを、製造者が記載しているようににて調製した(Qiagen、内毒素不含MAXIPREP(商標)キット)。QiagenのQIAprep Spin MiniprepキットまたはEndoFree Plasmid Mega/Maxiキットを用いて生成した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、これはまた、蛍光シグナルをそれらの対応する核酸塩基配列に翻訳する。プライマーは5'および3'末端において、得られた配列が重複するようにデザインした。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含量が50%であり、推定される二量体または二次構造を含まない。Sphingomab(商標)からのマウスV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列を図6に示す(それぞれ配列番号6および9)。図6では、CDR残基(Kabat, EA (1982), Pharmavol Rev, vol. 34: 23-38参照)を四角で囲み、下記表Iに示す。

#### 【表1】

表1: マウスV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインのマウスSphingomab(商標) CDR配列

VL CDR	CDR
ITTTDIDDDMN (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

#### 【0207】

いくつかのキメラ抗体V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインの完全ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図7に示す。図7では、Kabatの方法(Kabat, et al. (1991), NIH National Technical Information Service, pp. 1-3242)に従って、アミノ酸配列を符番し、CDRを特定した。

#### 【0208】

##### 2. COS7の発現

非ヒト哺乳類系における抗体発現では、各プラスミド10μgを用い、エレクトロポレーション(10<sup>7</sup>細胞/ml 10.7ml)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COS7にトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を8mlの増殖培地で4日平板培養した。キメラ306DH1x306DVK-2抗体は、一時的同時トランスフェクトCOS細胞馴化培地にて1.5μg/mlで発現された。この抗体とS1Pの結合を、S1PELISAを用いて測定した。

#### 【0209】

キメラ抗体の発現レベルは、次のようにして定量的ELISAで測定した。マイクロタ

イタープレート(Nunc MaxiSorp immunoplate, Invitrogen)を、P B Sに希釈した0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ヤギ抗ヒトI g G抗体(Sigma, St. Louis, MO)の100  $\mu\text{L}$  アリコートでコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。次に、これらのプレートを200  $\mu\text{L}$  / ウェルの洗浄バッファー(1  $\times$  P B S、0.1% T W E E N)で3回洗浄した。各希釈血清サンプルまたは融合物上清のアリコート200  $\mu\text{L}$  を、毒素をコーティングしたプレートに移し、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 軽鎖ペルオキシダーゼコンジュゲート(Jackson Immuno Research)を各ウェルに1:5000の希釈率で加えた。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、150  $\mu\text{L}$  のK - B L U E基質(Sigma)を各ウェルに加え、暗所、室温で10分間インキュベートした。50  $\mu\text{L}$  のR E D S T O P溶液(SkyBio Ltd.)を加えることで反応を停止させ、マイクロプレートリーダー3550(Bio-Rad Laboratories Ltd.)を用い、655 nmで吸収を測定した。これらの抗体結合実験からの結果を図8に示す。

【0210】

### 3.293Fの発現

ヒト系における抗体発現では、293フェクチン(Invitrogen)を用い、ヒト胚腎臓細胞系統293F(Invitrogen)にプラスミドをトランスフェクトし、培養に293F-Free Style Media(Invitrogen)を用いた。軽鎖および重鎖プラスミドを双方とも0.5  $\text{g}/\text{mL}$  でトランスフェクトした。トランスフェクションは $10^6$ 細胞/ $\text{mL}$ の細胞密度で行った。トランスフェクション3日後、25℃で5分間、1100 rpmで遠心分離することにより上清を採取した。発現レベルを定量的E L I S A(下記参照)により定量したところ、キメラ抗体では $\sim 0.25 \sim 0.5 \text{ g}/\text{m}$ と多様であった。

【0211】

### 4.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)を、1M炭酸バッファー(pH 9.5)に希釈したウサギ抗マウスI g G、F(a b')<sub>2</sub>フラグメント特異的抗体(Jackson Immuno Research)またはウサギ抗ヒトI g G F(a b')<sub>2</sub>フラグメント特異的抗体(Jackson Immuno Research)で、37℃にて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 - 20で、37℃にて1時間ブロックした。一次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(較正曲線に使用)の希釈液および測定サンプルをウェルに加えた。プレートを洗浄し、ウェル当たり100  $\mu\text{L}$  の1:40, 000希釈H R Pコンジュゲートヤギ抗マウス(H + L)(Jackson Immuno Research)または1:50, 000希釈H R Pコンジュゲートヤギ抗ヒト(H + L)(Jackson Immuno Research)とともに37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、この酵素反応をテトラメチルベンジジン(Sigma)で検出し、1 M H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>を加えることで停止させた。Thermo Multiskan EXを用い、450 nmで光学密度(O D)を測定した。生データを分析のためG r a p h P a dソフトウェアに移した。

【0212】

### 5.直接的E L I S A

マイクロタイターE L I S Aプレート(Costar)を、1M炭酸バッファー(pH 9.5)に希釈したS 1 Pで一晩、37℃にて1時間コーティングした。プレートをP B S(137 mM N a C l、2.68 mM K C l、10.1 mM N a<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub>、1.76 mM K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>; pH 7.4)で洗浄し、P B S / B S A / T w e e n - 20で、室温にて1時間または4℃にて一晩ブロックした。一次インキュベーション(室温で1時間)では、抗S 1 P m A bおよび結合に関して試験するサンプルを用いた標準曲線を、次の希釈セット: 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.0125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ および0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて構成し、100  $\mu\text{L}$ を各ウェルに加えた。プレートを洗浄し、ウェル当たり100  $\mu\text{L}$ のH R Pコンジュゲートヤギ抗マウス(1:20, 000希釈)(Jackson Immuno Research)または1:50, 000希釈H R Pコンジュゲートヤギ抗ヒト(H + L)(Jackson Immuno Research)とともに室温で1時間インキュベートした。洗浄した後、この酵素反応をテトラメチルベンジジン

10

20

30

40

50

(Sigma)で検出し、1 M  $H_2SO_4$ を加えることで停止させた。Thermo Multiskan EXを用い、450 nmで光学密度(OD)を測定した。生データを分析のためGraphPadソフトウェアに移した。

【0213】

以下の表2は、変異株とキメラ抗体の比較分析を示す。これらの結果を作製するため、結合抗体を、HRPにコンジュゲートさせたマウスまたはヒトIgGに特異的な二次抗体により検出した。この発色反応を測定し、光学密度(OD)として報告した。抗体パネルの濃度は0.1  $\mu g/ml$ とした。二次抗体とS1Pコーティングマトリックスの相互作用だけを検出した。

【表2】

表2:

可変ドメイン	突然変異	プラスミド	結合
HC	キメラ	pATH50 + pATH 10	1.5
	CysAla	pATH50 + pATH11C1 pATH50 + pATH 12C	2
	CysSer	2	0.6
	CysArg	pATH50 + pATH14C1	0.4
	CysPhe	pATH50 + pATH16C1	2
LC	MetLeu	pATH53C1 + pATH10	1.6

10

20

【0214】

実施例6 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異なる重鎖および/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異なる分子、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))。

30

【0215】

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、CH1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9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。

40

【0216】

図9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(33.6 mM  $Na_2CO_3$ 、100 mM  $NaHCO_3$ ; pH 9.5)中、

50

B S A にコンジュゲートさせた  $0.1 \mu\text{g}$  の化学合成チオール化 S 1 P 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 S 1 P - B S A を E L I S A 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 P B S (  $137 \text{ mM NaCl}$ 、 $2.68 \text{ mM KCl}$ 、 $10.14 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.76 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  ;  $\text{pH } 7.4$  ) で 4 回洗浄し、P B S T 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、 $75 \mu\text{L}$  のサンプル (測定する S 1 P を含む) を、P B S T に希釈した  $0.1 \mu\text{g/mL}$  抗 S 1 P モノクローナル抗体  $25 \mu\text{L}$  とともにインキュベートし、E L I S A 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、E L I S A プレートを P B S で 4 回洗浄し、ウェル当たり  $100 \mu\text{l}$  の  $0.1 \mu\text{g/mL}$  H R P 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 P B S 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  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  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、E L - X - 800 E L I S A プレートリーダー (Bio-Tech) を用い、 $450 \text{ nm}$  で測定することにより決定した。

10

## 【0217】

実施例 4 に記載の実験に関する場合と同様に、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 (すなわち、上清) の抗体力価を測定する好ましい方法は、B S A などのタンパク質担体と供給結合された標的リガンド (例えば、S 1 P、L P A などのチオール化類似体) で E L I S A プレートをコーティングすることを含む。

20

## 【0218】

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、L P A、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。

## 【0219】

実施例 7 スフィンゴシンキナーゼ (S P H キナーゼ) に関する抗体に基づくアッセイ

スフィンゴシンキナーゼ (S P H キナーゼまたは S P H K) は、S P H から S 1 P への変換を触媒する。ヒト S P H - キナーゼをコードする遺伝子配列は既に記載されている (Melendez et al., Gene 251:19-26, 2000)。S P H キナーゼの 3 つのヒトホモログ (S K A、S K B および S K C) も記載されている (公開 P C T 特許出願 W O 0 0 / 5 2 1 7 3)。ネズミ S P H キナーゼはもまた記載されている (Kohama et al., J. Biol. Chem. 273:23722-23728, 1998; および公開 P C T 特許出願 W O 9 9 / 6 1 5 8 1)。公開 P C T 特許出願 W O 9 9 / 6 1 5 8 1 は、スフィンゴシンキナーゼをコードする核酸を報告している。公開 P C T 特許出願 W O 0 0 / 5 2 1 7 3 は、スフィンゴシンキナーゼのホモログをコードする核酸を報告している。他の S P H キナーゼもまた報告されている。例えば、Pits on et al., Biochem J. 350:429-441, 2000; 公開 P C T 出願 W O 0 0 / 7 0 0 2 8; Liu et al., J. Biol. Chem., 275:19513-19520, 2000; P C T / A U 0 1 / 0 0 5 3 9 (W O 0 1 / 8 5 9 5 3 として公開); P C T / U S 0 1 / 0 4 7 8 9 (W O 0 1 / 6 0 9 9 0 として公開); および P C T / E P 0 0 / 0 9 4 9 8 (W O 0 1 / 3 1 0 2 9 として公開) 参照。

30

40

## 【0220】

S P H キナーゼの阻害剤としては、限定されるものではないが、N, N - ジメチルスフィンゴシン (Edsall et al., Biochem. 37:12892-12898, 1998); D - スレオ - ジヒドロスフィンゴシン (Olivera et al., Nature 365:557-560, 1993); およびスフィンゴイド塩基 (Jonghe et al., "Structure-Activity Relationship of Short-Chain Sphingoid Bases As Inhibitors of Sphingosine Kinase", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9:3175-3180, 1999) が含まれる。

50

## 【0221】

これらのおよびその他の、または可能性のあるS P Hキナーゼ阻害剤を評価するのに有用なS P Hキナーゼのアッセイとしては、Olivera et al., *Methods in Enzymology*, 311:215-223, 1999; Caligan et al., *Analytical Biochemistry*, 281:36-44, 2000に記載されているものがある。

## 【0222】

S P Hキナーゼの阻害は、その基質であるS P Hの蓄積をもたらし、このS P Hは、S 1 P同様に、ある条件において望ましくないスフィンゴ脂質となり得ると考えられる。これらの望ましくない作用を回避または軽減するため、(i) 酵素が反応生成物としてS 1 Pを生じるもの(例えば、セラミドシンターゼなど、下記参照)ではない限り、S P Hを基質として用いる酵素を刺激する薬剤、または(ii) S P Hを生成物として生じる酵素を阻害する薬剤を投与することができる。

10

## 【0223】

特定の方法に限定されるものではなく、抗S 1 P抗体(例えば、モノクローナル抗S 1 P抗体)は、S P Hキナーゼ活性の*in vitro*アッセイの試薬としても使用可能である。例えば、精製S P H Kを、P B Sおよびキナーゼの基質であるS P H(例えば、脂肪酸不含B S Aと複合体を形成)の存在下、マイクロタイタープレートのウェルに加えることができる。次に、生じた反応生成物S 1 Pに対し、抗S 1 P抗体(例えば、上記実施例4のモノクローナル抗S 1 P抗体)を用い、E L I S Aを行うことができる。このようなアッセイでは、試験化合物によるS P H Kの阻害の結果、S P H K阻害化合物を含まない対照反応よりも低いレベルのS 1 Pを生じる。このようなアッセイはハイスループット向けに構成することができ、従って、S P H K活性のモジュレーターの高スループットスクリーニングアッセイの基礎として役立つ。

20

## 【0224】

実施例8 S 1 PリアーゼまたはS P P活性に関する抗体に基づくアッセイ

S 1 Pを分解する反応(すなわち、反応物としてS 1 Pを利用する反応)を触媒する酵素を刺激すると、S 1 P分子の分解の刺激が起こる。このような酵素としては、限定されるものではないが、下記のものに含まれる。

## 【0225】

S - 1 - Pリアーゼ: S 1 Pリアーゼは、S 1 Pからエタノールアミン - P ( t - 2 - ヘキサデカナルとしても知られる ) およびパルミトアルデヒドへの変換を触媒する (Veldhoven et al., *Adv. Lipid Res.* 26:67-97, 1993; Van Veldhoven, *Methods in Enzymology*, 311:244-254, 1999)。酵母(Lanterman et al., *Biochem. J.* 332:525-531, 1998)、ネズミ(Zhou et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242:502-507, 1998)、およびヒト(公開P C T特許出願W O 9 9 / 3 8 9 8 3) S 1 Pリアーゼ遺伝子が報告されている。公開P C T特許出願W O 9 9 / 1 6 8 8 8は、S 1 PリアーゼD N Aおよびタンパク質配列を報告している。米国特許第6, 187, 562号および公開P C T特許出願W O 9 9 / 3 8 9 8 3もまた、S 1 Pリアーゼを報告している。

30

## 【0226】

そのリアーゼを活性化し、またはそれをコードする遺伝子の発現を増強する小分子化合物を発見するための機能獲得アッセイを開発することができる。特定の方法に限定されるものではなく、*in vitro*または細胞に基づく形式において、加えられたS P HからのS 1 Pの産生を測定するE L I S A形式で抗S 1 P抗体を使用することができる。直接的に酵素において、または間接的にその酵素をコードする遺伝子の発現レベルを高めることによって(例えば、遺伝子活性化、S 1 Pリアーゼm R N Aの安定性の増大などによる) S 1 Pリアーゼ活性を刺激することが確認された化合物はさらに検討することができ、化合物がそれ自体、S 1 Pレベルが毒性に関連している患者におけるS 1 Pの細胞外濃度の低下、例えば、癌、新血管および脳血管疾患、自己免疫障害、炎症性障害、脈管形成、繊維性疾患および加齢性黄斑変性の処置などに有用であることが分かる可能性がある。

40

## 【0227】

50

S 1 Pホスファターゼ： S 1 Pホスファターゼ（S P Pホスホヒドロラーゼとしても知られる）は、S - 1 - Pからスフィンゴシンへの変換を触媒する哺乳類酵素である(Mandala et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95:150-155, 1998; Mandala et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 97:7859-7864, 2000; Mandala, Prostaglandins & other Lipid Mediators, 64:143-156, 2001; Brindley et al., Methods in Enzymology, 311:233-244, 1999)。2種のS - 1 - Pホスファターゼ、L B P 1とL B P 2が酵母から単離されている(Mandala et al., J. Biol. Chem. 272:32709-32714, 1997) ; P C T / U W 0 1 / 0 3 8 7 9 ( W O 0 1 / 5 7 0 5 7として公開)。

#### 【0228】

S 1 Pリアーゼの場合と同様に、S 1 Pホスファターゼを活性化する、またはそれをコードする遺伝子の発現を増強する化合物を発見するための機能獲得アッセイを開発することができる。例えば、in vitroまたは細胞に基づく形式において、加えられたS P HからのS 1 Pの産生を測定するE L I S A形式で抗S 1 P抗体を使用することができる。直接的に酵素において、または間接的にその酵素をコードする遺伝子の発現レベルを高めることによって（例えば、遺伝子活性化、S 1 Pホスファターゼm R N Aの安定性の増大などによる）S 1 Pホスファターゼ活性を刺激することが確認された化合物はさらに検討することができ、化合物がそれ自体、S 1 Pレベルが毒性に関連している患者におけるS 1 Pの細胞外濃度の低下、例えば、癌、新血管および脳血管疾患、自己免疫障害、炎症性障害、脈管形成、繊維性疾患および加齢性黄斑変性の処置などに有用であることが分かる可能性がある。

#### 【0229】

#### 実施例9 L P Aに対するモノクローナル抗体の産生および特性決定 抗体の産生

天然L P Aに対するポリクローナル抗体は文献で報告されているが(Chen JH, et al., Bioorg Med Chem Lett. 2000 Aug 7;10(15):1691-3)、モノクローナル抗体についての記載はない。実施例4に記載されているものと同様のアプローチを用い、L P Aに対するモノクローナル抗体、架橋剤としてI O AまたはS M C Cのいずれかを用いた標準的な化学的架橋による、反応性S H基とタンパク質担体(K L H)を介した類似体の架橋により形成されたハプテンの鍵成分としてのC - 1 2チオ - L P A類似体(実施例3の化合物28)を作製した。これを行うため、抗S 1 Pモノクローナル抗体の作製に関して実施例4に記載されている方法を用い、マウスをチオ - L P A - K L Hハプテン(この場合、チオール化L P A : S M C C : K L H)で免疫化した。L P A単独に対して免疫化した80匹のマウスのうち、L P Aに対して最高の力価を示した(ハプテンに用いたものと同じL P A類似体(化合物28)を、S M C Cを用いてB S Aにコンジュゲートし、E L I S Aプレート上にレイダウンしたE L I S Aを用いて測定)5匹を、開発のハイブリドーマ段階に移行するために選択した。

#### 【0230】

これら5匹の動物からの脾臓を採取し、標準的技術によりハイブリドーマを作製した。要するに、1匹のマウスがハイブリドーマ細胞系統となった(504Aと呼称)。504A系統の平板培養した全てのハイブリドーマのうち、66がこれまでに記載したスクリーニングE L I S Aにより測定したところ、抗体産生陽性を示した。

#### 【0231】

下記の表3は、チオール化L P A類似体がヘテロ二機能性架橋剤を用いてK L Hに架橋されたL P A類似体ハプテンに反応した2匹のマウスの脾臓から作製したハイブリドーマ抗体の細胞上清の抗体力価を示す。これらのデータは、抗L P A抗体が架橋剤ともタンパク質担体とも反応しないことを示している。重要なこととしては、これらのデータは、ハイブリドーマがL P Aに対する抗体を産生するが、S 1 Pに対する抗体は産生しないことを示している。

10

20

30

40

50

10

【表3】

表3：LPAハイブリドーマ

マウス番号	3回目の放血力価 1:312,500でのOD	24ウェルからの 上清	LPA結合 1:20でのOD	SIP結合 1:20でのOD	交差反応性 w/ SIP*
1	1.242	1.A.63	1.197	0.231	低
		1.A.65	1.545	0.176	無
2	0.709	2.B.7	2.357	0.302	低
		2.B.63	2.302	0.229	低
		2.B.83	2.712	0.175	無
		2.B.104	2.57	0.164	無
		2.B.1B7	2.387	0.163	無
		2.B.3A6	2.227	0.134	無

\*24ウェル上清からのSIPとの交差反応性

高=OD &gt; 1.0-2.0 [1:20]

中= OD 0.4-1.0 [1:20]

低= OD 0.4-0.2 [1:20]

無= OD &lt; 0.2 OD [1:20]

20

## 【0232】

マウスにおける抗LPA mAbの発生は、ELISA(12:0および18:1 LPAとの直接結合および競合ELISA)によりモニタリングした。免疫化したマウスの少なくとも半数に有意な免疫応答が見られ、最高の抗体力価を有する5匹を、脾臓融合後のハイブリドーマ細胞系統の開発を開始するために選択した。

30

## 【0233】

これら5つの融合物から作製された2000を超えるハイブリドーマ細胞系統の初期スクリーニングの後、計29の抗LPA分泌ハイブリドーマ細胞系統が18:1 LPAに高い結合を示した。これらのハイブリドーマ細胞系統のうち、24をさらにサブクローニングし、ELISAアッセイパネルで特性決定した。陽性を維持していた24クローンから、6つのハイブリドーマクローンをさらなる特性決定のために選択した。それらの選択は、より優れた生化学的および生物学的特性に基づくものであった。

## 【0234】

直接的結合速度

6つの抗LPA mAb(B3、B7、B58、A63、B3A6、D22)と12:0および18:1 LPA(0.1 μM)との結合をELISAにより測定した。EC<sub>50</sub>値を、6段階の漸増濃度のmAb(0~0.4 μg/ml)を用いた滴定曲線から算出した。EC<sub>50</sub>は、最大結合の50%を示す有効抗体濃度を表す。Maxは最大結合を示す(OD 450として表示)。結果を表4に示す。

40

## 【表4】

表4 抗LPA mAbの直接的結合速度

		B3	B7	B58	D22	A63	B3A6
12:0 LPA	EC <sub>50</sub> (nM)	1.420	0.413	0.554	1.307	0.280	0.344
	Max (OD450)	1.809	1.395	1.352	0.449	1.269	1.316
18:1 LPA	EC <sub>50</sub> (nM)	1.067	0.274	0.245	0.176	0.298	0.469
	Max (OD450)	1.264	0.973	0.847	0.353	1.302	1.027

## 【0235】

速度パラメーター  $k_a$  (結合速度定数)、 $k_d$  (解離速度定数) および  $K_D$  (結合平衡定数) を、BIAcore 3000 Biosensor 装置を用い、6つの主要候補について測定した。この研究では、LPAはセンサー表面に固定し、抗LPA mAbは表面を横切る溶液に浮遊させた。示されているように、6種類全てのmAbはLPAと、0.34 ~ 3.8 pMの範囲の同等の  $K_D$  値、および同等の速度パラメーターで結合する。

10

## 【0236】

抗LPAネズミmAbはLPAと高親和性を示す

LPAは、150共鳴単位の範囲の密度でセンサーチップに固定した。各mAbに固定したLPAに通し、結合/解離相の非線形回帰により速度定数を得た。誤差は、2反復の試験の少なくとも3回の測定を用い、標準偏差として示す。見掛けの親和性を  $K_D = k_a / k_d$  により求めた。 $k_a$  = 結合速度定数 ( $M^{-1} s^{-1}$ )  $k_d$  = 解離速度定数 ( $s^{-1}$ )

20

## 【表5】

表5 LPAに対する抗LPA mAbの親和性

mAbs	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
A63	$4.4 \pm 1.0 \times 10^5$	$1 \times 10^{-6}$	$2.3 \pm 0.5$
B3	$7.0 \pm 1.5 \times 10^5$	$1 \times 10^{-6}$	$1.4 \pm 0.3$
B7	$6.2 \pm 0.1 \times 10^5$	$1 \times 10^{-6}$	$1.6 \pm 0.1$
D22	$3.0 \pm 0.9 \times 10^4$	$1 \times 10^{-6}$	$33 \pm 10$
B3A6	$1.2 \pm 0.9 \times 10^6$	$1.9 \pm 0.4 \times 10^{-5}$	$16 \pm 1.2$

30

## 【0237】

6種類の抗LPA mAbの特異性プロフィール

LPAの多くのイソ型に生物活性があることが確認されており、mAbは治療上関連のあるある範囲のそれらを全て認識することが好ましい。抗LPA mAbの特異性は、抗体が固定化された脂質混合物に競合因子としての脂質を加えた競合アッセイを用いて評価した。6種類のmAbを用い、それらの特異性を評価するため、競合ELISAアッセイを行った。18:1 LPAをELISAプレートに捕捉した。各競合因子としての脂質(最大10  $\mu M$ )をBSA(1 mg/ml) ~ PBSで連続希釈した後、mAb(3 nM)でインキュベートした。次に、混合物をLPAコーティングウェルに移し、結合抗体の量を、二次抗体を用いて測定した。データを最大シグナル( $A_{450}$ )に対してノーマライズし、阻害率%として示す。アッセイは3反復で行った。IC<sub>50</sub>: 最大半分阻害濃度; MI: 最大阻害(阻害剤の不在下での結合%); ---: 阻害が弱いので評価せず。高い阻害結果は、抗体による競合因子としての脂質の認識を示す。表6に示されるように、全ての抗LPA mAbが異なるLPAイソ型を認識した。

40

【表 6】

表 6 6 種類の抗 L P A m A b の特異性プロフィール

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

10

## 【 0 2 3 8 】

興味深いことに、抗 L P A m A b は、1 2 : 0 (ラウロイル)、1 4 : 0 (ミリストイル)、1 6 : 0 (パルミトイル)、1 8 : 1 (オレオイル)、1 8 : 2 (リノレオイル) および 2 0 : 4 (アラキドノイル) L P A 間で識別可能であった。E C<sub>50</sub> のランク順は不飽和脂質では 1 8 : 2 > 1 8 : 1 > 2 0 : 4、飽和脂質では 1 4 : 0 > 1 6 : 0 > 1 8 : 0 であった。高い特異性を有する m A b が最終的な薬剤開発に望ましい。抗 L P A m A b の特異性を、ジステアロイル - ホスファチジン酸、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 - リン酸などの L P A 関連生体脂質との結合に関して評価した。これら 6 種類の抗体のうち、L P A の直前の代謝前駆体であるジステアロイル P A および L P C と交差反応性を示すものはなかった。

20

## 【 0 2 3 9 】

#### 実施例 1 0 抗 L P A モノクローナル抗体の抗癌活性 癌細胞の増殖

L P A は、G P C R 受容体を介した G<sub>i</sub>、G<sub>q</sub> および G<sub>12/13</sub> の刺激および下流シグナル伝達の活性化により、細胞の生存および増殖を支える強力な増殖因子である。細胞系統を L P A ( 0 . 0 1 m M ~ 1 0 m M ) に対するそれらの増殖応答に関して試験した。細胞増殖を Chemicon ( Temecula CA ) 製の細胞増殖アッセイキット ( P a n c - 1 ) および Pierce 製の C e l l - B l u e 力価 ( C a k i - 1 ) を使用することによりアッセイした。各データ点は、3 回の独立した実験の平均である。L P A は、S K O V 3 および O V C A R 3 ( 卵巣癌 )、P a n c - 1 ( 膵臓癌 )、C a k i - 1 ( 腎臓癌細胞 )、D U - 1 4 5 ( 前立腺癌 )、A 5 4 9 ( 肺癌 ) および H C T - 1 1 6 ( 結腸直腸腺癌 ) 細胞を含む 7 つのヒト由来腫瘍細胞系統ならびに 1 つのラット由来腫瘍細胞系統、R B L - 2 H 3 ( ラット白血病細胞 ) の増殖を用量依存的に増大させた。腫瘍由来細胞が通常、高い基底レベルの増殖を持っているとしても、L P A はほとんどの腫瘍細胞系統で増殖をさらに増大させることが明らかである。抗 L P A m A b ( B 7 および B 5 8 ) を、選択されたヒト癌細胞系統において L P A により誘発される増殖を阻害する能力に関して評価した。この L P A により誘発される増殖の増大は、抗 L P A m A b の添加により軽減されることが示された。

30

## 【 0 2 4 0 】

#### 抗 L P A m A b は腫瘍細胞を化学療法薬に対して増感させる

临床上適切なレベルの化学療法薬パクリタキセル ( タキソール ) に曝された際の、L P A の、アポトーシスから腫瘍細胞を保護する能力を調べた。S K V O 3 細胞を 1 % F B S ( S )、タキソール ( 0 . 5 m M )、+ / - 抗 L P A m A b で 2 4 時間処理した。L P A は、タキソールにより誘発されるアポトーシスから S K V O 3 細胞を保護した。アポトーシスは、製造者 ( Promega ) が推奨するようにカスパーゼ活性の測定によりアッセイした。予測通り、L P A は狂死したほとんどの癌細胞系統を、タキソールに誘発される細胞死から保護した。L P A 応答細胞の選択に抗 L P A 抗体を加えた場合、この抗 L P A 抗体は、細胞傷害性化学療法薬により誘発された細胞死から細胞を保護する L P A の能力を遮断した。さらに、この抗 L P A 抗体は、血清によりもたらされる保護を取り除くことができ

40

50

た。血清は約 5 ~ 20 mM の L P A を含むと見積もられる。S K O V 3 細胞におけるタキソールにより誘発されるカスパーゼ - 3 , 7 の活性化および細胞への血清の添加は細胞をアポトーシスから保護した。タキソールにより誘発されるカスパーゼ活性化は 3 種類全ての抗 L P A m A b を培養培地に加えることで増強された。このことは、L P A の保護作用および抗アポトーシス作用が血清中に存在する L P A の、選択抗体により媒介される中和によって取り除かれたことを示唆する。

#### 【 0 2 4 1 】

##### 抗 L P A m A b は L P A により媒介される腫瘍細胞の移動を阻害する

転移癌の重要な特徴は、腫瘍細胞が接触阻害から逃れ、それらの起源組織から移動するという点である。L P A は、いくつかの癌細胞種において転移能を増進することが示されている。従って、本発明者らは、細胞単層スクラッチアッセイを用いることで、数種のヒト癌細胞系統で、抗 L P A m A b の、L P A 依存性細胞移動を遮断する能力を調べた。細胞を 96 ウェルプレートに播種し、密集するまで増殖させた。24 時間飢餓状態にした後、ウェルの中央をピペットチップで掻き取った。当技術分野で認知されている「スクラッチアッセイ」では、細胞は、細胞単層におけるスクラッチ傷に対して、スクラッチ部に向かって移動することによる定型的な様式で応答し、その傷を閉じる。移動および傷の封鎖の進行を、所望の時点での 10 倍デジタル写真でモニタリングする。細胞は無処理 ( N T )、L P A ( 2 . 5 m M ) 処理または w / o m A b B 7 ( 10 μ g / m l ) 処理または非特異的抗体に適合するイソ型 ( N S ) ( 10 μ g / m l ) 処理であった。無処理細胞では、スクラッチの後に単層境界間に大きなギャップが残る。これに対し、L P A 処理細胞では、同じ時点で小さなギャップしか残っておらず、少数の細胞でギャップ間の接触が形成されている。L P A と抗 L P A 抗体 B 7 の双方で処理した細胞では、この時点でのギャップは L P A のみで処理した場合よりも数倍大きかったが、無処理の対照細胞ほど大きくはなかった。このことは、抗 L P A 抗体が L P A により刺激される腎細胞癌 ( C a k i - 1 ) 細胞の移動に対して阻害作用を持っていたことを示す。m A b s B 3 および B 5 8 でも同様のデータが得られた。このことは、抗 L P A m A b が、転移癌腫に元々由来する細胞系統の、L P A により媒介される移動を軽減し得ることを示す。

#### 【 0 2 4 2 】

##### 抗 L P A m A b は腫瘍細胞からの腫瘍形成促進サイトカインの放出を阻害する

L P A は、増殖促進性の腫瘍微小環境をもたらす、脈管形成を促進することにより、癌の確立および進行に関与している。特に、I L - 8 および V E G F などの増殖促進因子の増加が癌細胞で見られている。I L - 8 は癌の進行および予後に強く関連づけられている。I L - 8 は、新血管新生の促進および好中球および内皮細胞の走化性の誘発を介して癌においてその作用を発揮し得る。さらに、I L - 8 の過剰発現は、多くのヒト癌種における薬剤耐性表現型の発生に関連づけられている。

#### 【 0 2 4 3 】

3 種類の抗 L P A m A b ( B 3、B 7 および B 5 8 ) を、in vitro I L - 8 生産におけるそれらの低減能を非特異的抗体 ( N S ) と比較して調べた。C a k i - 1 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、密集するまで増殖させた。一晚、血清飢餓状態にした後、細胞を、抗 L P A m A b B 3、B 7、B 5 8 または N S ( 非特異的 ) と伴って、または伴わずに 18 : 1 L P A ( 0 . 2 m M ) で処理した。24 時間後、漸増濃度の抗 L P A m A b B 3、B 7 および B 5 8 の存在下、L P A 処理を行った、または行わなかった腎臓癌細胞 ( C a k i - 1 ) の培養上清を採取し、市販の E L I S A キット ( Human Quantikine Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN ) を用い、I L - 8 レベルを分析した。抗 L P A m A b で前処理した細胞では、I L - 8 発現は用量依存的に有意に低下したが ( 0 . 1 ~ 30 μ g / m l m A b )、無処理細胞において、L P A は I L - 8 の発現を平均 100 % 増加させた。他の周知の脈管形成促進因子 V E G F でも同様の結果が得られた。抗 L P A m A b による I L - 8 放出の阻害はまた、膵臓細胞系統 P a n c - 1 などの他の癌細胞系統でも見られた。これらのデータは、脈管形成促進因子放出の遮断はこれらの抗 L P A m A b の付加的で潜在的に重要な作用であることを示唆する。

## 【0244】

抗LPA mAbはin vivoにおいて脈管形成を阻害する

抗LPA mAb (B7)の1つを、マトリゲルプラグアッセイを用い、in vivoにおける、その脈管形成軽減能に関して調べた。このアッセイでは、ネズミ腫瘍に由来する基底膜を含む腫瘍残物の特許混合物マトリゲルを用いる。マトリゲルまたはその誘導体growth factor-reduced (GFR) マトリゲルを動物に皮下注射し、固化させて、「プラグ」を形成させる。置床前にこのマトリックスに脈管形成促進因子を混合すれば、このプラグは血管内皮細胞の侵入を受け、やがて血管が形成する。マトリゲルは単独で調製するか、あるいは組換え増殖因子 (bFGF、VEGF) または腫瘍細胞と混合して、その後、6週齢のヌード (NCr Nu/Nu) 雌マウスの側腹部に皮下注射することができる。この実施例では、Caki-1 (腎臓癌) 細胞をマトリゲル内に導入し、十分なレベルのVEGFおよび/またはIL8およびLPAを産生させる。マトリゲル移植1日前からはじめて3日ごとに、生理食塩水または10mg/kgの抗LPA mAb-B7で処理したマウス由来のCaki-1細胞 $5 \times 10^5$ 個を含むマトリゲルプラグを作製した。プラグの内皮CD31を染色した後、プラグ内に形成された微小血管構造の定量を行った。定量データは、3プラグからの1切片当たりの少なくとも16視野の平均 $\pm$ SEMであった。抗LPA mAb B7で処理したマウスからのプラグは、CD31に対する内皮染色によりアッセイされるように、生理食塩水処理マウスのプラグに比べ、血管形成に著しい低下を示した。染色された血管の定量は、生理食塩水処理動物に比べ、mAb B7処理動物のCaki-1含有プラグでの脈管形成に50%を超える低下を示す。これは、抗LPA mAb処置の結果としての、腫瘍細胞の脈管形成における統計学的に有意な低下であった (スチューデントのT検定により判定したところ、生理食塩水に対するmAb B7は $p < 0.05$ )。

10

20

## 【0245】

抗LPA mAbは腎臓および膵臓異種移植片において腫瘍進行を低下させる

抗LPA抗体は、多様なヒト腫瘍細胞系統において、LPAにより誘発される腫瘍細胞増殖、移動、細胞死からの保護およびサイトカインの放出の低減に有効であることが示されている (上記)。次に、mAb B58およびB7を腎臓癌および膵臓癌の異種移植モデルで試験した。以下は、この抗LPA抗体アプローチの可能性のある抗腫瘍形成作用を示す予備的結果である。

30

## 【0246】

腫瘍は、標準的なプロトコールを用い、4週齢の雌ヌード (NCr Nu/Nu) マウスの左側腹部にCaki-1およびPanc-1ヒト腫瘍細胞を皮下注射することにより発達させた。Caki-1では10日後、Panc-1では30日後、固形腫瘍 ( $\sim 200 \text{ mm}^3$ ) が形成されたところで、マウスを処理群に無作為化した。処理は25mg/kgの抗LPA mAbまたはビヒクル (生理食塩水) の腹腔内投与により開始した。抗体を試験期間中、3日ごとに投与した。処理は、caki-1腫瘍では25mg/kgの抗LPA mAb B58、Panc-1ではmAb B7、または生理食塩水からなった。データは、caki-1試験では7つの生理食塩水と6つのB58処理マウス、また、panc-1試験では4つの生理食塩水と5つB7処理マウスの平均 $\pm$ SEMである。腫瘍体積は電子カリパスを用いて1日おきに測定し、腫瘍体積を式 $W^2 \times L / 2$ で求めた。その後、生理食塩水群で腫瘍が $1500 \text{ mm}^3$ に達した際に動物を屠殺した。最終の腫瘍体積と重量を記録した。

40

## 【0247】

この予備試験では、腫瘍がおよそ $400 \sim 500 \text{ mm}^3$ の達した後に、抗LPA mAbの腫瘍体積を低減する能力が明らかになった。この時点で、対照動物の腫瘍は増殖し続けたが、抗LPA mAb処理動物の腫瘍は両異種移植モデルでより速度の遅い増殖を示した。データは、抗LPA mAbが、生理食塩水処理動物に比した場合、caki-1およびpanc-1腫瘍の最終重量も低減したことを示す。

## 【0248】

50

### 抗 L P A m A b は腫瘍を有する動物において循環脈管形成促進サイトカインのレベルを調節する

抗 L P A m A b ( B 5 8 および B 7 ) は、循環脈管形成促進サイトカインのレベルにも影響を及ぼした。抗 L P A m A b 7 ( P a n c - 1 ) で処理した動物において、インターロイキン - 8 ( I L - 8 ) の血清レベルは抗体処理動物では間出できなかったが、 P a n c - 1 および C a k i - 1 異種移植片ではそれぞれ 8 5 日後および 6 3 日後に検出できた。さらに重要なこととしては、腫瘍サイズと I L - 8 レベルの間に強い相関があった (  $r = 0.98$  )。 C a k i - 1 腫瘍を有する動物では、ヒト I L - 8 の血清レベルはまた、生理食塩水処理 (  $r = 0.55$  ) に比べた場合、抗 L P A m A b 5 8 処理 (  $r = 0.34$  ) によっても低減された。上述のように、循環サイトカインレベルの低減は、腫瘍細胞それ自体からのサイトカインの放出の直接的阻害によるものであると考えられる。これらのデータは、循環脈管形成促進化合物のレベルを低減しつつ、腫瘍進行を低下させる抗 L P A m A b の能力を示す。

【 0 2 4 9 】

### 抗 L P A m A b は転移のネズミモデルにおいて腫瘍進行を低減する

腫瘍進行の 1 つの重要な特徴は、転移して、離れた部位に二次的な腫瘍節を形成する能力である。上記の *in vitro* 試験は、細胞運動に関するスクラッチアッセイにおいて、腫瘍細胞に接触阻害を逃れて移動を促進させる L P A の能力を示した。これらの試験では、抗 L P A m A b はまた、 L P A の腫瘍増殖促進エフェクターも阻害した。抗 L P A m A b の、 *in vivo* における腫瘍転移を阻害する有効性。腫瘍転移の現象は、動物モデルで模倣することが困難であった。多くの研究者が、腫瘍細胞を血流に直接注射する「実験的」転移モデルを利用している。

【 0 2 5 0 】

血管形成は、血管数の増加が、細胞が循環に達するまでに進まなければならない距離が短くなるといくことを意味するので、転移に必須のプロセスである。抗 L P A m A b は、抗 L P A m A b がこの転移プロセスのいくつかの必須工程を遮断することができるという発見に基づき、 *in vivo* において腫瘍細胞転移を阻害すると考えられる。

【 0 2 5 1 】

試験： 高転移性ネズミ黒色腫 ( B 1 6 - F 1 0 ) を用い、 *in vivo* 転移に対する 3 種類の抗 L P A m A b の治療作用を調べた。このモデルは自己毒素の c P A 阻害剤に高い感受性があることが示されている。4 週齢の雌 ( C 5 7 B L / 6 ) マウスに、尾の静脈から B 1 6 - F 1 0 ネズミ黒色腫腫瘍細胞 (  $5 \times 10^4$  細胞 / 動物  $100 \mu\text{L}$  ) の注射を施した。マウス ( 1 群 1 0 匹 ) に 3 日毎に  $25 \text{ mg} / \text{kg}$  の抗 L P A m A b ( B 3 または B 7 のいずれか ) または生理食塩水を腹腔内注射により投与した。1 8 日後、肺を摘出し、分析した。肺器官は黒色腫細胞の好ましい転移部位であることから、転移節に関して緊密に評価した。組織学的検査で小さな病巣でも検出できるように、膨張と固定を同時に行うため、気管を通じて 1 0 % 緩衝ホルマリンで肺を膨張させた。肺を 5 葉に分離し、腫瘍を寸法によって分類し ( 大  $5 \text{ mm}$  ; 中  $1 \sim 4 \text{ mm}$  ; 小  $< 1 \text{ mm}$  )、解剖顕微鏡下で計数した。この肺の検査において、腫瘍の数は抗体処理動物において明らかに減少した。 m A b B 3 で処理した動物では、大腫瘍が 2 1 %、中腫瘍が 1 7 % および小腫瘍が 2 2 % 現象した。スチューデントの T 検定による統計学的分析は、生理食塩水に対して m A b B 3 で処理した動物の小腫瘍に関して  $p < 0.05$  が示された。

【 0 2 5 2 】

上記実施例で示したように、ここで、 L P A の腫瘍形成作用は腎臓癌 ( 例えば C a k i - 1 ) および膵臓癌 ( P a n c - 1 ) 細胞系統にまで拡大されることが示された。 L P A は両細胞系統において、腫瘍細胞の増殖、移動、ならびに V E G F および I L - 8 などの脈管形成促進性および / または転移促進性の因子の放出を誘発する。ここで、3 種類の高親和性および特異的モノクローナル抗 L P A 抗体が脈管形成および転移に関する *in vitro* 細胞アッセイパネルおよび *in vivo* 腫瘍モデルにおいて有効性を示すことが示された。

【 0 2 5 3 】

10

20

30

40

50

### 実施例 1 1 腫瘍生検材料の免疫組織化学

本実施例の目的は、S 1 P に対して生じた m A b を用いて生検材料において S 1 P を検出することが可能なことを示すことである。この免疫組織化学的 ( I H C ) 方法は腫瘍における S 1 P のレベル ( 腫瘍自体によって産生されると考えられる ) を評価し、スフィンゴシンキナーゼのタンパク質または R N A 発現を測定するよりも感受性および特異性が高いものであり得る。さらに、この I H C 法は、腫瘍から分泌された S 1 P は細胞外間隙 ( 例えば、血漿コンパートメント ) に希釈されるので、S 1 P シグナルの現象を被らない。本発明者らは、マウスマトリゲル / 異種移植モデルからの U 9 3 7 ヒト腫瘍切片 ( 凍結 ; 1 0 μ m 厚 ) における S 1 P 含量を分析した。U 9 3 7 細胞 ( ヒトリンパ腫細胞系統 ; A T C C カタログ番号 C R L - 1 5 9 3 . 2 ) を 1 0 . 5 m g / m l 濃度のマトリゲルマトリックスと混合した。U 9 3 7 を含むマトリゲルミックス 6 0 0 μ L ( 3 0 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / プラグ 6 0 0 μ l 容 ) を 4 ~ 6 週齢の n u / n u 雌マウスの右側腹部に移植し、3 0 日間増殖させた。これらの動物を屠殺し、マトリゲルプラグを切り取り、O T C に包埋し、ドライアイスおよびイソペンタン中で急速凍結した。その後、クリオスタットを用いて 5 μ m 切片とした。次に、切片を 1 0 % 中性緩衝ホルマリン ( Sigma, St. Louis MO ; カタログ番号 : H T 5 0 - 1 - 1 ; ロット番号 0 2 5 K 4 3 5 3 ) 中、室温で 2 0 分間固定した後、切片とした。これらの切片を室温で 5 分間、P B S 中 1 0 0 m M グリシン ( p H 7 . 4 ) で洗浄し、P B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 で 2 回洗浄した。切片を室温で 2 0 分間、1 % B S A / P B S / 0 . 0 5 % T w e e n でブロッキングした。一次抗体 ( 例えば、ネズミ抗 S 1 P m A b ) を 1 % / B S A / P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 中に希釈し ( 示されているように 1 : 2 5 または 1 : 5 0 ) 、腫瘍切片とともに室温で 3 時間インキュベートした。次に、切片を、穏やかに振盪しながら、P B S / 0 . 1 % T w e e n で 3 回洗浄した。1 % B S A / P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 中に希釈した二次抗体 ( F I T C コンジュゲート抗マウス A b ( 1 : 2 5 0 ) および R R X コンジュゲート抗ラット A b ( 1 : 2 5 0 0 または 1 : 5 0 0 ) を腫瘍切片とともに室温で 1 時間インキュベートした。次に、切片を P B S / 0 . 0 5 % T w e e n にて 5 分間隔で 6 回洗浄した。切片を、P B S に希釈した ( 1 : 5 0 0 0 ) D A P I ( 4 ' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドールジラクテート ( D A P I , 1 0 m g ; Sigma, St. Louis MO ; カタログ番号 D 3 5 7 1 , ロット 2 2 7 7 5 ) とともに室温で 2 0 分間インキュベートすることにより、D A P I で対比染色した。次に、切片を P B S にて 5 分間隔で 2 回、および D I H <sub>2</sub> O で 1 回洗浄し、G e l v i t o l マウント媒体にマウントし、乾燥させた。用いた一次抗体は 1 . 0 m g / m l に希釈した L T 1 0 0 2 ( L H - 2 ; 1 5 m g / m l ) 抗 S 1 P m A b であり、1 % / B S A / P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 中 1 : 2 5 の実施濃度で加えた。用いた二次抗体は、1 % / B S A / P B S / 0 . 0 5 % T w e e n に 1 : 2 5 0 希釈したフルオレセイン ( F I T C ) コンジュゲートウサギ抗マウス I g G ( H + L ) ( Jackson ImmunoResearch, West Grove PA ; カタログ番号 3 1 5 - 0 9 5 - 0 0 3 ; ロット番号 : 6 7 0 3 1 ) A b であった。画像を DeltaVision deconvolution microscope system ( Applied Precision, Inc., Issaquah, WA. ) に取り込んだ。このシステムは N i k o n T E - 2 0 0 倒立落射蛍光顕微鏡に取り付けた P h o t o m e t r i c s C C D を含む。一般に、~ 0 . 2 μ m 間隔で 8 ~ 1 0 の光学切片を取り込んだ。露光時間は各蛍光団に対してカメラ応答が直線的範囲となるように設定した。レンズは 2 0 倍と 1 0 倍を含んだ。これらのデータセットを、Silicon Graphics Octane ワークステーション上で S o f t W o r x ソフトウェア ( Applied Precision, Inc ) を用い、デコンヴォリューションおよび分析を行った。

#### 【 0 2 5 4 】

この I H C 法を用い、一次抗体として抗 S 1 P m A b を用いた場合、腫瘍生検画像に S 1 P が容易に観察できた。これに対して、一次抗体を除いた対照サンプルでは S 1 P 染色は見られなかった。

#### 【 0 2 5 5 】

特定の理論に縛られるものではなく、またこれらの実施例に限定されるものではないが

10

20

30

40

50

、バイオマーカー S 1 P の測定は、S 1 P 受容体に関する遺伝子発現およびスフィンゴシンキナーゼと組み合わせて使用することができ、これらは双方ともサロゲート癌マーカーとして役立つ。当技術分野で公知の遺伝子発現分析の方法例としては、DNA アレイまたはマイクロアレイ (Brazma and Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17 24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2 16)、S A G E (遺伝子発現の一連の分析) (Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415 425)、R E A D S (消化 c D N A の制限酵素増幅) (Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258 72)、T O G A (total gene expression analysis) (Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 1976 81)、タンパク質アレイおよびプロテオミクス (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2 16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100 10)、発現配列タグ (E S T) シーケンシング (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2 16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143 57)、サブトラクティブ RNA フィンガープリント法 (S U R F) (Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91 98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203 208)、サブトラクティブクローニング、ディファレンシャルディスプレイ (D D) (Jurecic and Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316 21)、比較ゲノムハイブリダイゼーション (Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286 96)、F I S H (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) 技術 (Goin g and Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895 904) および質量分析法 (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235 41) が含まれる。

【 0 2 5 6 】

本明細書に記載および特許請求される組成物および方法は全て、本開示に照らして過度な実験なく作製および実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して記載してきたが、当業者ならば、これらの組成物および方法に変形が適用できることが自明である。このような当業者に自明の同等の置換および変更は全て、添付の特許請求の範囲で定義されるような本発明の精神および範囲内にあるもと考えられる。

【 0 2 5 7 】

本明細書に挙げられている特許、特許出願および刊行物は全て、本発明が属する技術分野の熟練者の水準を示す。特許、特許出願および刊行物は、それに優先するものまたは別の利益が請求されているものを含め、全てが、あたかも個々の刊行物が具体的かつ個々に出典明示により本明細書の一部とされることが示されている場合と同様に、出典明示により本明細書の一部とされる。

【 0 2 5 8 】

本明細書に定義例示的に記載されている発明は、本明細書に具体的に開示されていない要素がなくても実施可能である。よって、例えば、本発明の各場合において、「含む」、「から本質的になる」および「からなる」とは、他の 2 つの用語のいずれとも置き換えることができる。用いられているこれらの用語および表現は、記載の用語として用いられ、限定するものではなく、このような用語および表現の使用において、示され、記載された特徴またはその一部の等価物を排除するものではなく、特許請求される本発明の範囲内で様々な変形や変更が可能であると認識される。従って、本発明は好ましい実施形態および任意選択の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書に開示されている概念の改変や変更も当業者であれば言及可能であり、また、このような変形や変更は添付の特許請求の範囲で定義されるような本発明の精神および範囲内にあるもとみなされる。

【 図 1 - 1 】

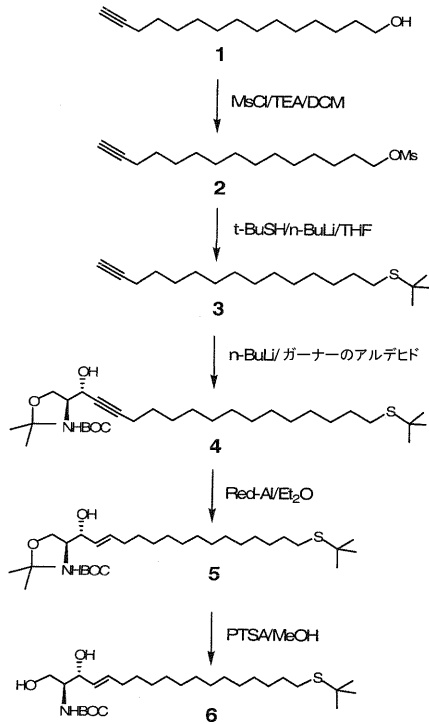


Figure 1a. 典型的なチオール化S1P関連抗原の合成

【 図 1 - 2 】

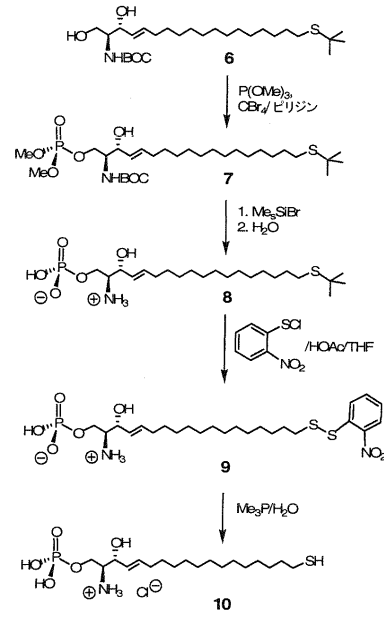


Figure 1b. 典型的なチオール化S1P関連抗原の合成 (続き)

【 図 1 - 3 】

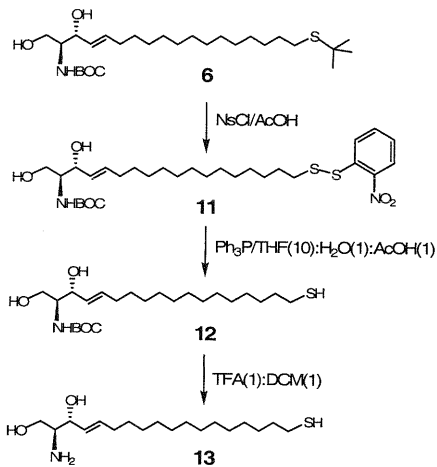


Figure 1c. 典型的なチオール化S1P関連抗原の合成 (続き)

【 図 2 - 2 】

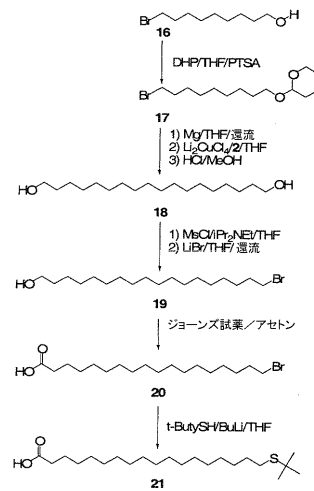


Figure 2b. 典型的な保護チオール化脂肪酸の合成

【 図 2 - 1 】

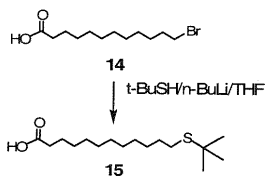
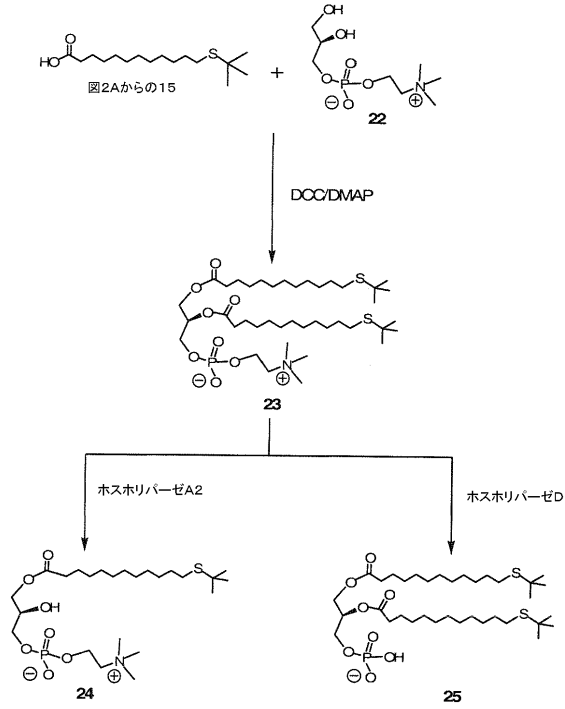
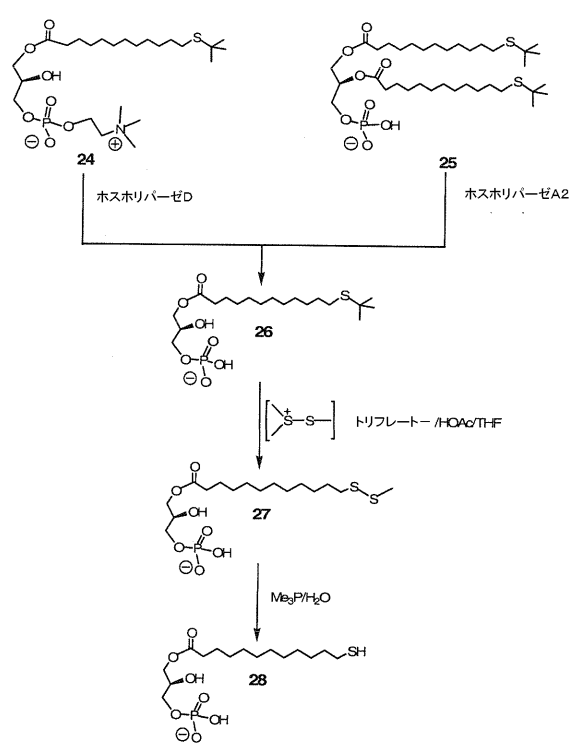


Figure 2a. 典型的な保護チオール化脂肪酸の合成

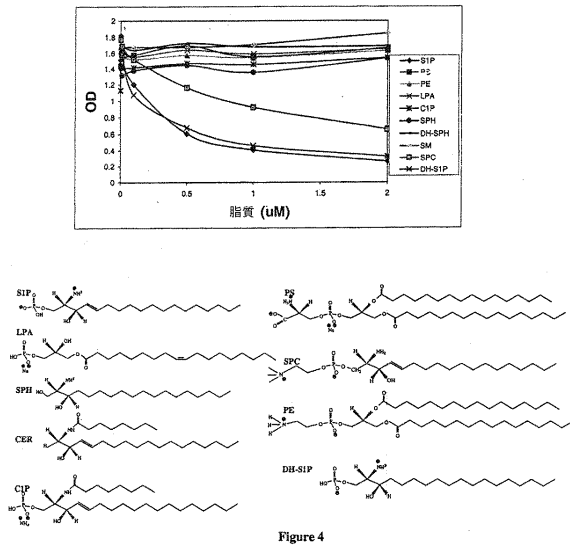
【 図 3 - 1 】



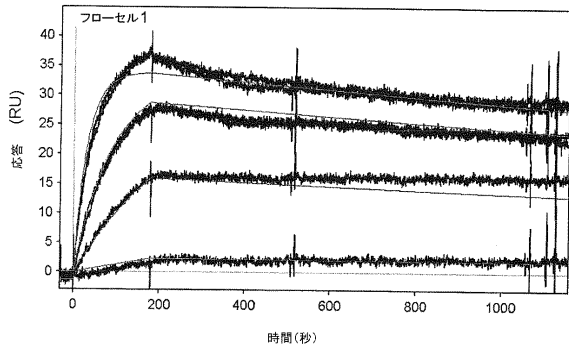
【 図 3 - 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】







【 図 7 - 9 】

```

> g a s v k i s o l v s f i f i d b t i h w b k q r p e q g l e w
> ..... Shingomabキメラ重鎖 (path11CD3).....>
471 c g a g g a t t t t c c c a g c a t g e t t a c a a a a a a a a g a g a g a g c a c c o t t g e c t g a g a c a a g t c t t c o a c t a c a g c t a c a t a
    CDR2
    i g w i s p r h d i l k y n e m f r e k a t t i z a d k s a s t t a y i
> ..... Shingomabキメラ重鎖 (path11CD2).....>
471 c a a g t c a a c a g t t c g a c t t t t o f e t g c a a g a g g g g t t c a a a t a c a c t a c t g t c t a c t t g g g c c a a g g a
    FW3
    q v e s i l f e d a a v y s a a c a g y f y o c l i a f d f w g q g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 (path11CD3).....>
471 c c a c t t c a c a g t t c t o c a g c t c a c c a a a g g g c
    FW4
    t i l v s a a s t k g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 (path11CD3).....>

pATH14 (DNA: 配列番号 : 31; PRT: 配列番号 : 38)
378 a t a g a t a a a g a g g g t t t c h e l t e r e m p t e g n a a t e n o d g y c t c h k i l u c a g g t c o c t t c g a a c a g t c t g a c g t c t g a c g t g a a t t g t g a a a c t g
    リーダー
    w a w s w v i l f i s v t t g r t e n q h i q u s d a e l v e p
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
478 g a g t t c a g t g a a g a t a c l g c a a g t t t c t g g t t c t t t o a t t g c c h a t a t t a t t a d t o p a t g a a g e a g a g c c t g e a c a g g g c t o g a a t g a t
    FW1
    g e s v y i a o k v a g f i f i d b t i h w b k q r p e q g l e w
    CDR1
    > ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
478 c g a g g a t t t t c c c a g c a t g e t t a c a a a a a a a a g a g a g c a c c o t t g e c t g a g a c a a g t c t t c o a c t a c a g c t a c a t a
    CDR2
    i g w i s p r h d i l k y n e m f r e k a t t i z a d k s a s t t a y i
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
478 c a a g t c a a c a g t t c g a c t t t t o f e t g c a a g a g g g g t t c a a a t a c a c t a c t g t c t a c t t g g g c c a a g g a
    FW3
    q v e s i l f e d a a v y s a a c a g y f y o c l i a f d f w g q g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
478 c c a c t t c a c a g t t c t o c a g c t c a c c a a a g g g c
    FW4
    t i l v s a a s t k g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>

```

【 図 7 - 10 】

```

> t t t t a a a a e e e e e e e e e e
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>

pATH15 (DNA: 配列番号 : 32; PRT: 配列番号 : 39)
414 a t a g a t a a a g a g g g t t t c h e l t e r e m p t e g n a a t e n o d g y c t c h k i l u c a g g t c o c t t c g a a c a g t c t g a c g t g a a t t g t g a a a c t g
    リーダー
    w a w s w v i l f i s v t t g r t e n q h i q u s d a e l v e p
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
514 g a g t t c a g t g a a g a t a c l g c a a g t t t c t g g t t c t t t o a t t g c c h a t a t t a t t a d t o p a t g a a g e a g a g c c t g e a c a g g g c t o g a a t g a t
    FW1
    g e s v y i a o k v a g f i f i d b t i h w b k q r p e q g l e w
    CDR1
    > ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
514 c g a g g a t t t t c c c a g c a t g e t t a c a a a a a a a a g a g a g c a c c o t t g e c t g a g a c a a g t c t t c o a c t a c a g c t a c a t a
    CDR2
    i g w i s p r h d i l k y n e m f r e k a t t i z a d k s a s t t a y i
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
514 c a a g t c a a c a g t t c g a c t t t t o f e t g c a a g a g g g g t t c a a a t a c a c t a c t g t c t a c t t g g g c c a a g g a
    FW3
    q v e s i l f e d a a v y s a a c a g y f y o c l i a f d f w g q g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
514 c c a c t t c a c a g t t c t o c a g c t c a c c a a a g g g c
    FW4
    t i l v s a a s t k g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>

pATH16 (DNA: 配列番号 : 33; PRT: 配列番号 : 40)
365 a t a g a t a a a g a g g g t t t c h e l t e r e m p t e g n a a t e n o d g y c t c h k i l u c a g g t c o c t t c g a a c a g t c t g a c g t g a a t t g t g a a a c t g
    リーダー
    w a w s w v i l f i s v t t g r t e n q h i q u s d a e l v e p
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
365 g a g t t c a g t g a a g a t a c l g c a a g t t t c t g g t t c t t t o a t t g c c h a t a t t a t t a d t o p a t g a a g e a g a g c c t g e a c a g g g c t o g a a t g a t
    FW1
    g e s v y i a o k v a g f i f i d b t i h w b k q r p e q g l e w
    CDR1
    > ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
365 c g a g g a t t t t c c c a g c a t g e t t a c a a a a a a a a g a g a g c a c c o t t g e c t g a g a c a a g t c t t c o a c t a c a g c t a c a t a
    CDR2
    i g w i s p r h d i l k y n e m f r e k a t t i z a d k s a s t t a y i
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
365 c a a g t c a a c a g t t c g a c t t t t o f e t g c a a g a g g g g t t c a a a t a c a c t a c t g t c t a c t t g g g c c a a g g a
    FW3
    q v e s i l f e d a a v y s a a c a g y f y o c l i a f d f w g q g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
365 c c a c t t c a c a g t t c t o c a g c t c a c c a a a g g g c
    FW4
    t i l v s a a s t k g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>

```

【 図 7 - 11 】

```

465 c g a g g a t t t t c c c a g c a t g e t t a c a a a a a a a a g a g a g c a c c o t t g e c t g a g a c a a g t c t t c o a c t a c a g c t a c a t a
    CDR2
    i g w i s p r h d i l k y n e m f r e k a t t i z a d k s a s t t a y i
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
465 c a a g t c a a c a g t t c g a c t t a t t t o f e t g c a a g a g g g g t t c a a a t a c a c t a c t g t c t a c t t g g g c c a a g g a
    FW3
    q v e s i l f e d a a v y s a a c a g y f y o c l i a f d f w g q g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
465 c c a c t t c a c a g t t c t o c a g c t c a c c a a a g g g c
    FW4
    t i l v s a a s t k g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>

pATH17 (DNA: 配列番号 : 34; PRT: 配列番号 : 41)
282 a t a g a t a a a g a g g g t t t c h e l t e r e m p t e g n a a t e n o d g y c t c h k i l u c a g g t c o c t t c g a a c a g t c t g a c g t g a a t t g t g a a a c t g
    リーダー
    w a w s w v i l f i s v t t g r t e n q h i q u s d a e l v e p
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
382 g a g t t c a g t g a a g a t a c l g c a a g t t t c t g g t t c t t t o a t t g c c h a t a t t a t t a d t o p a t g a a g e a g a g c c t g e a c a g g g c t o g a a t g a t
    FW1
    g e s v y i a o k v a g f i f i d b t i h w b k q r p e q g l e w
    CDR1
    > ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
482 c g a g g a t t t t c c c a g c a t g e t t a c a a a a a a a a g a g a g c a c c o t t g e c t g a g a c a a g t c t t c o a c t a c a g c t a c a t a
    CDR2
    i g w i s p r h d i l k y n e m f r e k a t t i z a d k s a s t t a y i
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
582 c a a g t c a a c a g t t c g a c t t a t t t o f e t g c a a g a g g g g t t c a a a t a c a c t a c t g t c t a c t t g g g c c a a g g a
    FW3
    q v e s i l f e d a a v y s a a c a g y f y o c l i a f d f w g q g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>
682 c c a c t t c a c a g t t c t o c a g c t c a c c a a a g g g c
    FW4
    t i l v s a a s t k g
> ..... Shingomabキメラ重鎖 .....>

```

【 図 9 】

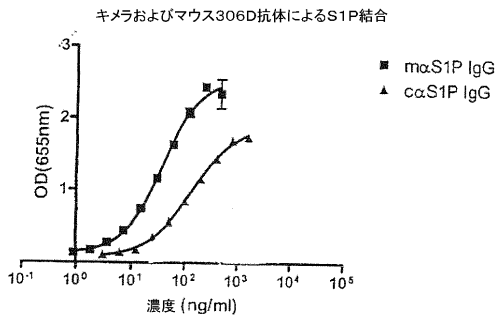
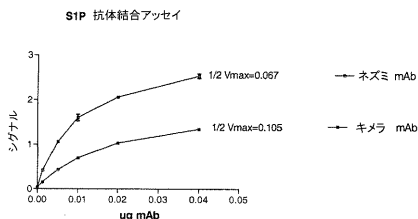


Figure 9

【 図 8 】

Figure 8



【配列表】

0005600252000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	47/48	
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A
C 0 7 K	16/44	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	C 0 7 K	1/22	
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	C 0 7 K	16/44	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 0 7 K	14/795	(2006.01)	G 0 1 N	33/577	A
			C 1 2 N	15/00	A
			C 0 7 K	14/795	

- (31)優先権主張番号 60/923,644  
(32)優先日 平成19年4月16日(2007.4.16)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 11/755,352  
(32)優先日 平成19年5月30日(2007.5.30)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 11/755,485  
(32)優先日 平成19年5月30日(2007.5.30)  
(33)優先権主張国 米国(US)

- (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 ジェネビーブ・ハンセン  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 7 カリフォルニア州サンディエゴ、サン・アントニオ・ローズ・コート 1  
7 0 5 0 番

審査官 上村 直子

- (56)参考文献 米国特許第 0 6 3 0 0 3 0 8 ( U S , B 1 )  
特開 2 0 0 2 - 2 4 3 7 3 7 ( J P , A )  
特表 2 0 0 9 - 5 3 8 9 3 2 ( J P , A )  
Mills, G.B., Detection of Serum Lysophosphatidic Acids Using Affinity Binding and Surface Enhanced Laser Deorption, DTIC [online], 2 0 0 6 年 4 月 1 日, p.1-17, 125-138, [retrieved on 2012.08.20], URL, <http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a455094.pdf>  
COYLE, L.C. et al., Chemisorbed phospholipid monolayers on gold: well-defined and stable phospholipid surfaces for cell adhesion studies, Chemistry of Materials, 1 9 8 9 年, Vol.1, p.606-611  
OHLSSON, J. and MAGNUSSON, G., Analogues of glycosphingolipids and glycerolipids suitable for conjugation to gold- and amino- functionalised surfaces, Tetrahedron, 2 0 0 0 年, Vol.56, p.9975-9984  
YADAV, J.S. et al., The first total synthesis of the 6-hydroxy-4E-sphingenes, Tetrahedron Letters, 2 0 0 3 年, Vol.44, p.2983-2985  
Bioorg Med Chem Lett., 2 0 0 0 年 8 月 7 日, Vol.10, No.15, p.1691-1693

Matteo R., et al., Anti-tumor effects of several monoclonal antibodies that bind all the principal isoforms of lysophos, Annual meeting of the American Association for Cancer Research. Proceeding, 2007年 4月14日, Vol.48, p.971, #4101

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C A p l u s ( S T N )

R E G I S T R Y ( S T N )

专利名称(译)	新型生物活性脂质衍生物，由与其反应的免疫诱导的物质（免疫衍生部分）及其制备和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5600252B2</a>	公开(公告)日	2014-10-01
申请号	JP2009513443	申请日	2007-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	LPATH公司		
申请(专利权)人(译)	Erupasu公司		
当前申请(专利权)人(译)	Erupasu公司		
[标]发明人	ロジャーエイサバディニ ウィリアムエイガーランド ジェネビーブハンセン		
发明人	ロジャー・エイ・サバディニ ウィリアム・エイ・ガーランド ジェネビーブ・ハンセン		
IPC分类号	C07F9/10 A61K47/24 A61K39/395 A61K47/42 A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/48 C12Q1/02 C12P21/08 C07K1/22 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/577 C12N15/09 C07K14/795		
CPC分类号	C07K16/00 A61K47/544 A61K47/60 A61K47/643 A61K2039/505 C07K16/18 C07K16/3076 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C12N2500/44 G01N33/6854 G01N33/92		
FI分类号	C07F9/10.CSPB A61K47/24 A61K39/395.J A61K39/395.B A61K47/42 A61K39/395.T A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/48 C12Q1/02.ZNA C12P21/08 C07K1/22 C07K16/44 G01N33/53.N G01N33/577.A C12N15/00.A C07K14/795		
审查员(译)	植村直子		
优先权	60/810185 2006-05-31 US 60/835569 2006-08-04 US 60/923644 2007-04-16 US 11/755352 2007-05-30 US 11/755485 2007-05-30 US		
其他公开文献	JP2009541215A JP2009541215A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

描述了用于产生对生物活性脂质靶标具有反应性的单克隆抗体及其衍生物的组合物和方法。这些组合物各自具有极性头部基团和至少一个烃链（例如溶血脂质如溶血磷脂酸或鞘氨醇-1-磷酸）（其中碳原子是具有悬垂反应性基团的衍生物）。衍生的脂质，其包含：衍生的；通过将衍生的脂质与载体部分（例如载体蛋白，聚乙二醇，金胶体，藻酸盐或硅氧烷珠）连接而制备的免疫原；包括通过用这种免疫原免疫产生的单克隆抗体和衍生物；以及包含这些抗体和抗体衍生物的治疗和诊断组合物。还提供了制备这种衍生化脂质，免疫原和单克隆抗体和衍生物的方法，一旦形成后检测这种抗体的方法，以及使用这些抗体和衍生物的治疗和诊断方法。它被描述。

