

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-513088

(P2015-513088A)

(43) 公表日 平成27年4月30日(2015.4.30)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------|-------------|
| GO 1 N 33/92 (2006.01) | GO 1 N 33/92 | Z 2 G O 4 5 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | S 4 B O 6 3 |
| GO 1 N 33/573 (2006.01) | GO 1 N 33/573 | A |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 | 5 2 1 |
| C 1 2 Q 1/25 (2006.01) | C 1 2 Q 1/25 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁)

(21) 出願番号 特願2014-559956 (P2014-559956)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月27日 (2013. 2. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月22日 (2014. 10. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/027902
 (87) 国際公開番号 W02013/130521
 (87) 国際公開日 平成25年9月6日 (2013. 9. 6)
 (31) 優先権主張番号 61/605, 076
 (32) 優先日 平成24年2月29日 (2012. 2. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513000322
 エルパス, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92
 121, サンディエゴ, 4025 ソレン
 ト バレー ブルバード
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元
 (72) 発明者 サツバディーニ, ロジャー, エー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92
 040, レイクサイド, 12509 デル
 ソル ロード

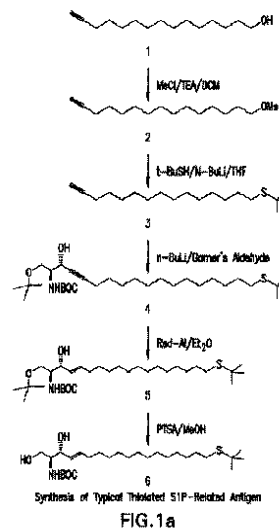
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経外傷を検出および診断するための方法およびキット

(57) 【要約】

神経外傷 (例えば、外傷性脳損傷、脳卒中、または脊髄損傷) を検出および診断するための方法およびキットが提供される。これらの方法は、疑い損傷後の患者試料中のリゾホスファチジン酸 (LPA) および/または LPA 代謝産物レベルの決定に依存する。

【選択図】 図 1 a



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

持続性神経外傷の疑いがある被験体において神経外傷を検出または診断する方法であって、前記被験体由来の生体試料中の L P A または L P A 代謝産物である第 1 のバイオマーカーのレベルを決定することを含み、前記試料中の前記 L P A または L P A 代謝産物の上昇したレベルは神経外傷を示す、方法。

【請求項 2】

前記神経外傷は外傷性脳損傷、脊髄損傷、または脳卒中である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

L P A は総 L P A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

L P A は、16 : 0 アシル L P A、18 : 0 アシル L P A、18 : 1 アシル L P A、18 : 2 アシル L P A、および 20 : 4 アシル L P A のうちの 1 つ以上である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 L P A 代謝産物はリゾホスファチジルコリン (L P C) またはリゾ血小板活性化因子 (リゾ P A F) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

生体試料は組織試料または体液試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記生体試料は脳脊髄液 (C S F)、血液、血漿、尿または中枢神経系組織の試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

L P A または L P A 代謝産物のレベルの決定は、物理学的測定方法、酵素法または L P A または L P A 代謝産物に結合する作用物質を使用する方法による、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

L P A または L P A 代謝産物に結合する作用物質を使用する方法は抗体に基づく方法または抗原結合抗体断片に基づく方法である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記物理学的測定方法は質量分析または液体クロマトグラフィー / 質量分析である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体に基づく方法は酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) またはラテラルフロー免疫アッセイであり、前記抗体に基づく方法において使用される抗体は L P A または L P A 代謝産物に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

さらに、前記生体試料または前記被験体由来の別の生体試料中の、神経外傷に対する少なくとも 1 つの追加のタンパク質または脂質バイオマーカーのレベルを決定することを含み、前記第 1 のバイオマーカーおよび前記少なくとも 1 つの追加のタンパク質または脂質バイオマーカーは同じでなく、前記第 1 のバイオマーカーおよび前記少なくとも 1 つの追加のタンパク質または脂質バイオマーカーは同じアッセイまたは異なるアッセイで検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記追加のタンパク質または脂質バイオマーカーは、ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ (U C H - L 1)、グリア線維酸性タンパク質 (G F A P)、高分子量神経フィラメントサブユニット N F - H のリン酸化形態 (p N F - H)、L P A、L P A 代謝産物および 12 - ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (12 - H E T E) からなる群より選択される、請求

10

20

30

40

50

項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記第 1 のバイオマーカーが L P A である場合、前記追加のバイオマーカーは L P A 代謝産物または 1 2 - H E T E であり；前記第 1 のバイオマーカーが L P C である場合、前記追加のバイオマーカーは L P A、リゾ P A F または 1 2 - H E T E であり；および前記第 1 のバイオマーカーがリゾ P A F である場合、前記追加のバイオマーカーは L P A、L P C または 1 2 - H E T E である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 L P A 代謝産物は L P C またはリゾ P A F である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第 1 のバイオマーカーは L P A であり、L P A レベルの決定は、L P A と特異的に反応する抗体、またはその抗原結合断片を使用する抗体に基づく方法による、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法はさらに、固体支持体または担体部分に直接、または間接的に結合された誘導体化 L P A の使用を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記誘導体化 L P A はチオール化 L P A である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記担体部分は、ポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバント、シリコーンビーズ、およびタンパクからなる群より選択され、任意で、前記担体部分は着色されまたは検出可能な標識を有する、請求項 1 7 に記載の方法質。

【請求項 2 0】

被験体において神経外傷を検出または診断するためのキットであって、前記キットは、前記被験体由来の生体試料中の L P A または L P A 代謝産物である第 1 のバイオマーカーのレベルを決定するための手段を含み、L P A または L P A 代謝産物の上昇したレベルは神経外傷を示す、キット。

【請求項 2 1】

前記第 1 のバイオマーカーは L P A であり、L P A のレベルを決定するための前記手段は L P A 結合剤に基づく方法または酵素法である、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記生体試料は体液試料である、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記生体試料は脳脊髄液 (C S F)、血液、血漿、尿または中枢神経系組織の試料である、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 4】

L P A レベルを決定するための L P A 結合剤に基づく方法は、抗体に基づく方法であり、前記キットは、L P A に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片を含む、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 5】

L P A レベルを決定するための抗体に基づく方法は E L I S A アッセイまたはラテラルフローイムノアッセイである、請求項 2 4 に記載のキット。

【請求項 2 6】

前記キットはさらに、固体支持体または担体部分に直接または間接的に結合された誘導体化 L P A を含む、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 7】

前記担体部分は、ポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバント、シリコーンビーズ、ラテックスビーズ、着色粒子、およびタンパク質からなる群より選択される、請求項 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

前記担体部分は固体支持体に付着される、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 29】

さらに、前記生体試料または前記被験体由来の別の生体試料中の、神経外傷のための少なくとも 1 つの追加のタンパク質または脂質バイオマーカーのレベルを決定するための手段を含み、前記第 1 のバイオマーカーおよび前記少なくとも 1 つの追加のタンパク質または脂質バイオマーカーは同じでなく、前記第 1 のバイオマーカーおよび前記少なくとも 1 つの追加のタンパク質または脂質バイオマーカーは同じアッセイまたは異なるアッセイで検出される、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 30】

前記追加のタンパク質または脂質バイオマーカーは、ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ (UCH-L1)、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP)、高分子量神経フィラメントサブユニット NF-H のリン酸化形態 (pNF-H)、LPA、LPA 代謝産物および 12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (12-HETE) からなる群より選択される、請求項 29 に記載のキット。

10

【請求項 31】

前記 LPA 代謝産物は LPC または リゾPAF である、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 32】

前記第 1 のバイオマーカーが LPA である場合、前記追加のバイオマーカーは LPA 代謝産物または 12-HETE であり；前記第 1 のバイオマーカーが LPC である場合、前記追加のバイオマーカーは LPA、リゾPAF または 12-HETE であり；および、前記第 1 のバイオマーカーが リゾPAF である場合、前記追加のバイオマーカーは LPA、LPC または 12-HETE である、請求項 31 に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経外傷を検出および/または診断する方法に関する。これらの方法はリゾホスファチジン酸 (LPA) およびある一定の LPA 代謝産物のレベルが神経外傷、例えば、脊髄損傷、脳卒中、外傷性脳損傷 (TBI)、など後に上昇するという新規知見に基づく。方法は生体試料、例えば、生物流体または組織試料中の LPA および代謝産物のレベルを決定することを含む。LPA または LPA 代謝産物レベルは、下記により決定され得る：免疫学的方法、例えば、ELISA、免疫組織化学的方法；ラテラルフローイムノアッセイ診断法、酵素法、質量分析、または当技術分野で知られている他の方法（今現在既存であるか後に開発されるかによらない）。

30

【0002】

本発明はまた、神経外傷を検出するためのキットに関し、このキットは、特に、生理的条件下で LPA または LPA 代謝産物に特異的に反応するモノクローナル抗体、抗原結合抗体断片、および抗体誘導体に結合する作用物質およびその変異体を含む。そのようなキットは、例えば、異常なレベルの LPA と関連する疾患および病状の診断、そのような疾患の進行のモニタリング、およびそのような疾患および病状のための治療効力のモニタリングおよび評価ならびに抗 LPA 療法から利益を受け得る標的 patient 集団を同定するためのコンパニオン診断試験において使用することができる。神経外傷の疑いがある被験体のスクリーニングはまた、入院ならびに外科手術および他の侵襲性のまたはコストのかかる手順を含む治療レジメンに対する決定を助けることができる。

40

【0003】

LPA は様々な細胞型における増殖、分化、血管新生、運動性、およびアポトーシスからの保護を含む複数の細胞応答を媒介する生理活性脂質である。LPA は、腫瘍増殖促進微小環境を提供し、および血管新生を促進することにより癌の確立および進行に参与する。加えて、LPA は線維症、黄斑変性症などの眼疾患、神経外傷、および疼痛関連障害に参与している。

【0004】

50

L p a t h , I n c . は、とりわけ、L P A に対する高親和性、特異的モノクローナル抗体のファミリー（その1つはL p a t h o m a b として知られている）をカバーする特許権を所有し、または別の方法で管理する。癌、線維症、および眼障害の様々な動物モデルにおけるL p a t h o m a b の効力は、例えば、悪性腫瘍、血管新生、および線維症関連障害の治療における、このクラスの抗L P A 抗体（およびこれらに由来する分子）の有用性を強調する。L p a t h o m a b はまた、神経外傷、例えば、脊髄損傷および外傷性脳損傷の治療、ならびに疼痛、例えば神経障害性疼痛の低減に有効であることが示されている。治療的利点に加えて、L P A に対する抗体はまた、L P A の検出に有用であるという利点を有する。以下でより詳細に記載されるように、L P A のレベルは多くの疾患または病状で上昇し、または異常である。この事実により、L p a t h が開発した高親和性結合抗L P A 抗体と組み合わせて、L P A の検出、および異常なレベルのL P A と関連する疾患の診断のためのキットおよび方法の開発に至った。加えて、臨床試料中のL P A レベルの高感度測定により、例えば、血液、血液分画物（例えば、血清、血漿、など）、尿、および/または脳脊髄液（C S F ）における疾患の治療の効力のモニタリングが可能になる。よってコンパニオン診断法、すなわち、神経外傷の治療のための抗体治療薬ならびにそのような治療中のL P A レベルの検出のための抗体方法および/またはキットが構想される。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0005】

1. 序

下記記載は、本発明を理解する際に有用であり得る情報を含む。本明細書で提供される情報のいずれも、または本明細書で特定のまたは暗に言及されるいずれの刊行物もここで特許請求される発明に対して先行技術である、あるいはこれにさらに特定の関連することを認めるものではない。

【0006】

2. 背景

A. 神経外傷

神経外傷は、損傷、出血または疾患によるかどうかに関係なく、中枢神経系への損傷を示す。主な型の神経外傷としては、脊髄損傷（S C I）、外傷性脳損傷（T B I）、脳卒中（虚血性または出血性）が挙げられる。C N S 損傷は、死または生涯にわたる身体障害となる可能性の最も高い損傷の型である。

【0007】

i. 外傷性脳損傷（T B I）

T B I は頭部への殴打または振動あるいは穿通性頭部外傷に起因する脳における機能の破壊である。米国では、1年に150万を超えるT B I 患者があり、これらの125,000が、永久的身体障害となっている。T B I の一般的な原因としては、転倒、自動車関連の衝突、暴力、スポーツ外傷および戦闘外傷、例えば爆薬爆発が挙げられる。T B I はまた、戦場での軍事犠牲の主因、および退役軍人が苦しむ長期リハビリテーション問題の最大の原因である。致命的でない場合（22%の中程度および35%の重度T B I 患者が損傷後1年以内に死亡する）、T B I は永久的で重度の身体的、認知的、および挙動的機能障害となる可能性があり、長期ヘルスケアの必要な病人となる。現在のところ、T B I を標的とするF D A に認可された薬物は無い。

【0008】

T B I はその原因が多様であり、2段階イベントとして見ることができる：1) 一次病理性イベント、例えば出血および虚血、組織の断裂および軸索損傷となる、機械的衝撃により引き起こされる、限局的または広汎性であり得る、一次的損傷；2) 一次的損傷の結果である、二次的損傷、例えば広汎性炎症、細胞死およびグリオシス。この二次的損傷は、損傷の直後に始まり、数週間の間継続する可能性があり、神経幹細胞活性の活性阻害を伴うと考えられる。集合的に、これらのイベントは、神経変性につながる。

【0009】

T B Iの大部分は軽度であり、よって損傷の直後では診断されないままになる可能性がある。なぜなら、軽度T B Iを特徴づける単一のT B I症状または症状のパターン、例えば、迅速なスクリーニング試験、理想的には戦場、緊急治療室または緊急救難車で使用することができるもの（例えば、本明細書で記載されるキット）は存在しないからである。診断未確定のおよび未処置のT B Iはリスクを与える、というのも、いくつかの徴候および症状は損傷後数日から数カ月遅延する可能性があり、未処置の場合、患者の身体的、情動的、挙動的、社会的、または家族状態に著しい影響を有する可能性があり、機能障害となる可能性がある。損傷由来の二次的ダメージが最初の衝撃後に続くので、早期治療（および、よって迅速な診断）、特にポイントオブケア治療が望ましい。T B Iのための理想的な療法は、損傷梗塞サイズを低減させ、ならびに二次的炎症反応を制限するであろう。

10

【 0 0 1 0 】

i i . 脊髄損傷 (S C I)

S C Iは通常、椎骨を骨折または脱臼させる脊椎への突然の外傷性殴打、または脊髄を切断する損傷で始まる。S C Iの一般的な原因としては、自動車事故、転倒、暴力行為、スポーツおよびレクリエーション損傷ならびに脊椎に影響するある一定の疾患が挙げられる。脊髄損傷は同様に戦闘状態において起こり、脊髄損傷は、現在のイラクおよびアフガニスタン紛争における約5パーセント（5%）の犠牲者を占める。ダメージは脊髄が直接ダメージを受ける損傷の瞬間に始まり、または周囲の骨、円板、または靭帯が脊髄組織を傷つけ、または断裂させる場合、脳と身体の残りの間の脊髄でシグナルを上下に運ぶ神経細胞の長い伸長部である軸索の破壊を引き起こす。脊髄への損傷はこれらの軸索の2~3、多くまたはほとんどにダメージを与えることがあり、結果として生じた麻痺および感覚消失の程度は結果として様々である。改善された救急医療ならびに積極的な治療およびリハビリテーションは、神経系へのダメージを最小に抑える、および制限された能力を回復させることさえ助けることができる。脊髄の圧迫を軽減する、および骨折を修復するために外科手術が必要とされることがある。ステロイド薬物メチルプレドニゾロンは、損傷後最初の8時間以内投与された場合、神経細胞へのダメージを低減させると考えられる。麻痺および感覚消失に加えて、S C Iはしばしば呼吸の問題（損傷のレベルがより高いと、しばしば人工呼吸器サポートが必要とされる）、慢性疼痛ならびに膀胱および腸管機能不全、ならびに心臓の問題への感受性の増加を伴う。

20

【 0 0 1 1 】

i i i . 脳卒中

脳卒中は、脳中での出血（放血）（通常、血管の破裂により引き起こされる）、または脳領域への血流の損失（虚血）（例えば、脳の一部への動脈における血餅詰まりにより引き起こされ得る）により引き起こされる脳への血流の突然の中断である。虚血性脳卒中は脳卒中の大半の一因である。脳卒中は突発的な脱力、感覚消失、あるいは会話、視覚、または歩行困難を引き起こし得る。症状は血流の中断の位置および程度ならびに結果として起こる組織ダメージによって様々である。脳卒中は、米国では、第3位の死因であり、重篤な、長期身体障害の主因である。脳卒中は典型的に身体検査、特に画像化、例えばCTスキャン、MRIスキャンなどにより決定される。脳卒中は現在、血液検査（複数可）により診断できない。しかしながら、血液検査は、脳卒中症状に至った医学的状态をさらに理解するために、実施され得る。くも膜下出血による脳卒中が疑われる場合、または髄膜炎などの他のC N S病状が疑われる場合、腰椎穿刺がしばしば実施される。

30

40

【 0 0 1 2 】

B . 生理活性シグナル伝達脂質

ある一定の脂質およびそれらの誘導体が現在、細胞膜中の単に単純な構造要素として、あるいは - 酸化、解糖または代謝過程のためのエネルギー源としてではなく、医学研究のための重要な標的として認識されている。特に、ある一定の脂質は、動物およびヒト疾患において重要なシグナル伝達メディエーターとして機能する。細胞膜の脂質の大部分は排他的に構造的役割を果たすが、それらのごく一部は細胞外刺激を細胞内に中継するのに関与する。これらの脂質は、「生理活性脂質」または、代わりに、「生理活性シグナル伝

50

達脂質」と呼ばれる。「脂質シグナル伝達」は、細胞膜脂質をセカンドメッセンジャーとして使用する多くの細胞シグナル伝達経路のいずれかを示し、ならびに脂質シグナル伝達分子のそれ自体の特定の受容体との直接相互作用を示す。脂質シグナル経路は成長因子から炎症性サイトカインに及ぶ様々な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決定を調節する。生理活性脂質シグナル伝達の研究は、激しい科学的調査の領域であり、というのも、ますます多くの生理活性脂質が同定され、それらの作用が特徴付けられているからである。

【0013】

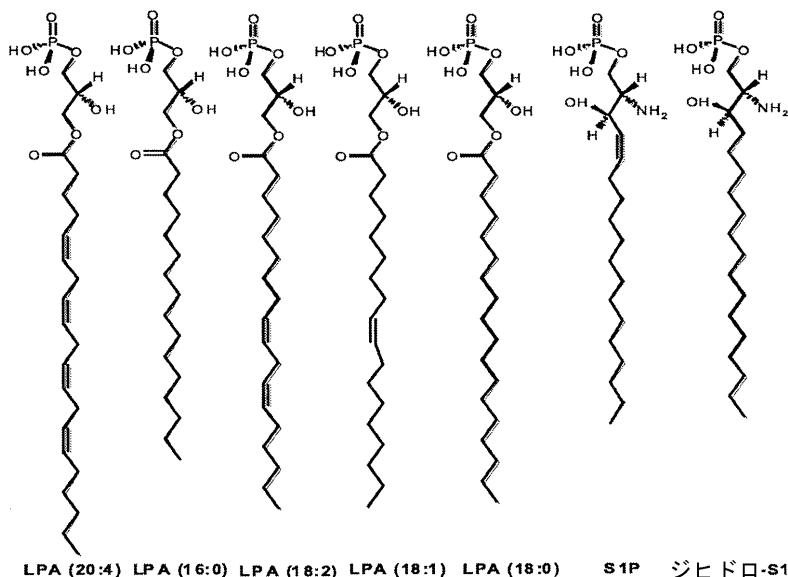
生理活性脂質の例としては、下記が挙げられる：エイコサノイド（カンナビノイド、ロイコトリエン、プロスタグランジン、リポキシン、エポキシエイコサトリエン酸、およびイソエイコサノイドを含む）、非エイコサノイドカンナビノイドメディエーター、リン脂質およびそれらの誘導体、例えばホスファチジン酸（PA）およびホスファチジルグリセロール（PG）、血小板活性化因子（PAF）およびカルジオリピンならびにリゾリン脂質、例えばリゾホスファチジルコリン（LPC）および様々なリゾホスファチジン酸（LPA）。生理活性シグナル伝達脂質としては、また、下記も挙げられる：スフィンゴ脂質、例えばスフィンゴミエリン、セラミド、セラミド-1-リン酸、スフィンゴシン、スフィンゴシルホスフォリルコリン、スフィンガニン、スフィンガニン-1-リン酸（ジヒドロ-S1P）およびスフィンゴシン-1-リン酸。スフィンゴ脂質およびそれらの誘導体は、重要な細胞過程に対する多面的効果を有する細胞外および細胞内シグナル伝達分子の群を表す。生理活性シグナル伝達脂質の他の例としては、下記が挙げられる：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、およびセレブロシド。

【0014】

1. リゾ脂質

リゾリン脂質（LPL）は、リゾ脂質としても知られており、単一の炭化水素骨格およびリン酸基を含む極性頭部基を含む低分子量（典型的には約500ダルトン未満）脂質である。いくつかのリゾ脂質は生理活性シグナル伝達脂質である。医学的に重要な生理活性リゾ脂質の2つの特定の例は、LPA（グリセロール骨格）およびS1P（スフィンゴイド骨格）である。選択したLPA、S1P、およびジヒドロS1Pの構造を下記に示す。

【化1】



【0015】

LPAの構造骨格はグリセロール系リン脂質、例えばホスファチジルコリン（PC）またはホスファチジン酸（PA）に由来する。S1Pなどのリゾスフィンゴ脂質の場合、セラミド骨格の脂肪酸がない。S1P、ジヒドロS1P（DHS1P）、およびスフィンゴ

シルホスフォリルコリン (S P C) の構造骨格はスフィンゴシンに基づき、これはスフィンゴミエリンに由来する。

【 0 0 1 6 】

L P A および S 1 P は同じクラスの複数の膜貫通ドメイン G タンパク質共役 (G P C R) 受容体に結合することにより、様々な細胞シグナル経路を調節する。S 1 P 受容体は S 1 P 1、S 1 P 2、S 1 P 3、S 1 P 4、および S 1 P 5 (以前は E D G - 1、E D G - 5 / A G R 1 6、E D G - 3、E D G - 6 および E D G - 8) として指定され、L P A 受容体は L P A 1、L P A 2、および L P A 3 (以前は、E D G - 2、E D G - 4、および E D G - 7) として指定される。このファミリーの 4 番目の L P A 受容体が、L P A (L P A 4) として同定され、これらのリゾリン脂質に対する他の推定受容体もまた報告されている。

10

【 0 0 1 7 】

L P A および S 1 P は、免疫関連細胞、例えば T - および B - リンパ球の調節を通して免疫応答において役割を果たすことが示されている。これらの脂質は免疫応答部位への T 細胞移動を促進し、T 細胞の増殖ならびに様々なサイトカインの分泌を調節する。特に、S 1 P は、リンパ球の末梢循環中への放出を制御すると考えられる。よって、L P A および S 1 P に結合する作用物質は、望ましくない、過剰または異常な免疫応答を減少させるための、および疾患および病状、例えばリンパ球の望ましくない、過剰または異常な関与または異常な免疫応答と関連するある一定の血液癌および自己免疫障害を治療するための方法において有用であると考えられる。

20

【 0 0 1 8 】

a . リゾホスファチジン酸 (L P A)

リゾホスファチジン酸 (モノ - アシルグリセロール - 3 - リン酸、 < 5 0 0 ダルトン) は、単一の炭化水素骨格およびリン酸基を含む極性頭部基から構成される。L P A は単一の分子実体ではなく、様々な長さおよび飽和度の脂肪酸を有する内在性構造変異体の集合体である。よって、本明細書で使用される場合、「L P A」は、別記されない限り、生理的に関連する生理活性 L P A 変異体の組を示す。アイソフォームに対する標準命名法によれば、例えば、数字 1 8 : 2 は L P A アイソフォームが、2 つの二重結合を有する 1 8 - 炭素脂肪酸を有することを示す。L P A の生物学的に関連した変異体は 1 8 : 2、1 8 : 1、1 8 : 0、1 6 : 0、および 2 0 : 4 を含む。飽和脂肪酸 (1 6 : 0 および 1 8 : 0) ならびに不飽和脂肪酸 (1 6 : 1、1 8 : 1、1 8 : 2、および 2 0 : 4) の両方を有する L P A 種が血清および血漿中で検出されている。1 6 : 0、1 8 : 1、1 8 : 2、および 2 0 : 4 L P A アイソフォームは、血液中で支配的な種である。

30

【 0 0 1 9 】

検出可能な L P A のレベルが様々な体液、例えば血清、血漿、唾液、濾胞性流体、炎症流体、いくらかの悪性浸出液および脳脊髄液で見出されている [A o k i , e t a l . [(2 0 0 8) B i o c h i m B i o p h y s A c t a 1 7 8 1 : 5 1 3 - 8 においてレビューされている]。広範囲の細胞型が、L P A を産生することが知られており、血小板、有糸分裂後ニューロン、アストロサイト、赤血球、脂肪細胞、および様々な癌細胞が挙げられる。飽和 (1 6 : 0 および 1 8 : 0) ならびに不飽和脂肪酸 (1 6 : 1、1 8 : 1、1 8 : 2、および 2 0 : 4) の両方を有する L P A 種が生物流体中で同定されており、1 6 : 0、1 8 : 2、1 8 : 1、1 8 : 0 および 2 0 : 4 L P A が支配的な種である (A o k i , e t a l . , 2 0 0 8) 。

40

【 0 0 2 0 】

L P A は様々な前駆体、例えばグリセロール 3 - リン酸、ホスファチジン酸および様々なリゾリン脂質から生成させることができる。グリセロリン脂質およびトリグリセリド合成にとって重要な新規 L P A 合成では、L P A は、小胞体において、グリセロール - 3 - リン酸のグリセロール 3 - リン酸アセチルトランスフェラーゼによるアシル化により合成される。この経路は要請によって起こる可能性があり、細胞シグナル伝達により調節されない。

50

【0021】

血清および血漿中の主LPA源は、オートタキシン(ATX、リゾホスホリパーゼD)の活性によるものであり、これは活性化血小板から放出される様々なリゾリン脂質(LPL)、例えば、ホスファチジルコリン(LPC)、リゾホスファチジルエタノールアミン、およびリゾホスファチジルセリンの加水分解によりLPAを生成させる。ATXは、多様な生物流体、例えば脳脊髄液、血漿、および精液中で見出されており；ヒト血漿中にLPAが存在する一因となる主酵素である[Sato (2005), J Neurochem 92:904-14; Tokumura, et al. (2002), Biochim Biophys Acta. 1582: 18-25]。

【0022】

LPAはまた、細胞外で、分泌されたホスホリパーゼA1およびA2によるホスファチジン酸の脱アシル化を介して合成することができ、ならびに細胞内ホスホリパーゼA1およびA2が関与する同様のメカニズムは、血小板中のLPAレベルの一因であろう(Aoki, et al., 2008)。最後に、LPAはまた、ミトコンドリアにおけるモノアシルグリセロールキナーゼによるモノアシルグリセロールのリン酸化から生じ得る。

【0023】

生理的条件下、LPAはほとんどの細胞型において少量でしか存在しない、というのは、これは、リン脂質生合成の初期工程において中間体分子の役割を果たすからである。正常な生理では、LPAはATXの自己阻害によりそれ自体の生合成を調節すると考えられ；よって、血漿中の細胞外LPAレベルは、血清中のおよそ0.1-1 μ の低/基礎レベルで維持される[Baker, et al. (2001), Anal Biochem 292:287-95]。興味深いことに、上昇したLPAのレベルがある一定の病理学的状態、例えばアテローム性動脈硬化[Siess, et al. (1999), Proc Natl Acad Sci U S A. 96(12):6931-6]、卵巣癌[Eder, et al. (2000), Clin Cancer Res. 6:2482-91]および損傷された角膜[Liliom, et al. (1988), Am J Physiol. 274:C1065-74]で観察され、血液が子ブタにおいてくも膜下腔内に注射された脳出血性損傷モデルでは、10 μ までのレベルに到達すると考えられる[Tigyi, et al. (1995), Am J. Physiol. 268:H2048-2055]。さらに、ATX発現の増加したレベルは、癌および腫瘍攻撃性と関連し得る[Mills, GB and Moolenaar, WH (2003), Nat Rev. 癌 3(8):582-91]。

【0024】

成体ラット脳では、LPAは約1-14nmol/gの値を有することが見出されているが、約80ng/mlのより高い値が最初報告され[Aaltonen, et al. (2010), J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 878:1145-52; Sugiura, et al. (1999), Biochim Biophys Acta. 1440:194-204]、脳幹および中脳において最高レベル、視床において中間レベルならびに皮質および小脳において最低レベルであり、よって、成体脳内でのLPA合成および生理的役割の変動、例えば疼痛のための下行調節経路における関与が示唆される。LPAはまた、ラットおよびイヌの脳脊髄液中に存在し[Sato, et al. (2005), J Neurochem. 92(4):904-14]、およびATXはラットおよびマウス脳の脈絡叢中に存在する[Fuss, et al. (1997), J Neurosci 17(23):9095-9103; Narita, et al. (1994), J Biol Chem 269(45):28235-42]。

【0025】

10

20

30

40

50

損傷後、LPAは坐骨神経結紮のモデルにおけるマウス脊髄において合成され [Ma, et al. (2010), J Pharmacol Exp Ther. 333(2):540-6] およびLPA様活性は新生仔ブタにおいて自己血液のくも膜下腔内注射後脳脊髄液で増加する [Tigyi, et al. (1995), Am J Physiol. 268:H2048-2055]。通常、検出不能なレベルのATXが成体ラット脳の病変に隣接するアストロサイト中で増加する [Savaskan, et al. (2007), Cell Mol Life Sci. 64(2):230-43]。ヒトでは、脳脊髄液中のATXの存在が多発性硬化症患者において証明されており [Hammack, et al. (2004), Mult Scler. 10(3):245-60] および、ヒト血漿中のより高いLPAレベルは、非弁膜症性心房細動患者における無症候性脳梗塞を予測すると推測される [Li, et al. (2010), Int J Mol Sci. 11(10):3988-98]。さらに、外傷性脳損傷(TBI)患者由来のヒト脳脊髄液中では、[Farias, et al. (2011), J Trauma. 2011 71(5):1211-8]、アラキドン酸、ホスファチジン酸のLPAおよびアラキドン酸への加水分解から生成される脂質のレベルの増加が記載されている。一貫して、LPAレベルはまた、マウスにおいて坐骨神経損傷後に増加し、正常組織の基礎レベルに比べておよそ100倍高くなる [Ma, et al. (2010), J Pharm Exp Therapeut. 333:540-546]。損傷後のヒト脳では、LPA₁は、反応性アストロサイトにより発現されることが見出され、LPA₂は側脳室の内側の上衣細胞により発現されることが見出された。興味深いことに、これらの損傷を受けたヒト脳の皮質内で、LPA₂ mRNAは上方制御され、およびATX mRNAは下方制御された。Frugier, et al. (2011), Cell Mol Neurobiol. 31(4):569-77。

10

20

30

40

50

【0026】

ATX発現は病変部に隣接する反応性アストロサイトでは著しく上方制御され (Savaskan et al., 2007)、およびPLA₂活性はいくつかの型のCNS損傷、例えば閉鎖性頭部損傷 [Shohami et al. (1989), J Neurochem 53(5):1541-6, abstract]、脳虚血 [Rordorf, et al. (1991), J Neurosci 11(6):1829-36] または脊髄損傷 (Ma, et al., 2010) において増加し、損傷後のLPA産生の促進におけるPLA₂の役割が示唆される。実際、ATX遺伝子のノックダウンまたはPLA₂の薬理的阻害のいずれかは損傷後のLPA産生および神経障害性疼痛を著しく減少させる (Ma, et al., 2010)。

【0027】

これまで、ヒト患者における神経外傷後の脳脊髄液中のLPAの直接測定はなされていない。BBBの破壊は血小板を含む造血細胞の血流から損傷部位への侵入を可能にすると考えられ、より高いLPAのレベルが活性化血小板によるその放出により存在できるようになり得る。

【0028】

LPAは長く、真核生物および原核生物細胞の両方において、リン脂質生合成の前駆体として知られてきたが、LPAは、ごく最近になって、活性化細胞、とりわけ血小板により迅速に産生され、放出され、特異的な細胞-表面受容体上で作用することにより標的細胞に影響するシグナル伝達分子として浮上してきた。小胞体において合成され、より複雑なリン脂質に加工されることに加えて、LPAは、細胞活性化後、前から存在するリン脂質の加水分解により生成させることができ；例えば、sn-2位は一般に、脱アシル化のために脂肪酸残基がなく、sn-3ヒドロキシルのみが脂肪酸にエステル化されたままである。その上、LPAの産生において重要な酵素、オートタキシン(リゾPLD/NPP2)は、多くの腫瘍型がオートタキシンを上方制御するので、癌遺伝子の産物となり得る。ヒト血漿および血清中のLPAの濃度は報告されており、高感度の特異的LC/MS手

順を用いて実施される決定が挙げられる。例えば、25 で1時間静置させた新たに調製されたヒト血清では、LPA濃度はおよそ1.2 mMであると推定され、LPA類似体16:0、18:1、18:2、および20:4が支配的な種であった。同様に、25 で1時間静置させた新たに調製されたヒト血漿では、LPA濃度はおよそ0.7 mMであると推定され、18:1および18:2 LPAが支配的な種であった。

【0029】

LPAは主にあるクラスの複数の膜貫通Gタンパク質共役受容体(GPCR)に結合することによりその生物学的機能を媒介する。LPA1-5と呼ばれる5つのLPA特異的GPCRが、今日までに同定されており；それらは、重複する、および別個のシグナル伝達特性および組織発現の両方を示す。LPA1-3受容体はGPCRのいわゆるEDGサブファミリー(EGD2/LPA1、EDG4/LPA2、およびEDG7/LPA3)に属し、互いに50%配列類似性を有する。それらの最も近い類縁体はカンナビノイドCB1受容体であり、これは生理活性脂質2-アラキドノイル-グリセロール(2-AG)およびアラキドノイル-エタノールアミンに結合する。2つの新たに同定されたLPA受容体は、LPA4(以前はGPR23/p2y9)およびLPA5(以前はGPR92)と呼ばれ、P2Yヌクレオチド受容体により密接に関連する。加えて、LPAは細胞内受容体、PPRを認識する。

10

【0030】

LPA1は、幅広い組織および器官において発現され、一方LPA2およびLPA3はより限定された発現プロファイルを示す。しかしながら、LPA2およびLPA3発現は卵巣および結腸癌ならびに炎症において増加することが示され、LPA2およびLPA3の主な役割は病態生理条件にあることが示唆される。

20

【0031】

これらの受容体の役割は、一部、マウスにおける受容体ノックアウト研究により解明されている。LPA1欠損マウスは嗅覚障害に起因する哺乳不全により一部出生後致死を示す。LPA1欠損マウスはまた、ブレオマイシン誘発肺損傷に応じて肺線維症から保護される。さらに、LPA1受容体遺伝子が欠乏したマウスは神経損傷誘発神経障害性疼痛挙動および現象を喪失する。

【0032】

対照的に、LPA2受容体が欠乏したマウスは正常であると思われる。LPA3受容体ノックアウトマウスは、胚盤胞着床の遅延および胚空間の変化により産仔数が低減し、LPA3欠損子宮は低減したシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)発現およびプロスタグランジン合成を示し；一方、PGE2のLPA3欠損雌マウスへの外因性投与は、着床異常を救うことが報告されている。

30

【0033】

LPAは幅広い生物学的応答、例えば細胞増殖の誘導、細胞移動および神経突起退縮の刺激、ギャップ結合閉鎖、およびさらに粘菌走化性に影響する。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応答性に対して試験されるので増殖し続ける。LPAの主な生理的および病態生理的效果としては、例えば下記が挙げられる：

【0034】

創傷治癒：現在では、細胞成長および増殖の刺激に加えて、LPAは細胞張力および細胞-表面フィブロネクチン結合を促進し、これらは創傷修復および再生における重要なイベントであることが知られている。

40

【0035】

アポトーシス：近年、抗アポトーシス活性はまた、LPAに帰し、近年、ペルオキシソーム増殖受容体はLPAに対する受容体/標的であることが報告されている。

【0036】

血管成熟：オートタキシン、LPAの産生に関連する分泌されたリゾホスホリパーゼD、は発生中の血管形成に必須である。加えて、不飽和LPAは血管平滑筋細胞脱分化の誘導に対する主な誘因として同定された。

50

【 0 0 3 7 】

浮腫および血管透過性：L P Aはマウスにおいて血漿滲出およびヒスタミン放出を誘導する。

【 0 0 3 8 】

炎症：L P Aはヒト角膜上皮細胞において炎症性メディエータとして機能する。L P Aは角膜創傷治癒に関与し、水晶体におけるR O Sの放出を刺激する。L P Aはまた、ウサギ角膜においてH S V - 1を再活性化することもできる。

【 0 0 3 9 】

毒グモ、ロクソスケレス・レクルサ (*Loxosceles reclusa*) (ドクイトグモ)の咬傷は壊死性潰瘍を引き起こし、これは重篤な持続性組織ダメージ、および時折死を引き起こし得る。このクモの咬傷から生じる創傷の病態は、A Aおよびプロスタグランジンにより媒介される激烈な炎症反応から構成される。L・レクルサクモ毒液の主成分はホスホリパーゼD酵素であり、しばしばスフィンゴミエリナーゼD (S M a s e D)と呼ばれ、これはスフィンゴミエリンを加水分解し、C 1 Pを生成する。しかしながら、様々な頭部基を有するリゾリン脂質はL・レクルサ酵素により加水分解され、L P Aが放出されることが見出されている。抗L P A作用物質は、様々な型の炎症、例えば、限定はされないが、L・レクルサ毒物注入に起因する炎症を低減または治療するのに有用であると考えられる。

10

【 0 0 4 0 】

線維症および瘢痕形成：L P Aは、皮膚線維芽細胞において、E R K依存性経路を介するI型コラーゲンm R N A安定性のT G F媒介刺激を阻害する。その上、L P Aは、コラーゲン遺伝子発現および線維芽細胞の増殖を刺激することにより、いくらかの直接線維形成性効果を有する。

20

【 0 0 4 1 】

免疫応答：L P Aは、S 1 Pのように、免疫関連細胞の調節により免疫応答において役割を果たすことが示されている。これらの脂質は免疫応答部位へのT細胞移動を促進し、T細胞の増殖ならびに様々なサイトカインの分泌を調節する。

【 0 0 4 2 】

神経外傷：近年発見され、下記実施例において示されるように、L P AレベルおよびL P A代謝産物のレベルはT B Iにおいて上昇し、よって、L P Aおよびこれらの代謝産物は神経外傷に対するバイオマーカーとなる。加えて、L P Aの抗体中和は、下記実施例で示されるように、T B IおよびS C Iの両方において神経保護となることが示されている。

30

【 0 0 4 3 】

よって、L P Aの有効濃度を低減させる作用物質、例えばL p a t hの抗L P A m A bは、望ましくない、過剰または異常なレベルのL P Aと関連する疾患および病状、例えば神経外傷、創傷治癒および線維症、アポトーシス、血管新生および新血管新生、血管透過性および炎症と関連するものを治療するための方法において有用であると考えられる。近年、出願人は、L P Aに対するいくつかのモノクローナル抗体を開発した。これらの抗L P A抗体は、様々なL P Aを中和し、それらの生物学的および薬理作用を緩和する。よって、抗L P A抗体は、過剰な、望まれないまたは異常なレベルのL P Aと関連する様々な疾患および病状の防止および/または治療に有用であると考えられる。

40

【 0 0 4 4 】

C・L P Aの検出およびL P A関連病状の診断/検出

薄層クロマトグラフィー (T L C)、続いてガスクロマトグラフィー (G C)および/または質量分析 (M S)などの技術を用いて、L P Aなどのリン脂質を分離し、半定量的に測定するための方法は知られている。例えば、脂質は、体液または組織の試験試料から抽出することができる。あるいは、薄層クロマトグラフィーを使用して、様々なリン脂質を分離してもよい。リン脂質およびリゾリン脂質はその後、例えば、紫外光を使用してプレート上で可視化させることができる。あるいは、リゾリン脂質濃度はリン脂質から単離

50

した後、もしくはリン脂質の一部としてNMRまたはHPLCなどの物理学的測定、または質量分析(MS)またはLC-MSにより同定することができる。LPAレベルはまた、培養下の真核生物細胞に対するLPA特異的効果に基づくアッセイを用いて、卵巣癌患者由来の腹水中で決定されている。しかしながら、これらの手順は時間がかかり、高価で、変化しやすく、典型的に半定量的にすぎない。生物流体中のLPAなどのリゾリン脂質を検出するための、ならびに変化したレベルのリゾリン脂質と関連する病状を相関させ、および検出するための酵素法もまた知られており、例えば、米国特許6,255,063号および6,248,553号であり、これらは元々Atairgin Technologies, Inc.に譲渡され、今は本発明と共に所有されている。本明細書における方法を使用するLPAの検出および/または定量は、特異的LPA結合剤によるLPAの検出のため、よってLPA、特に異常なレベルのLPAと関連する疾患および病状の検出および診断のための高感度の特異的方法のための基礎を提供する。特に、患者試料におけるLPAの抗体に基づく検出および/または定量は、神経外傷、例えばTBI、SCI、脳卒中またはCNSへの他のダメージを維持している疑いがある患者において神経外傷を検出および/または診断する方法のための基礎を提供する。そのような検出方法およびキットは、迅速なポイントオブケア検査および診断に特に好適である。1つの実施形態では、ラテラルフロー診断方法およびキットを使用して、血液、尿または他の患者試料中のLPAおよび/またはLPA代謝産物(複数可)が迅速に検出され、定量される。

10

【0045】

D. セラノスティクスおよびコンパニオン診断法

20

セラノスティクスまたはコンパニオン診断法の概念は、特に個別化医療の分野で高まっている。有効なコンパニオン診断法は、二様で臨床効力を増強すると考えられる：第1に、応答性患者を治療前に同定させることにより、および第2に、治療の効力をリアルタイムでモニタできるようにすることにより。第1の状況では、コンパニオン診断により、医師は、患者を治療する前に、所定の治療が特定の患者に有効かどうか、および場合によっては、いずれの用量で有効かさえも決定することができる。言い換えれば、コンパニオン診断法は、所定のレジメンから利益を得る可能性が最も高い患者を同定する。そのような製品は、規定された遺伝要素を有するある一定の癌および他の病状の治療においてますます使用されている。例えば、ハーセプチン(商標)(Genentech)は、乳癌のための抗体に基づく治療である。コンパニオン免疫組織化学アッセイ(Hercept Test(商標))は、HER2陽性転移性乳癌を有する患者を同定するために開発されたものであり、というのも、これらの患者はハーセプチン(商標)治療により良く応答するからである。本明細書に記載されるように、身体試料中のLPAの測定による神経外傷の迅速な診断のための診断方法およびキットは神経外傷を有する患者の即時同定を可能にし、彼等は、このように、抗LPA抗体および/または他の薬物を使用する治療、あるいは神経外傷の治療のための外科的および/または他の手順から利益を得ると考えられる。第2の状況では、コンパニオン診断により、例えば、神経外傷後の治療処置の開始後の患者試料中のLPAレベルの定量を介して、治療に対する患者の応答をリアルタイムでモニタすることが可能になる。例えば、治療の効力は、特にCSF中のLPAレベルの測定により決定し、追跡することができる。治療は、例えば、抗LPA抗体またはLPA結合抗体断片の投与によってもよい。抗LPA抗体は、神経外傷、例えば、脊髄損傷または外傷性脳損傷を治療する、およびそのような外傷に起因するダメージを低減するのに有効であることが示されている。よって、本明細書におけるキットおよび方法は、神経外傷の治療のための治療薬、特にTBIおよび他の神経外傷の治療のための抗LPA抗体に対するコンパニオン診断法として有用であると考えられる。

30

40

【0046】

E. 定義

本発明との関連で使用されるいくつかの用語が以下で規定される。これらの用語に加えて、他のものが、必要に応じて、明細書の他の場所で規定される。別に明確に本明細書で規定されない限り、この明細書で使用される専門用語はそれらの当該技術分野において承

50

認されている意味を有するであろう。

【0047】

「異常な」という用語は、例えば、細胞標的、例えばタンパク質または生理活性脂質のレベルまたは有効濃度に関して、過剰であるまたは望まれないことを意味する。

【0048】

「抗体」(「Ab」)または「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、抗原またはエピトープに結合することができる、免疫グロブリン遺伝子に由来する、これに倣って作られるまたはこれによりコードされるペプチド、ポリペプチドの任意の形態、またはその断片を示す。例えば、Immunobiology, Fifth Edition, C. A. Janeway, P. Travers, M., Walport, M. J. Shlomchik, ed. Garland Publishing (2001)を参照されたい。「抗体」という用語は、本明細書では最も広い意味で使用され、モノクローナル、ポリクローナルまたは多重特異性抗体、ミニボディ、ヘテロコンジュゲート、ダイアボディ、トリアボディ、キメラ、抗体、合成抗体、抗体断片、および親抗体の相補性決定領域(CDR)(または抗原結合活性を保持するその変異体)を使用する結合剤を含む。抗体は、本明細書では親抗体の少なくとも1つの所望の活性を保持するとして規定される。所望の活性としては、抗原に特異的に結合する能力、インビトロでプロリレーション(proliferation)を阻害する能力、インビボで血管新生を阻害する能力、およびインビトロでサイトカインプロファイル(複数可)を変化させる能力が挙げられる。本明細書では、抗体および抗体断片、変異体、および誘導体はまた、そのような分子、または少なくともその抗原結合部分(複数可)が抗LPA抗体に由来するという点において、「免疫由来部分」とも呼ばれる場合がある。

10

20

【0049】

天然抗体(天然免疫グロブリン)は典型的に2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖からなる、通常、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は典型的には、重鎖に1つの共有結合ジスルフィド結合により結合され、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。各重および軽鎖はまた、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は一端に可変ドメイン(VH)を有し、これはまた可変ドメインと呼ばれ、続いて多くの定常ドメインを有する。各軽鎖は一端に可変ドメイン(VL)およびその他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列され、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列される。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメイン間の界面を形成する。「可変ドメイン」および「可変部」という用語は、同じ意味で使用される。「定常ドメイン」および「定常部」という用語はまた、互いに同じ意味である。

30

【0050】

VHおよびVL領域の各々における3つの超可変領域(相補性決定領域またはCDRとしても知られている)は、分子の特有の抗原結合部位を形成する。抗体分子内のアミノ酸配列変異の大部分はCDR内にあり、抗体に、その抗原に対するその特異性を与える。

【0051】

任意の脊椎動物種由来の抗体(免疫グロブリン)の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に異なる型の1つに割り当てることができる。

40

【0052】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。5つの免疫グロブリンの主要なクラスが存在し：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、これらのいくつかはさらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2に分割することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および3次元配置はよく知られている。

50

【0053】

「抗体誘導体」は、免疫由来部分、すなわち、抗体に由来する分子である。これは、例えば、抗体変異体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、多価抗体、抗体コンジュゲートなどを含み、それらは抗原に対する所望のレベルの結合活性を保持する。

【0054】

本明細書では、「抗体断片」は、無傷の抗体の抗原結合部位または可変ドメインを含む無傷の抗体の部分を示し、ここで、その部分は無傷の抗体のFc領域の定常重鎖ドメイン（例えば、CH2、CH3、およびCH4）を含まないことができる。あるいは、定常重鎖ドメイン（例えば、CH2、CH3、およびCH4）の部分は「抗体断片」に含ませることができる。抗体断片は抗原結合を保持し、下記を含む：Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、およびFv断片；ダイアボディ；トリアボディ；単鎖抗体分子（sc-Fv）；ミニボディ、ナノボディ、および抗体断片から形成される多重特異性抗体。抗体のパパイン消化により、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片（各々が、単一の抗原結合部位を有する）、および残留「Fc」断片（その名前は、容易に結晶化することができるその能力を反映する）が生成する。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、依然として、抗原に架橋することができるF(ab')₂断片が得られる。例として、Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を含む。「Fv」は完全な抗原認識および結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は密接な、非共有結合性会合にある1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインの二量体から構成される。この配置では、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を規定する。集合的に、6つの超可変領域が抗原結合特異性を抗体に与える。しかしながら、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な3つの超可変領域しか含まないFvの半分）でさえも抗原を認識し、これに結合する能力を有するが、結合部位全体よりも親和性が低い。「単鎖Fv」または「sFv」抗体断片は抗体のVHおよびVLドメインを含み、ここで、これらのドメインは単鎖ポリペプチド中に存在する。一般に、Fvポリペプチドはさらに、VHとVLドメインの間にポリペプチドリンカーを含み、これにより、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成することが可能になる。sFvのレビューのために、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

10

20

30

【0055】

Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステイン（複数可）を含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端の数個の残基が付加していることによりFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有するFab'のための、本明細書における表示である。F(ab')₂抗体断片は元々Fab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

40

【0056】

「抗体変異体」、この場合抗LPA抗体変異体は、本明細書では、抗体配列中の1つ以上のアミノ酸残基（複数可）の付加、欠失および/または置換のためにアミノ酸配列が天然抗LPA抗体アミノ酸配列と異なり、親抗結合抗体の少なくとも1つの所望の活性を保持する分子を示す。所望の活性としては、抗原に特異的に結合する能力、インビトロで増殖を阻害する能力、インビボで血管新生を阻害する能力、およびインビトロでサイトカインプロファイルを変化させる能力が挙げられる。抗体変異体におけるアミノ酸変化（複数可）は、軽鎖および/または重鎖の可変ドメインまたは定常部内であってもよく、Fc領域、Fab領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、およびヒンジ領域内が含まれる。1つの実施形態では、変異体は親抗体の1つ以上の超可変領域（複数可）

50

における1つ以上のアミノ酸置換(複数可)を含む。例えば、変異体は親抗体の1つ以上の超可変領域において、少なくとも1つの、例えば、約1~約10、好ましくは約2~約5の置換を含み得る。通常、変異体は親抗体重または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも65%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。場合によっては、少なくとも50%の配列同一性が好ましく、この場合、分子の他の特性は、結合および特異性などの所望の属性を有する。この配列に関する同一性または相同性は、必要に応じて、最大パーセント配列同一性を達成するために、配列を整列させ、ギャップを導入した後、親抗体残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして本明細書で規定される。N末端、C末端、または内部伸長、欠失、または抗体配列への挿入はいずれも、配列同一性または相同性に影響するものとして解釈されない。変異体はLPAに結合する能力を保持し、好ましくは、親抗体のものより優れた望ましい活性を有する。例えば、変異体はより強い結合親和性、血管新生を低減させるおよび/または腫瘍進行を中断させる増強された能力を有し得る。そのような所望の特性(例えば、より低い免疫原性、より長い半減期、増強された安定性、増強された効力)を分析するために、変異体のFab形態を親抗体のFab形態と、または変異体の全長形態を親抗体の全長形態と比較すべきであり、というの、例えば、抗スフィンゴ脂質抗体の型が本明細書で開示される生物活性アッセイにおいてその活性に影響を与えることが見出されているからである。本明細書における特定の対象の変異抗体は、少なくとも約10倍、好ましくは少なくとも約%5、25、59、またはそれ以上の少なくとも1つの所望の活性を表すものとして行うことができる。好ましい変異体は、親抗体と比べた場合、インビトロで測定すると優れた生物物理学的特性またはインビトロまたはインビボで測定すると優れた生物学的活性を有するものである。

10

20

30

40

50

【0057】

「抗LPA作用物質」は、LPAに結合する任意の治療薬を示し、LPAおよびその変異体に結合する抗体、抗体変異体、抗体由来分子または非抗体由来部分を含む。

【0058】

「生理活性脂質」は、脂質シグナル伝達分子を示す。生理活性脂質は、それらが細胞外および/または細胞内シグナル伝達を媒介し、よって、分化、移動、増殖、分泌、生存、および他のプロセスを調節することにより、多くの型の細胞の機能を制御することに関与するという点で、構造脂質(例えば、膜結合型リン脂質)から区別される。インビボでは、生理活性脂質は、細胞外液中で見出すことができ、そこでは、それらは他の分子、例えば血清タンパク質、例としてアルブミンおよびリポタンパク質と複合体形成することができる、または「遊離」形態で、すなわち、別の分子種と複合体形成されずに存在することができる。細胞外メディエーターとして、いくつかの生理活性脂質は、膜結合型イオンチャネルまたはGPCRまたは酵素またはひいては、複雑なシグナル伝達系を活性化する因子を活性化することにより、細胞シグナル伝達を変化させ、結果として、細胞機能または生存の変化が起こる。細胞内メディエーターとして、生理活性脂質は、細胞内成分、例えば酵素、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りそれらの作用を行使することができる。

【0059】

生理活性脂質の例としては下記が挙げられる: スフィンゴ脂質、例えばセラミド、セラミド-1-リン酸(C1P)、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)。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骨格(スフィンゴミエリンに由来)により特徴付けられる。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、重要な細胞過程に多面的効果を有する細胞外および細胞内シグナル伝達分子の群を表す。それらとしては、スルファチド、ガングリオシドおよびセレブロシドが挙げられる。他の生理活性脂質はグリセロール系骨格により特徴付けられ; 例えば、リゾリン脂質、例えばリゾホスファチジルコリン(LPC)および様々なリゾホスファチジン酸(LPA)、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) である。さらに他の生理活性脂質はアラキドン酸に由来し；これらとしては、エイコサノイド (エイコサノイド代謝産物、例えば 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挙げられる。

【 0 0 6 0 】

スフィンゴシン系生理活性脂質 (スフィンゴイド骨格を有するもの、例えばスフィンゴシンおよび S 1 P) とは対照的に、抗体産生のためのグリセロール系生理活性脂質 (グリセロール由来骨格を有するもの、例えば L P A) を標的にすることが好ましい可能性がある。他の実施形態では、抗体生成のためのアラキドン酸由来生理活性脂質を標的にすることが望ましい可能性があり、他の実施形態では、スフィンゴイド由来生理活性脂質ではなく、アラキドン酸由来およびグリセロール由来生理活性脂質が好ましい。一緒に、アラキドン酸由来およびグリセロール由来生理活性脂質は、本明細書では、「非スフィンゴイド生理活性脂質」と呼ばれることがある。

10

【 0 0 6 1 】

本明細書で規定される生理活性脂質のクラスから特定の排除されるのは、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り、それらは主に細胞膜の内および / または外葉の構造部材として機能する。

20

【 0 0 6 2 】

抗体または抗体断片もしくは変異体との関連での「生物活性」という用語は、所望のエピトープに結合することができ、ある意味では生物学的効果を及ぼす抗体または抗体断片もしくは抗体変異体を示す。生物学的効果としては、下記が挙げられるが、それらに限定されない：増殖シグナルの調節、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調節。

【 0 0 6 3 】

「バイオマーカー」は、疾患の進行または治療の効果を測定するために有用となる特別な分子特徴を有する、体内の特異的生化学物質である。

【 0 0 6 4 】

「心血管療法」は心臓療法 (心筋虚血および心不全の治療) ならびに心血管系と関連する他の疾患、例えば心疾患の防止および / または治療を含む。「心疾患」という用語は、心臓または心筋組織が関係する任意の型の疾患、障害、外傷または外科的処置を含む。特に興味深いのは、組織リモデリングと関連する病状である。「心臓治療薬」という用語は、心臓および心筋疾患および障害により引き起こされる、もしくはこれと関連する疾患に治療的である作用物質を示す。

30

【 0 0 6 5 】

「担体」は、ハプテンへのコンジュゲーションのために適合された部分を示し、これにより、ハプテンは免疫原性となる。代表的な、非限定的クラスの担体はタンパク質であり、これらの例としては、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、ヘماغルタニン (h e m a g l u t a n i n)、破傷風、およびジフテリアトキソイドが挙げられる。好適な担体の他のクラスおよび例は当技術分野で知られている。これら、ならびに後に発見または発明される自然発生または合成担体は、本明細書における開示に従う適用に適合させることができる。

40

【 0 0 6 6 】

本明細書では、「細胞」「細胞系」および「細胞培養物」という表現は同じ意味で使用され、全てのそのような指定は後代を含む。よって、「形質転換体」および「形質転換細胞」という用語は、初代被験体細胞および、移行数に関係なく、それら由来の培養物を含む。全ての後代は、計画的なまたは偶発的な変異のために、D N A 量が正確に同一ではない可能性があることもまた理解される。元々形質転換された細胞においてスクリーニング

50

された同じ機能または生物活性を有する変異後代が含まれる。別々の指定が意図される場合、それは文脈から明らかであろう。

【0067】

「キメラ」抗体（または免疫グロブリン）という用語は、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中の対応する配列と同一または相同である重および/または軽鎖を含むが、その鎖（複数可）の残りは、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る抗体中の対応する配列と同一または相同である分子、ならびに、所望の生物活性を示す限り、そのような抗体の断片を示す（Cabilly, et al., 下記; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 81:6851 (1984)）。キメラ抗体の1つの例は、マウス可変ドメイン（VLおよびVH）ならびにヒト定常ドメインを含む抗体である。しかしながら、抗体配列は、起源は脊椎動物または無脊椎動物であってもよく、例えば、哺乳類、鳥または軟骨魚を含む魚、齧歯類、イヌ、ネコ、有蹄動物およびヒトを含む霊長類由来である。

10

【0068】

「併用療法」という用語は、示された治療効果を達成す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レジメンを示す。例えば、併用療法は、2つ以上の化学的に異なる活性成分、例えば、速効性化学療法薬および抗脂質抗体の投与を含み得る。あるいは、併用療法は、単独、または放射線療法および/または外科手術などの別の治療の送達と組み合わせ、抗脂質抗体および/または1つ以上の化学療法薬の投与を含み得る。2つ以上の化学的に異なる活性成分の投与との関連で、活性成分は、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できることが理解される。別個の組成物として投与する場合、異なる活性成分を含む組成物は、同じまたは異なる時間に、同じまたは異なる経路で、同じまたは異なる投与レジメンを用いて投与することができる（全て特定の状況の要求に応じ、主治医の決定に応じる）。同様に、単独または1以上の化学療法薬と組み合わせ、1つ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/または外科手術と併用する場合、薬物（複数可）は、外科手術または放射線治療の前または後に送達することができる。

20

【0069】

「コンパニオン診断」は、特定の薬物治療または療法と関連させた診断試験を示す。特に、身体試料中のLPAまたはLPA代謝産物（複数可）の測定による神経外傷の迅速な診断のための診断方法およびキットは、神経外傷を有する患者の迅速な同定を可能にし、よって、彼等は、抗LPA抗体またはLPA結合抗体断片および/または他の薬物を用いた治療、あるいは神経外傷の治療のための外科的および/または他の手順から利益を得ると考えられる。

30

【0070】

「制御配列」という表現は、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を示す。例えば、原核生物に好適な制御配列はプロモーター、任意でオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核生物細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが知られている。

40

【0071】

「誘導体化生理活性脂質」は生理活性脂質、例えば、LPAであり、これは極性頭部基および少なくとも1つの炭化水素鎖を有し、ここで、炭化水素鎖内の炭素原子は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。この誘導体化は、分子との反応、例えば、担体へのコンジュゲーションのために生理活性脂質を活性化するように機能する。

【0072】

「誘導体化生理活性脂質コンジュゲート」は、担体に共有結合的にコンジュゲートされている誘導体化生理活性脂質を示す。担体はタンパク質分子であってもよいし、あるいは

50

ポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバントまたはシリコーンビーズなどの部分であってもよい。誘導体化生理活性脂質コンジュゲートは抗体応答を生じ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理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理活性脂質コンジュゲートは、検出のために使用する場合、固体支持体に付着されている。

【0073】

「検出すること」は、(例えば、疾患または病状)の実存または存在を発見または確認することを意味する。

【0074】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を示し、断片は同じポリペプチド鎖内に軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された重鎖可変ドメイン(VH)を含む(VH-VL)。同じ鎖上の2つのドメイン間で対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは別の鎖の相補的ドメインと対合させられ、2つの抗原結合部位が生成される。ダイアボディは、例えば、EP404,097号;WO93/11161号;およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)においてより詳細に記載される。

【0075】

「診断」はその症状、例えば試験結果および他の測定値の検査による疾病または他の状態の同定を意味する。

【0076】

「有効濃度」は、ある一定の望ましくない生理活性脂質の、例えば、絶対、相対、および/または使用可能濃度および/または活性を示す。言い換えれば、生理活性脂質の有効濃度は、その生物学的機能を実行するのに使用することができる、および実行することができる脂質の量である。例えば、生理活性脂質(例えば、例として、C1P)に対するモノクローナル抗体などの免疫由来部分は、脂質に結合し、その生物学的機能を実行できないようにすることにより、脂質の有効濃度を低減させることができる。この例では、脂質自体は依然と存在する(言い換えれば、抗体により分解されない)が、もはやその受容体または他の標的に結合して、下流効果を引き起こすことはできず、そのため、絶対濃度よりもむしろ「有効濃度」が適切な測定値である。直接および/または間接的に生理活性脂質の有効濃度を測定するための方法およびアッセイが存在する。

【0077】

「エピトープ」または「抗原決定基」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示す。

【0078】

「発現カセット」という用語は、構造遺伝子(すなわち、抗体鎖などのタンパク質コード配列)のそ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示す。発現カセットは、ポリペプチド-コード配列と、任意で、他の配列、例えば、転写終結シグナルと作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーターを含む。発現の達成に必要なまたは有用な付加的調節エレメント、例えば、エンハンサーもまた使用され得る。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「ネイキッドDNA」ベクター、などを含む。

【0079】

「完全ヒト抗体」は、好適な免疫原と共に提供された際に、必ずしもCDRグラフティングを必ずしも必要としないヒト抗体を産生することができる遺伝子操作された(すなわち、トランスジェニック)動物、典型的に哺乳類、通常マウス(例えば、Medarexから得られるもの)において産生される抗体を示すことができる。これらの抗体は、それらが、非ヒト抗体遺伝子が置換または抑制され、およびヒト免疫グロブリン遺伝子のいくらかまたは全てと置換されている動物(例えば、トランスジェニックマウス)から生成さ

10

20

30

40

50

れるという点で、完全「ヒト」である。言い換えれば、抗体は、関連のCDRのためのヒトフレームワークを生成するように遺伝子操作されたマウスまたは他の動物に免疫原性形態で提供された場合、生理活性脂質、特定的にはLPAに対して生成されるものを含む。

【0080】

「ハプテン」は、非免疫原性であるが、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するが、免疫原性の特性を有さない。ハプテンは一般に、ほとんどの状況下で、担体、例えば、タンパク質、ポリエチレングリコール(PEG)、コロイド金、シリコンビーズ、などに付着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である。担体はまた、それ自体によって免疫応答を惹起しないものであり得る。

10

【0081】

「ヘテロコンジュゲート抗体」という用語は、2つの共有結合的に結合された抗体を示すことができる。そ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調製することができる。本明細書では、「コンジュゲート」という用語は、1つ以上の抗体断片(複数可)または結合部分と1つ以上のポリマ分子(複数可)の共有結合により形成される分子を示す。

【0082】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。あるいは、別の方法で見れば、ヒト化抗体は、ヒト配列の代わりに非ヒト(例えばマウス)抗体に由来する選択された配列も含むヒト抗体である。ヒト化抗体は保存的アミノ酸置換またはその結合および/または生物学的活性を有意に変化させない、同じまたは異なる種に由来する非天然残基を含むことができる。そ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。ほとんどの部分では、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、所望の特性を有するマウス、ラット、ラクダ、ウシ、ヤギ、またはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRに由来する残基により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。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基により置換される。

20

【0083】

さらに、ヒト化抗体はレシピエント抗体にも移入されたCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含むことができる。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。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つ、1つの態様では2つの、可変ドメインを全て含み、この場合、全ての、または全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、全ての、または実質的に全てのFR領域はヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は任意で免疫グロブリン定常部(Fc)の少なくとも一部、またはヒト免疫グロブリンのそれも含む。例えば、下記を参照されたい: Cabilly, et al., 米国特許第4,816,567号; Cabilly, et al., 欧州特許第0,125,023 B1号; Boss, et al., 米国特許第4,816,397号; Boss, et al., 欧州特許第0,120,694 B1号; Neuberger, et al., WO 86/01533号; Neuberger, et al., 欧州特許第0,194,276 B1号; Winter, 米国特許第5,225,539号; Winter, 欧州特許第0,239,400 B1号; Padlan, et al., 欧州特許出願第0,519,596 A1号; Queen, et al. (1989), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 86:10029-10033)。さらなる詳細のために、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332:323-329 (1988); ならびに Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) および Hansen, WO 2006105062号を参照されたい。

30

40

50

【0084】

「過剰増殖性障害」という用語は、限定はされないが、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患および障害を示す。内皮細胞と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様々な網膜症などの血管新生の疾患、ならびにアテローム性動脈硬化の治療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し得る。線維芽細胞を含む過剰増殖性障害（すなわち、線維形成）としては、限定はされないが、加齢性黄斑変性、心筋梗塞と関連する心臓リモデリングおよび不全などの過剰な瘢痕（すなわち、線維症）の障害、ならびに外科手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、ならびに類線維腫およびステント留置が挙げられる。

10

【0085】

「免疫原」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。免疫原は、担体にコンジュゲートされた誘導体化生理活性脂質、すなわち、「誘導体化生理活性脂質コンジュゲート」であってもよい。免疫原として用いられる誘導体化生理活性脂質コンジュゲートは、免疫原に応じ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使用され得る。あるいは、捕捉材料として用いられる誘導体化生理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。

20

【0086】

特に生物学的現象との関連で「阻害する」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、腫瘍が全く形成しないこと、または未処置の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。

【0087】

「単離された」組成物は、その自然環境の成分から同定され、および分離されおよび/または回収されたものである。その自然環境の汚染成分は、抗体に対する診断または治療的使用を妨害する材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施形態では、組成物は抗体であり、(1) Lowry法により決定すると95重量%超の抗体、最も好ましくは99重量%超まで、(2)スピニングカップシークエネーターの使用により、少なくとも15残基のN末端または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、あるいは(3) SDS-PAGEにより、還元または非還元条件下でクーマシーブルーまたは、好ましくは、銀染色を使用して均質性が得られるまで精製されるであろう。単離された抗体は組換え細胞内インサイチューの抗体を含み、というの、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分は存在しないからである。しかしながら、通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製されるであろう。

30

【0088】

「標識」という用語は、本明細書で使用される場合は、検出可能な化合物または組成物、例えば抗体に直接、または間接的にコンジュゲートされたものを示す。標識はそれ自体、それだけで検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、あるいは酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒することができる。

40

【0089】

「リポソーム」は薬物（例えば、本明細書で開示される抗スフィンゴ脂質抗体および、任意で、化学療法薬）を哺乳類に送達するのに有用である様々な型の脂質、リン脂質および/または界面活性剤から構成される小さな小胞である。リポソームの成分は一般に、生体膜の脂質配列と同様の二重層構造で配列される。「単離された」核酸分子は、抗体核酸の天然源中で通常、これと結合されている少なくとも1つの汚染核酸分子から同定され、分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、自然で見出される形態または設定以

50

外である。そのため、単離された核酸分子は、天然細胞中に存在する核酸分子から区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、通常、抗体を発現する細胞中に含まれる核酸分子を含み、この場合、例えば、核酸分子は、未操作細胞のものとは異なる染色体上の位置にある。

【0090】

この開示との関連で、「液体組成物」は、製造者から最終使用者（例えば、医師または看護師）に提供されるその充填および完成形態が、固体ではなく液体または溶液であるものを示す。ここで、「固体」は、液体または溶液でない組成物を示す。例えば、固体は、凍結乾燥、フリーズドライ、沈殿、および同様の手順により調製された乾燥組成物を含む。

10

【0091】

「線形抗体」という表現は、本出願を通して使用される場合、Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)において記載される抗体を示す。簡単に言うと、これらの抗体は一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む。線形抗体は二重特異性または単一特異性とすることができる。

【0092】

「LPA代謝産物」という用語は、これらからLPAが作られている化合物、ならびにLPAの分解により得られるもの；すなわち、リゾリン脂質代謝経路に関係する化合物を示す。「代謝前駆体」という用語はまた、これらからLPAが作られている化合物を示すために使用され得る。LPA代謝産物の例としては、リゾ血小板活性化因子(リゾPAF)、LPC、およびリゾホスファチジルグリセロール(LPG)(これらは全てLPAに変換することができる)[Gesta, Set al., (2002) J. Lipid Res. 43: 904-910]；ならびにモノアシルグリセロール(MAG)(LPAは脂質ホスファターゼによりこれに変換させることができる)が挙げられる。Mills and Moolenaar (2003) Nature Reviews Cancer 3, 582-591。

20

【0093】

「モノクローナル抗体」(mAb)という用語は本明細書では、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、または前記抗体の集団を示す。集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能な変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。「モノクローナル」という修飾語句は実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の産生が必要であると解釈されるものではない。例えば、モノクローナル抗体は、最初にKohler et al., Nature 256: 495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法により作ることができ、または組換えDNA方法によって作ることができる(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」はまた、ファージ抗体ライブラリーから、例えば、Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いて、あるいは当技術分野で知られている他の方法により単離することもできる。本明細書におけるモノクローナル抗体は、特定の、重および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である一方、その鎖(複数可)の残りが別の種に由来するか、別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同であるキメラ抗体、ならびに、それらが所望の生物活性を示す限りそのような抗体の断片を含む(米国特許第4,816,567号；およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8

30

40

50

1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5 (1 9 8 4)) 。

【 0 0 9 4 】

「単独療法」は、単回投与として、あるいは時間経過に伴う複数回投与として投与されるかに関係なく1つの治療的に有効な化合物の送達に基づく治療レジメンを示す。

【 0 0 9 5 】

「多重特異性抗体」という用語は少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特性を有する抗体、またはモノクローナル抗体を示すことができる。1つの実施形態では、エピトープは同じ抗原由来である。別の実施形態では、エピトープは2つ以上の異なる抗原由来である。多重特異性抗体を作るための方法は当技術分野で知られている。多重特異性抗体は二重特異性抗体(2つのエピトープに対する結合特性を有する)、三重特異性抗体(3つのエピトープ)などを含む。例えば、多重特異性抗体は、2つ以上の免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現を用い組換えで生成させることができる。あるいは、多重特異性抗体は、化学結合を用いて調製することができる。当業者は、これらの、または当技術分野で知られている可能性のある他の方法を用いて多重特異性抗体を生成することができる。多重特異性抗体は多重特異性抗体断片を含む。多重特異性(この場合、二重特異性)抗体の1つの例はS1PエピトープおよびC1Pエピトープに対する結合特性を有する抗体であり、よって、それらは、S1PおよびC1Pの両方を認識し、これらに結合することができる。二重特異性抗体の別の例は、生理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対する結合特性を有する抗体である。このように、抗体は、例えば、標的目的で、生理活性脂質を認識し、結合することができ、かつ、細胞を認識し、結合することができる。

10

20

【 0 0 9 6 】

「新生物」または「癌」は、異常、かつ、制御されない細胞成長を示す。「新生物」、または腫瘍もしくは癌は、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。破壊的な成長、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。侵襲性は、典型的には組織の境界を規定している基底層を破り、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示す。転移とは典型的には、リンパ管または血管による腫瘍細胞の播種を示す。転移はまた、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示す。転移の過程を通じた、腫瘍細胞の身体の他の領域への移動は、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。

30

【 0 0 9 7 】

「神経外傷」は、中枢神経系(CNS)、すなわち、脳および/または脊髄への損傷またはダメージを示す。神経外傷は外傷性脳損傷(TBI)、脊髄損傷(SCI)、および脳卒中(出血性および虚血性)を含む。

【 0 0 9 8 】

核酸は別の核酸配列と機能的関係に置かれた場合、「作動可能に連結される」。例えば、ポリペプチドの分泌に関与する前タンパク質として発現される場合、プレ配列または分泌リーダーのためのDNAは、ポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結される;配列の転写に影響する場合、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列に作動可能に連結される;あるいは、翻訳を促進するように配置される場合、リボソーム結合部位はコード配列に作動可能に連結される。一般に、「作動可能に連結される」は、連結されるDNA配列は近接しており、分泌リーダーの場合、近接し、解読相内にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは近接している必要はない。連結は好都合な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが従来の実施にしたいが使用される。

40

【 0 0 9 9 】

本明細書では「親」抗体は、変異体を調製するために使用されるアミノ酸配列によりコードされるものである。親抗体は天然抗体であってもよく、またはすでに変異体、例えば、キメラ抗体であってもよい。例えば、親抗体はヒト化またはヒト抗体であってもよい。

50

【0100】

「特許可能な」組成物、プロセス、機械、または製造品は、対象物が、分析が実施される時に特許性に対する全ての法定要件を満たすことを意味する。例えば、新規性、非自明性、などに関しては、後の調査により、1つ以上の特許請求の範囲が、新規性、非自明性、などを否定する1つ以上の実施形態を含むことが明らかにされた場合、定義により「特許可能な」実施形態に限定される特許請求の範囲（複数可）は特定の、特許可能でない実施形態（複数可）を排除する。また、これに添付された特許請求の範囲は、最も広い合理的な範囲を提供する、ならびにそれらの妥当性を維持すると解釈されるべきである。さらに、特許請求の範囲は、特許性のための法定要件の1つ以上が改正される場合、特許性のための特定の法定要件が、本出願が出願され、または特許として発行された時から、添付の特許請求の範囲の1つ以上の妥当性が問題とされる時まで満たされているかどうかを評価するための標準が変化した場合、（1）それらの妥当性を維持するおよび（2）この条件下で最も広い合理的な解釈を提供するように解釈されるべきである。

10

【0101】

「薬学的に許容される塩」という用語は、製剤において使用されるものなどの塩を示し、これは本明細書に記載される作用物質および化合物の生物学的有効性および特性を保持し、生物学的にまたは別様に望ましい。多くの場合、本明細書に記載される作用物質および化合物は、荷電基、例えば、荷電アミノおよび/またはカルボキシル基またはそれらに類似する基の存在のために酸および/または塩基塩を形成することができる。薬学的に許容される酸付加塩は、無機および有機酸から調製することができ、一方、薬学的に許容される塩基付加塩は無機および有機塩基から調製することができる。薬学的に許容される塩のレビューのために（Berge, et al. (1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19を参照されたい）。

20

【0102】

「複数」とは、1を超えることを意味する。

【0103】

「ポイントオブケア検査」は、患者ケアの場所、またはその近くでの医療検査または診断を意味する。

【0104】

「プロモーター」という用語は、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、本明細書に記載されるコンストラクトで使用されるプロモーターは遺伝子の転写のタイミングおよび/または速度の制御または調節に關与するシス作用性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、転写調節に關与する、エンハンサー、プロモーター、転写ターミネーター、複製開始点、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、シス作用性転写制御エレメントとすることができる。使用に好適な転写調節領域としては、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、および原核生物または真核生物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挙げられるが、それらに限定されない。

30

40

【0105】

「組換えDNA」という用語は、ヒトにより操作、作出または改変された核酸およびそれから発現される遺伝子産物を示す。「組換え」ポリペプチドまたはタンパク質は組換えDNA技術により、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因性DNAコンストラクト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り調製されたものである。

【0106】

「分離された」、「精製された」、「単離された」、などの用語は、試料保持容器に含まれる試料の1つ以上の成分が、その容器内に存在する1以上の他の試料成分から物理的

50

に取り出される、または取り出されている、あるいは1以上の他の試料成分の存在下で希釈されていることを意味する。分離または精製工程中に取り出し、または希釈することができる試料成分としては、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挙げられる。

【0107】

「固相」により、抗体が直接または間接的に付着することができるものなどの非水性マトリクスが意味される。本明細書に含まれる固相の例としては、部分的にまたは完全にガラス（例えば、細孔制御ガラス）、多糖類（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンから形成されたものが挙げられる。ある一定の実施形態では、文脈によって、固相はアッセイプレートのウェルを含むことができ；他の実施形態では、それは精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィークラム）である。この用語はまた、ビーズまたは別個の粒子の不連続固相、例えば、米国特許第4,275,149号で記載されるものを含む。

10

【0108】

「種」という用語は、本明細書で、様々な文脈で使用され、例えば、化学療法薬の特定の種である。個々の文脈において、用語は、特定の文脈で言及される種類の化学的に不明瞭な分子の集団を示す。

【0109】

「特異的」または「特異性」という用語は、抗体-抗原相互作用との関連では、抗体とその標的エピトープの間の選択的、非ランダム相互作用を示す。ここで、「抗原」という用語は、抗体分子または他の免疫由来部分により認識され、結合される分子を示す。抗体が結合する抗原の特異的部分は「エピトープ」と呼ばれる。この相互作用は、分子間での適切な化学または分子相互作用を可能にする構造的、疎水性/親水性、および/または静電特徴の存在に依存する。よって、抗体は一般に、その標的抗原のエピトープに「結合する」（または「特異的に結合する」）または「と反応する」（または「と特異的に反応する」）、あるいは、同等に、「に対して反応性がある」（または「に対して特異的反応性がある」と言われる。抗体は一般に当技術分野ではそれらの抗原に「対して」または「対する」ものとして、抗原への抗体結合の省略表現として記載される。よって「C1Pに結合する抗体」、「C1Pに対して反応性がある抗体」、「C1Pと反応する抗体」、「C1Pに対する抗体」および「抗C1P抗体」は全て、当技術分野では同じ意味を有する。抗体分子は、所望の抗原への結合を、関係のない抗原または類似抗原または抗原混合物への結合と、所定の組の条件下で比較することにより結合の特異性に対して試験することができる。好ましくは、抗体は関係のない抗原、または標的抗原の類似体にさえ、有意の結合を欠いている。

20

30

【0110】

本明細書では、「安定な」は、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つの分子（例えば、ペプチドとTLR分子）間の相互作用を示す。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示す。

【0111】

「被験体」または「患者」は、治療が行われる動物を示す。治療することができる動物としては、脊椎動物が挙げられ、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）動物などの哺乳類が特に好ましい例である。

40

【0112】

「代替マーカー」は、疾患状態に対する治療の効果を間接的に示す、体内の生物活性の検査測定値を示す。過剰増殖および/または心血管状態に対する代替マーカーの例としてはSPHKおよび/またはS1PRが挙げられる。

【0113】

「治療薬」は、治療効果を提供することが意図される薬物または化合物を示し、限定はされないが下記が挙げられる：抗炎症薬、例えばCOX阻害剤および他のNSAID、抗

50

血管新生薬、以上で規定される化学療法薬、心血管治療薬、免疫調節薬、神経変性障害を治療するために使用される作用物質、眼科薬物、など。

【0114】

「治療的有効量」（または「有効量」）は、そのような治療に必要な被験体に投与した場合、治療を達成するのに十分な活性成分、例えば、抗体などの作用物質の量を示す。したがって、組成物の治療的有効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。治療的有効量は、治療される特定の被験体および病状、被験体の体重および年齢、疾患状態の重症度、選択される特定の化合物、準拠される投与レジメン、投与のタイミング、投与様式などに依存し、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。併用療法との関連で、特定の活性成分の治療的有効量を構成するものは、単独療法（すなわち、活性成分として1つの化学実体のみを使用する治療レジメン）として投与される場合の活性成分の治療的有効量を構成するものとは異なり得ることが認識されるであろう。

10

【0115】

本明細書に記載される組成物は、生理活性脂質に基づく療法の方法において使用される。本明細書では、「療法」および「療法の」という用語は、疾患、障害または身体外傷のための全範囲の防止および/または治療を含む。「療法」薬は、予防的または防止的な様式で（危険がある（薬理遺伝学）と同定することができる個体を標的にするように設計された手順を組み入れたものを含む）；または、本質的に寛解性または根治的となるように作用することができ；あるいは、治療される疾患または障害の少なくとも1つの症状の進行の速度または程度を減速させるように作用することができ；あるいは、疾患、障害または身体外傷からの療養と関連する、必要とされる時間、任意の不快または疼痛の発生または程度、物理的制約を最小に抑えるように作用することができ；あるいは他の療法および治療に対するアジュバントとして使用することができる。

20

【0116】

「治療」または「治療、処置する」という用語は、疾患または障害に対する防止または保護（すなわち、臨床症状の発症を引き起こさない）；疾患または障害の阻害（すなわち、臨床症状の発症の阻止、遅延または抑制；および/または疾患または障害の緩和（すなわち、臨床症状の退行を引き起こす）を含む、疾患または障害のいずれかの治療を意味する。認識されるように、疾患または障害の「防止」と「抑制」の間の区別は、1つまたは複数の最終的誘導的イベントが未知か潜在性である可能性があるため、常に可能であるわけではない。「治療の必要な」ものは、すでに障害を有するもの、ならびに障害が防止されるべきであるものを含む。したがって、「予防」という用語は、「防止」および「抑制」の両方を含む「治療」の型を構成することが理解される。よって、「保護」という用語は「予防」を含む。

30

【0117】

「治療レジメン」という用語は、化学療法薬および細胞傷害性薬剤、放射線療法、外科手術、遺伝子治療、DNAワクチンおよび療法、siRNA療法、抗血管新生療法、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体など）、受容体デコイおよび他のタンパク質に基づく療法薬を用いる疾患または障害のいずれかの治療を意味する。

40

【0118】

抗体の「可変」領域は、フレームワークおよび相補性決定領域（CDR、別名超可変領域として知られている）を含む。可変性は抗体の可変ドメイン中に一様に分布していない。それは、6つのCDRセグメントに集中し、軽鎖および重鎖可変ドメインの各々に3つである。可変ドメインのより保存性の高い部分はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然重および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、 β -シート構造を連結する、場合によってはその一部を形成するループを形成する、3つの超可変領域によって連結された4つのFR（それぞれ、FR1、FR2、FR3およびFR4）（主に β -シート構造を採用する）を含む。「超可変領域」という用語は本明細書で使用される場合、抗原結合に關与

50

る抗体のアミノ酸残基を示す。超可変領域は、下記を含む：「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24 - 34（L1）、50 - 56（L2）および89 - 97（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の31 - 35（H1）、50 - 65（H2）および95 - 102（H3）；Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）および/または「超可変ループ」由来のそれらの残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26 - 32（L1）、50 - 52（L2）および91 - 96（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の26 - 32（H1）、53 - 55（H2）および96 - 101（H3）；Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901 - 917 (1987)）。「フレームワーク」または「FR」残基は本明細書で規定される超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。

10

【0119】

各鎖中の超可変領域は、FRによりごく接近して共に保持され、他の鎖由来の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), pages 647 - 669を参照されたい）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、様々なエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性の抗体の関与を示す。

20

【0120】

「ベクター」または「プラスミド」または「発現ベクター」は、1つ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示す。ベクターは、単独の、または他の化合物と複合体化された核酸を含むことができる。ベクターは任意で、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/または膜を含む。ベクターは、限定されるものではないが、DNA断片が結合され、複製可能となり得るレプリコン（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もしくは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。プラスミドは市販されており、制限無く公的に入手可能であり、あるいは、公開されているプロトコ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。加えて、発現ベクターはまた、真核生物細胞培養物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、形質転換された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を含み得る。

30

【発明の概要】

【0121】

本出願は、被験体由来の生体試料中のLPAレベルおよび/またはLPA代謝産物レベルを決定することを含む、被験体において神経外傷を検出または診断する方法を提供し、ここで、試料中の上昇したLPAレベルおよび/またはLPA代謝産物レベル（未損傷対照に対する典型的な値に比べて）は、神経外傷を示す。神経外傷は外傷性脳損傷、脊髄損傷、または脳卒中を含む。LPAレベルは、総LPAレベル、または1つ以上のLPAアイソフォーム、例えば16:0、18:0、18:1、18:2、または20:4アシルLPAの1つ以上のレベルを示し得る。生体試料は、組織試料または体液試料、例えば、脳脊髄液（CSF）、血液、血漿、尿、または中枢神経系組織の試料であってもよい。LPA代謝産物は、例えば、ホスファチジルコリン（LPC）またはリゾ血小板活性化因子（LPAF）であってもよい。

40

【0122】

50

L P A または L P A 代謝産物レベルの決定は、任意の好適な現在知られている、または後に開発される方法、例えば、L P A 結合剤に基づく方法、例えば抗体に基づく方法、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A)、ラテラルフローイムノアッセイ (L F I A) または免疫組織化学 (I H C) ; 物理学的測定方法、例えば、質量分析または液体クロマトグラフィー / 質量分析 ; あるいは酵素法により実施してもよい。抗体に基づく方法において使用される抗体は、L P A に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片である。方法は、さらに、生体試料中の神経外傷に対する少なくとも 1 つの追加のバイオマーカー、例えば脂質またはタンパク質バイオマーカーのレベルを決定することを含み得る。追加のタンパク質または脂質バイオマーカーの例は、ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ (U C H - L 1)、グリア線維酸性タンパク質 (G F A P)、高分子量神経フィラメントサブユニット N F - H のリン酸化形態 (p N F - H)、L P A 代謝産物および 1 2 - ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (1 2 - H E T E) である。1 つの実施形態では、被験体において神経外傷を検出または診断する方法は、前記被験体由来の生体試料中の L P A レベルを決定することを含み、ここで、L P A レベルの決定は、L P A と特異的に反応する抗体、またはその抗原結合断片を使用する抗体に基づく方法による。方法は、さらに、固体支持体または担体部分、例えば、ポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバント、シリコーンビーズ、着色粒子、またはタンパク質に直接、または間接的に結合された、誘導体化、例えば、チオール化 L P A の使用を含み得る。他の代表的な実施形態では、L P A が第 1 のバイオマーカーであり、追加のバイオマーカーは L P A 代謝産物または 1 2 - H E T E であってもよく ; L P C が第 1 のバイオマーカーであり、追加のバイオマーカーは L P A、リゾ P A F、または 1 2 - H E T E であってもよく ; あるいは第 1 のバイオマーカーはリゾ P A F であり、追加のバイオマーカーは L P A、L P C または 1 2 - H E T E であってもよい。

【 0 1 2 3 】

被験体において、神経外傷を検出または診断するためのキットが本発明によりさらに包含される。そのようなキットは典型的には、被験体由来の生体試料中の L P A および / または L P A 代謝産物レベルを決定するための構成要素を含み、ここで、典型的な未損傷対照に比べて上昇したレベルは神経外傷を示す。L P A または L P A 代謝産物レベルを決定するための構成要素は、例えば、抗体に基づく方法または酵素法であってもよく、生体試料は、組織試料または体液試料、例えば、脳脊髄液 (C S F)、血液、血漿、尿または中枢神経系組織の試料であってもよい。いくつかの実施形態では、L P A または L P A 代謝産物レベルの検出のためのキット構成要素は、抗体、またはその抗原結合断片 (L P A または L P A 代謝産物に特異的に結合する) を含むラテラルフローイムノアッセイによる。ラテラルフローイムノアッセイは、さらに、固体支持体または担体部分、例えば、ポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバント、シリコーンビーズ、ラテックスビーズ、またはタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、アルブミン、ウシサイログロブリン、または当技術分野で知られている他の担体および支持体に直接または間接的に結合された誘導体化 L P A または L P A 代謝産物を含み得る。いくつかの実施形態では、担体は着色され、または検出可能な標識を有する。いくつかの実施形態では、1 を超えるバイオマーカー (例えば、L P A および L P A 代謝産物、L P A および 1 2 - H E T E、または L P A 代謝産物およびタンパク質バイオマーカー) は、同じラテラルフローアッセイで検出される。いくつかの実施形態では、L P A または L P A 代謝産物レベルを決定するための構成要素 (複数可) は E L I S A アッセイであり、キットは抗体、またはその抗原結合断片 (L P A または L P A 代謝産物に特異的に結合する) を含む。いくつかの実施形態では、1 を超えるバイオマーカー (例えば、L P A および L P A 代謝産物、L P A および 1 2 - H E T E、または L P A 代謝産物およびタンパク質バイオマーカー) は同じ E L I S A で検出される。キットはさらに固体支持体または担体部分、例えば、ポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバント、シリコーンビーズ、ラテックスビーズ、他の着色粒子またはタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリブシンインヒビターに直接または間接的に結

合された誘導体化LPAまたはLPA代謝産物を含み得る。いくつかの実施形態では、担体は着色されまたは検出可能な標識を有する。担体部分は、固体支持体に付着され得る。キットはさらに、上記で記載される、生体試料中の神経外傷のための少なくとも1つの追加のバイオマーカーのレベルを決定するための手段を含み得る。

【0124】

発明の前記および他の態様は下記詳細な説明、添付の図面、および特許請求の範囲からより明らかになるであろう。

【0125】

別に規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、この発明が関連する分野の当業者により普通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で記載されるものと同様の、または等価の方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、好適な方法および材料が以下で記載される。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が、制御する。加えて、材料、方法、および実施例は例示にすぎず、制限することを意図しない。

10

【0126】

この明細書で記載される図面および表の各々の簡単な概要を下記で提供する。本出願はカラーで作成された少なくとも1つの図を含む。カラー図面を有する本出願のコピーは必要料金の請求および支払い時に提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0127】

【図1】免疫原の主要成分、ならびにELISAおよびBiaCoreアッセイのためのレイダウン材料の主要成分として使用された典型的なチオール化SP類似体を製造するための有機合成スキームである。

【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された関連脂肪酸を製造するための有機合成スキームである。

【図3】免疫原の主要成分、ならびにELISAおよび他のアッセイのためのレイダウン材料の主要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である。

【図4】抗LPA抗体B3による処置はSCI後の機能回復を改善することを示す2つの部分からなる図である。mBBBスコアおよびグリッド歩行テストをSCI後5週まで測定した。B3による処置(n=7)を、アイソタイプ対照抗体(con;n=8)と比較して、SCI後2週間与える。データは平均±SEMである；* p<0.05。図4aは、mBBBオープンフィールド歩行運動試験スコアを示す線グラフであり；図4bはグリッド歩行テストスコアを示す線グラフである。

30

【図5】LPAに対する抗体は脊髄損傷(SCI)後の神経生存を改善することを示す棒グラフである。病変部に対して吻側の追跡された神経細胞の数の定量は、対照に比べて抗体処置マウスでは著しく高い。データは平均±SEMである；** p<0.001。

【図6】抗LPA mAb(B3)はSCI後の神経膠痕を低減させることを示す2つの部分からなる棒グラフである。SCI後2週での、マウス脊髄の損傷部位の免疫染色。マウスは抗LPA mAb(B3、0.5mg/マウス)を皮下に、SCIの直後に開始して、1週間に2回2週間を摂取した、またはしなかった。B3処置は、反応性アストロサイトの量を低減させ(GFAPおよびCSPG細胞)(パネルA)、病変部に近いニューロンの量を増加させる(NeuN)(パネルB)。

40

【図7】皮質損傷後のマウス脳を示す顕微鏡写真である。左側のパネルAは、皮質衝撃モデルにおいてTBI後典型的に見られる出血領域を有するマウス脳を示す。右側のパネルBは、同じモデルにおけるが、抗LPA抗体で処置したTBI後のマウス脳を示す。このモデルで通常観察される出血は大きく低減する。

【図8】抗LPA抗体は、外傷性脳損傷のマウスモデルにおいて保護的であることを示す、2つの部分からなる図である。図8aはTBI後の12匹のマウスの脳を示す。上パネ

50

ル中の6つの脳 (C o n) は、T B I 前に抗体処置を受けなかったマウス由来であった。下パネル中の6つの脳 (M a b) は1回の衝撃損傷 (1.5 mm 深さ) の適用前に、抗 L P A 抗体 B 3、0.5 mg / マウス i . v . を受けたマウス由来であった。マウスを損傷後 24 h r に取り出した。図 8 b は、これらの動物における梗塞体積の組織学的定量を示す。図示されるように、対照に比べて、抗 L P A 抗体処置マウスにおける梗塞サイズの減少は統計的に有意である。

【図 9】抗 L P A m A b 介入治療は T B I 後の神経外傷を著しく低減させることを示す散布図である。マウスを制御式皮質衝撃 (C C I) を用いた T B I に供し、対照 m A b または B 3 のいずれかを用いて、25 mg / k g の単回 i . v . 投与として与え、損傷後 30 m i n に処置した。データを損傷後 2 日に取得し、各動物に対する梗塞サイズを組織学的に定量した。データは、2つの独立した、盲検研究において、平均 ± S E M、n = 8 動物 / 群である。

10

【図 10】抗 L P A m A b 介入治療は T B I 後の神経外傷を著しく低減させることを示す 2 つの部分からなる図である。マウスを制御式皮質衝撃 (C C I) を用いた T B I に供し、対照 m A b または B 3 のいずれかを用いて、25 mg / k g の単回 i . v . 投与として与え、損傷後 30 m i n に処置した。データを損傷後 7 日に取得した。図 10 a は、損傷後第 1 日 (上部) および第 7 日 (底部) に評価した、M R I による梗塞サイズの組織学的定量を示す一対の棒グラフである。データは、2つの独立した、盲検研究において平均 ± S E M、n = 8 動物 / 群である。* p < . 05。図 10 b は T B I および抗 L P A 抗体 B 3 (右) またはアイソタイプ対照 (左) 抗体によるその後の処置後のマウス脳の代表的な M R I 画像を示す 2 つの対の写真である。上部の対画像は損傷後第 1 日にとり、底部対は、第 7 日にとった。

20

【図 11】損傷後 1、2、3、4、および 5 日での 5 人の T B I 患者の各々の C S F 中の総 L P A レベルを示す線グラフ (カラー) である。3 人の未損傷、正常対照被験体は 0.050 ± 0.012 μ M の平均 L P A レベルを示した。

【図 12】対照の C S F 中の平均総 L P A と比較した、損傷後 24 時間で測定した同じ 5 人の T B I 患者の C S F 中の平均総 L P A レベルを示す棒グラフである。

【図 13】神経外傷患者対対照由来の C S F 試料におけるいくつかの生理的に関連する L P A アイソフォームのレベルを示す棒グラフ (カラー) である。

【図 14】損傷後 1、2、3、4、および 5 日での、外傷性脳損傷患者の脳脊髄液 (C S F) 中の L P A 前駆体 リゾ P A F (図 14 a) および L P C (図 14 b) の散布図を示す、2 つの部分からなる図である。

30

【図 15】損傷後 0、1、2、3、4、および 5 日での 8 人の神経外傷 (T B I) 患者の各々の C S F 中の総 L P A レベルを示す線グラフ (カラー) である。3 人の未損傷、正常対照被験体は 0.13 ± 0.09 μ M の平均 L P A レベルを示した。

【図 16】損傷後 0 ~ 144 時間の 11 人の神経外傷 (T B I) 患者由来の C S F 試料中の総アシル L P A レベルの時間経過を示す散布図である。

【図 17】図 16 における 11 人の神経外傷 (T B I) 患者由来の C S F 中の時間に伴う総アシル L P A レベルを、対照と共に示す棒グラフである。患者試料はサンプリング時間 (損傷後 < 14 時間、損傷後 < 24 時間、損傷後 < 36 時間および損傷後 > 36 時間) により分類する。

40

【図 18】13 人の神経外傷 (T B I) 患者由来の C S F 中の損傷後第 0 日 ~ 第 5 日の時間経過に伴う個々のアシル L P A アイソフォーム (16 : 0 赤色、18 : 0 青色、18 : 1 マゼンタ、18 : 2 青緑色および 20 : 4 緑色) のレベルを、対照と共に示す棒グラフ (カラー) である。

【図 19】C S F 中の L P A レベルの損傷の重症度の 3 つの標準基準との相関を示す 3 つの線グラフの組である。C S F を損傷後 24 h r 以内に 8 の神経外傷 (T B I) 患者から採取した。図 19 a は C S F 中の L P A レベルのグラスゴー昏睡尺度 (G C S) との相関を示し；図 19 b は C S F 中の L P A レベルの拡張グラスゴーアウトカムスケールとの相関を示し (G O S E)；図 19 c は C S F 中の L P A レベルの損傷重症度スコアとの相関を

50

示す (I S S)。

【発明を実施するための形態】

【0128】

本発明は CNS 損傷またはダメージを維持している疑いがある患者由来の流体または組織試料中の L P A および / または L P A 代謝産物レベルを測定することにより、神経外傷を検出および診断するための方法およびキットを提供する。L P A レベルおよびある一定の L P A 代謝産物レベルは、正常対照に比べて、T B I 後ヒト被験体の脳脊髄液 (C S F) 中で著しく上昇することが、近年示されており (下記実施例を参照されたい) ; 言い換えれば、L P A は、神経外傷のためのバイオマーカーとなる。この観察結果は、神経外傷の迅速な診断のための新規の、非常に有用な診断試験および手順への扉を開くであろう。

10

【0129】

L P A および L P A 代謝産物は、様々な手段、例えば酵素手段、物理学的測定 (例えば、質量分析、L C - M S)、および特異的 L P A 結合剤、例えば L P A に対する抗体、L P A に結合するアプタマー、L P A 受容体断片などに頼る方法を用いて測定することができる。誘導体化 L P A はまた、L P A の検出および測定、例えば、抗体に基づく方法、例として E L I S A または他の免疫化学アッセイにおいて有用であり得、標識された L P A (放射標識されたまたはそれ以外) を調製するのに使用され得る。

【0130】

特異性の高い抗 L P A 抗体が L p a t h , I n c . により生成されており、癌、線維症および他の病状に対する治療的有用性を有することが証明されている。つい最近、抗 L P A 抗体は、神経外傷、例えば、T B I、脳卒中および S C I の動物モデルにおいて神経保護的であることが示されている。よって、抗 L P A 抗体は神経外傷に関連する治療および診断用途の両方を有し、したがってコンパニオン診断法において使用され得る。

20

【0131】

A . 誘導体化および / またはコンジュゲートされた L P A

1 . 組成物

本発明は免疫原性応答 (すなわち、抗体産生) を促進するおよび / または L P A 分子の担体分子または他の部分、例えば標識または固体支持体へのコンジュゲーションを可能にするように誘導体化された L P A を使用することができる。1つの実施形態では、L P A の炭化水素鎖内の炭素原子が、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] により誘導体化される。この誘導体化は、分子との反応、例えば、担体へのコンジュゲーションのために生理活性脂質を活性化するように作用する。1つの実施形態では、誘導体化 L P A はチオール化 L P A である。1つの実施形態では、誘導体化 L P A は誘導体化 C 1 2 または C 1 8 L P A である。1つの実施形態では、チオール化 L P A はクロスリンカー、例えば、二官能性クロスリンカー、例えば I O A または S M C C を介して、担体 (タンパク質であってもよい) にコンジュゲートされる。このように L P A を免疫化される種において免疫原性であるタンパク質または他の担体、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、血清アルブミン (ウシ血清アルブミンまたは B S A を含む)、ウシサイログロブリン、または大豆トリブシンインヒビターに、二官能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を介するコンジュゲーション)、N - ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C l ₂、または R ¹ N = C = N R (式中、R および R ¹ は、異なるアルキル基である) を用いてコンジュゲートすることは有用である得る。非タンパク質担体 (例えば、コロイド金) もまた、抗体産生での使用のために当技術分野で知られている。

30

40

【0132】

誘導体化または誘導体化およびコンジュゲート L P A は、抗 L P A 抗体 (ポリクローナルおよび / またはモノクローナル) を生成するための免疫原として使用することができる。誘導体化または誘導体化およびコンジュゲート L P A はまた、発明の方法、特に診断方

50

法において使用することができる。

【0133】

2. 誘導体化LPAに対する研究および診断用途

以上で記載される誘導体化LPAは、抗LPA抗体を検出するおよび/または精製するために使用することができ、以上で記載される担体にコンジュゲートさせることができる。誘導体およびコンジュゲートは、臨床診断方法を含む診断方法で使用するために、固体支持体にコンジュゲートさせることができる。例えば、LPA抗体、特に自己抗体の検出および/または定量は、LPAが役割を果たす様々な医学的状态を診断するのに使用することができる。LPA抗体の定量はまた、LPAの異常なレベルにより特徴付けられる疾患および病状を検出および/または診断する、または、例えば、本明細書に記載されるものなどの抗LPA抗体を用いた治療後の投与、半減期および薬物レベル、または患者応答を評価する臨床設定において有用である。本明細書に記載されるように製造された誘導体化LPAは、Lpathの抗LPA抗体がLPAを認識するエピトープを不能にしない反応性基を有する。よって、誘導体化LPAは、LPAの検出および/または定量のために抗LPA抗体に依存するアッセイ方法またはキットの一部として使用することができる。誘導体化LPAはまた、シンチレーション近接アッセイ(SPA)または他のアッセイにおいて使用するために標識(放射標識または他の標識)のLPAへの付着を可能にするように使用することができる。

10

【0134】

1つの実施形態では、誘導体化LPAコンジュゲート(例えば、BSAまたはKLHにコンジュゲートされたチオール化LPA)は、抗LPA抗体を検出するために使用されるELISAにおいてレイダウン材料として使用される。1つの実施形態では、LPAはBSAにコンジュゲートされたチオール化C12LPAまたはチオール化C18LPAである。この実施形態は、例えば、LPAの検出のためのELISAアッセイにおけるレイダウン材料(プレートをコートするため)として有用である。例えば、LPA競合的ELISAでは、プレートは、誘導体化および/または誘導体化およびコンジュゲートLPAでコートされる。1組の1つ以上のLPA標準および1つ以上の試料(例えば、血清または細胞培養物上清)をマウス抗LPA抗体と混合し、誘導体化LPAコートプレートに添加する。抗体はプレートに結合されたLPAまたは試料もしくは標準中のLPAのいずれかへの結合に対して競合する。インキュベーションおよびいくつかのELISA工程後、450nmでの吸光度を測定し、試料中のLPA濃度を、検量線と比較することにより決定する。

20

30

【0135】

誘導体化または誘導体化およびコンジュゲートLPAはまた、固体支持体(例えば、樹脂または他のカラムマトリクス、ビーズ、膜、プレート)に結合させ、例えば、血液または血清から抗LPA抗体を単離するおよび/または精製するために使用することができる。そのような抗LPA抗体は新しく生成された抗体(例えば、LPAに対する哺乳類モノクローナルまたはポリクローナル抗体)であってもよく、または天然ヒト抗LPA抗体であってもよい。

【0136】

よって、誘導体化LPAおよび誘導体化およびコンジュゲートLPAはどちらも、研究のために、および臨床診断法において有用である。1つの実施形態では、誘導体化または誘導体化およびコンジュゲートLPAは、患者試料中のLPAの測定による神経外傷の検出のためのキットおよび方法において使用される。1つの実施形態では、これらのキットおよび方法はまた、LPAに特異的に結合する抗体を使用する。

40

【0137】

B. 抗LPA抗体を含む抗LPA作用物質

1. 序

治療的使用のためのLPAの有効な阻害剤は、特異性の高い、強力なLPAに対する抗体のLpathの開発前には同定されていない。別のアプローチは、オートタキシン(A

50

TX)、リゾホスホリパーゼDとして機能し、LPAを生成する、分泌されるヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼの阻害である。ATX-LPAシグナル伝達軸は血管新生、慢性炎症、線維性疾患および腫瘍進行に関与し、この系を療法に対する魅力的な標的とするが、また、ATXの好適に強力で選択的な非脂質阻害剤は現在入手できない。LPA受容体の阻害剤、例えば選択的LPA1受容体アンタゴニストAM966 (Swaney et al. Br J Pharmacol. 2010 August; 160(7): 1699-1713)もまた、LPA関連疾患、特に線維症に対する治療として試されている。LPA自体の直接中和はLPA合成または複数のLPA受容体の1つ以上の阻害よりもより単純で好ましいアプローチであると考えられる。よって、LPAに密接にかつ特異的に結合する化合物は、治療薬として、ならびに検出および診断法において使用するのに望ましい。

10

【0138】

2. LPAの疾患関連性および抗LPA作用物質のための治療的使用

LPAは多くの疾患および障害と関連する。レビューのために、Gardell, et al. (2006), Trends Mol Med. 12(2): 65-75, および Chun J. and Rosen, H., (2006) Curr. Pharma. Design 12: 161-171を参照されたい。これらは下記を含む: 自己免疫障害、例えば糖尿病、多発性硬化症および強皮症; 線維性疾患および病状; 癌を含む過剰増殖性障害; 血管新生および新血管新生と関連する障害; 肥満; アルツハイマー病を含む神経変性疾患; 統合失調症、免疫関連障害、例えば移植片拒絶および移植片対宿主病、など。疾患におけるLPAおよび疾患の治療および防止における抗LPA作用物質、特に抗体に関する追加の記載は、例えば、米国特許出願公開番号: 20090136483号、20080145360号、20100034814号および20110076269号(全て、本発明と共に所有され、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)において見出され得る。

20

【0139】

a. 過剰増殖性障害

LPA関連過剰増殖性障害としては、新生物、内皮細胞増殖と関連する障害、および線維形成と関連する障害が挙げられる。ほとんどの場合、新生物は癌である。内皮細胞増殖と関連する典型的な障害は血管新生依存性障害、例えば、固形腫瘍により引き起こされる癌、血液腫瘍、および加齢性黄斑変性である。線維形成と関連する障害としては、異常な心臓リモデリングと関与するもの、例えば心不全が挙げられる。

30

【0140】

癌は現在主として3つの型の療法、外科手術、放射線、および化学療法の1つまたは組み合わせにより治療される。外科手術は、患部組織の塊除去を含む。外科手術は時としてある一定の部位、例えば、胸部、結腸、および皮膚に位置する腫瘍を除去する場合に有効であるが、骨格などの他の領域に位置する腫瘍の治療、あるいは白血病などの播種性新生物状態の治療において使用することができない。放射線療法は曝露された細胞の死またはダメージを引き起こす電離放射線への生組織の曝露を含む。放射線療法由来の副作用は、急性かつ一時的である可能性があるが、他のものは不可逆的であり得る。化学療法は、細胞複製または細胞代謝の破壊を含む。よって、現在の治療薬は通常、患者に対し、毒性および重篤な副作用の形態の著しい欠点を含む。よって、多くのグループが近年、癌に対する戦争を闘う新規アプローチを探し始めた。これらの新しいいわゆる「革新的療法」は遺伝子治療および治療タンパク質、例えばモノクローナル抗体を含む。

40

【0141】

癌の治療のためにクリニックで使用される第1のモノクローナル抗体は、1997年に発売されたリツキサン(リツキシマブ)であり、モノクローナル抗体の治療薬としての有用性を証明している。よって、驚くほどのことではないが、20のモノクローナル抗体がその後、クリニックで使用するために認可されており、その中の、9つが癌のために処方される。これらの製品の成功、ならびに、小分子と比べた場合のモノクローナル抗体を開

50

発するためのコストおよび時間の低減はモノクローナル抗体治療薬を小分子の後の薬物候補の第2の最大カテゴリとする。さらに、小分子療法薬と比較した場合の抗体の優れた特異性は、効力および毒性の両方の観点から主な利点となることが証明されている。

【0142】

その結果として、モノクローナル抗体は癌の治療における主役となろうとしており、それらは、癌治療市場のシェアを増加させつつあると推定される。一般に治療mAbは、タンパク質を標的にし；ごく最近になって生理活性脂質に対するmAbを産生することができるようになっている（例えば、S1Pに対する抗体、出願人の米国特許出願公開第20070148168号を参照されたい）。

【0143】

腫瘍成長および生存を促進する細胞外メディエーターの同定は、癌の罹患率および致死率を低減させる治療介入を発見する際の重要な工程である。以下で記載されるように、LPAは多面的な、腫瘍化成長因子であると考えられる。LPAは、細胞増殖、細胞生存、および転移を刺激することにより腫瘍成長を促進する。LPAはまた、内皮細胞の移動および生存をサポートすることにより（それらが腫瘍内に新しい血管を形成するため）、腫瘍血管新生を促進する。総合すれば、LPAは癌進行に寄与するイベントの増殖性、血管新生促進、および抗アポトーシスシーケンスを開始する。よって、LPAレベルをインピボで調節する、特に、低減させる療法は癌の治療において有効である。

【0144】

典型的には、癌などの過剰増殖性障害を治療または防止するための方法は被験体、例えばヒト被験体または患者に、有効量の、各々の、抗LPA作用物質、例えば抗LPA抗体、または複数の異なる作用物質種、および細胞傷害性薬剤を投与することを含む。細胞傷害性薬剤は化学療法薬を含む。

【0145】

関連する方法は、過剰増殖性障害の治療または防止のための治療レジメンの毒性を低減させることを意図する。そのような方法は、過剰増殖性障害を患う被験体、例えばヒト被験体または患者に、有効量の抗LPA作用物質、例えば抗LPA抗体、または複数の異なる作用物質を、過剰増殖性障害を治療または防止するように意図された治療レジメンの投与前、中、または後に投与することを含む。抗LPA作用物質を使用して細胞、例えば、癌細胞を化学療法薬に感作させることにより、効力がより低い用量で達成され得、よって、化学療法薬による毒性が低くなると考えられる。

【0146】

発明のさらに別の態様は、過剰増殖性障害を患う被験体に抗LPA作用物質、例えば抗LPA抗体、または複数の異なる作用物質種を、過剰増殖性障害を治療または防止し、被験体の生存確率を増強させるように意図された治療レジメンの投与前、中、または後に投与することにより、過剰増殖性障害に対して治療される被験体の生存確率を増強させる方法に関する。

【0147】

1. 線維症、創傷治癒および瘢痕形成

線維芽細胞、特に筋線維芽細胞は細胞損傷および炎症に応じた瘢痕形成における主要細胞要素である (Tomasek et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63, および Virag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40)。筋線維芽細胞によるコラーゲン遺伝子発現はリモデリングの顕著な特徴であり、瘢痕形成に必要である (Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6, および Sun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8)。

【0148】

線維症は、正常な創傷治癒または発達と対照的に、病理学的修復または反応性プロセス

10

20

30

40

50

の一部としての器官または組織における過剰または異常な線維性結合組織の形成または発達として説明することができる。線維症の最も一般的な形態は下記である：肝臓、肺、腎臓、皮膚、子宮および卵巣線維症。いくつかの病状、例えば強皮症、サルコイドーシスなどは、複数の器官および組織における線維症により特徴付けられる。

【0149】

近年、生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) は、組織修復および創傷治癒におけるその役割で認識されている。Watters et al., *Wound Repair Regen.* (2007) 15:607-16。生物メディエータとして、LPAは組織修復および創傷治癒におけるその役割で認識されている (Watters, 2007)。特に、LPAは肺および腎臓炎症および線維症と関連する。LPAはヒト気管支肺胞上皮洗淨 (BAL) 流体中、ベースラインで検出可能であり、その発現はアレルギー性炎症中に増加する。Georas, S.N. et al. (2007) *Clin Exp Allergy.* (2007) 37:311-22。さらに、LPAは気道上皮細胞内の炎症を促進する。Barekzi, E. et al. (2006) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 74:357-63。近年、肺および腎臓線維症は増加したLPA放出およびLPA1型受容体 (LPA₁) を介するシグナル伝達に関連している。LPAレベルはIPF患者由来の気管支肺胞上皮洗淨 (BAL) 試料中で上昇し、マウスにおけるブレオマイシン誘発肺線維症は、LPA₁の活性化に依存した。Tager et al., (2008) *Proc Am Thorac Soc.* 5:363. (2008)。マウスにおける片側尿管閉塞後、尿細管間質性線維症がLPA₁ノックアウトマウスにおいて減少し、線維化促進性サイトカイン発現がLPA₁アンタゴニストで処置した野生型マウスにおいて軽減した。J. P. Pradere et al., (2007) *J. Am. Soc. Nephrol.* 18:3110-3118。LPAは、コラーゲン遺伝子発現および増殖を刺激することにより、心臓線維芽細胞において直接線維形成性効果を有することが示されている。Chen, et al. (2006) *FEBS Lett.* 580:4737-45。合わせると、これらの研究は、組織修復および線維症におけるLPAの役割を証明し、線維性障害の治療において、生理活性脂質をこれまで認識されていなかったクラスの標的として同定する。

【0150】

線維性障害の例としては、下記が挙げられる：強皮症、肺線維症、肝臓線維症、腎臓線維症、子宮線維症、皮膚の線維症、および心臓線維症。LPAの有効濃度を低減する作用物質、例えばLpathの抗LPA mAbは、異常な線維症により特徴付けられる疾患および病状を治療するための方法において有用であると考えられる。

【0151】

b. 心血管および脳血管障害

LPAは、肝臓組織の線維形成および創傷治癒 (Davaillie et al., *J. Biol. Chem.* 275:34268-34633, 2000; Ikeda et al., *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279:G304-G310, 2000)、創傷した脈管構造の治癒 (Lee et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278:C612-C618, 2000)、およびそのような疾患と関連する他の疾患状態、イベント、例えば癌、血管新生および炎症 (Pyne et al., *Biochem. J.* 349:385-402, 2000) に関与するので、開示の組成物および方法は、これらの疾患だけでなく、同様に心臓疾患、特に、組織リモデリングと関連するものを治療するために適用できる。LPAはコラーゲン遺伝子発現および心臓線維芽細胞の増殖を刺激することによりいくらかの直接線維形成作用を有する。Chen, et al. (2006) *FEBS Lett.* 580:4737-45。

【0152】

c. 肥満および糖尿病

LPA合成に關与するオートタキシン、ホスホリパーゼDは、脂肪細胞により分泌されることが見出されており、その発現は肥満-糖尿病db/dbマウス由来の脂肪細胞において、ならびに著しく肥満の女性被験体および肥満に關係なく2型糖尿病を有するヒト患者において上方制御される(Ferry et al. (2003) JBC 278:18162-18169; Boucher et al. (2005) Diabetologia 48:569-577(Pradere et al. (2007) BBA 1771:93-102において引用される))。LPAはそれ自体、前脂肪細胞の増殖および分化に影響を与えることが示されている。Pradere et al., 2007。合わせると、これにより肥満および糖尿病の治療における抗LPA作用物質の役割が示唆される。

10

【0153】

d. 疼痛

神経障害性疼痛を含む疼痛の発症におけるLPAの重要な役割を、様々な薬理学的および遺伝的アプローチを使用して確立させた。LPAは持続性機械的アロディニアおよび熱痛覚過敏ならびに脱髄およびLPA1受容体を介する疼痛関連タンパク質の上方制御に關与する。加えて、LPAのくも膜下腔内注射は、挙動的、形態および生化学変化、例えば、神経結紮後に觀察されるものと同様の後根の脱髄を伴う疼痛刺激に対する長期感受性を誘導する。Fujita, R., Kiguchi, N. & Ueda, H. (2007) Neurochem Int 50, 351-5。神経損傷を有する野生型動物は、後根における脱髄、ならびに脊髄後角内のタンパク質キナーゼCアイソフォームおよび後根神経節内の21カルシウムチャネルサブユニットの両方の発現の増加と並行する挙動的アロディニアおよび痛覚過敏を発症する。LPA1受容体遺伝子欠損マウス(Ipa1-/-マウス)は神経損傷誘発神経障害性疼痛挙動および現象を喪失することが証明されている。Inoue, M. et al. (2004) Nat Med 10, 712-8。オートタキシン遺伝子に対するヘテロ変異マウス(atx+/-)は、神経損傷誘発神経障害性疼痛のおよそ50%回復を示した。痛覚過敏は、Ipa1-/-およびatx+/-マウスの両方で完全に消滅した。さらに、RhoおよびRhoキナーゼシグナル経路の阻害剤はまた、神経障害性疼痛を防止した。Mueller, B.K., Mack, H. & Teusch, N. (2005) Nat Rev Drug Discov 4, 387-98。よって、LPA生合成および/またはLPA1受容体を標的にすることは、神経損傷誘発神経障害性疼痛の緩和への新規アプローチを表し得る。

20

30

【0154】

細胞レベルでは、LPAは神経およびグリア細胞における形態変化の強力な誘導因子である。66, 151-155. Kingsbury, M.A., et al. (2003) Nat Neurosci 6, 1292-9; Jalink, K. et al., (1993) Cell Growth Differ 4, 247-55; Tigyi, G. & Miledi, R. (1992) J Biol Chem 267, 21360-7 (1992); Fukushima, N. et al. (2000) Dev Biol 228, 6-18; Yuan, X.B. et al. (2003) Nat Cell Biol 5, 38-45; Fukushima, N., et al. (2007) Neurochem Int 50, 302-7。

40

【0155】

初代アストロサイトでは、ならびに神経膠腫由来細胞系では、LPAは、突起成長(「星形化」)、活性RhoAにより管理され、限局的接着タンパク質の再構築および活性化を伴うプロセスの反転を引き起こす。Ramakers, G.J. & Moolenaar, W.H. (1998). Exp Cell Res 245, 252-62。ミエリン形成におけるLPAの役割はまた、LPAはシュワン細胞中で細胞-細胞

50

接着および生存を促進するという所見により示唆される。Weiner, J. A., et al. (2001) *J Neurosci* 21, 7069-78; Ramer, L. M. et al (2004) *J Neurosci* 24, 10796-805。

【0156】

e. 神経外傷およびCNS疾患/病状

LPA経路の主要成分はCNS損傷後に調節される。成体マウスでは、LPA受容体は、脊髄において差次的に発現され、LPA受容体1-3(LPA1-3)は、損傷に応じて強く上方制御される。Goldshmit, et al. (2010), *Cell Tissue Res.* 341:23-32。無傷の未損傷脊髄におけるLPA受容体発現の検査は、LPA1-3は、低い、脊髄の異なる領域では別々のレベルで発現されることを示した。LPA1は、中心管において上衣細胞により発現され、一方、LPA2は、中心管を直接取り巻く細胞において、低レベルで、灰白質中のいくつかのアストロサイト上で発現される。LPA3は低レベルで、前角の運動ニューロン上で、灰白質ニューロピル全体に発現される。SCI後、LPA1は、損傷部位近くのアストロサイトのサブ集団上で、損傷後4日に依然として発現されているが、その発現レベルは増加している。LPA2はアストロサイトにより発現され、2日までは病変部周辺の反応性アストロサイト上で上方制御され、4日までさらに増加する。LPA3発現は、ニューロンに限定されたままであるが、少数のニューロンでは2日まで上方制御され、4日までさらに増加し、その発現が神経突起まで延長する。この上方制御は病変部に近接してだけでなく、

10

20

【0157】

損傷後のLPA1-3の局所上方制御の証明と共に、ほとんどの神経細胞型、とりわけ細胞形態、増殖および生存に対するLPAの多面的効果を考えると、LPAは、反応性アストログリオシス、神経再生および軸索再成長において主要な役割を果たすことにより、神経外傷後の細胞再編成の本質的側面を調節する可能性がある。

【0158】

データは、LPA刺激への神経応答は、脳および/または脊髄損傷後の次のダメージまたは修復の量に著しく影響する可能性があることを強く示唆する。上昇したLPAのレベルが脳および脊髄損傷を含むある一定の病理学的状態において観察される。マウス脳へのLPA注射は、損傷部位でのアストロサイト反応性を誘発し、一方、脊髄では、LPAは神経障害性疼痛および脱髄を誘発する。LPAはアストロサイト増殖を刺激し、海馬ニューロンの死を促進し得る。その上、LPAはミクログリア活性化を媒介し、神経微小血管内皮に対し細胞傷害性である。

30

【0159】

損傷後、LPAは坐骨神経結紮のモデルにおけるマウス脊髄において合成され(Ma, Uchida et al. 2010)およびLPA様活性は新生仔ブタにおける脳出血を模倣するための自己血液のくも膜下腔内注射後脳脊髄液で増加する(Tigyti, et al. (1995), *Am J. Physiol.* 268:H2048-2055; Yakubu, et al. (1997), *Am J. Physiol.* 273:R703-709)。通常、検出不能なレベルのATXが成体ラット脳の病変に隣接するアストロサイトで増加する(Savaskan, et al. (2007), *Cell Mol Life Sci.* (2007) 64:230-43)。ヒトでは、脳脊髄液中のATXの存在が多発性硬化症患者において証明されており(Hammack, et al. (2004), *Mult Scler.* 10:245-60)ならびにヒト血漿中のより高いLPAレベルは、無症候性脳梗塞を予測する(Li, et al. (2010), *Int J Mol Sci.* 11:3988-98)。さらに、外傷性脳損傷(TBI)患者由来のヒト脳脊髄液中では(Farias, et al. (2011), *J 外傷.* 71:1211-8)アラキドン酸、ホスファチジン酸のLPAおよびアラキドン酸への加水分解から生成される脂質のレベル

40

50

の増加が報告されている。

【0160】

損傷、出血、または神経系への外傷後、神経系内のLPAのレベルは10 μ まで増加すると考えられる。Dottorìら[(2008) Stem Cells 26:1146-54]は、10 μ のLPAはヒトNSCのニューロン分化を阻害することができるが、より低い濃度では阻害せず、損傷後CNS内の高いLPAのレベルは、NSCのニューロンへの分化を阻害し、よって、内在性ニューロン再生を阻害することが示唆されることを示した。よって、LPAシグナル伝達の調節は、神経系損傷において著しい影響を有することができ、新しい、可能性のある治療アプローチが可能になる。LPAに対する抗体はここで(下記実施例を参照されたい)、梗塞サイズ、神経炎症(グリア新生を含む)および神経変性を減少させることが示されている。

10

【0161】

LPAおよびLPA代謝産物は今や、下記実施例で示されるように、神経外傷、例えばTBIのためのバイオマーカーであることが示されている。LPAはTBI後CSF中で上昇し、よって、神経外傷の存在を示すように診断的に使用することができる。これにより、神経症状と関係なく神経外傷を検出するのを助ける、本明細書に記載される迅速な方法およびキットの開発が可能になる。そのような方法およびキットは、例えば、救急医療員、緊急治療室医師により、ならびに戦闘状態において、患者トリアージを助けるために使用することができる。方法の迅速性により、治療を損傷後すぐに開始することができ、これにより、初期損傷に続いて起こるCNSダメージが最小に抑えられる(可能な限り)と考えられる。治療は抗LPA作用物質、例えば本明細書に記載される抗体を用いてもよく、それは、神経外傷のモデルにおいて効力を示している(本明細書における実施例を参照されたい)。

20

【0162】

LPAに加えて、神経外傷に対する他のマーカーが知られており、およびこれらは神経外傷を検出および診断するための方法およびキットにおいてLPAと組み合わせて使用され得る。例えば、CSFおよび血清中のアルブミンレベルの比較を使用して、BBB破壊を評価することができ、アストロサイトタンパク質S100Bおよび単量体トランスサイレチンは、BBB破壊のための血清マーカーとして報告されている。Blythe et al. (2009) J. Neurotrauma 26:1497-1507。プロテオミクスアプローチがTBIのための30の推定予後バイオマーカーを同定するために使用されており、セレベリン、FGF-13、グルタチオンペルオキシダーゼ3、セルピンA3、ムリノグロビン(murinoglobulin)、ApoA4、クラスタリン/ApoJ、補体タンパク質C1QB、C8BおよびC8G、フィブリノゲン および 鎖、プロトロンビン、ヘモグロビンサブユニット、 および 、ヘモペキシン、および10のイムノグロビン(immunoglobulin)(または関連)タンパク質:IGHG、IGK5、EP3-6、LOC100047628、IGHM、IGL3C、IGH2、IGK8、IGG3C、およびEALCが挙げられる。Crawford et al. (2012) J. Neurotrauma 29:246-60。高分子量神経フィラメントサブユニットNF-Hのリン酸化形態(pNF-H)は、SCI後の血液中

で上昇し、レベルは、軸索ダメージの程度を反映することが報告されている。Hayakawa et al. (2012) 1-4。ユビキチンC末端ヒドロラーゼ(UCH-L1)の血清レベルは、対照から軽度TBIを区別することが示されている。UCH-L1は、損傷の1時間以内に検出可能であり、レベルはグラスゴースコア、CTにより検出可能な頭蓋内病変の存在、および神経外科的介入の必要性と相関する。Papa et al. (2012) J. Trauma 72:1335-1344。グリア線維酸性タンパク質(GFAP)は、TBIおよび脳卒中後に血液中に放出される脳-特異的バイオマーカーであり、これらの病状に対する推定バイオマーカーである。Schiff, L. et al., Mol Diagn Ther. 2012 Apr 1; 16(2):79-92(抄録)。症状発症の4.5h以内に実施された血漿GFAP分析

30

40

50

は頭蓋内出血を虚血性脳卒中から区別することができる。Foerch et al. (2012) *Clinical Chemistry* 58:237-245 および米国特許出願公開20060240480号。TBIに対する追加の推定タンパク質バイオマーカーとしては、SBDP150、SBDP120、MBP1frag、MAP2、BA0293、S100B、NSA、MMP9、VCAMおよびIL-12が挙げられる。

【0163】

LPAに加えて、神経外傷のための他の脂質バイオマーカー、例えば本明細書に記載されるLPA代謝産物(例えば、リゾPAFおよびLPC)、ならびに12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(12-HETE)などの他の脂質バイオマーカーもまた存在し、これはTBI後の患者のCSF中で上昇することが示されている[Farias et al., (2011) *J. Trauma* 71:1211-1218]。これらの脂質バイオマーカーはまた神経外傷の検出および診断のために単独で、または組み合わされて使用され得る。1つの実施形態では、LPAおよび1つ以上のLPA代謝産物のレベルが神経外傷を検出および/または診断するために被験体由来の1つ以上の生体試料中で決定される。別の実施形態では、LPAのレベルおよび/またはLPA代謝産物のレベルが12-HETEのレベルに加えて、神経外傷を検出および/または診断するために被験体由来の1つ以上の生体試料において決定される。

10

【0164】

神経外傷のためのタンパク質および脂質バイオマーカーの他の例が存在する。本明細書で開示される、神経外傷を検出および診断するための方法およびキットは、LPAの決定に、単独で、または神経外傷の1つ以上の追加のマーカーの検出および/または測定と組み合わせて依存してもよい。いくつかの実施形態では、複数のバイオマーカーの決定が望ましい。

20

【0165】

3. LPAに対する抗体

天然起源のLPAに対するポリクローナル抗血清は、文献で報告されている(Chen JH et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 2000 Aug 7:10(15):1691-3)。下記実施例は下記を含む、治療的観点から望ましい特性を有するモノクローナル抗LPA抗体の産生を記載する:(a) LPAおよび/またはその変異体、例えば18:2、18:1、18:0、16:0、14:0、12:0および20:4 LPAに対する結合親和性。抗体親和性は下記実施例において記載されるように決定され得る。好ましくは、抗体はLPAに高親和性で、例えば、約 1×10^{-7} M以下;おそらく約 1×10^{-8} M以下;およびおそらく約 5×10^{-9} M以下のKd値で結合する。生理的状況では、LPA受容体に対するLPA親和性よりも高い親和性で、抗体がLPAに結合することが好ましい。診断アッセイなどの非生理的状況では、この要求は必ずしもないあてはまらないことが理解されるであろう。

30

【0166】

LPAに対して強い結合親和性を有する抗体の他に、治療的観点から他の有益な特性を有する、キメラ、ヒト化または変異抗体を選択することもまた望ましい可能性がある。例えば、抗体は、瘢痕形成を低減させ、あるいは腫瘍進行を変化させるものであってもよい。抗LPA抗体の活性を決定するための1つのアッセイはELISAである。好ましくは、ヒト化または変異抗体は、治療的有効量の抗体をヒト患者に投与しても、免疫原性応答を惹起しない。免疫原性応答が惹起される場合、好ましくは応答は、抗体が依然として、これにより治療される患者に治療効果を提供するようなものである。

40

【0167】

抗原結合抗体断片および変異体を含む、LPAに対する抗体についてのより多くの情報、が出願人の特許出願、例えば、米国特許出願公開第20090136483号、20080145360号、20100034814号および20110076269号(これらはすべて、本発明と共に所有され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)および下記実施例において見出され得る。LPAに対する抗体はポリクローナルまたはモノ

50

クローナルであってもよく、ヒト化されてもよい。抗LPA抗体をコードする単離された核酸、核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびに抗体の産生のための組換え技術もまた、上記特許出願に記載される。

【0168】

a. 医薬製剤、用量および投与経路

患者における望ましくないLPAの量を制御する1つの方法は、1つ以上のLPAに結合し、よって、遊離LPAのレベルを低減させる治療「スポンジ」として働く1つ以上の抗LPA抗体を含む組成物を提供することによる。化合物が「遊離」といわれる場合、化合物は、その望ましくない効果を及ぼす1つ以上の部位に到達することから全く制限されていない。典型的には、遊離化合物は、遊離化合物の作用部位（複数可）であるか、それを 10
含む、あるいはそこから化合物が自由にその作用部位（複数可）に移動することができる血液および組織中に存在する。遊離化合物はまた、化合物を望ましくない化合物に変換するいずれの酵素によっても作用され得る。

【0169】

抗LPA抗体は、疾患、障害または身体外傷の治療を含む様々な目的に有用な医薬組成物で製剤化され得る。1つ以上の抗LPA抗体を含む医薬組成物はそのような治療のためにキットおよび医療装置に組み入れてもよい。医療装置は、医薬組成物を治療の必要な患者に投与するために使用することができ、1つの実施形態によれば、そのような装置を含むキットが提供される。そのような装置およびキットは、医薬組成物の自己投与を含む日常投与用に設計され得る。そのような装置およびキットはまた、例えば、救急車または緊急治療室内、または外科手術中、または損傷の可能性があるが、十分な医学的な注意が即座に用意されない活動において（例えば、ハイキングおよびキャンプ、または戦闘状態）、緊急用に設計され得る。 20

【0170】

抗体の治療製剤は、所望の程度の純度を有する抗体を任意的な生理的に許容される担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される用量および濃度ではレシピエントにとって無毒であり、下記を含む：リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマ、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖類、二糖類、および他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、またはデキストリン；EDTAなどのキレート剤；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；ナトリウム 40
などの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）。

【0171】

本明細書における製剤はまた、必要に応じて治療される特定の徴候のための1を超える活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない補完的活性を有するものを含み得る。そのような分子は、意図される目的のために有効な量で、併用で好適に存在する。

【0172】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術により、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラ 50

チン・マイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)またはマクロエマルジョンにてトラップされ得る。そのような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) において開示される。

【0173】

インビボ投与のために使用される製剤は無菌でなければならない。これは、例えば、除菌膜に通す濾過により、容易に達成される。

【0174】

徐放調製物が調製され得る。徐放調製物の好適な例としては抗体を含む固体疎水性ポリマの半透性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態にある。徐放マトリクスの例としては、下記が挙げられる：ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリビニルアルコール)、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸のコポリマ、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマ、例えばリュプロンデポ(Lupron Depot)・TM・(乳酸-グリコール酸コポリマおよび酢酸リュプロリドから構成される注射用マイクロスフェア)、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸。ポリマ、例えばエチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸は、分子の放出を100日超可能にし、ある一定のヒドロゲルはタンパク質をより短い期間放出する。カプセル化された抗体が体内に長期間残ったままである場合、それらは水分に37 で曝露された結果として変性または凝集する可能性があり、生物活性が喪失し、免疫原性の潜在的な変化が起こる。関与するメカニズムによって安定化のための合理的戦略を考案することができる。例えば、凝集メカニズムがチオ-ジスルフィド交換による分子間のS-S結合形成であることが発見された場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含水量制御、適切な添加物の使用、および特異的ポリママトリクス組成物の開発により達成することができる。

【0175】

治療用途のために、抗LPA作用物質、例えば、抗体は哺乳類、好ましくはヒトに、薬学的に許容される剤形、例えば上記で記載されるもので投与され、ヒトに静脈内でボラスとして、またはある期間にわたる持続注入により、あるいは筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、くも膜下腔内、経口、局所、鼻腔内もしくは吸入経路により投与され得るものが含まれる。CNS適用のためには、脳脊髄内、くも膜下腔内および鼻腔内投与が特に有用であり得る。血液脳関門(BBB)はほとんどの薬物に対して不透性であるが、鼻腔内送達はCNSへの効率的な薬物送達を可能にし；これは吻側移動ストリーム、三叉神経および/または嗅神経を介して起こると考えられる。Scranton et al. (2011) PLoS ONE 6:e18711。経路および装置を含む鼻腔内投与のレビューのために、Dhuria et al. (2010) J Pharm Sci. 99(4):1654-73を参照されたい。薬物を、鼻腔上3分の1内に鼻腔内投与することが好ましい可能性がある(米国特許出願第6313093号、Freymann, WH)。これらの標的CNS経路に加えて、全身または他の経路を介するCNS投与の可能性もまた、神経外傷を有する患者においては存在する。というのも、BBBはしばしば神経外傷後の時間窓の間損なわれるからである。

【0176】

疾患の防止または治療のために、抗体の適切な用量は、上記で規定される治療される疾患の型、疾患の重症度および経過、抗体が防止または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴および抗体への応答、および主治医の慎重さに依存する。抗体は、1度に、または一連の治療にわたって患者に好適に投与される。

【0177】

10

20

30

40

50

疾患の型および重症度によって、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $50 \text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 - 20 \text{mg}/\text{kg}$) の抗体が、例えば、1回以上の別々の投与によるか、または持続注入によるかに関係なく、患者への投与のための初期候補用量となる。典型的な1日または1週用量は、上記因子によって約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $20 \text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲となり得る。数日以上にわたる反復投与では、病状によって、治療が疾患症状の所望の抑制が起こるまで繰り返される。しかしながら、他の投与レジメンが有用であり得る。この療法の進行は、例えば、X線画像を含む従来の技術およびアッセイにより容易にモニタされる。体液または組織中のLPAレベルを決定するために抗体を使用する検出方法は、治療抗体への患者曝露を最適化するために使用され得る。

【0178】

別の実施形態によれば、LPA活性を妨害する作用物質、例えば、mAbを含む組成物が単独療法として投与されるが、他の好ましい実施形態では、LPA活性を妨害する作用物質を含む組成物は、併用療法の一部として投与される。場合によっては、疾患の防止または治療における抗体の有効性は、抗体を、それらの目的に有効な別の作用物質、例えば、癌の治療のための化学療法薬と連続的に、または併用で投与することにより、改善され得る。他の場合では、抗LPA作用物質は、細胞を化学療法治療に対し増強させる、または感作させるように作用することができ、よって、より低い用量で効力が得られ、毒性が低くなる。好ましい併用療法は、LPA活性を妨害する作用物質を含む組成物の投与に加えて、化学療法薬の投与、放射線療法、外科手術、および前記のいずれかの組み合わせからなる群より選択される第2の治療レジメンを送達させることを含む。

【0179】

そのような他の作用物質は、投与される組成物中に存在してもよく、または別個に投与されてもよい。また、抗体は他の作用物質または様式、例えば、癌の治療のための化学療法薬または放射線と連続的に、または併用で好適に投与される。

【0180】

b. 抗LPA作用物質に対する研究および、臨床診断を含む診断使用

抗LPA作用物質、例えば、アプタマー、受容体断片、小分子および抗体は、LPAに特異的に結合する分子である。そのようなものとして、それらは、例えば、体液(複数可)からLPAを検出するおよび/または精製するために使用され得る。

【0181】

抗LPA抗体を親和性精製剤として使用するために、抗体は固体支持体、例えばビーズ、Sephadex樹脂または濾紙上に、当技術分野でよく知られている方法を用いて固定化される。固定化抗体(または他の抗LPA検出試薬)が、精製されるLPAを含む試料と接触させられ、その後、支持体を、固定化抗体に結合したLPAを除く試料中の全ての材料を実質的に除去する好適な溶媒で洗浄される。最後に、支持体は別の好適な溶媒、例えばグリシン緩衝液、例えばpH3~pH5.0の間で洗浄され、LPAが抗体から遊離される。

【0182】

抗LPA抗体は、例えば、特異的細胞、組織、または体液中のその存在を検出する、LPAのための診断アッセイにおいて有用である。そのような診断方法は、例えば、過剰増殖疾患または障害の診断において有用であり得る。よって、臨床診断使用ならびに研究使用は発明により包含される。これらの方法では、抗LPA抗体は好ましくは、固体支持体、例えば、ビーズ、カラム、プレート、ゲル、フィルタ、膜、などに付着される。

【0183】

診断適用のために、抗体は検出可能な部分で標識してもよい。多くの標識が利用でき、それらは一般に下記カテゴリに分類することができる：

(a) 放射性同位元素、例えば ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、および ^{131}I 。抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (19

10

20

30

40

50

91)において記載される技術を用いて、放射性同位体で標識することができ、放射能はシンチレーション測定を用いて測定することができる。

(b) 蛍光標識、例えば希土類キレート(ユーロピウムキレート)またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリンおよびTexas Redが利用可能である。蛍光標識は抗体に、例えば、Current Protocols in Immunology、上記で開示される技術を用いてコンジュゲートさせることができる。蛍光は蛍光光度計を用いて定量することができる。

(c) 様々な酵素-基質標識は利用可能であり、米国特許第4,275,149号はこれらのいくつかのレビューを提供する。酵素は一般に様々な技術を用いて測定することができる発色性基質の化学的变化を触媒する。例えば、酵素は基質の色変化を触媒してもよく、これは、分光光度的に測定することができる。あるいは、酵素は基質の蛍光または化学発光を変化させ得る。蛍光変化を定量するための技術が以上で記載される。化学発光基質は、化学反応により電子的に励起され、その後、(例えば、ケミルミノメーターを用いて)測定することができる光を放出することができ、またはエネルギーを蛍光アクセプターに供与する。酵素標識の例としては、下記が挙げられる:ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ;米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジジン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ(例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ、など。酵素を抗体にコンジュゲートさせるための技術はO'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzymology (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166(1981)において記載される。

10

20

30

【0184】

酵素-基質の組み合わせの例としては、例えば、下記が挙げられる:

(i) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)、ここで、水素ペルオキシダーゼは染料前駆体(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する;

(ii) 発色性基質としてパラ-ニトロフェニルリン酸を有するアルカリホスファターゼ(AP);ならびに(iii)発色性基質を有する-D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)(例えば、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)または蛍光発生基質を有する4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシダーゼ。

40

【0185】

多くの他の酵素-基質の組み合わせを当業者は利用可能である。これらの一般レビューのために、米国特許第4,275,149号および4,318,980号を参照されたい。

【0186】

時として、標識は間接的に、抗体にコンジュゲートされる。当業者はこれを達成する様々な技術に気付くであろう。例えば、抗体はビオチンとコンジュゲートさせることができ、上記で言及した3つの広いカテゴリ標識のいずれかを、アビジンとコンジュゲートさせることができ、あるいは逆もまた同様である。ビオチンは選択的にアビジンに結合し、よって標識は抗体にこの間接的様式でコンジュゲートされ得る。あるいは、標識の抗体との間接的コンジュゲーションを達成するために、抗体は、小ハプテン(例えば、ジゴキシン

50

）とコンジュゲートされ、以上で言及される異なる型の標識の1つは抗ハプテン抗体（例えば、抗ジゴキシン抗体）とコンジュゲートされる。よって、標識の抗体との間接コンジュゲーションが達成され得る。

【0187】

別の実施形態では、抗LPA抗体は標識される必要はなく、その存在は、例えば、抗LPA抗体に結合する標識抗体を使用して検出することができる。

【0188】

抗体は任意の公知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイにおいて使用され得る。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。抗LPA抗体を使用するELISAアッセイ（競合的または直接）は、LPAを検出し、その結合および抗原特異性を評価するのに有用である。出願人の抗LPA抗体を組み入れたLPA ELISAキットは、Echelon Biosciences, Salt Lake City UT (cat no. K-2800) から市販されている。

10

【0189】

競合結合アッセイは、標識された標準が、試験試料分析物と、限られた量の抗体との結合に対し競合する能力に依存する。試験試料中のLPAの量は、抗体に結合する標準の量に反比例する。結合する標準の量の決定を促進するために、抗体は一般に、競合前または後に不溶性であり、よって、抗体に結合する標準および分析物は便宜上、非結合のままの標準および分析物から分離することができる。

20

【0190】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用を含み、それぞれ、検出されるタンパク質の異なる免疫原性部分、またはエピトープに結合することができる。サンドイッチアッセイでは、試験試料分析物は、固体支持体上に固定化されている第1の抗体に結合し、その後、第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3つの部分からなる複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,110号を参照されたい。第2の抗体はそれ自体、検出可能な部分で標識してもよく（直接サンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、1つの型のサンドイッチアッセイはELISAアッセイであり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

30

【0191】

免疫組織化学では、血液または組織試料は新鮮または凍結とすることができ、またはパラフィンに包埋され、例えば、ホルマリンなどの保存剤で固定され得る。

【0192】

抗体はまた、インビボ診断アッセイのために使用され得る。抗体は放射標識されてもよく（例えば¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、¹²⁵I、³H、³²P、または³⁵Sで）、そのため結合された標的分子は、イムノシンチログラフィ（immunoscintigraphy）を用いて局在化させることができる。

40

【0193】

c. LPA関連疾患または病状の検出および診断のためのキット

便宜上、神経外傷を検出および診断する方法では、特に救急医療用途では、LPAに対する抗体は、キット、例えば、あらかじめ決められた量の試薬と方法を実施するための説明書とのパッケージされた組み合わせ中で提供することができる。いくつかの実施形態では、キットはまた、例えば、血液またはCSFを採取するための患者試料採取装置、例えば、シリンジ、体液、例えば尿、涙、唾液、などを採取するためのバイアルを含む。1つの実施形態では、キットは、LPAの検出および定量のための抗体に基づくアッセイのための材料を含み、好ましくは患者試料中のLPAの定量のための手段および材料（例えば標準）を含み、LPAレベルが神経外傷を示すレベルまで上昇したかどうか決定される。

50

【0194】

1つの実施形態では、LPAアッセイはキット内の小型で携帯可能な固体支持体、例えばマイクロタイタープレート上で実施される。1つの実施形態では、神経外傷の診断のためにLPAを検出および定量するためのアッセイはELISAアッセイである。1つの実施形態では、このアッセイは、本明細書に記載されるように、抗LPA抗体および誘導体化LPAの両方を使用する。誘導体化LPAコンジュゲート（例えば、BSAまたはKLHにコンジュゲートされたチオール化LPA）は、抗LPA抗体を検出するために使用されるELISAキットにおいてレイダウン材料（プレートをコートするため）として使用することができる。1つの例として、LPA競合的ELISAキットでは、プレート（提供される）は、誘導体化および/または誘導体化およびコンジュゲートLPAでコートされる。1つ以上のLPA標準（一般にキット中で提供される）および1つ以上の試料（例えば、尿、血液、血清、細胞または組織）の組が、マウス抗LPA抗体と混合され、誘導体化LPAコートプレートに添加される。抗体はプレートに結合されたLPAまたは試料もしくは標準中のLPAへの結合に対し競合する。インキュベーションおよびいくつかのELISA工程（キット中で提供される説明書および試薬）後、試料中のLPA濃度が、検量線との比較により、例えば、比色分析アッセイを使用して決定される。1つの非限定的実施形態では、ELISAキットにおいてレイダウン材料のために使用されるLPAは、BSAにコンジュゲートされたチオール化C12LPAまたはチオール化C18LPAである。キット中で使用される抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってもよく、好ましくはモノクローナル抗体である。

10

20

【0195】

誘導体化およびコンジュゲートLPAおよび抗LPA抗体を組み入れたキット（どちらも、Lpath Inc.により開発された）はEchelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, UTから市販されている（Lysophosphatidicアッセイキット、Cat. No. K-2800）。

【0196】

便宜上、抗LPA抗体（またはその抗原結合断片）は、キット、例えば、あらかじめ決められた量の試薬と診断アッセイを実施するための説明書とのパッケージされた組み合わせ中で提供することができる。抗体が酵素で標識される場合、キットは酵素により必要とされる基質および補因子（例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアを提供する基質前駆体）を含む。加えて、他の添加物、例えば安定剤、緩衝液（例えば、ブロック緩衝液または溶解緩衝液）なども含めることができる。様々な試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する、試薬の溶液中の濃度を提供するように広く変動させることができる。特に、試薬は溶解時に、適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、通常凍結乾燥された乾燥粉末として提供することができる。キットはまた、好都合で安全な患者試料採取のための材料 - 無菌手袋、滅菌ワイプ、洗浄液、リンスまたは患者安全性および/または無菌試料採取を確保するためのスワブ、などを含み得る

30

【0197】

1つの実施形態では、キットはラテラルフロー試験 [イムノクロマトグラフィーストリップ (ICS) またはラテラルフローイムノアッセイ (LFIA)] フォーマットを使用し、これは、迅速な診断法のために広く使用されており、特に戦場において、使用が最も容易であるという利点を有し、いくつかの分析物（例えば、LPAおよび1つ以上の追加のバイオマーカー）を1度に試験することができる。そのようなラテラルフローキットおよび方法は、ポイントオブケア検査に特に好適である。1つの実施形態では、血液または尿の試料が、ラテラルフロー試験を用いて試験され、LPAおよび/またはLPA代謝産物（複数可）が検出され、神経外傷が検出および診断される。

40

【0198】

いくつかの実施形態では、診断キットはまた、神経外傷の治療のための治療材料、例えば抗LPA抗体またはその抗原結合断片を含む。このキットは、以上で記載されるキットの診断部分を用いて、持続性神経外傷を有すると決定された患者の迅速な神経保護治療を

50

提供するように意図される。キットの治療部分は好ましくは患者投与のための材料、例えば無菌シリンジ、無菌手袋、などを、投与情報および、必要に応じて、抗体を溶解および/または希釈するために必要な材料と共に含む。いくつかの実施形態では、キットは抗体の鼻腔内投与のための溶液および装置を含む。

【0199】

本明細書で記載されるキットの大きな利点は、神経外傷の迅速な診断であり、これにより、神経保護が可能な重要な時間窓の間、脳損傷の第二相が最大ダメージを引き起こす前、おそらくBBBが依然として損なわれている間、治療が可能になる。場合によっては、キットはまた、治療に必要な材料を提供し、これにより、診断直後に、緊急治療室環境に到達する前であっても治療を開始できる。TBI症状または軽度TBIを特徴付ける症状のパターンは1つではないので、例えば、迅速なスクリーニング試験、理想的なもの（例えば、本明細書で記載されるキット）は戦場または緊急救難車において使用することができる。診断未確定のおよび未処置のTBIはリスクを与える。というのも、徴候および症状は、損傷後数日から数カ月にかけて遅れる可能性があり、未処置の場合、患者の身体的、情動的、挙動的、社会的、または家族状態に著しい影響を有する可能性があり、機能障害となる可能性があるからである。

10

【0200】

d. 他の製造品

別の態様では、以上で記載される障害の治療のために有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、容器および標識を含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、および試験管が挙げられる。容器は様々な材料、例えばガラスまたはプラスチックから形成され得る。容器は症状を治療するのに有効である組成物を保持し、無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は皮下注射針により穴を空けることができる共栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい）。組成物中の活性剤は抗スフィンゴ脂質抗体である。容器上の、またはこれと関連する標識は、組成物が選択した病状を治療するために使用されることを示す。製造品はさらに、薬学的に許容される緩衝液、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンガー液およびデキストロス溶液を含む第2の容器を含み得る。それはさらに、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料を含むことができ、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、シリンジ、および使用説明書を有する添付文書が挙げられる。

20

30

【0201】

発明は、下記実施例を参照することにより、よりよく理解されるであろう。実施例は、発明を実施するために現在知られている最良の様式を単に説明することを意図する。発明の範囲はそれらに限定されると考えられるべきではない。

【0202】

実施例

発明はさらに、下記の詳述された実施例を参照して記載されるであろう。これらの実施例は、いかなる様式によっても本発明の範囲を制限すると決して考えるべきではない。

【0203】

実施例1：S1Pの代表的なチオール化類似体を製造するための合成スキーム

40

この実施例で記載される合成アプローチにより、主として従来の有機化学を使用して構造要素の連続付加により抗原を調製する。この実施例で説明されるアプローチに対するスキームを図1で提供し、下記合成の説明における化合物番号は、図1において番号が付された構造を示す。

【0204】

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、15-ヒドロキシ基のメチルスルホニルクロリドによる活性化により、ヒドロキシル置換を促進させ、スルホネート、2を生成した。スルホネートのt-ブチルチオールによる置換により、保護されたチオエーテル、3を得、これをGarnerアルデヒドと縮合させ4を生成させた。アルキン部分をアルケン(5)に穏やかに還元させ、続いて、オキサゾリデン

50

(oxazolidene)環の酸触媒開環により、S-保護されたおよびN-保護されたチオール置換スフィンゴシン、6を得た。この最後の工程中、ジ-t-ブチルジカーボネートによる再誘導体化を使用し、酸触媒開環中のN-BOC基の損失を軽減させた。

【0205】

認識されるように、化合物6はそれ自体、スフィンゴシンに対する抗体を産生するためのハプテンを調製するための抗原として、または、その代わりに、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開始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、リン酸トリメチルによる化合物6リン酸化により化合物7を生成させた。臭化トリメチルシリルによる化合物7の処理により、リン酸から両方のメチル基、一級アミンからt-ブチルオキシカルボニル基を除去し、唯一の保護基として、硫黄上にt-ブチル基を有する化合物8を得た。この基を除去するために、t-ブチル基をNBSで置換しジスルフィド、9を形成させ、これをその後、還元し、チオール化S1P類似体、10を形成させた。

10

【0206】

別のアプローチは、化合物6を直接NBSClで処理し、ジスルフィド、11を形成させることを含み、これをその後、還元して、N-保護されたチオール化S1P類似体、12を形成させた。この化合物の弱酸により処理により、チオール化されたスフィンゴシン類似体、13を得、これは、酵素的に、例えば、スフィンゴシンキナーゼを用いてリン酸化することができ、チオール化S1P類似体、10が得られる。

20

【0207】

提示した合成アプローチの改変が、特に保護および脱保護試薬の選択に関しては可能であり、例えば、チオールを脱保護するための実施例3に記載されるトリメチルジスルフィドトリプレートの使用である。

30

【0208】

化合物2・DCM(400mL)を、1(10.3g、45.89mmol)を入れた500mL RBフラスコに添加し、得られた溶液を0℃まで冷却した。次に、TEA(8.34g、82.60mmol、9.5mL)を一斉に添加し、続いてMsCl(7.88g、68.84mmol、5.3mL)を10minにわたり一滴ずつ添加した。反応物を、RTで0.5h、または開始材料が消失するまで攪拌させた($R_f = 0.65$ 、5:1ヘキサン:EtOAc)。反応を、 NH_4Cl (300mL)で停止させ、(2×200mL)DCMで抽出した。有機層を、 $MgSO_4$ 上で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させ、固体とした(13.86g、99.8%収率)。 1H NMR($CDCl_3$) 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(5重線, $J = 7.5 Hz$, 2H), 1.505(5重線, $J = 7.5 Hz$, 2H), 1.37(br s, 4H), 1.27(br s, 14H)。 ^{13}C { 1H } NMR($CDCl_3$) 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HRMS分析(ES-TOF)において観察された主イオンは $m/z = 325.1804$ であった($C_{16}H_{30}O_3S$ に対して計算: $M + Na^+ 325.1808$)。

30

40

【0209】

化合物3・三口1L RBフラスコに、t-ブチルチオール(4.54g、50.40mmol)およびTHF(200mL)を入れ、その後、氷浴に入れた。n-BuLi(31.5mLの1.6Mヘキサン溶液)を、30minにわたり添加した。次に、化合物2(13.86g、45.82mmol)(THFに溶解(100mL))を、2minにわたり添加した。反応物を1時間または開始材料が消失するまで攪拌させる($R_f = 0.7$ 、1:1ヘキサン/EtOAc)。反応を、飽和 NH_4Cl (500mL)で停止させ、 EtO_2 (2×250mL)で抽出し、 $MgSO_4$ 上で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させ、黄色油を得た(11.67g、86%収率)。 1H NMR($CDCl_3$)

50

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 (5重線, J = 7.5 Hz, 2H), 1.51 (5重線, J = 7 Hz, 2H), 1.38 (br s, 4H), 1.33 (s, 9H), 1.26 (s, 14H)。¹³C {¹H} NMR (CDCl₃) 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。

【0210】

化合物4. 化合物3 (5.0 g、16.85 mmol)を入れた250 mLシュレンクフラスコを、3度、排気し、窒素を充填し、その後、乾燥THF (150 mL)を添加した。得られた溶液を-78℃まで冷却した。次に、n-BuLi (10.5 mLの1.6 Mヘキサン溶液)を、2 minにわたり添加し、反応混合物を、18 minの間-78℃で攪拌し、その後、冷却浴を20 min間除去した。ドライアイス浴を戻した。15 min後、Garnerアルデヒド (aldehyde) (3.36 g、14.65 mmol)を含む乾燥THF (10 mL)をその後、5 minにわたり添加した。20 min後、冷却浴を除去した。2.7 hr後、薄層クロマトグラフィー (TLC)は、Garnerアルデヒドが消失したことを示した。反応を、飽和NH₄Cl水溶液 (300 mL)で停止させ、Et₂O (2 × 250 mL)で抽出した。Et₂O相を合わせNa₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発させ、粗化合物4およびそのジアステレオマーを (図1で図示せず) 黄色油 (9.06 g)として得た。この材料をその後、次の工程で、さらに精製せずに使用した。

10

20

【0211】

化合物5. 化合物4中の三重結合を還元するために、油を乾燥Et₂O (100 mL)中に、窒素下で溶解させた。RED-Al (20 mL、65%トルエン溶液)を、得られた溶液にRTで徐々に添加し、水素ガス (H₂)の放出を制御した。反応物を、RTで一晩攪拌させ、あるいはTLCが、開始材料の消失を示した場合 (R_f = 0.6、1:1 EtOAc:ヘキサン中)、冷MeOHまたはNH₄Cl水溶液で徐々に反応停止させ、H₂の放出を制御した。得られた白色懸濁液を、セライトパッドに通して濾過し、濾液をEtOAc (2 × 400 mL)で抽出した。EtOAc抽出物を合わせMgSO₄上で乾燥させ、濾過し、および濾液を蒸発させ、粗化合物5およびそのsynジアステレオマー (図1で図示せず)を黄色油 (7.59 g)として得た。

30

【0212】

化合物6. 化合物5を含む油を、MeOH (200 mL)に溶解し、PTSA水和物 (0.63 g)を添加し、溶液をRTで1日、その後50℃で2日攪拌し、その時点で、TLCは、全ての開始材料 (5)が消失したことを示唆した。しかしながら、いくらかの極性材料が存在し、酸がBOC基を部分的に開裂させたことを示唆した。反応を飽和NH₄Cl水溶液 (400 mL)を添加することにより完成させ、エーテル (3 × 300 mL)で抽出した。エーテル相を合わせ、Na₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、濾液を蒸発乾燥させ、5.14 gの油を得た。形成したアミンを再保護するために、粗生成物を、CH₂Cl₂ (150 mL)に溶解し、これにBOC₂O (2.44 g)およびTEA (1.7 g)を添加した。TLC (1:1ヘキサン/EtOAc)がもはや材料がベースライン上に残っていないことを示した場合、飽和NH₄Cl水溶液 (200 mL)を添加し、有機相を分離した後、混合物をCH₂Cl₂ (3 × 200 mL)で抽出した。抽出物を合わせ、Na₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、濾過物を濃縮して乾燥させ、黄色油を得 (7.7 g)、これをヘキサン/EtOAc (最大1:1)の勾配を用いてシリカカラム上でクロマトグラフにかけ、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に対するR_fは0.45であった。syn異性体では (図1で図示せず)、R_fは0.40であった。化合物6の収量は2.45 gであった (Garnerアルデヒドに基づき全体で39%)。anti異性体の¹H NMR (CDCl₃) 1.26 (br s, 20H), 1.32 (s, 9H), 1.45 (s, 9

40

50

H), 1.56 (5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)。¹³C {¹H} NMR (CDCl₃) 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。

Anal. C₂₇H₅₃NO₄S に対して計算: C, 66.48; H, 10.95; N, 2.87。観察: C, 65.98; H, 10.46; N, 2.48。

【0213】

化合物7・乾燥ピリジン(2 mL)に溶解したアルコール化合物6(609.5 mg、1.25 mmol)の溶液に、CBr₄(647.2 mg、1.95 mmol、1.56 equiv)を添加した。フラスコを氷浴中で冷却し、P(OMe)₃(284.7 mg、2.29 mmol、1.84 equiv)を、2 minにわたり、一滴ずつ添加した。4 min後、氷浴を除去し、12 hr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、エマルジョンを形成させ、これを水(20 mL)による希釈で分離した。水相をエーテル(2 × 10 mL)で、その後EtOAc(2 × 10 mL)で抽出した。エーテル抽出物および最初のEtOAc抽出物を合わせ、HCl水溶液(10 mL、2 N)、水(10 mL)、および飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)で洗浄した。最後のEtOAc抽出物を使用して水性洗浄物を逆抽出した。有機相を合わせ、MgSO₄上で乾燥させ、濾過し、濾液を濃縮し、粗生成物(1.16 g)を得、これをフラッシュクロマトグラフィーにより、シリカ(3 × 22 cm カラム)上でCH₂Cl₂、その後CH₂Cl₂-EtOAc(1:20、1:6、1:3、および1:1 生成物が溶出し始めた、6:4、7:3)を用いて精製した。初期画分は56.9 mgの油を含んだ。後の画分は生成物を(化合物7、476.6 mg、64%)透明で、無色の油として提供した。

Anal. C₂₉H₅₈NO₇PS(595.82)に対して計算: C, 58.46; H, 9.81; N, 2.35。観察: C, 58.09; H, 9.69; N, 2.41。

【0214】

化合物8・化合物7(333.0 mg、0.559 mmol)および攪拌子を含むフラスコを排気し、窒素を充填した。アセトニトリル(4 mL、CaH₂から蒸留)を、シリンジにより注入し、今や溶液を含むフラスコを氷浴で冷却した。シリンジを使用して、(CH₃)₃SiBr(438.7 mg、2.87 mmol、5.13 equiv)を、1 minの経過にわたり添加した。35 min後、フラスコの上部を追加の部分のアセトニトリル(1 mL)ですすぎ、氷浴を除去した。さらに80 min後、1 アリコートを除去し、溶液を、その上に窒素ガスを吹き付けることにより乾燥させ、残渣を¹H NMRによりCDCl₃中で分析し、これは、P-OCH₃部分に帰する微量のピークのみを示した。20 min後、水(0.2 mL)を、反応混合物に添加し、続いてCDCl₃溶液を使用してアリコートを分析し、ロータリー・エバポレーター上で混合物を濃縮して約0.5 mL体積とした。小分けのアセトン(3 mL)を使用して、残渣を風袋の重さを量った試験管に移し、淡褐色溶液を形成させた。水(3 mL)を小分けにして添加した。0.3 mLの添加後、濁りが見られた。合計1 mL後、粘着性の沈殿が形成した。追加の0.6 mLの水を添加した時、さらに濁り、ガムが分離したが、最終部分の水は、混合物の外観を変化させないように見えた。全体としては、このプロセスは数時間の期間にわたって達成された。管を遠心分離し上清をピペットで除去した。固体はもはやガム状ではなく、P₄O₁₀上にて真空で乾燥させ、化合物8(258.2 mg、95%)を一水和物として得た。

10

20

30

40

50

Anal. $C_{22}H_{46}NO_5PS + H_2O$ (485.66) に対して計算: C, 54.40; H, 9.96; N, 2.88。観察: C, 54.59; H, 9.84; N, 2.95。

【0215】

化合物9. 化合物8 (202.6 mg, 0.417 mmol) をグローブボックス中で攪拌子、乾燥 THF (3 mL) および氷 HOAc (3 mL) を含む試験管に添加した。NBSCl (90 mg, 0.475 mmol, 1.14 equiv) を添加し、0.5 hr 後、透明な溶液を得た、合計 9 hr 後、アリコート蒸発乾燥させ、残渣を 1H NMR により $CDCl_3$ 中で分析した。CH₂StBu および CH₂SSAr に対応するピークは、反応が約 75% 完了したことを示唆し、スペクトルの $CDCl_3$ 中の純粋 NBSCl のものとの比較は、試薬が反応中に残っていなかったことを示唆した。そのため、追加の部分 (24.7 mg, 0.130 mmol, 0.31 equiv) を添加し、続いて 3 hr 後、追加の部分 (19.5 mg, 0.103 mmol, 0.25 equiv) を添加した。さらに 1 hr 後、混合物をリンスするために THF (2 mL) を用いて新しい試験管に移し、水 (1 mL) を添加した。

10

【0216】

化合物10. e_3 (82.4 mg, 1.08 mmol, 添加した 2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドの総量の 1.52 倍) を、以上で記載される透明な溶液化合物9 に添加した。混合物が熱くなって濁り、時間と共に沈殿が形成した。4.5 hr 後、メタノールを添加し、管を遠心分離した。沈殿は何とか沈み、管の底部 1 cm を占めた。透明な黄色上清をピペットを用いて除去した。メタノール (5 mL, 窒素で脱酸素化) を添加し、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。濃縮させると、最終メタノール洗浄により、4.4 mg の残渣のみが得られた。バルク固体残渣を、 P_4O_{10} 上、真空で乾燥させ、化合物10 (118.2 mg, 68%) を一塩酸塩として得た。

20

Anal. $C_{18}H_{38}NO_5S + HCl$ (417.03) に対して計算: C, 51.84; H, 9.43; N, 3.36。観察: C, 52.11; H, 9.12; N, 3.30。

【0217】

化合物11. 化合物6 (1.45 g, 2.97 mmol) を、AcOH (20 mL) に溶解し、NBSCl (0.56 g, 2.97 mmol) を一斉に添加した。反応物を 3 hr 間、または開始材料の消失および生成物の出現が TLC により観察されるまで攪拌させた [生成物 $R_f = 0.65$ 、開始材料 $R_f = 0.45$ 、1:1 EtOAc / ヘキサン]。反応物を高真空ラインで濃縮して乾燥させ、残渣を THF / H_2O (100 mL, 10:1) に溶解した。

30

【0218】

化合物12. Ph_3P (0.233 g, 8.91 mmol) を、化合物11を含む上記溶液に一斉に添加し、反応物を 3 hr 間、または開始材料が消失するまで攪拌させた。粗反応混合物を、高真空ライン上で濃縮して乾燥させ、化合物12を含む残渣を得た。

【0219】

化合物13. 化合物12を含む上記残渣を、DCM (50 mL) および TFA (10 mL) に溶解した。混合物を RT で 5 hr 攪拌し、濃縮して乾燥させた。残渣をシリカゲルを有するカラム上にロードし、純粋 DCM、続いて 5% MeOH、その後 10% MeOH を含む DCM を用いてクロマトグラフにかけ、最終生成物、化合物13を、粘着性白色固体 (0.45 g, 5 から 46% 収率) として得た。 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)

40

50

。 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}(\text{CDCl}_3)$ 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。

【0220】

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

この実施例で記載される合成アプローチは、さらにタンパク質または他の担体に複合体化され、免疫応答を惹起するために動物に投与される、より複雑な脂質構造に組み入れられるチオール化脂肪酸の調製を詳述する。アプローチは、従来の有機化学を使用する。この実施例で取られるアプローチを示すスキームを図2で提供し、下記合成の説明における化合物番号は、図2における番号が付された構造を示す。

10

【0221】

2つの合成を記載する。C-12チオール化脂肪酸のための第1の合成は市販の12-ドデカン酸、化合物14から開始する。その後、臭素をt-ブチルチオールで置換させ、保護されたC-12チオール化脂肪酸、化合物15を得る。C-18チオール化脂肪酸のための第2の合成は市販の9-プロモ-ノナノール(化合物16)から開始する。化合物16中のヒドロキシル基は、ジヒドロピラン(dihydropyran)基の添加により保護され、得られた化合物、17は、Grignard反応による臭素化材料の半分の活性化により二量体化し、続いて他の半分の添加した。ジヒドロピラン保護基の酸触媒除去後に生成された18-ヒドロキシオクタデカノール(化合物18)を、選択的にモノ-臭素化させ、化合物19を形成させる。この反応中、アルコール基のおよそ半分がメタンスルホン酸エステル形成により求核置換に対し活性化される。アルコールをその後、酸化し、18-プロモカルボン酸、化合物20を形成させ、これをその後、t-ブチルチオールで処理して、臭素を置換させ、保護された、チオール化C-18脂肪酸、化合物21を形成させる。

20

【0222】

保護されたチオール化脂肪酸は、それぞれ、t-ブチルチオエーテルは、複雑な脂質に組み入れることができ、保護基は、例えば、実施例1および3で記載される脱保護アプローチの1つを用いて除去することができる。得られた遊離チオールはその後、タンパク質または他の担体と複合体化させるために使用することができ、その後、動物にハプテンを接種することができる。

30

【0223】

A. C-12チオール化脂肪酸の合成

化合物15. t-ブチルチオール(12.93g、143mmol)を、乾燥シュレンクフラスコに添加し、シュレンク法を使用して、系を窒素下に置いた。脱ガス乾燥THF(250mL)を添加し、フラスコを氷浴中で冷却した。n-BuLi(55mLの2.5Mヘキサン溶液、137.5mmol)10minにわたり、シリンジにより徐々に添加した。混合物を0で、1時間撹拌させた。プロモ酸、化合物14(10g、36mmol)を固体として添加し、反応物を60で24hr加熱、撹拌した。反応を、2MHCl(250mL)で停止させ、エーテル(2x300mL)で抽出した。エーテル層を合わせ、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15(10g、99%収率)をベージュ粉末として得た。 $^1\text{H}\text{NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$ 1.25-1.35(br s, 12H), 1.32(s, 9H), 1.35-1.40(m, 2H), 1.50-1.60(m, 2H), 1.60-1.65(m, 2H), 2.35(t, 2H, J=7.5Hz), 2.52(t, 2H, J=7.5Hz)。HRMS(ES-TOF)中の主イオンをm/z 311.2020で観察した、M+Na⁺に対して計算311.2015。

40

【0224】

B. C-12チオール化脂肪酸の合成

化合物17. 乾燥シュレンクフラスコに、化合物16(50g、224.2mmol)を入れ、ナトリウム/ベンゾフェノンから蒸留した脱ガス乾燥THF(250mL)に溶

50

解した。フラスコを氷浴中で冷却し、その後PTSA (0.5 g、2.6 mmol) を添加した。脱ガス乾燥DHP (36 g、42.8 mmol) をその後、5 minにわたり徐々に添加した。混合物をRTまで温め、一晚攪拌させ、TLC (10:1 PE:EtOAc) によりプロモアルコールに対するスポットの完全消失により反応が終わったことが判断されるまでモニタした。TEA (1 g、10 mmol) をその後添加し、PTSAを反応停止させた。混合物をその後、冷重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、EtOAc (3 × 250 mL) で抽出した。有機層をその後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮して、68.2 gの粗生成物を得、これをカラムクロマトグラフィー (10:1 PE:EtOAc) により精製し、60 g (99% 収率) の無色油を得た。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 1.31 (br s, 6H), 1.41 - 1.44 (m, 2H), 1.51 - 1.62 (不明瞭な多重線, 6H), 1.69 - 1.74 (m, 1H), 1.855 (5重線, J = 7.6 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 7 Hz, 2H), 3.48 - 3.52 (m, 2H), 3.73 (dt, 2H, J = 6.5 Hz), 3.85 - 3.90 (m, 2H), 4.57 (t, 2H, J = 3 Hz)。

10

【0225】

化合物18. マグネシウム切削屑 (2.98 g、125 mmol) を火炎乾燥シュレンクフラスコに、ヨウ素の結晶と共に添加した。ナトリウムから蒸留した乾燥THF (200 mL) をその後添加し、シュレンク技術を用いて系を脱ガスした。化合物17 (30 g、97 mmol) をその後、マグネシウムに10 minにわたり徐々に添加し、溶液を65の油浴に入れ、一晚攪拌させた。反応は、アリコートのアセトンで反応停止し、10:1 PE:EtOAc混合物中でのRFの変化を観察することにより、TLCにより完了したと判断した。Grignard溶液をその後、カニューレにより、窒素下で追加の化合物17 (30 g、97 mmol) を含む三口フラスコに移した。得られた混合物を含むフラスコをその後、氷浴中で0まで冷却させ、Li₂CuCl₄の溶液 (1 M、3 mL) をその後、シリンジにより添加した。反応混合物は数分以内に非常に暗い青色に変化した。この混合物を一晚攪拌させた。次の朝、反応はTLC (10:1 PE:EtOAc) により完了したと判断し、飽和NH₄Cl溶液で反応停止させ、その後、エーテル (3 × 250 mL) 中に抽出させた。エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、粗生成物 (40 g) を得、これを、MeOHに溶解した。濃HCl (0.5 mL) をその後、添加し、これにより、白色エマルジョンが形成し、これを、3 hr攪拌させた。白色エマルジョンをその後、濾過し、16 g (58% 収率) の純粋ジオール、化合物18を得た。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) 1.26 (br s, 24H), 1.41 - 1.42 (m, 4H), 1.51 - 1.68 (m, 4H), 3.65 (t, 4H, J = 6.5 Hz)。

20

30

【0226】

化合物19. 対称ジオール、化合物18 (11 g、38.5 mmol) を、乾燥シュレンクフラスコに窒素下で添加し、その後、ナトリウムから蒸留した乾燥THF (700 mL) を添加した。系を脱ガスし、フラスコを氷浴に入れた。ジイソプロピルエチルアミン (6.82 mL、42.3 mmol) をシリンジを介して添加し、続いてMsCl (3.96 g、34.4 mmol) を徐々に添加し、混合物を1 hr攪拌させた。反応を、飽和NaH₂PO₄溶液 (300 mL) で停止させ、その後、EtOAc (3 × 300 mL) で抽出した。有機層を、その後合わせ、MgSO₄で乾燥させ、濃縮し、14 gのジオール、モノメシレート、およびジメシレートの混合物を得た。NMRは1:0.8のCH₂OH:CH₂OMSプロトン混合物を示した。混合物をその後、乾燥THF (500 mL) に溶解し、脱酸素化し、これに、LiBr (3.5 g、40.23 mmol) を添加した。この混合物を一晚還流させ、その時点で、反応を水 (150 mL) で停止させ、EtOAc (3 × 250 mL) で抽出した。有機層をその後、MgSO₄で乾燥させ、濃縮し、臭素化生成物の混合物を得、これらをその後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 (3.1 g、25% 収率) を白色粉末として得た。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 1.26 (br s, 26H), 1.38 - 1.4

40

50

6 (m, 2H), 1.55 (5重線, 2H, J = 7.5 Hz), 1.85 (5重線, 2H, J = 7.5 Hz), 3.403 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 3.66 (t, 2H, J = 6.8 Hz)。

【0227】

化合物20. 丸底フラスコに、化合物19 (2.01g、5.73mmol) および試薬グレードアセトン (150mL) に溶解した固体を入れた。同時に、Jones 試薬を、CrO₃ (2.25g、22mmol) をH₂SO₄ (4mL) 中に溶解し、その後、10mLの冷水を徐々に添加し、溶液を10min 攪拌させることにより調製した。冷Jones 試薬をその後、丸底フラスコに徐々に5min にわたり添加し、その後、溶液を1hr 攪拌した。得られたオレンジ色の溶液が、数分以内に緑色に変わった。混合物をその後、水 (150mL) で反応停止させ、2回エーテル (3 × 150mL) 中で抽出した。エーテル層をその後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮して、化合物20 (2.08g、98% 収率) を白色粉末として得た。¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) 1.27 (br s, 26H), 1.58 - 1.71 (m, 2H), 1.77 - 1.97 (m, 2H), 2.36 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 3.42 (t, 2H, J = 7 Hz)。

10

【0228】

化合物21. t-ブチルチオール (11.32g、125mmol) を、乾燥シュレンクフラスコに添加し、ナトリウムから蒸留した乾燥THF (450mL) 中に溶解した。溶液をこれに窒素を通気することにより脱酸素化し、その後、フラスコを氷浴に入れた。n-BuLiのヘキサン溶液 (70mL、1.6M) をその後、徐々にシリンジを介して10min にわたり添加した。この混合物を1hr 攪拌させ、その後、化合物20 (5.5g、16.2mmol) を添加し溶液を60 で一晚還流させた。次の朝、アリコート完成させ、NMRにより分析し、反応は完了したと判断した。反応を、HCl (200mL、2M) で停止させ、エーテル (3 × 250mL) で抽出した。エーテル層をその後、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、90% 収率)。¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) 1.26 (br s, 26H), 1.32 (br s, 9H), 1.48 - 1.70 (m, 4H), 2.35 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 2.52 (t, 2H, J = 7.3 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 200MHz) 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。

20

30

【0229】

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

この実施例で記載される合成アプローチによりチオール化LPAが調製される。LPA類似体はその後、担体、例えば、タンパク質担体にさらに複合体化させることができ、これはその後、動物に投与され、LPAに対する免疫原性応答を惹起することができる。このアプローチは有機化学および酵素反応の両方を使用し、そのための合成スキームを図3で提供する。下記合成の説明における化合物番号は、図3における番号が付された構造を示す。

40

【0230】

開始材料は実施例2における化合物15および鏡像異性的に純粋なグリセロホスホコリン (化合物22) であった。これらの2つの化学物質を合わせて、エステル化を促進するためにDCCを用いて、ジアセチル化生成物、化合物23を得た。1つの合成プロセス変形では、得られたジアシル化グリセロホスホコリンを、最初にホスホリパーゼ-A2で処理し、グリセロール骨格のsn-2位の脂肪酸を除去し、化合物24を生成させた。この物質をさらに別の酵素、ホスホリパーゼ-Dで処理し、コリンを除去し、化合物26を形成させた。別の合成プロセス変形では、ホスホリパーゼ-D処理はホスホリパーゼ-A2処理を促進し、化合物25を得、化合物25のホスホリパーゼ-Dによる処理はその後、化合物26を得る。どちらの変形も同じ生成物、ホスファチジン酸誘導体、化合物26に

50

至る。化合物 26 中の *t*-ブチル保護基をその後、最初にトリメチルジスルフィドトリフレートを使用して除去して化合物 27 を生成させ、続いてジスルフィド還元を用いて所望の LPA 誘導体、化合物 28 を生成させる。当業者が認識するように、実施例 1 で記載されるニトロベンジルスルフェニル反応シーケンスもまた、化合物 28 を生成するために使用することができる。

【0231】

化合物 23 . 火炎乾燥シュレンクフラスコに、チオエーテル酸、化合物 15 (10 g、35.8 mmol)、化合物 22 (グリセロホスホコリン - CdCl₂ 複合体、4.25 g、8.9 mmol)、DCC (7.32 g、35.8 mmol)、および DMAP (2.18 g、17.8 mmol) を添加し、その後、フラスコを排気し、窒素を充填した。最少量の脱ガス乾燥 DCM を添加し (100 mL)、濁った混合物を得た。フラスコをホイルで覆い、その後、TLC (シリカ、10 : 5 : 1 DCM : MeOH : 濃 NH₄OH) によるように完了するまで攪拌させた。化合物 16 の不溶性が TLC によるその消失のモニタリングを妨害したが、Rf 0.1 の生成物スポットの強度が増加していないと判断された時に反応を停止させた。これは典型的には 3 ~ 4 日を必要とし、場合によっては、さらなる DCC および DMAP の添加が必要となった。完了時に、反応混合物を濾過し、濾液を濃縮し、黄色油を得、これを、フラッシュクロマトグラフィーを使用し、以上で記載される溶媒系を用いて精製し、3.6 g (50% 収率) の、(CH₃)₃N -、- CH₂StBu および - CH₂COO - 部分に対するピークに対する積分を比較することにより推定される、化合物 23 およびモノアシル化生成物の 5 対 1 の比の混合物を含む透明なワックスを得た。

油の HRMS (ESI - TOF) による分析は、*m/z* 820.4972 で主イオンを生成させ、*M* + *Na*⁺ に対して計算 = C₄₀H₈₀NNaO₈PS₂⁺ 820.4960。

【0232】

A . 合成変異体 1 - ホスホリパーゼ - A2 処理

化合物 24 . 以上で記載される化合物 23 およびモノアセチル化生成物の混合物 (3.1 g、3.9 mmol) を、Et₂O (400 mL) およびメタノール (30 mL) に溶解した。ホウ酸塩緩衝液 (100 mL、pH 7.40、0.072 mM を含む CaCl₂) を添加し、続いてホスホリパーゼ - A2 (ハチ毒由来、130 ユニット、Sigma) を添加した。得られた混合物を 10 hr、攪拌させた。その時点で TLC (シリカ、MeOH : 水 4 : 1 前の溶媒系 10 : 5 : 1 DCM : MeOH : 濃 NH₄OH は無効であることが証明された) は、開始材料の不在 (Rf = 0.7) および新しいスポットの出現 (Rf = 0.2) を示した。有機および水層を分離し、水層をエーテル (2 × 250 mL) で洗浄した。生成物を水層から、DCM : MeOH の混合物 (2 : 1、2 × 50 mL) で抽出した。有機層をその後、回転蒸発により濃縮し、生成物を白色ワックスとして得 (1.9 g、86% 収率)、NMR は、これが、純粋生成物 (化合物 24) であることを示した。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 1.25 - 1.27 (br s, 12H), 1.31 (s, 9H), 1.35 - 1.45 (m, 2H), 1.52 - 1.60 (m, 4H), 2.31 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.51 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 3.28 (br s, 9H) 3.25 - 3.33 (br s, 2H), 3.78 - 3.86 (m, 1H), 3.88 - 3.96 (m, 2H), 4.04 - 4.10 (m, 2H), 4.26 - 4.34 (m, 2H)。HRMS (ESI - TOF) によるワックスの分析は、*m/z* 550.2936 で主イオンを生成させた、*M* + *Na*⁺ に対して計算 550.2943

(C₂₄H₅₀NNaO₇PS₂⁺)、および *m/z* 528.3115, *MH*⁺ に対して計算 528.3124 (C₂₄H₅₁NO₇PS₂⁺)。

Anal . C₂₄H₅₀NO₇PS + 2H₂O (563.73) に対して計算 : C, 51.13 ; H, 9.66 ; N, 2.48。観察 : C, 50.90 ; H, 9.37 ; N, 2.76。

【0233】

化合物 26 . リゾ化合物 24 (1 . 5 g , 2 . 7 m m o l) を、s e c - ブタノール (5 m L) および E t ₂ O (2 0 0 m L) の混合物に溶解し、得られた濁った混合物を、濁りが消失するまで超音波処理した。緩衝液 (2 0 0 m L , p H 5 . 8 , 0 . 2 M N a O A c , 0 . 0 8 M C a C l ₂) を添加し、続いてキャベツ抽出物 (サボイキャベツ (ホスホリパーゼ - D を含む) 由来の 8 0 m L の抽出物、9 m g のタンパク質 / m L を含む) を添加した。反応物を、1 日攪拌し、T L C (C 1 8 R P S i O ₂ , 5 : 1 A C N : 水) によりモニタし、開始材料および生成物の R f = それぞれ 0 . 3 および 0 . 0 5 であった。反応を完了するまで進めるために、必要に応じて、追加の部分のキャベツ抽出物 (5 0 m L) を添加し、反応物をさらに 1 日攪拌した。このプロセスを必要に応じてもう 2 回繰り返し、変換を完了させた。反応が完了した場合、混合物をロータリー・エバポレーター上で濃縮し、エーテルを除去し、その後、E D T A 溶液 (0 . 5 M , 2 5 m L) を添加し、生成物を M e O H : D C M の 5 : 4 混合物 (3 0 0 m L) 中に抽出した。有機層の濃縮、続いて残渣の D C M およびアセトンからの再結晶により、純粋生成物 (0 . 9 g , 7 5 % 収率) を得た。¹ H N M R (C D C l ₃ , 2 0 0 M H z) 1 . 2 5 - 1 . 2 7 (b r s , 1 2 H) , 1 . 3 3 (s , 9 H) , 1 . 5 2 - 1 . 6 0 (m , 4 H) , 2 . 3 4 (t , 2 H , J = 7 . 5 H z) , 2 . 5 2 (t , 2 H , J = 7 . 5 H z) , 3 . 6 - 3 . 8 (b r s , 1 H) , 3 . 8 5 - 3 . 9 7 (b r s , 2 H) , 4 . 0 2 - 4 . 1 8 (m , 2 H) 。

10

【 0 2 3 4 】

化合物 27 . 保護された試料 L P A 、化合物 26 (0 . 1 5 0 g , 0 . 3 4 m m o l) を、メタノール洗浄し、グローブボックス内のバイアルに添加した。これをその後、A c O H : T H F (1 : 1 , 1 0 m L) の混合物に懸濁させた。これは、1 h r の超音波処理後でさえ決して完全に溶解しなかった。固体 [M e ₂ S S M e] O T f (0 . 1 1 4 g , 0 . 4 4 m m o l) をその後、添加した。これを 1 8 h r , 攪拌させた。アリコートを取り出し、真空下で濃縮して乾燥させ、硫黄に最も近い C H ₂ ピークの ¹ H N M R シフトを観察するために残渣を C D ₃ O D に再溶解または懸濁させることにより、反応をモニタした。開始材料は 2 . 5 2 p p m のピークを有し、一方、この時点で形成された非対称ジスルフィドは、約 2 . 7 p p m のピークを有した。この材料 (化合物 27) はさらに単離し、あるいは特徴付けしなかった。

20

【 0 2 3 5 】

化合物 28 . 化合物 27 を含む混合物を水 (1 0 0 μ L) で処理し、すぐに、P M e ₃ (0 . 1 1 g , 1 . 4 m m o l) で処理した。3 h r 攪拌した後、溶媒を真空により除去し、不溶性白色固体を得た。メタノール (5 m L) を添加し、混合物を遠心分離し、母液をデカントした。真空濃縮で 1 2 0 m g (9 1 % 収率) の化合物 28 、ベージュ固体を得た。化合物 28 はチオール化 L P A ハプテンであり、これは、担体、例えば、アルブミンまたは K L H に、ジスルフィド結合形成を介してコンジュゲートすることができる。

30

化合物 28 のキャラクタリゼーション : ¹ H N M R (1 : 1 C D ₃ O D : C D ₃ C O ₂ D , 5 0 0 M H z) 1 . 2 5 - 1 . 3 5 (b r s , 1 2 H) , 1 . 3 2 - 1 . 4 (m , 2 H) , 1 . 5 5 - 1 . 6 (m , 4 H) , 2 . 3 4 (t , 2 H , J = 7) , 2 . 4 7 (t , 2 H , J = 8 . 5) , 3 . 8 9 - 3 . 9 7 (b r s , 2 H) , 3 . 9 8 - 4 . 1 5 (m , 2 H) , 4 . 2 1 (m , 1 H) 。メタノールに溶解した試料の負イオン E S は、m / z = 3 8 5 . 1 で主イオンを生成した。

40

【 0 2 3 6 】

実施例 4 : L P A に対するモノクローナル抗体
抗体産生

前の実施例で記載される誘導体化脂質、C - 1 2 チオ - L P A 類似体 (実施例 3 の化合物 28) を、標準化学架橋により I O A または S M C C のいずれかを架橋剤として使用して、類似体を反応性 S H 基を介してタンパク質担体 (K L H) に架橋することにより形成されるハプテンの主要成分として使用するアプローチを用い、L P A に対するモノクローナル抗体を生成させた。これを実施するため、マウスをチオ - L P A - K L H ハプテン (

50

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 類似体に対して免疫化した 8 0 匹のマウスのうち、 L P A に対し最も高い力価を示した 5 匹の動物 (E L I S A を使用して決定、この場合、ハプテンで使用したのと同じ L P A 類似体 (化合物 2 8) を、 S M C C を使用して、 B S A にコンジュゲートし、 E L I S A プレート上に載置した) を、ハイブリドーマ開発相に移動するために選択した。

【 0 2 3 7 】

これらの 5 匹のマウス由来の脾臓を摘出し、ハイブリドーマを標準技術により生成させた。簡単に言うと、 1 匹のマウスはハイブリドーマ細胞系 (5 0 4 A と指定) を生成した。 5 0 4 A シリーズの全ての蒔かれたハイブリドーマのうち、 6 6 が、前に記載したスクリーニング E L I S A により測定すると、陽性抗体産生を示した。

10

【 0 2 3 8 】

下記表 1 は、チオール化 L P A 類似体がヘテロ二官能性架橋剤を使用して K L H に架橋された L P A 類似ハプテンに応答する 2 匹のマウスの脾臓から作出したハイブリドーマの細胞上清中の抗体力価を示す。これらのデータは、抗 L P A 抗体がクロスリンカーまたはタンパク質担体に対しても反応しないことを証明する。重要なことには、データは、ハイブリドーマは、 S 1 P に対してではなく、 L P A に対する抗体を産生することを示す。

【表 1】

表 1 : L P A ハイブリドーマ

| マウス番号 | 3代 血中力価 でのOD、 1 : 3 1 2, 50 0 比 | 2 4 ウェル由来の上 清 | L P A 結合での OD、 1 : 2 0 比 | S 1 P 結合での OD 1 : 2 0 比 | S 1 P との 交差反応性 |
|-------|---|--|---|--|----------------------------|
| 1 | 1.242 | 1.A.63 1.A.65 | 1.197 1.545 | 0.231 0.176 | 低 無 |
| 2 | 0.709 | 2.B.7 2.B.63 2.B.83 2.B.104 2.B.1B7 2.B.3A6 | 2.357 2.302 2.712 2.57 2.387 2.227 | 0.302 0.229 0.175 0.164 0.163 0.134 | 低 低 無 無 無 無 |

20

30

* 2 4 ウェル上清由来の S 1 P との交差反応性 : 高 = [1 : 2 0] で O D > 1 . 0 - 2 . 0 ; 中 = [1 : 2 0] で O D 0 . 4 - 1 . 0 ; 低 = [1 : 2 0] で O D 0 . 4 - 0 . 2 ; 無 = [1 : 2 0] で O D < 0 . 2 O D 。

【 0 2 3 9 】

マウスにおける抗 L P A m A b の発生を E L I S A (1 2 : 0 および 1 8 : 1 L P A への直接結合ならびに競合 E L I S A) によりモニタした。著しい免疫学的応答が、免疫化マウスの少なくとも半分において観察され、最も高い抗体力価を有する 5 匹のマウスを選択して、脾臓融合後のハイブリドーマ細胞系開発を開始した。

40

【 0 2 4 0 】

これらの 5 つの融合物から生成させた 2 0 0 0 を超えるハイブリドーマ細胞系の初期スクリーニング後、合計 2 9 の抗 L P A 分泌ハイブリドーマ細胞系が、 1 8 : 1 L P A に対し高い結合を示した。これらのハイブリドーマ細胞系のうち、 2 4 をさらにサブクローニングし、 E L I S A アッセイのパネルで特徴付けを行った。陽性のままであった 2 4 のクローンから、 6 のハイブリドーマクローンをさらなるキャラクタリゼーションのために選

50

択した。それらの選択は、それらの優れた生化学的および生物学的特性に基づいた。マウスハイブリドーマ細胞系 504B3-6C2、504B7.1、504B58/3F8、504A63.1 および 504B3A6 (本明細書では、それぞれ、B3、B7、B58、A63、および B3A6 と呼ばれるクローンに対応する) は、2007年5月8日に、American Type Culture Collection (ATCC 特許寄託機関、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110) により特許寄託目的のために LPath Inc. の代理として受理され、それぞれ、寄託番号 PTA-8417、PTA-8420、PTA-8418、PTA-8419 および PTA-8416 が認められた。

【0241】

本明細書で言及される、全ての抗 LPA 抗体およびその一部はこれらの細胞系に由来した。

【0242】

直接結合動力学

6つの抗 LPA mAb (B3、B7、B58、A63、B3A6、D22) の 12:0 および 18:0 LPA (0.1 μ M) への結合を ELISA により測定した。EC₅₀ 値を滴定曲線から 6つの精製 mAb の濃度増加 (0~0.4 μ g/ml) を用いて計算した。EC₅₀ は最大結合の 50% を有する有効な抗体濃度を表す。Max は、最大結合 (OD₄₅₀ として表される) を示す。結果を表 2 に示す。

【表 2】

表 2—抗 LPA mAb の直接結合動力学

| | | B3 | B7 | B58 | D22 | A63 | B3A6 |
|----------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12:0 LPA | EC ₅₀ (nM) | 1.420 | 0.413 | 0.554 | 1.307 | 0.280 | 0.344 |
| | Max (OD ₄₅₀) | 1.809 | 1.395 | 1.352 | 0.449 | 1.269 | 1.316 |
| 18:0 LPA | EC ₅₀ (nM) | 1.067 | 0.274 | 0.245 | 0.176 | 0.298 | 0.469 |
| | Max (OD ₄₅₀) | 1.264 | 0.973 | 0.847 | 0.353 | 1.302 | 1.027 |

【0243】

動力学パラメータ k_a (会合速度定数)、 k_d (脱会合速度定数) および K_D (会合平衡定数) を 6つの有力候補に対して、BIAcore 3000 バイオセンサー装置を用いて決定した。この研究では、LPA をセンサ表面に固定化し、抗 LPA mAb を溶液中で表面を横切って流した。図示されるように、6つ全ての mAb が LPA と、0.34~3.8 μ M の範囲の同様の K_D 値および同様の動力学パラメータで結合した。

【0244】

抗 LPA マウス mAb は、LPA に対し高親和性を示す

LPA をセンサチップに 150 レゾナンスユニットに及ぶ密度で固定化した。各 mAb の希釈物を固定化 LPA 上に通過させ、動力学定数を会合/解離相の非線形回帰により得た。誤差は、2通りの実行での少なくとも 3つの決定を用いて標準偏差として与える。結果を表 3 に示す。見かけの親和性を $K_D = k_d / k_a$ により決定した。

$k_a = M^{-1} s^{-1}$ で表した会合速度定数 $k_d = s^{-1}$ で表した解離速度定数

【表 3】

表3－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 | $4.4 \pm 1.0 \times 10^5$ | 1×10^{-6} | 2.3 ± 0.5 |
| B3 | $7.0 \pm 1.5 \times 10^5$ | 1×10^{-6} | 1.4 ± 0.3 |
| B7 | $6.2 \pm 0.1 \times 10^5$ | 1×10^{-6} | 1.6 ± 0.1 |
| D22 | $3.0 \pm 0.9 \times 10^4$ | 1×10^{-6} | 33 ± 10 |
| B3A6 | $1.2 \pm 0.9 \times 10^6$ | $1.9 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ | 16 ± 1.2 |

10

【0245】

6つの抗LPA mAbの特異性プロファイル

20

LPAの多くのアイソフォームが生物活性であると同定されており、mAbが、それらの全てをある程度、治療的に関連すると認識することが好ましい。抗LPA mAbの特異性を競合アッセイを用いて評価したが、この場合、競合脂質を、抗体-固定化脂質混合物に添加した。

【0246】

競合ELISAアッセイを、抗LPA mAbを用いて実施し、それらの特異性を評価した。チオール化された18:1 LPA - BSAコンジュゲートを、ELISAプレート上に捕捉させた。各競合脂質(最大10 μ M)をBSA(1 mg/ml) - PBS中で連続希釈し、その後、mAb(3 nM)と共にインキュベートした。混合物をその後、LPAコートウェルに移し、結合した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})に対して規格化し、パーセント阻害として表す。アッセイを3通りで実施した。 IC_{50} : 最大半量阻害濃度; MI: 最大阻害(阻害剤がない場合の結合%); : 阻害が弱いため推定せず。高い阻害結果は抗体による競合脂質の認識を示す。表4に示されるように、全ての抗LPA mAbは、異なるLPAアイソフォームを認識した。

30

【表 4】

表4. 抗LPA mAbの特異性プロファイル。

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

40

【0247】

50

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 間で識別することができた。最終薬物開発のための望ましい E C ₅₀ ランク順は、高い特異性と共に、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 である。抗 L P A m A b の特異性を、それらの L P A 関連生体脂質、例えばジステアロイル - 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 - リン酸への結合に対して評価した。抗体のいずれも、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 への交差反応性を示さなかった。

【0248】

実施例 5 : マウス抗 L P A 抗体のクローニング - 概要

L P A に対するキメラ抗体を、ヒト I g G 1 免疫グロブリンの F c 領域を有するハイブリドーマ由来の 3 つのマウス抗体の 1 つの活性 L P A 結合領域を含む可変ドメイン (F v) を使用して生成させた。F c 領域はヒト抗体の C H 1、C H 2、および C H 3 ドメインを含んだ。特定の方法に限定されないが、キメラ抗体はまたヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、または I g M の F c 領域から生成させることができた。当業者であれば認識するであろうように、「ヒト化」抗体は、マウス抗 L P A m A b の相補性決定領域 (C D R、例えば、C D R 1 - 4) をヒト抗体フレームワーク領域 (例として、F r 1、F r 4、など) 例えば、I g G 1 のフレームワーク領域と共にグラフトすることにより生成させることができる。

【0249】

L P A に対するマウス m A b をクローニングするための全体の戦略は、各抗体由来の軽鎖 (V L) および重鎖 (V H) 両方のマウス可変ドメインをクローニングすることから構成された。遺伝子のコンセンサス配列は、定常部断片が アイソタイプと一致すること、ならびに軽鎖が、アイソタイプと一致することを示す。マウス可変ドメインをヒト抗体軽鎖の定常ドメイン (C L) およびヒト重鎖の定常ドメイン (C H 1、C H 2、および C H 3) と一緒にクローニングさせ、キメラ抗体コンストラクトが得られた。

【0250】

軽鎖および重鎖の可変ドメインを、P C R により増幅させた。増幅させた断片を、中間体ベクター (p T O P O) にクローニングした。配列の確認後、可変ドメインをその後、それらの個々の定常ドメインと組み合わせた。軽鎖の可変ドメインを p C O N 2 にクローニングし、および重鎖の可変ドメインを、p C O N 1 f にクローニングした。クローニング手順は、シグナルペプチド配列、翻訳開始を増強するための A T G 開始コドンに先行するコンセンサス K o z a k 配列、および 5 ' 切断部位、H i n d I I I を含む上流プライマーの設計を含んだ。下流プライマーは、重鎖のための 3 ' 切断部位 A p a l および軽鎖のための B s i W l を含むように設計された。

【0251】

可変ドメインを含むベクターをそれらの個々の定常ドメインと合わせて、哺乳類細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後 3 日に、上清を収集し、E L I S A により L P A への結合に対して分析した。抗 L P A 抗体可変ドメインのクローニング、発現およびキャラクタリゼーションのための詳細な方法は米国特許出願公開第 : 2 0 0 9 0 1 3 6 4 8 3 号 (本発明と共に所有され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる) で示される。

【0252】

キメラ抗体に対する結合特性を表 5 に示す。「H C」および「L C」は、それぞれ、重鎖および軽鎖のアイデンティティを示す。

10

20

30

40

【表 5】

表5：キメラ抗LPA抗体B3、B7、およびB58の結合特性。

| | HC | x | LC | 力価 (ug/ml) | EC50 (ng/ml) | Max OD |
|----------|-----|---|-----|---------------|-----------------|--------|
| <u>1</u> | B7 | | B7 | 3.54 | 43.24 | 2.237 |
| <u>2</u> | B7 | | B58 | 1.84 | 25.79 | 1.998 |
| <u>3</u> | B7 | | B3 | 2.58 | 24.44 | 2.234 |
| <u>4</u> | B58 | | B7 | 3.80 | 38.99 | 2.099 |
| <u>5</u> | B58 | | B58 | 3.42 | 41.3 | 2.531 |
| <u>6</u> | B58 | | B3 | 2.87 | 29.7 | 2.399 |
| <u>7</u> | B3 | | B7 | 4.18 | 49.84 | 2.339 |
| <u>8</u> | B3 | | B58 | 0.80 | 20.27 | 2.282 |
| <u>9</u> | B3 | | B3 | 4.65 | 42.53 | 2.402 |

10

【0253】

表5から、異なるハイブリドーマ（すなわち、異なるクローン）由来の軽鎖および重鎖をキメラ分子に組み換えることによりLPAへの抗体結合を最適化することができることがわかる。

20

【0254】

実施例6 Lpathのリードマウス抗体、Lpathomab（商標）（LT3000）- 概要

マウス抗体クローンB7リード化合物を選択し、LT3000としても知られているLpathomab（商標）と改名した。以上で記載される通り、このマウス抗LPA mAbはタンパク質-誘導体化LPA免疫原を用いたマウスの免疫化後のハイブリドーマ細胞系に由来した。有益な特性を有するハイブリドーマ細胞系を同定し、標準ハイブリドーマ培養技術を使用してモノクローナル抗体を産生させるために使用した。

30

【0255】

出願人は包括的な一連の前臨床効力研究を実施し、抗LPA抗体に基づくアプローチの潜在的治療的有用性を確認した。細胞外LPAの抗体中和（例えば、有効濃度の低減）は、ヒトにおける疾患進行の著しい減少をもたらすことができると考えられる。癌では、LPA中和により、腫瘍増殖および腫瘍成長をサポートに必要な脈管構造の成長の阻害が得られ得る。さらに、最近の研究は、多くの血管新生阻害剤はまた、抗侵襲性および抗転移性化合物として作用することができ、これはまた、最初の腫瘍から離れた部位への広がりを緩和することができることを示唆する。線維症では、LPA中和により、組織損傷後の異常な創傷治癒応答と関連する炎症および線維症の低減が得られ得る。よって、Lpathomab（商標）は下記を含むいくつかの作用メカニズムを有し得る：

40

- ・腫瘍細胞成長、移動および化学療法薬に対する感受性への直接効果
- ・抗血管新生効果を介する腫瘍への間接効果
- ・相乗的血管新生促進成長因子の放出および中和を防止することによる腫瘍への追加の間接効果
- ・線維芽細胞の増殖、移動、および筋線維芽細胞表現型へのび形質転換ならびに筋線維芽細胞によるコラーゲン産生への直接効果
- ・相乗的血管新生促進性、炎症促進性および線維化促進性成長因子の発現および放出を防止することによる組織線維症への間接効果。

【0256】

実施例7：Lpathomab / LT3000の生物物理学的特性

50

L p a t h o m a b / L T 3 0 0 0 は、シグナル伝達脂質 L P A に対し高親和性を有し (B i a C o r e アッセイにおける表面プラズモン共鳴、および直接結合 E L I S A アッセイにおいて証明されるように 1 - 5 0 p M の K_D) ; 加えて、L T 3 0 0 0 は、L P A に対する高い特異性を証明しており、20 を超える生理活性脂質を含む 100 を超える異なる生理活性脂質およびタンパク質 (そのいくつかは L P A に構造的に類似する) に対し結合親和性を示していない。マウス抗体は 2 つの同一の軽鎖および 2 つの同一の重鎖からなり、155.5 k D a の総分子量を有する全長 I g G 1 k アイソタイプ抗体である。生物物理学的特性を表 6 にまとめて示す。

【表 6】

表 6 : L p a t h o m a b (L T 3 0 0 0) の一般特性

10

| | |
|-------------------|---|
| アイデンティティ | LT3000 |
| 抗体アイソタイプ | Murine IgG1k |
| 特異性 | リゾホスファチジン酸 (LPA) |
| 分子量 | 155.5 kDa |
| 1 m g / m l の O D | 1.35 (溶液、280 n m) |
| K_D | 1-50 pM |
| 見かけの T_m | 67°C、pH7.4 |
| 外観 | 1 × P B S 緩衝液 (6.6 m M のリン酸塩、15.4 m M の塩化ナトリウム、pH7.4) に溶解した場合透明 |
| 溶解度 | 6.6 m M リン酸塩、15.4 m M 塩化ナトリウム、pH7.4 中で > 40 m g / m L |

20

【0257】

L p a t h o m a b はまた、予備細胞アッセイ、例えばサイトカイン放出、移動および侵襲において生物活性を示しており ; これらを、L P A アイソフォームおよび他の生理活性脂質に対する L T 3 0 0 0 の特異性、ならびに L T 3 0 0 0 のインビトロ生物学的効果を示すデータと共に表 7 にまとめて示す。

【0258】

30

【表 7】

| 表 7. LT3000 (Lpathomab, B7抗体) | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| A. 競合脂質 | 14:0 LPA | 16:0 LPA | 18:1 LPA | 18:2 LPA | 20:4 LPA |
| IC ₅₀ (mM) | 0.105 | 0.483 | >2.0 | 1.487 | 0.161 |
| MI (%) | 61.3 | 62.9 | 100 | 100 | 67 |
| B. 競合脂質 | LPC | S1P | C1P | Cer | DSPA |
| MI (%) | 0 | 2.7 | 1.0 | 1 | 0 |
| C. 細胞アッセイ | LPA | | %阻害 | | |
| | アイソフォーム | | (LPAを100とする) | | |
| 移動 | 18:1 | | | 35* | |
| 侵襲 | 14:0 | | | 95* | |
| IL-8 放出 | 18:1 | | | 20 | |
| IL-6 放出 | 18:1 | | | 23* | |
| | | | | %誘導 | |
| | | | | (LPA+タキソールを100とする) | |
| アポトーシス | 18:1 | | | 79 | |

A. 競合ELISAアッセイをLpathomabおよび5つのLPAアイソフォームを用いて実施した。18:1 LPAをELISAプレート上に捕捉させた。各競合脂質(最大10 mM)をBSA/PBS中で連続希釈し、3 nM Lpathomabと共にインキュベートした。混合物をその後、LPAコートウェルに移し、結合した抗体の量を測定した。B. 競合ELISAを実施しLpathomabの特異性を評価した。データを最大シグナル(A₄₅₀)に対して規格化し、パーセント阻害として表した(n=3)。IC₅₀: 最大半量阻害濃度; MI %: 最大阻害(阻害剤がない場合の結合の%)。C. 移動アッセイ: Lpathomab (150 mg/ml)は、1 mM LPA (n=3)により誘発されたSKOV3細胞移動を低減させた; 侵襲アッセイ: Lpathomab (15 mg/ml)は2 mM LPA (n=2)により誘発されたSKOV3細胞侵襲をブロックした; ヒトIL-8およびIL-6のサイトカイン放出: Lpathomab (それぞれ、300-600 mg/ml)は、SKOV3条件培地における1 mM LPA誘発血管新生促進および転移性IL-8およびIL-6の放出を低減させた(n=3)。アポトーシス: SKOV3細胞を1 mMタキソールで処理した; 1 mM LPAは、タキソール誘発カスパーゼ3活性化をブロックした。Lpathomab (150 mg/ml)への添加はアポトーシスからのLPA誘発保護をブロックした(n=1)。データ分析: スチューデントt検定。*はp<0.05を意味する。

10

20

30

【0259】

Lpathomab / LT3000のLPAへの強力な特異的結合は、癌、血管新生および線維化関連障害に対する潜在的治療効果を有する細胞外LPAの有効性を低減させる。

【0260】

第2のマウス抗LPA抗体、B3、もまた表8に示される結合分析に供した。

【表 8】

| 表 8. B3 抗体の生化学特性 | | |
|--|------------|-----------|
| A. BIACORE | 高密度表面 | 低密度表面 |
| 脂質チップ | 12:0 LPA | 18:0 LPA |
| K _D (pM), 部位 1、(部位 2) | 61(32) | 1.6 (0.3) |
| B. 競合脂質カクテル (C ₁₆ :C ₁₈ :C _{18:1} :C _{18:2} :C _{20:4} , 比 3:2:5:11:2) | (μM) | |
| IC ₅₀ | 0.263 | |
| C. 中和アッセイ | | |
| B3抗体 (nmol) | LPA (nmol) | |
| 0 | 0.16 | |
| 0.5 | 0.0428 | |
| 1 | 0.0148 | |
| 2 | 検出下限未満 | |
| <p>A. B3 抗体に対する B i a c o r e 分析. LPA の 12 : 0 および 18 : 0 アイソフォームを、GLC センサチップ上に固定した; B3 の溶液を、チップ上に通過させ、センサーグラム (s e n s o g r a m) を 12 : 0 および 18 : 0 LPA チップの両方に対して得た。得られたセンサーグラムは、一価および二価抗体結合能力による抗体の複雑な結合動力学を示した。K_D 値を LPA 12 および LPA 18 の両方に対しざっと計算した。B. 競合 ELISA アッセイを B3 および LPA アイソフォームのカクテル (3 : 2 : 5 : 11 : 2 の比の C₁₆ : C₁₈ : C_{18:1} : C_{18:2} : C_{20:4}) を用いて実施した。競合物 / カクテル脂質 (最大 10 μ M) を BSA / PBS 中で連続希釈し、0.5 μ g / m l B3 と共にインキュベートした。混合物をその後、LPA コートウェルプレートに移し、結合した抗体の量を測定した。データを最大シグナル (A₄₅₀) に対して規格化し、IC₅₀ (最大半量阻害濃度) として表した。C. 中和アッセイ: B3 の濃度が増加すると、ゲルにコンジュゲートされた。マウス血漿をその後活性化させ、LPA の内在性レベルを増加させた。活性化された血漿試料をその後、増加した濃度の抗体-ゲル複合体と共にインキュベートした。抗体に複合体化しなかった LPA の残りをその後、ELISA により決定した。LPA は抗体濃度依存様式で B3 により吸収された。</p> | | |

10

20

【0261】

L p a t h o m a b / L T 3 0 0 0 / B 7 および B 3 を用いて実施した、選択研究は L p a t h の特許出願、例えば、米国特許出願公開：20090136483号、20080145360号、20100034814号および20110076269号(全て本発明と共に所有され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される。簡単に言うと、癌および血管新生モデルでは、B7/LT3000は下記を証明した：

30

【0262】

インビトロモデルでは：
OVCAR3 卵巣癌細胞の増殖の低減；
インビトロでの、C a k i - 1 からの I L - 8、S K O V 3 (卵巣) 腫瘍細胞からの I L - 8 および I L - 6 の L P A 誘発放出の中和；
S K O V 3 腫瘍細胞をアポトーシスから保護する際の L P A 効果の緩和 (標準化学療法薬と共に使用された場合に増強された効力を示唆する)；
L P A 誘発腫瘍細胞移動および化学療法薬からの侵襲の阻害。

40

【0263】

インビボモデルでは：
ヌードマウスに移植した同所性、腹腔内および皮下ヒト腫瘍の転移および進行の阻害；
皮下 S K O V 3 異種移植片モデルおよび前立腺 D U 1 4 5 癌細胞における腫瘍関連血管新生の低減；
マウスマトリゲルプラグアッセイにおける b F G F および V E G F 誘発血管新生の中和；

50

ならびに

目のブルッフ膜のレーザー誘起損傷のモデルにおける脈絡膜血管新生の低減。

【0264】

線維症モデルでは、LT3000はマウスにおける肺線維症のプレオマイシンモデルに従う炎症および線維症を低減させ、この広く受け入れられているモデルで予防的にかつ介入的に有効であった。診断状況では、患者試料において、LPAレベルを1つ以上の線維形成性マーカーのレベル（例えば、サイトカインまたは成長因子）と関連させることにより線維症を検出するための非侵襲的方法は、臨床設定において線維症をモニタリングするのに有用であると考えられる。プレオマイシン肺損傷を有するマウスは、抗LPA抗体Lp athomab (LT3000)による治療後、IL-13およびTIMP-1レベル

10

【0265】

これらの知見は、損傷後の細胞外マトリクス産生および組織リモデリングにおける生理活性脂質LPAの著明な役割を証明する。さらに、これらの研究は、LPAを、多くの疾患および臓器系と関連する線維症の治療における新規臨床標的として同定する。LPAに対するモノクローナル抗体は線維症の治療に対し大きな臨床的可能性を有すると考えられる。

【0266】

実施例8：Lp athomab (LT3000)のヒト化
LT3000のヒト化

20

マウス抗LPAモノクローナル抗体、LT3000 (Lp athomab)の可変ドメインを、マウスCDRをヒトフレームワーク領域 (FR) にグラフトすることによりヒト化した。Lefranc, M. P., (2003). *Nucleic Acids Res*, 31 : 307-10; Martin, A. C. and J. M. Thornton, (1996) *J Mol Biol*, 1996. 263 : 800-15; Morea, V., A. M. Lesk, and A. Tramontano (2000) *Methods*, 20 : 267-79; Foot e, J. and G. Winter, (1992) *J Mol Biol*, 224 : 487-99; Chothia, C, et al., (1985). *J Mol Biol*, 186 : 651-63。ヒト化プロセスの詳細は米国特許出願公開20090136483号に記載される。

30

【0267】

好適なアクセプターヒトFR配列は、IMGTおよびKab atデータベースから、LT3000に対する相同性に基つき、配列アライメントおよび分析プログラム (SRV7.6) を用いて選択した。Lefranc, M. P. (2003) *Nucl. A cids Res*. 31 : 307-310; Kabat, E. A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, NIH National Techn. Inform. Service, pp. 1-3242。FR、バーニア、カノニカルおよびVH-VLインターフェース残基 (VCI) で高い同一性を有する配列を最初に選択した。このサブセットから、最も非保存的なVCI置換、異常プロリンまたはシステイン残基および体細胞変異を有する配列を排除した。このように、AJ002773をLT3000重鎖可変ドメインのヒト化バージョンの基礎とするヒトフレームワークとして選択し、このように、DQ187679をLT3000軽鎖可変ドメインのヒト化バージョンの基礎とするヒトフレームワークとして選択した。

40

【0268】

ヒト化VLおよびVH配列を含む3次元 (3D) モデルを、CDRを形成する残基に隣接したFR残基を同定するために構築した。これらのFR残基は潜在的にCDRループ構造および抗体の抗原に対する高い親和性および特異性を保持する能力に影響する。この分

50

析に基づき、A J 0 0 2 7 7 3 中の 6 残基および D Q 1 8 7 6 7 9 中の 3 残基が同定され、L T 3 0 0 0 とは著しく異なると考えられ、マウス配列への変異復帰に対し考慮された。

【0269】

哺乳類細胞における抗体発現および産生

マウス抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングした。ヒトフレームワーク配列およびマウス CDR を含む合成遺伝子を合成オリゴヌクレオチドから構築し、pCR4 Blunt-TOPO に平滑末端制限部位を用いてクローニングした。配列決定し、100% 配列一致を観察した後、重および軽鎖をクローニングし、全長 IgG1 キメラ抗体として、重鎖遺伝子のために pConGamma ベクターを用いて、軽鎖遺伝子のために pConKappa ベクターを用いて発現させた (Lonza Biologies, Portsmouth NH)。これらの遺伝子の各々のための発現カセットは、プロモーター、コザック配列、およびターミネーターを含んだ。これらのプラスミドを大腸菌 (One Shot Top10 化学的コンピテント大腸菌細胞、Invitrogen, Cat No. C4040-10) に形質転換させ、LB 培地中で増殖させ、グリセロール中で貯蔵した。大規模プラスミド DNA を製造者により説明されるように調製した (Qiagen、エンドトキシンを含まない MAXI PREP (商標) キット、Cat. No. 12362)。プラスミドを、ヒト胚性腎臓細胞系 293F に 293 フェクチン (fectin) を使用して、培養のための 293F-FreeStyle Media を使用してトランスフェクトした。トランスフェクトされた培養物は、およそ 2-12 mg/L のヒト化抗体を発現した。

10

20

【0270】

抗体精製

モノクローナル抗体を培養上清から、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。0.5 ml の ProSep-vA-Ultra 樹脂を含むアリコート (Millipore, Cat. No. 115115827) を重力流使い捨てカラム (Pierce, Cat. No. 29924) に添加し、10-15 ml の結合緩衝液 (Pierce, Cat. No. 21001) と平衡化させた。一時的に発現されたヒト化抗体を含む培養上清を結合緩衝液で 1:1 希釈し、樹脂上に通過させた。カラム上に保持された抗体を 15 ml の結合緩衝液で洗浄し、低 pH 溶出緩衝液 (Pierce, Cat. No. 21004) で溶出し、100 μl の結合緩衝液を含む 1 ml 画分で回収し、pH を中和した。吸光度 (280 nm) > 0.1 を有する画分を 1 リットルの PBS 緩衝液 (Cellgro, Cat. No. 021-030) に対して一晚透析した (Slide-A-Lyzer Cassettes, 3500 MWCO, Pierce, Cat. No. 66382)。透析した試料を centricon-YM50 (Amicon, Cat. No. 4225) 濃縮器を用いて濃縮し、0.22 μM 酢酸セルロース膜 (Costar, Cat. No. 8160) に通して濾過した。各調製物の純度を、SDS-PAGE を用いて評価した。

30

【0271】

SDS-PAGE 電気泳動

各抗体試料を 2-メルカプトエタノールを有する (還元)、または有しない (非還元) ゲルローディング緩衝液 (Sigma, Cat. No. M-3148) を用いて 0.5 μg/μl に希釈した。還元試料を 95 °C で 5 min 加熱し、一方、非還元試料を室温でインキュベートした。4-12% 勾配ゲル (Invitrogen, Cat. No. NP0322) を、2 μg の抗体/レーンと共にロードし、170 ボルトで 1 時間、室温で 1X NuPAGE MOPS SDS 泳動用緩衝液 (Invitrogen, Cat. No. NP0001) 中で移動させた。電気泳動後、抗体を、ゲルを 50% メタノール、10% 酢酸中に約 10 min 浸漬させることにより固定した。ゲルをその後、3 × 200 ml の蒸留水で洗浄した。最後に、ゲルを一晚 Gel Code (登録商標) Blue Stain (Pierce, Cat. No. 2490) 中で染色し、水で脱染することによ

40

50

りバンドを可視化した。

【0272】

定量ELISA

抗体力価を定量ELISAを用いて決定した。ヤギ-抗ヒトIgG-Fc抗体(Bethyl A80-104A、1mg/ml)を炭酸塩緩衝液で(100mM NaHCO₃、33.6mM Na₂CO₃、pH 9.5)1:100希釈した。プレートを、100μl/ウェルのコーティング溶液(チオール化LPA-BSAコンジュゲート)を37で1時間インキュベートすることによりコートした。プレートを4X、TBS-T(50mM Tris、0.14M NaCl、0.05% tween-20、pH 8.0)で洗浄し、200μl/ウェルTBS/BSA(50mM Tris、0.14M NaCl、1% BSA、pH 8.0)で1時間、37でブロックした。試料および標準を非結合プレート上で2通り、実行するのに十分な量で調製した。標準を、ヒト標準血清(Bethyl RS10-110; 4mg/ml)をTBS-T/BSA(50mM Tris、0.14M NaCl、1% BSA、0.05% Tween-20、pH 8.0)中で下記濃度まで希釈することにより調製した: 500ng/ml、250ng/ml、125ng/ml、62.5ng/ml、31.25ng/ml、15.625ng/ml、7.8125ng/ml、および0.0ng/ml。試料を、試料の光学密度(OD)が標準の範囲にあるように、TBS-T/BSA中で適切な希釈を得ることにより調製し; 最も直線的な範囲は125ng/ml 15.625ng/mlであった。プレートを4X、TBS-Tで洗浄した後、100μlの標準/試料調製物を、各ウェルに添加し、37で1時間インキュベートした。次に、プレートを4X、TBS-Tで洗浄し、1時間、37で、TBS-T/BSA中で1:150,000希釈した、100μl/ウェルのHRP-ヤギ抗ヒトIgG抗体(Bethyl A80-104P、1mg/ml)と共にインキュベートした。プレートを4X、TBS-Tで洗浄し、4まで冷却した100μl/ウェルのTMB基質を用いて発色させた。7分後、反応を、1M H₂SO₄(100μl/ウェル)で停止させた。ODを450nmで測定し、データを、Graphpad Prismソフトウェアを用いて解析した。検量線を4つのパラメータ式を用いて適合させ、試料中のヒトIgG量を計算するために使用した。

10

20

【0273】

直接結合ELISA

ヒト化抗体のLPA結合親和性を、直接結合ELISAアッセイを用いて決定した。マイクロタイターELISAプレート(Costar)を一晩、0.1M炭酸塩緩衝液(pH 9.5)中で希釈した、Imjectマリエミド(malieimide)活性化ウシ血清アルブミン(BSA)(Pierce Co.)にコンジュゲートされたチオール化C12:0LPA1.0μg/mlで、37にて1h、コートした。プレートを、PBS(137mM NaCl、2.68mM KCl、10.1mM Na₂HPO₄、1.76mM KH₂PO₄; pH 7.4)で洗浄し、PBS/BSA/tween-20で、1hr室温でまたは一晩4でブロックした。最初のインキュベーション(室温で1hr)では、希釈系列の抗LPA抗体(0.4μg/ml、0.2μg/ml、0.1μg/ml、0.05μg/ml、0.0125μg/ml、および0μg/ml)を、マイクロプレートに添加した(100ml/ウェル)。プレートを洗浄し、100μl/ウェルの、1:20,000希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ヒト(H+L)(Jackson, cat # 109-035-003)と共に1hr、室温でインキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼをテトラメチルベンジジン基質(Sigma, cat No T0440)を用いて発色させ、1M H₂SO₄を添加することにより停止させた。光学密度(OD)を450nmでThermo Multiskan EXを用いて測定した。EC₅₀(最大半量結合濃度)を、用量-応答曲線の4つのパラメータ式による最小二乗適合により、Graphpad Prismソフトウェアを用いて決定した。

30

40

【0274】

LPA競合ELISA

50

ヒト化抗体の特異性を競合ELISAにより決定した。チオール化C18:0LPA-BSAコンジュゲートコーティング材料を炭酸塩緩衝液(100mM NaHCO₃、33.6mM Na₂CO₃、pH 9.5)で0.33μg/mlまで希釈した。プレートを、100μl/ウェルのコーティング溶液でコートし、37で1時間インキュベートした。プレートを4回、PBS(100mM Na₂HPO₄、20mM KH₂PO₄、27mM KCl、1.37mM NaCl、pH 7.4)で洗浄し、150μl/ウェルのPBS、1%BSA、0.1% tween-20で1h、室温でブロックした。ヒト化、抗LPA抗体を、脂質競合物(14:0LPA(Avanti, Cat. No 857120)、18:1LPA(Avanti, Cat. No 857130)、18:1LPC(Avanti, Cat. No 845875)、cLPA(Avanti, Cat. No 857328)、18:1PA(Avanti, Cat. No 840875)、PC(Avanti, Cat. No 850454)に対し、5μM、2.5μM、1.25μM、0.625μM、および0.0μMで試験した。抗体をPBS、0.1% tween-20中で0.5μg/mlまで希釈し、脂質試料と、1:3の抗体対試料比で、非結合プレート上で合わせた。プレートを4回、PBSで洗浄し、1時間、室温で100μl/ウェルの一次抗体/脂質複合体と共にインキュベートした。次に、プレートを4回、PBSで洗浄し、1h、室温で、100μl/ウェルの、PBS、1%BSA、0.1% tween-20中で1:20,000希釈したHRP-コンジュゲートヤギ抗ヒト抗体と共にインキュベートした。再び、プレートを4回、PBSで洗浄し、4でTMB基質(100μl/ウェル)を用いて発色させた。8分後、反応を、100μl/ウェルの1M H₂SO₄で停止させた。光学密度(OD)を450nmで、Thermo Multiskan EXを用いて測定した。生データを分析のためにGraphPadソフトウェアに伝達させた。

10

20

30

40

50

【0275】

熱安定性

ヒト化抗体の熱安定性を、加熱後のそれらのLPA結合親和性(EC50)を、直接結合ELISAを用いて測定することにより研究した。PBS(Cellgo, Cat. No 021-040)に溶解した抗体を25μg/mlまで希釈し、60、65、70、75および80で10minインキュベートした。温度を上昇させる前に、10μlの各試料を除去し、90μlのPBSで希釈し、氷上で保存した。試料をその後、短時間ボルテックスし、不溶性材料を遠心分離により、1min間、13,000rpmで除去した。上清の結合活性を直接LPA結合ELISAを用いて決定し、対照(熱処理なしの同じ試料から構成された)と比較した。

【0276】

表面プラズモン共鳴

全ての結合データをProtein光学バイオセンサー(BioRad, Hercules CA)上で収集した。12:0LPA-チオールおよび18:0LPA-チオールをマレイミド修飾GLCセンサチップ(Cat. No 176-5011)にカップリングさせた。最初に、GLCチップを7分、スルホ-NHS/EDCの等量混合物で活性化させ、続いてエチルジアミンによる7分のブロックング工程を実施した。次にスルホ-MBS(Pierce Co., cat # 22312)を、HBS泳動用緩衝液(10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% tween-20、pH 7.4)中0.5mMの濃度で表面上を通過させた。LPA-チオールをHBS泳動用緩衝液中で10、1および0.1μMの濃度まで希釈し、7分間注入し、3つの異なる密度のLPA表面(-100、-300および-1400RU)を生成させた。次に、ヒト化抗体に対する結合データを最も高い濃度として25nMから開始して3倍希釈系列を用いて収集した(最初のストックはそれぞれ、1対100希釈された)。表面を10秒パルスの100mM HClで再生させた。全てのデータを25で収集した。対照は基準表面ならびにブランク注入を使用して処理した。各表面からの応答データは、様々な程度の多価結合により引き起こされる可能性のある複雑な結合挙動を示した。結合定数の推定値を抽出す

るために、様々な抗体濃度からのデータを、1 - 部位および2 - 部位モデルを用いてグローバルに適合させた。これにより、二価（部位1）および一価部位（部位2）の親和性の推定値が得られた。

【0277】

LPAモル結合能

LPA:mAbのモル比を、置換アッセイを用いて決定した。ハウケイ酸塩管（Fisherbrand、Cat. No 14-961-26）を、5ナノモルのビオチン化LPA（50 μ gの脂質（Echelon Biosciences、Cat. No L-012B、Lot No F-66-136を705 μ lの1:1クロロホルム:メタノール中に懸濁させ、100 μ M溶液を得た）で乾燥室素ストリームを用いてコートした。コート管をPBS（Cellgro、Cat. No 021-030）に溶解した75 μ l（125 pmole）の抗体と共に、室温でインキュベートした。3時間のインキュベーション後、LPA:mAb複合体を遊離脂質からタンパク質脱塩カラム（Pierce、Cat. No 89849）を用いて分離し、結合したビオチン化LPAのモル濃度を、HABA/アビジン置換アッセイ（Pierce、Cat. No 28010）を用いて、製造者の指示に従い決定した。

10

【0278】

ヒト化変異体の操作

マウス抗LPA抗体を、LT3000 V_H および V_L 由来のKabataCDRをアクセプターヒトフレームワークにグラフトすることによりヒト化した。7つのヒト化変異体を、HEK293細胞において、血清を含まない条件で一時的に発現させ、これを精製し、その後、アッセイのパネルにおいて特徴付けした。各軽鎖および重鎖の配列を含むプラスミドを、産生のための哺乳類細胞にトランスフェクトさせた。培養5日後、mAb力価を定量ELISAを用いて決定した。重および軽鎖の全ての組み合わせで、2-12 μ gの抗体/mlの細胞培養物が得られた。

20

【0279】

ヒト化変異体のキャラクタリゼーション

全てのヒト化抗LPA mAb変異体は、キメラ抗LPA抗体（LT3010としても知られている）およびマウス抗体LT3000と同様の低いピコモル範囲で結合親和性を示した。ヒト化変異体は全て、LT3000と同様の、またはそれより高い T_M を示した。特異性に関しては、ヒト化変異体は、LT3000と同様の特異性プロファイルを示した。例えば、LT3000リゾホスファチジルコリン（LPC）、ホスファチジン酸（PA）、リゾホスファチジン酸の様々なアイソフォーム（14:0および18:1 LPA、環状ホスファチジン酸（cPA）、およびホスファチジルコリン（PC）に対し交差反応性を示さなかった。

30

【0280】

ヒト化変異体の活性

5つのヒト化変異体をインビトロ細胞アッセイにおいてさらに評価した。LPAは、癌細胞からのインターロイキン-8（IL-8）の放出を惹起するのに重要な役割を果たすことが知られている。LT3000は、濃度依存性様式で卵巣癌細胞からのIL-8放出を低減させた。ヒト化変異体は、LT3000に比べてIL-8放出の同様の低減を示した。

40

【0281】

2つのヒト化変異体についてはまた、新血管新生に対するマトリゲル管形成アッセイにおいて微小血管密度（MVD）に対するそれらの効果について試験した。どちらも、MVD形成を減少させることが示された。

【0282】

実施例9：Lpathomabの予備動物薬物動態

予備PK研究をLpathomabを用いて実施した。IV投与群では、マウスに単回30mg/kg用量を注射し、15日までの時間点で屠殺した。抗体はまた、i.p.投

50

与により与え、動物を最初の24hr中に屠殺し、異なる送達経路に対するこの時間期間にわたって血液中のmAbのレベルを比較した。薬物動態パラメータをWinNonlinにより評価した。3匹のマウスを各時間点で屠殺し、血漿試料を採取し、ELISAによりmAbレベルに対して分析した。マウスにおけるLpathomabの半減期をi.v.投与により102hr(4.25日)であると決定した。その上、抗体は、i.p.投与されると血液に6-12hr以内に完全分配され、i.p.投与が異種移植片および他の研究に好適であることが示唆される。

【0283】

実施例10：脊髄損傷およびLPAに対するモノクローナル抗体を用いたLPAの免疫組織化学的染色

免疫組織化学的方法を使用して、細胞内のLPAの存在および位置を決定することができる。脊髄損傷ありおよびなしの動物由来の脊髄(成体(3月齢)雄C57BL/6マウス)を損傷後4日に免疫染色した。成体C57BL/6マウス(20-30g)を、腹腔内注射した、ケタミンおよびキシラジン(それぞれ、100mg/kgおよび16mg/kg)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の混合物で麻酔した。脊髄を低胸部~高腰部領域で、レベルT12(腰膨大のレベルに対応)で露出させた。微細な鉗子を使用して、椎骨の棘突起および椎弓板を除去し、左側切断をT12で行った。微細なメスを使用して、脊髄の左側で脊髄を切断し、これは2度目の切断で、確実に病変を達成させ、上を覆う筋肉および皮膚をその後縫合した。これにより、左後肢の麻痺がもたらされた。2または4日後、動物を上記のように再び麻酔し、その後、PBSで心臓の左心室を通して、続いて4%パラホルムアルデヒド(PFA)で灌流させた。灌流後、脊髄を微細な鉗子を使用して優しく除去し、1時間、冷4%PFA中で後固定し、続いてパラフィン包埋または凍結切片のために、20%スクロースを含むPBS中で、一晚、40Cで凍結保存した。組織をn=3未損傷マウスおよびn=3損傷マウスから損傷後2および4日に取得した。Goldshmit Y, Galea MP, Wise G, Bartlett PF, Turnley AM: Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. J Neurosci 2004, 24(45): 10064-10073に記載される通り。

【0284】

IHC凍結脊髄矢状切片(10μm)を、標準免疫組織化学的手順を用いて調べ、異なるLPA受容体の発現および局在化を決定した。凍結切片を10min 4%PFAで後固定し、3回PBSで洗浄し、その後、1時間、室温(RT)で、5%ヤギ血清(Millipore)および0.1%Triton-Xを有するPBSを含むブロッキング溶液中でブロッキングし、非特異的抗血清相互作用をブロックした。使用した一次抗体はB3(0.1mg/ml)ウサギ抗LPA1(1:100、Cayman Chemical、USA)、ウサギ抗LPA2(1:100、Abeam、UK)およびマウス抗GFAP(1:500、Dako、Denmark)であった。一次抗体をブロッキング溶液中に添加し、切片を一晚中40Cでインキュベートした。それらをその後、洗浄し、二次抗体中で1hr、RTでインキュベートし、続いてDapi対比染色を実施した。切片をFluoromount(Dako)中でカバーガラスをかけ、Zeiss AxioCam HRCデジタルカメラおよびZeiss Axiovision 3.1ソフトウェアキャプチャーデジタル画像を備えたOlympus BX60顕微鏡を使用して調べた。いくつかの二重標識切片もまた、Zeiss AxioPlan 2顕微鏡に取り付けられたBiorad MRC1024共焦点レーザー走査システムを使用して調べた。全ての画像を照合し、多色パネルをAdobe Photoshop 6.0を使用して作成した。

【0285】

損傷後、アストロサイトと呼ばれるCNS中の非神経グリア細胞は、多くのダメージおよび疾患状態に应答し、「グリア应答」をもたらす。グリア線維酸性タンパク質(GFA

10

20

30

40

50

P) 抗体はこの応答の一部を形成する反応性アストロサイトを観察するために広く使用されており、というのも、正常アストロサイトよりも、反応性アストロサイトはGFAP抗体ですっとより強く染色されるからである。LPAを免疫組織化学により、抗体B3(0.1mg/ml一晚)を使用して明らかにした。蛍光顕微鏡法は、反応性アストロサイトが損傷後4日の脊髄中に存在することを示し、これらの細胞はLPAに対して確実に染色される。対照的に、未損傷(対照)脊髄は、アストロサイトまたはLPAに対してほとんどもしくは全く染色されない。よって、LPAは、脊髄の反応性アストロサイト中に存在する。損傷および対照動物の両方において、中心管(幹細胞ニッチであると仮定される)は、LPAに対して染色されない。

【0286】

実施例11: 脊髄損傷(SCI)後の抗LPA抗体処置マウスにおける機能回復

野生型マウスに上記実施例10で記載されるように脊髄片側切断損傷を与えた。SCI後2週間の抗LPA抗体B3の投与は、オープンフィールド歩行運動試験(mBBB)およびグリッド歩行テストにより決定されるように著しい機能回復をもたらすことが見出された(Goldshmit, et al. (2008), J. Neurotrauma 25(5): 449-465)。mBBBは0(完全麻痺を示す)から14(後肢の正常運動を示す)の範囲のスケールを使用する後肢機能障害の評価である。結果は平均+/-SEMとして表す。図4aは、SCI後4および5週に、mBBBにより測定される機能回復の統計的に有意な改善を示す。マウスにはまた、グリッド歩行テストを実施し、歩行運動機能回復を評価したが、これは、運動感覚性および固有受容性を組み合わせたものである。試験は的確な四肢配置および正確な運動制御を要求する。無傷の(未損傷)動物は典型的に、足を踏み外すことなくグリッドを横切る。対照的に、片側切断された動物は、病変と同側の後肢でミス犯す。マウスは、脊髄片側切断後1週間間隔で、水平なワイヤグリッド(1.2x1.2cmグリッド間隔、35x45cm総面積)上で試験した。マウスをグリッドの周りで3分間自由に歩かせ、その間、最小時間2分の歩行が要求された。左後肢足がグリッドを通過して完全に突き出て、全てのつま先およびかかとがワイヤ表面の下に延びた場合、これを踏み外しとしてカウントした。左後肢がとった歩みの総数もまたカウントした。正しい歩みのパーセンテージを計算し、+/-SEMで表した。図4bに示されるように、抗LPA抗体B3で処置したマウスは、グリッド歩行テストにおける正しい歩みのパーセントにおいて劇的な改善を示し; この改善はSCI後5週

【0287】

実施例12: LPAに対する抗体は脊髄損傷(SCI)後の軸索再生および神経生存を改善する

SCI後2週間の野生型マウスへのB3mAbの投与後の、前の実施例で記載される機能改善に加えて、抗LPA抗体処置はまた、病変部を通る軸索の再生およびそれらの突起を脳に向かって突出させる追跡神経細胞の著しい増加をもたらした。テトラメチルローダミンデキストラン(TMRD)を使用してアイソタイプ対照(n=6)において病変部に到達した下行軸索を標識し、B3処置マウス(n=7)における病変部を通して何とか再生した軸索と比較した。ヘマトキシリン染色を使用して、病変部を明らかにした。標識された軸索はまた、病変部の上流のそれらの細胞体中に標識を蓄積させる神経細胞に属する。病変部の吻側の標識された神経細胞の数の定量はB3処置マウスにおいて著しく高くなる(図5)。データは平均±SEM; **p<0.001である。そのようなニューロンは後に、可塑性プロセスの一部として、損傷後の長い下行または上行軸索の置換を提供し得る。

【0288】

実施例13: SCI後の抗LPA抗体の神経保護効果

以上で記載されるSCI後、1または2週間の抗LPA抗体B3(0.5mg/マウス、皮下、週2回)による処置は、アストロサイトグリオシスおよび神経膠痕形成、ならびに神経細胞アポトーシスを著しく低減させる。B3処置はGFAP発現(図6a)お

10

20

30

40

50

よび損傷部位での反応性アストロサイトによるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (C S P G)、グリオーシスのためのマーカーの細胞外マトリクスへの分泌を低減させる。さらに、B3抗体処置はまた、NeuN、ニューロン特異的核タンパク質に対する細胞染色の数により測定される、病変部での神経生存を増加させる (図 6 b)。

【 0 2 8 9 】

実施例 1 4 : 外傷性脳損傷 (T B I) のマウス皮質衝撃モデルにおける抗 L P A 抗体 - 防止的

マウスは T B I 研究のための理想のモデル生物であり、というのも、ヒト T B I の許容されるモデルが存在し、マウスにおける I 型 I F N 系は、ヒトにおけるものと同様であり、遺伝子標的マウスを生成させることができることは、単なる相関よりも原因および効果を明らかにすることを助けるからである。成体マウスを、ケタミン / キシラジンの単回 i p 注射で麻酔し、頭頂骨の上の頭皮をクリッパーで剪毛した。各頭皮をクロルヘキシジン (c h l o r h e x i d e i n e) 溶液で消毒し、切開し右頭頂骨を露出させた。微細な穿子端を有する歯科医のドリルをその後使用して、右頭頂骨の中心を中心とする薄い骨の 3 m m 直径の円形トレンチを作った。微細な鉗子をその後使用して、3 m m の頭頂骨プレートをおねじりして除去し、下の頭頂葉皮質を露出させた。除去した骨のプレートを無菌生理食塩水中に入れ、保持した。マウスを定位的頭部フレームに載置し、衝突体 (2 m m 直径) の先端を皮質の表面に直角に穿頭孔の中心に配置し、皮質を覆う硬膜に触れるまで下げた。1回の衝撃損傷 (1 . 5 m m 深さ) をコンピュータコントローラを用いて適用した。マウスを頭部フレームから除去し、骨のプレートを置換した。骨ろうをプレートの縁の周りに適用し、プレートを定位置に密閉し、保持した。その後、皮膚切開を、微細な絹縫合糸で閉じ、その領域にクロルヘキシジン溶液を噴霧した。その後、マウスを熱ランプ下の保持ボックスに戻し、意識を回復させた (麻酔された総時間 = 3 0 - 4 0 分)。

【 0 2 9 0 】

処置 : 治療またはアイソタイプ対照を、様々な時間点で注射した。抗 L P A 抗体 (B 3 または他のもの) を、尾部 - I V (0 . 5 m g) により注射した。2 4 - 4 8 時間後、動物を屠殺し、それらの脳を分析した。

【 0 2 9 1 】

分析 : ニューロン死 / 生存 (T U N E L 分析)、反応性アストログリオーシス (G F A P で共標識された K i 6 7 陽性細胞により明らかにされる) および N S / P C 応答 (C D 1 3 3 / K i 6 7 による増殖、C D 1 3 3 による損傷部位への移動および分化) を分析する。免疫応答を C D 1 1 b 免疫染色により評価する。定量を密度測定により I m a g e J (N I H) を用いて実施する。

【 0 2 9 2 】

結果 : このモデルからのデータは、損傷前に投与した抗 L P A 抗体治療 (B 3) は、この皮質衝撃モデルにおいて T B I 後にマウス脳で普通に見られる出血の程度を低減させることを示す (図 7)。

【 0 2 9 3 】

実施例 1 5 : 外傷性脳損傷の (T B I) マウス皮質衝撃モデルにおける抗 L P A 抗体
実施例 1 4 で記載される研究の結果に基づき、同じマウス皮質衝撃モデルを使用して、より大きな二重盲検防止研究を始めた。マウスを、制御式皮質衝撃 (C C I) を用いて T B I に供し、損傷前に 0 . 5 m g 抗体 (約 2 5 m g / k g) の単一静脈内用量として与えた、アイソタイプ対照モノクローナル抗体または抗 L P A 抗体 B 3 のいずれかで処置した。マウスを 2 4 時間後に屠殺し、この時点で、梗塞サイズを撮影しおよびその体積を定量した。図 8 は抗 L P A 処置動物対アイソタイプ対照抗体処置動物における梗塞サイズの組織学的定量を示す。対照動物と比較した場合の抗 L P A 抗体で処置した動物における脳梗塞体積の低減は統計的に有意であった。

【 0 2 9 4 】

実施例 1 6 : 外傷性脳損傷 (T B I) のマウス皮質衝撃モデルにおける抗 L P A 抗体 - 介入研究 # 1

10

20

30

40

50

以上で記載される研究の結果に基づき、より大きな二重盲検介入治療研究を同じ臨床的に関連するマウス皮質衝撃モデルを使用して始めた。マウス（8動物/群）を、制御式皮質衝撃（CCI）を用いてTBIに供し、外科手術後30分に0.5mg抗体（約25mg/kg）の単一静脈内用量として与えた、アイソタイプ対照モノクローナル抗体または抗LPA抗体B3のいずれかで処置した。マウスを48時間後に屠殺し、この時点で、梗塞サイズを撮影し、画像解析を使用して組織学的に定量した。図9は各抗LPA処置動物および各アイソタイプ対照抗体処置動物における梗塞サイズの組織学的定量を示す。これらのデータは、抗LPA抗体による処置は、介入的に（損傷後）与えた場合であっても、TBIに対し神経保護することを示す。

【0295】

実施例17：外傷性脳損傷（TBI）のマウス皮質衝撃モデルにおける抗LPA抗体 - 介入研究#2

この二重盲検研究では、実施例16で記載されるように、マウス（8匹/群）をTBIに供し、抗LPA抗体で処置したが、ここでは、マウスを損傷後7日に屠殺した。梗塞サイズを損傷後第1日および第7日にMRIにより測定し、結果を図10に示す。これらの結果は、抗LPA抗体で処置したマウスにおける、TBI後脳梗塞サイズの統計的に有意な減少を証明する。これらのデータは、抗LPA抗体による処置は損傷後に介入的に与えた場合であっても、TBIに対し神経保護することを示す。当然のことながら、この介入治療モデルは臨床的に関連するモデルである。

【0296】

実施例18：患者の脳脊髄液中のLPAは、TBIのためのマーカーとなる

5人のTBI患者由来のCSF試料を、National Trauma Research Institute, The Alfred Hospital, Melbourne, Australia (Australian Brain Bank Networkの一部である)に位置するNeurotrauma Tissue and Fluid Bankから入手した。CSFを5人のTBI患者から、損傷後24時間（第1日）から開始して連続する5日間採取した。各試料は2×10μlおよび2×100μlのアリコート=4管/患者を有する。3×対照試料が提供される場合、待機神経系外科手術時に採取した。各対照試料は2×10μlおよび2×100μlアリコート=4管/被験体を有する。試料情報を表9に示す。

【表9】

表9：CSF試料情報

| 試料名 | 第1日 | 第2日 | 第3日 | 第4日 | 第5日 |
|-----|--------------------|------|------|------|------|
| 04 | 04_1 | 04_2 | 04_3 | 04_4 | 04_5 |
| 02 | 02_1 | 02_2 | 02_3 | 02_4 | 02_5 |
| 03 | 03_1 [#] | 03_2 | 03_3 | 03_4 | 03_5 |
| 01 | 01_1 ^{##} | 01_2 | 01_3 | 01_4 | 01_5 |
| 05 | 05_1 | 05_2 | 05_3 | 05_4 | 05_5 |
| 対照1 | | | | | |
| 対照2 | | | | | |
| 対照3 | | | | | |

試料03__1、03__2、03__3、03__4、および03__5はわずかに淡黄色であった

試料01__1は著しく赤みがかかったピンク色であった

【0297】

患者情報を表10に示す。「入院日」は、病院への入院を示す。「GCS」は、グラスゴー昏睡スコアを示す。ISSは、損傷重症度スケールを示す。GOSEは、拡張グラスゴーアウトカムスケールを示す。損傷メカニズム下では、「MVA」は、自動車事故を示

10

20

30

40

50

し、「Ped」は、歩行者事故を示し、「Pen」は、穿通性損傷を示す。

【表10】

表10：TBI患者情報

| 患者コード | 年齢 | 性別 | 入院日 | 酸素飽和 | 局所性／ 広汎性 | 損傷メカニズム | GCS | ISS | GOSE |
|---------|----|----|------------|-------|-------------|---------|-----|-----|------|
| 01 | 23 | M | 05/03/2004 | 非低酸素性 | 局所性 | Ped | 7 | 33 | 4 |
| 02 | 19 | M | 12/04/2004 | 非低酸素性 | 広汎性 | MVA | 8 | 30 | 5 |
| 03 | 50 | M | 15/04/2004 | 低酸素性 | 広汎性 | MVA | 5 | 41 | 4 |
| 04 | 33 | M | 26/05/2004 | 非低酸素性 | 局所性 | Ped | 4 | 38 | 1 |
| 05 | 50 | M | 04/07/2005 | 正常酸素圧 | | Pen | 10 | 20 | 8 |
| 対照 1 | 42 | M | 27/05/2008 | 非低酸素性 | | | | | |
| 対照 3 | 80 | M | 28/11/2007 | 非低酸素性 | | | | | |
| 対照 4 | 56 | M | 17/05/2005 | 非低酸素性 | | | | | |

10

【0298】

20

GCSを使用して、外傷性脳損傷を患う患者における昏睡の重症度を定量する。精神覚醒は完全覚醒から嗜眠および昏迷まで、ずっと深昏睡まで変化し、ここでは、患者は外部刺激に対してごくわずかに応答するまたは無応答である。GCSはこの意識レベルを3（最悪、深昏睡）～15（正常、覚醒）のスケールで等級分けする。13以上の昏睡スコアは軽度脳損傷、9～12は中程度損傷および8以下は重度脳損傷を示す。

【0299】

GOSEはグラスゴー昏睡尺度を補完するように設計された頭部損傷後の転帰または回復の実用的な指標である。8つの回復レベルは下記である：1）死亡；2）植物状態；3）低重度身体障害；4）高重度身体障害；5）低中程度身体障害；6）高中程度身体障害；7）低良好回復；8）高良好回復。

30

【0300】

ISSは複数の損傷を有する患者に対する全体スコアを提供する解剖学的スコアリングシステムである。各損傷は簡易損傷スケール（AIS）スコアが割り当てられ（1～6、1は軽症、5は重度および6は生存不能損傷である）および6つの身体領域の1つ（頭部、顔面、胸部、腹部、四肢（骨盤を含む）、外側）に割り当てられる。各身体領域内の最も高いAISスコアのみが使用される。3つの最も激しく損傷された身体領域はそれらのスコアを二乗し、共に加算され、ISSスコアが得られる。

【0301】

CSF試料中のLPAのレベル（複数の脂質種）は、高速液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化 - タンデム質量分析（HPLC-ESI-MS/MS）より、Andrew Morris教授によってUniversity of Kentuckyにて、Lpathと契約して測定された。対照および損傷されたCSF中の様々なLPA種を公開された方法を用いて決定した。Gellet et al. (2012) BBRC 422:758-763; Federico et al. (2012) Mol. Endocrinol. 26:786-797。LPAはCSF中で検出されているが（Sato et al., 2005）、CSF中のLPAの主要分子種を同定するLC-MSによる詳細な分析は、以前は達成されていない。多くのLPA種 [14:0、16:1、16:0、18:3、18:2、18:1、18:0、20:4および22:6アシル（エステル結合した）LPA] を測定し、全ての生理的に関連する種（16:0、18:2、18:1、18:0および20:4）をCSF中で検出した。

40

50

【0302】

図11は損傷後1、2、3、4および5日での5人のTBI患者の各々のCSF中の総LPAレベルを示す。総LPAレベルは、損傷後24時間で、5人の患者のうち4人で上昇し、1人の患者を除き全てにおいて、48時間までに低下した。興味深いことに、LPAレベルが上昇しなかった患者は、穿通性損傷を有した患者(05)であり；この患者は正常(正常酸素圧)酸素レベルを有する唯一のものであり、最も高いGCSスコア(10、中程度脳損傷を示す)を有した。LPAレベルが高いままであった患者(03)は、唯一の低酸素患者であった。

【0303】

図12は、対照のCSF中の平均総LPAと比較した、損傷後24時間に測定した、同じ5人のTBI患者のCSF中の平均総LPAレベルを示す。よって、平均して、脳損傷患者のCSF中の総LPAレベルは、全健康対照被験体のもののおよそ4倍である。

10

【0304】

図13は、損傷後1-5日での、神経外傷患者、ならびに対照被験体由来のCSF試料中の生理的に関連するアシルLPAアイソフォームのレベルを示す。これらの生理的に関連するアイソフォーム(16:0、18:0、18:1、18:2、20:4)の5つ全ては、各時間点で、損傷患者のCSF中で、ならびに対照被験体において検出することができるが；しかしながら各アイソフォームのレベルは、対照に比べて、神経外傷患者において高い。LPAレベルの違いは、対照に対して、わずかな増加(18:0の場合)~数倍の増加(16:0、18:2)の範囲となる。加えて、いくつかのアイソフォームは損傷後すぐに劇的に増加し、その後低下する(例えば、20:4および18:2)が、他のアイソフォームは上昇し、上昇したままである(例えば、18:0、18:1)。よって、様々なLPAアイソフォームは、神経外傷の異なる局面を示し得る。Zhao Z, Yu M, Crabb D, Xu Y, Liangpunsakul S. Ethanol-induced alterations in fatty acid-related lipids in serum and tissues in mice. Alcohol Clin Exp Res 2010; 35:229-34。

20

【0305】

これらの予備データは、LPAレベルが神経外傷後のCSF中で増加するという初めての証拠である。LPAは神経外傷のためのバイオマーカーとなるというこの新規観察は、本明細書で特許請求される方法およびキットのための基礎となる。

30

【0306】

実施例19 TBIを有する患者由来のCSF中のLPA代謝産物

LPA前駆体リゾPAFおよびLPCを、損傷後1、2、3、4および5日にTBI患者のCSF中で測定した。Zhao Z, Yu M, Crabb D, Xu Y, Liangpunsakul S. Ethanol-induced alterations in fatty acid-related lipids in serum and tissues in mice. Alcohol Clin Exp Res 2010; 35:229-34。結果を図14a(リゾPAF)および14b(LPC)に示す。LPCおよびリゾPAFはどちらも損傷後第1および2日に高くかつ著しく上昇し、第3および4日にわたって徐々に減り、損傷後第5日までにおよそ対照レベルにもどることがわかる。よって、リゾPAFおよびLPCを含むLPA代謝産物はまた、TBIのための有用なバイオマーカーであると考えられる。これは、リゾPAFレベルは、脳虚血の動物モデルでは虚血発作後に変化しないことを示す、前に公開された結果と対照的である。Nishida and Markey (1996) Stroke 27:514-519。

40

【0307】

実施例20 追加の神経外傷患者由来のCSF試料中のLPAレベル

実施例18に加えて、追加の8人のTBI患者由来のCSF試料を入手した。患者デー

50

タを、利用可能であれば(「-」は利用可能でないデータを示す)、表11に示す。

【表11】

表11 TBI患者情報-第2コホート

| 患者番号 | 年齢 | 性別 | 損傷メカニズム | GCS | ISS | GOSE | 局所性 (F) または 広汎性 (D) 損傷 | 低酸素性 (Hx) または 正常酸素圧 (Nx) |
|------|----|----|---------|-----|-----|------|---------------------------------|--------------------------------|
| 06 | 40 | M | 落下/跳躍 | 7 | 21 | 6 | D | Nx |
| 07 | 33 | M | バイク事故 | 3 | 43 | 4 | F&D | Hx |
| 08 | 33 | M | 落下/跳躍 | 7 | 17 | 6 | F | Nx |
| 09 | 21 | F | バイク事故 | 7 | 21 | 3 | D | Nx |
| 10 | 26 | F | 落下/跳躍 | 3 | 45 | 3 | F | Hx |
| 11 | 22 | M | 穿通性損傷 | 7 | 30 | 5 | F | Nx |
| 12 | 35 | M | 落下/跳躍 | 4 | 45 | 5 | F | Hx |
| 13 | 25 | M | 自動車事故 | 4 | 41 | - | - | Hx |

10

【0308】

20

C S F 試料を、損傷後5日にわたり採取したが、実施例18の5人の患者に対してよりも損傷後早くに採取を始めた。図15はこれらの患者由来のC S F試料中の総アシルL P Aレベルを示す。一般に、L P Aレベルは、損傷後第1日に最も高く、その後、減少することがわかる。

【0309】

実施例21 神経外傷患者由来のC S F中のL P Aレベルの時間経過

総アシル-L P Aレベルを、損傷後およそ6日までの時間で、11人の神経外傷患者由来のC S F中で測定した(実施例18で記載される5人の患者および実施例20で記載される8人の患者由来のデータのうち、2人の患者に対するデータはC S Fサンプリングの時間についての不十分な情報のために、時間経過から除外しなければならなかった)。測定を、前の実施例で記載される液体クロマトグラフィー-質量分析(L C - M S)により実施した。L P Aレベルを、図16に示される散布図として、損傷後の時間数で表された時間に対してグラフにした。L P Aレベルは損傷後およそ36時間以内に、特にこの期間の前半で劇的に上昇することがわかる。

30

【0310】

図17は損傷後の時間により分類された同じ測定値を示す。総L P Aレベルは損傷のおよそ14時間以内で最も高く、損傷後約36時間まで高いままであり、損傷後約36時間後に対照レベル近くまで降下することがわかる。よって、神経外傷を検出および/または診断するために、損傷後およそ36時間以内では持続するC S F中のL P Aレベルを決定することに依存する、本明細書で開示される診断方法およびキットを使用することが好ましいと考えられる。

40

【0311】

実施例22 13人の神経外傷患者対対照由来のC S F試料中のL P Aアイソフォーム

図18は損傷後1-5日での13人全てのT B I患者、ならびに対照被験体由来のC S F試料中の生理的に関連するアシルL P Aアイソフォームのレベルを示す。これは、5人の最初の患者(実施例18および図13)+実施例20で記載される8人の追加の患者由来のデータを含む。前述同様に、5つ全てのこれらの生理的に関連するアイソフォーム(16:0、18:0、18:1、18:2、20:4)を、各時間点の損傷患者のC S F中で、ならびに対照被験体において検出したが;しかしながら、各アイソフォームのレベルは、対照に比べて神経外傷患者において高かった。

50

【0312】

実施例23 LPA測定値と損傷の重症度との相関

上記データは、LPAレベルは、典型的には、神経外傷後最初の24時間に最も高いので、実施例20で記載される8人の患者に対する疾患重症度スコアを、損傷後24時間以内にこれらの患者からとったCSF試料中のLPAレベルに対してグラフにした。

【0313】

図19aは、CSF中のLPAのより高いレベルはより低いグラスゴー昏睡スコア(GCS)(より不良の転帰を示す)と相関することを示す。GCSを使用して、3(最悪、深昏睡)~15(正常、覚醒)のスケールで、外傷性脳損傷を患う患者における昏睡の重症度を定量する。13以上の昏睡スコアは軽度脳損傷を示し、9~12は中程度損傷、および8以下は重度脳損傷を示す。全ての患者が9未満のGCSスコアを有し、これは重度脳損傷を示したが、最も高いLPAレベルは、最低(最も重度の損傷)スコアを有する患者由来のCSF試料中で見られ、反対に最低LPAレベルは、最も高い(相対的により低い重度の損傷)スコアを有する患者由来のCSF試料中で見られた。

10

【0314】

図19bは、損傷の24時間以内にこれらの8人の患者からとったCSF試料中のより高いLPAのレベルはまた、より低い拡張グラスゴーアウトカムスケール(GOSE)スコアと相関することを示す。GOSEは、グラスゴー昏睡尺度を補完するように設計された、頭部損傷後の転帰または回復の実用的な指標である。8つの回復レベルは下記である：1)死亡；2)植物状態；3)低重度身体障害；4)高重度身体障害；5)低中程度身体障害；6)高中程度身体障害；7)低良好回復；8)高良好回復。再び、最も高いLPAレベルは、最低(最も重度の損傷)スコアを有する患者由来のCSF試料中で見られ、反対に最低LPAレベルは、最も高い(相対的により低い重度の損傷)スコアを有する患者由来のCSF試料中で見られた。

20

【0315】

GCSおよびGOSEスコアリングシステムとは違って、複数の損傷を有する患者に対する全体スコア(多発外傷)を提供する損傷重症度スケール(ISS)は解剖学的スコアリングシステムである。各損傷は簡易損傷スケール(AIS)スコアが割り当てられ(1~6、1は軽症、5は重度および6は生存不能損傷である)および6つの身体領域の1つ(頭部、顔面、胸部、腹部、四肢(骨盤を含む)、外側)に割り当てられる。各身体領域内の最も高いAISスコアのみが使用される。3つの最も激しく損傷された身体領域はこれらのスコアを二乗し、共に加算され、ISSスコアが得られる。よって、GCSおよびGOSEと対照的に、ISSで低いスコアは最も好ましく、高いスコアは最も重度である。図19cで見てわかるように、損傷の24時間以内にこれらの8人の患者からとったCSF試料中のより高いLPAのレベルは、ISS上のより高いスコア(より重度の損傷)と相関する。

30

【0316】

よって、神経外傷および多発外傷に対する3つ全ての標準スコアリング方法では、CSF中のより高いLPAのレベルが損傷の重症度の増加と相関し、LPAは、TBIなどの重篤な損傷に対するバイオマーカーとして定性的かつ定量的に機能することがわかる。

40

【0317】

本明細書に記載され、特許請求される組成物および方法は全て必要以上の実験をせずに本開示を考慮して、製造し、実行することができる。発明の組成物および方法について好ましい実施形態の観点から説明してきたが、組成物および方法に変更を加えることができることは、当業者には明らかであろう。当業者に明らかなそのような同様の置換および改変は全て添付の特許請求の範囲により規定される発明の精神および範囲内に含まれると見なされる。

【0318】

明細書で言及された全ての特許、特許出願、および刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。それに対して優先権または別の恩典が主張されるものを含む全ての

50

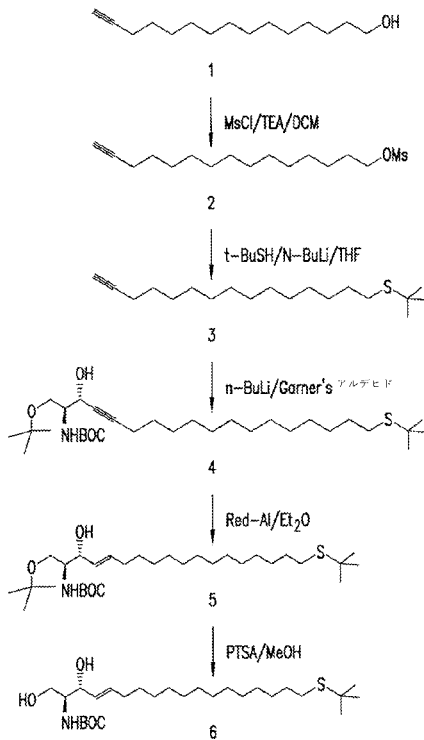
特許、特許出願、および刊行物は、各々の個々の刊行物が参照により組み込まれることが特定の、かつ個々に示されているのと同じ程度まで、本明細書で参照により組み込まれる。

【0319】

本明細書で例示的に記載される発明は、本明細書で特定のに開示されていないいずれの要素（複数可）がなくても好適に実施することができる。よって、例えば、本明細書における各場合において、「含む」、「から本質的に構成される」、および「から構成される」という用語のいずれも、他の2つの用語のいずれかと置換することができる。使用した用語および表現は、説明の用語として使用され、制限するものでなく、そのような用語および表現の使用においては、図示され、記載された特徴またはその部分のいずれの等価物も排除することを意図しないが、様々な改変が特許請求される発明の範囲内で可能であることが認識される。よって、本発明について好ましい実施形態および任意な特徴により特定のに開示してきたが、本明細書で開示される概念の改変および変更は当業者により使用されることがあり、そのような改変および変更は、添付の特許請求の範囲により規定されるこの発明の範囲内にあると考えられることが理解されるべきである。

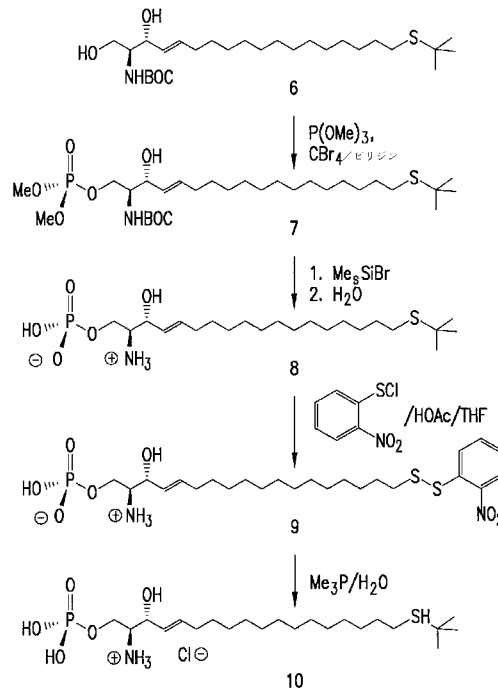
10

【図1A】



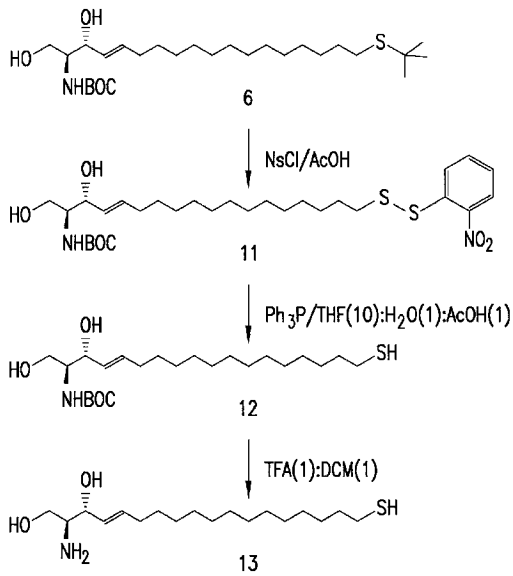
典型的なチオール化S1-P関連核糖の合成

【図1B】



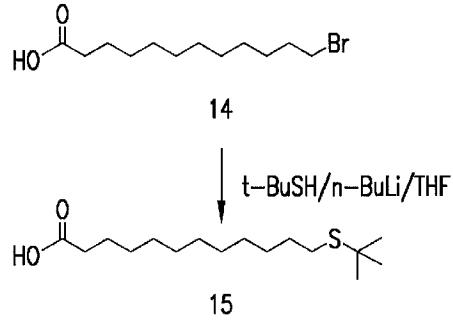
典型的なチオール化S1-P関連核糖の合成 (続き)

【 図 1 C 】



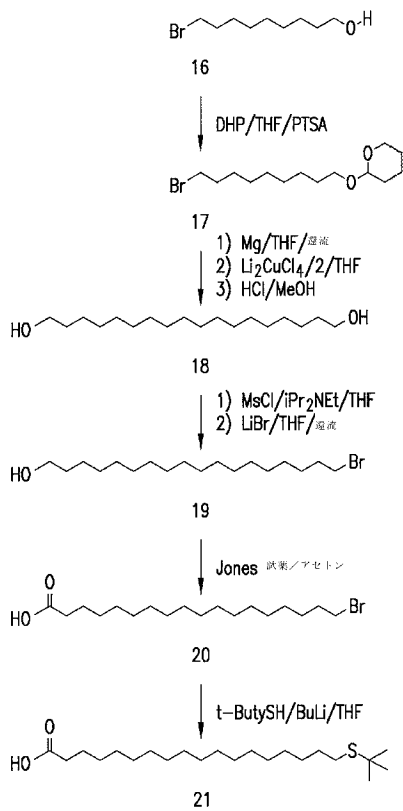
典型的なチオール化 S1-P 関連抗原の合成 (続き)

【 図 2 A 】



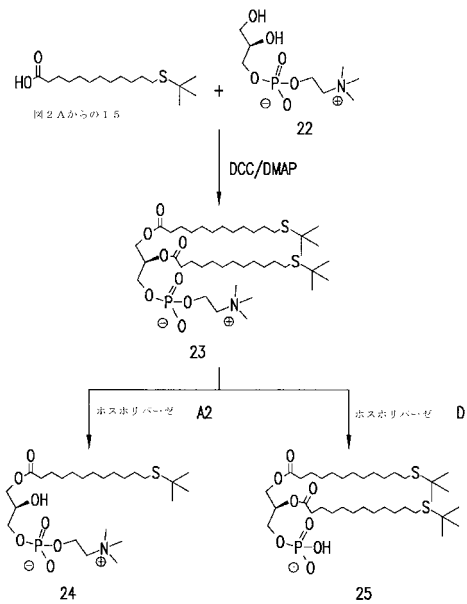
典型的な保護されたチオール化脂肪酸の合成

【 図 2 B 】



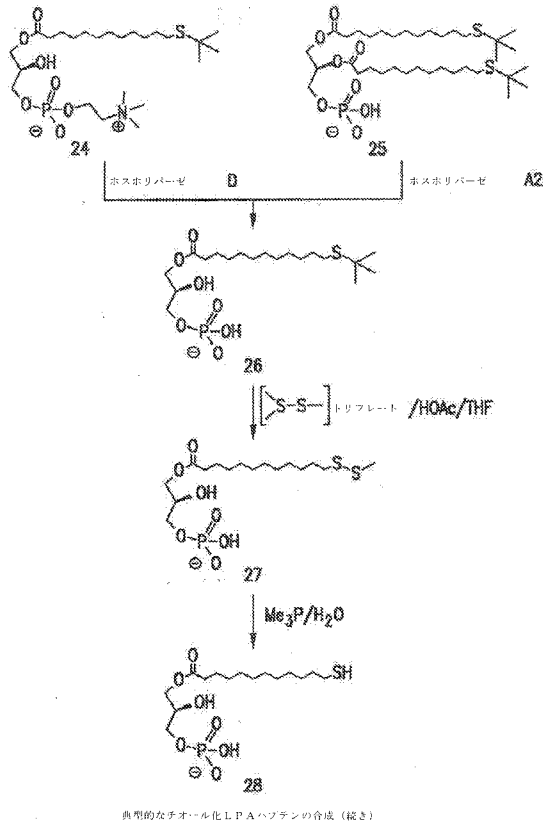
典型的な保護されたチオール化脂肪酸の合成

【 図 3 A 】

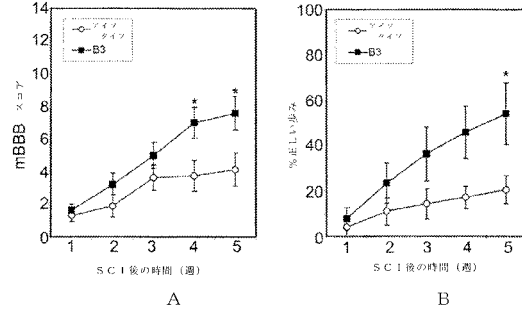


典型的なチオール化 LPA ヘフランの合成

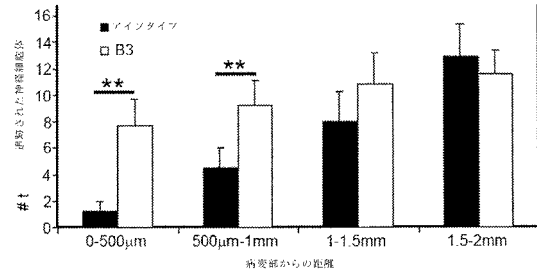
【 図 3 B 】



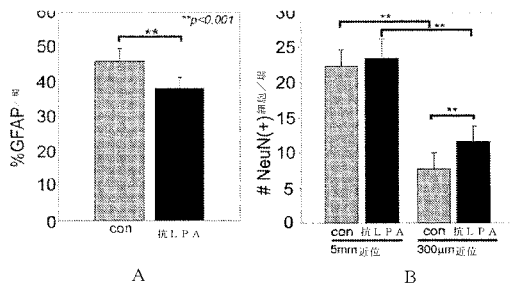
【 図 4 】



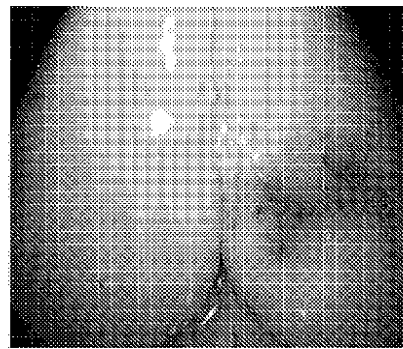
【 図 5 】



【 図 6 】

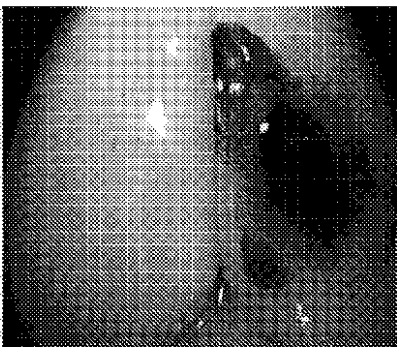


【 図 7 B 】



B

【 図 7 A 】



A

【 図 8 A 】

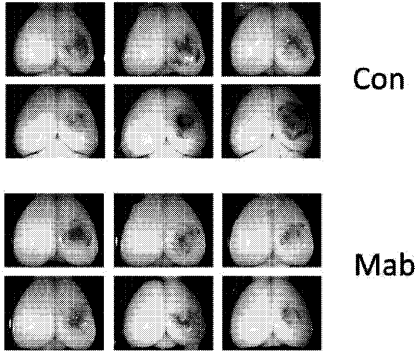
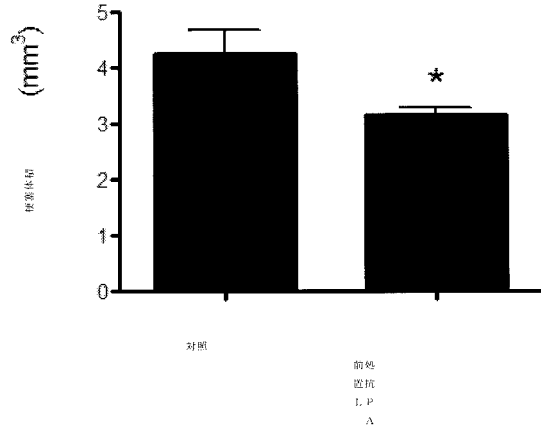
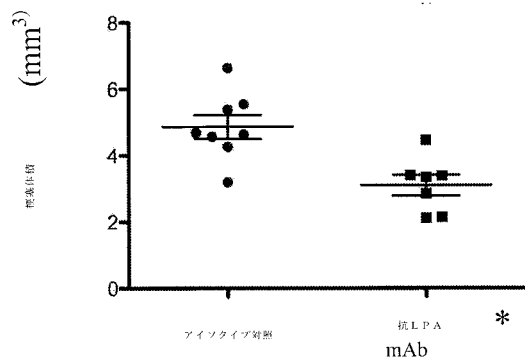


FIG. 8a

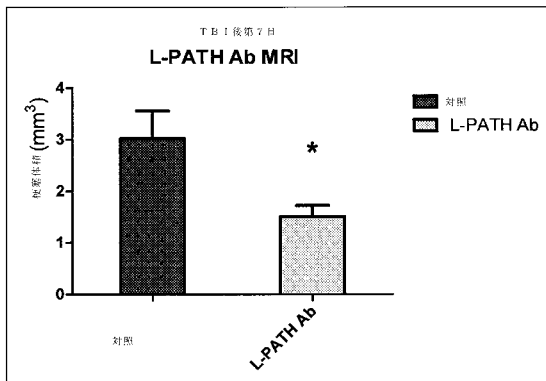
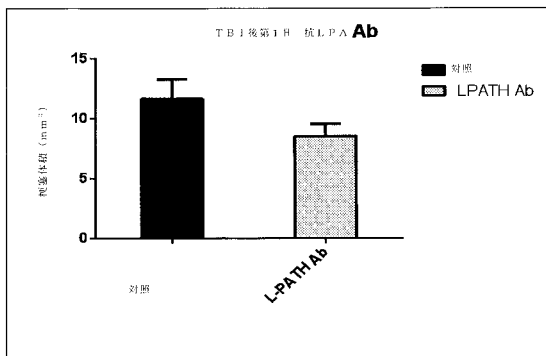
【 図 8 B 】



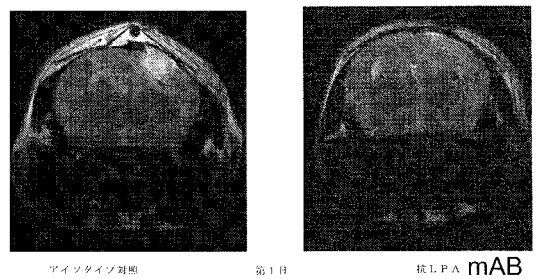
【 図 9 】



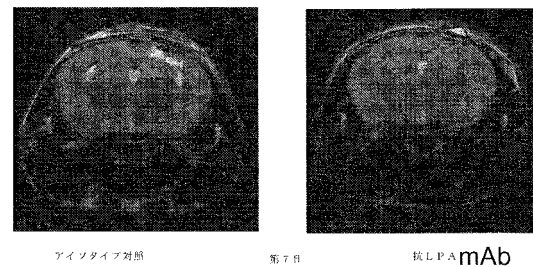
【 図 10 A 】



【 図 10 B 】

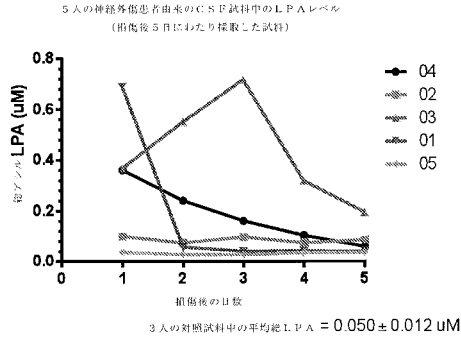


(B3)

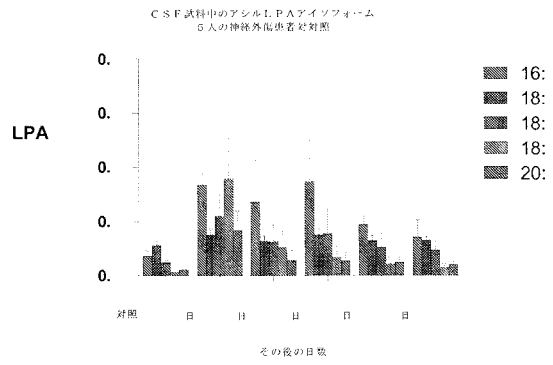


(B3)

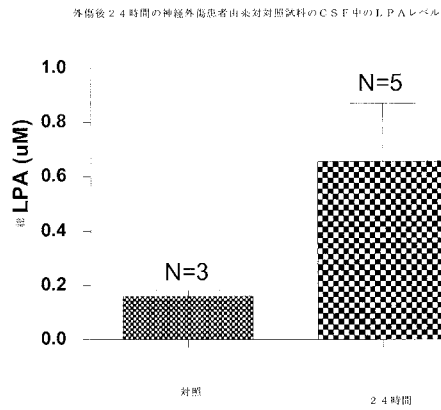
【 図 1 1 】



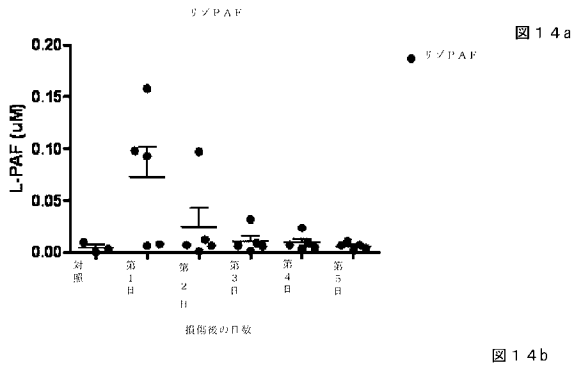
【 図 1 3 】



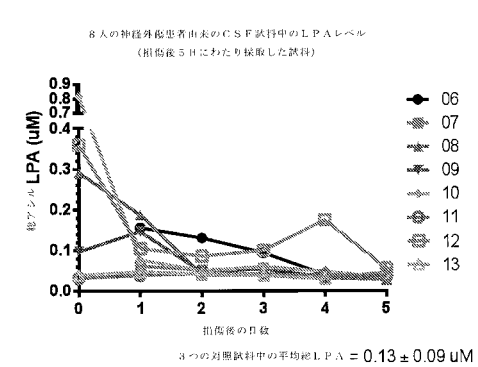
【 図 1 2 】



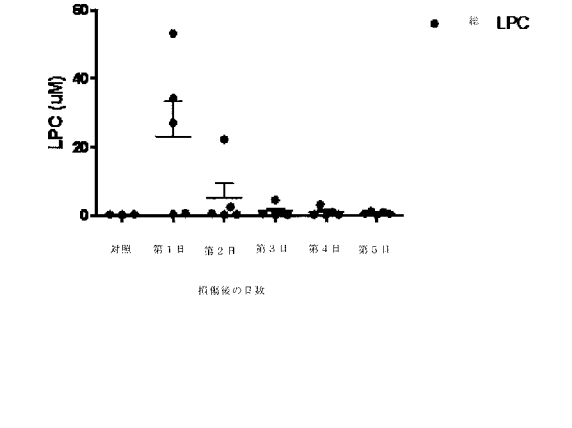
【 図 1 4 】



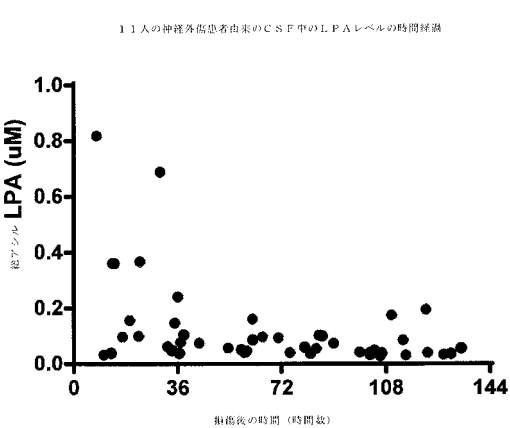
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

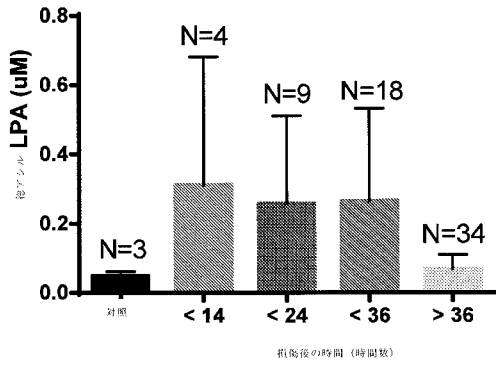


【 図 1 6 】



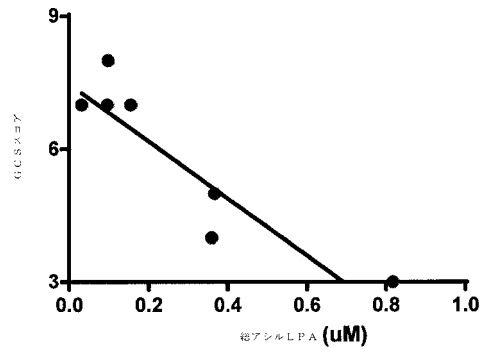
【 図 1 7 】

11人の神経外傷患者および対照由来のCSF中のLPAレベル



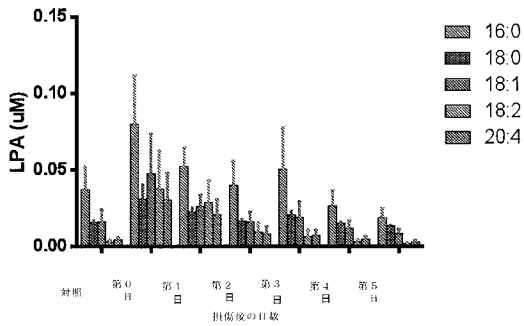
【 図 1 9 A 】

GCSスコア対損傷後24時間以内に採取した8人の神経外傷患者由来のCSF中のLPAレベル



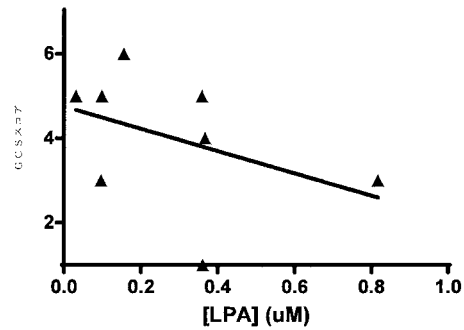
【 図 1 8 】

13人の神経外傷患者対対照由来のCSF試料中のアシルLPAアイソフォーム



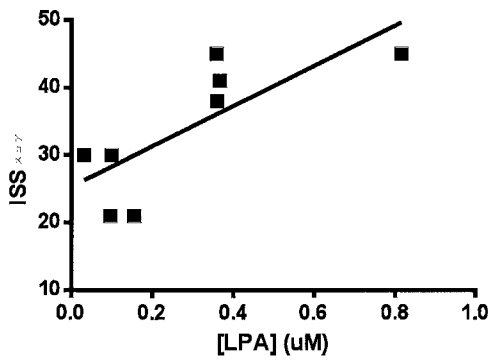
【 図 1 9 B 】

GOSスコア対損傷後24時間以内に採取した8人の神経外傷患者由来のCSF中のLPAレベル



【 図 1 9 C 】

ISSスコア対損傷後24時間以内に採取した8人の神経外傷患者由来のCSF中のLPAレベル



【 国際調査報告 】

| | | |
|--|--|--|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 2013/027902 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| <i>G01N 33/483 (2006.01)</i> <i>G01N 33/50 (2006.01)</i> <i>G01N 33/53 (2006.01)</i> <i>G01N 33/543 (2006.01)</i> <i>G01N 33/563 (2006.01)</i> <i>C12Q 1/25 (2006.01)</i> | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| G01N 33/58, 33/48, 33/483, 33/487, 33/49, 33/493, 33/50, 33/53, 33/531, 33/532, 33/536, 33/543, 33/544, 33/545, 33/552, 33/553, 33/563, 33/577, 30/00, 33/58, C12Q 1/00, 1/25 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| Esp@cenet, PAJ, RUPTO, PubMed, PatSearch (RUPTO internal), WIPO, Google | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2008/073988 A2 (GRACE LABORATORIES, LLC et al.) 19.06.2008, claim 1, p. 10, paragraph 2, p. 13, paragraph 2 | 1-32 |
| Y | MIRELLA DOTTORI et al. Lysophosphatidic acid inhibits neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells derived from human embryonic stem cells. Stem Cells, 2008 May, Vol.26 (5), pp.1146-1154, especially, abstract, p 1153, Conclusion | 1-32 |
| Y | US 2010/0034814 A1 (ROGER A. SABBADINI et al.) 11.02.2010, paragraphs [0002], [0017], [0018], [0036], [0046], [0057], [0063], [0069], [0116], [0349] - [0364] | 4, 5, 8-11, 14-19, 21, 24-28, 31- 32 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" | earlier document but published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 20 May 2013 (20.05.2013) | | 04 July 2013 (04.07.2013) |
| Name and mailing address of the ISA/ FIPS Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezhkovskaya nab., 30-1 | | Authorized officer O. Mankevich |
| Facsimile No. +7 (499) 243-33-37 | | Telephone No. (495)531-65-15 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 2013/027902

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | MONDELLO S. et al. Neuronal and glial markers are differently associated with computed tomography findings and outcome in patients with severe traumatic brain injury: a case control study, <i>Critical Care</i> , 2011 Jun 24, Vol.15 (3): R156, pp.1-10, especially, abstract, p.5, Discussion | 12, 13, 29, 30 |
| A | DAI SHIDA et al. Lysophosphatidic Acid (LPA) Enhances the Metastatic Potential of Human Colon Carcinoma DLD1 Cells through LPA1. <i>Cancer Res</i> , 2003, Vol.63, pp.1706-1711 | 1-32 |

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 DA20 DA36 DA61 FB03
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ21 QR01 QS02

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于检测和诊断神经损伤的方法和试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | JP2015513088A | 公开(公告)日 | 2015-04-30 |
| 申请号 | JP2014559956 | 申请日 | 2013-02-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 萨尔瓦多路径公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Erupasu公司 | | |
| [标]发明人 | サツバディーニロジャーエー | | |
| 发明人 | サツバディーニ,ロジャー,エー. | | |
| IPC分类号 | G01N33/92 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/543 C12Q1/25 | | |
| CPC分类号 | G01N33/92 G01N33/6896 G01N2405/04 G01N2800/2871 | | |
| FI分类号 | G01N33/92.Z G01N33/53.S G01N33/573.A G01N33/543.521 C12Q1/25 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA61 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QR01 4B063/QS02 | | |
| 优先权 | 61/605076 2012-02-29 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

提供了用于检测和诊断神经损伤(例如,创伤性脑损伤,中风或脊髓损伤)的方法和试剂盒。这些方法依赖于疑似损伤后患者样品中溶血磷脂酸(LPA)和/或LPA代谢物水平的测定。

