

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5989299号
(P5989299)

(45) 発行日 平成28年9月7日(2016.9.7)

(24) 登録日 平成28年8月19日(2016.8.19)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/16

請求項の数 12 (全 114 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-510480 (P2010-510480)	(73) 特許権者	508129218
(86) (22) 出願日	平成20年5月29日 (2008.5.29)		エルパス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2010-530218 (P2010-530218A)		L p a t h, I n c.
(43) 公表日	平成22年9月9日 (2010.9.9)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 - 1 4 0 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/065045		カリフォルニア州 サンディエゴ、ソレン
(87) 国際公開番号	W02008/150841		ト バレー ブルーバード、4 0 2 5 番
(87) 国際公開日	平成20年12月11日 (2008.12.11)	(74) 代理人	100109634
審査請求日	平成23年5月26日 (2011.5.26)		弁理士 舩谷 威志
審査番号	不服2014-23315 (P2014-23315/J1)	(72) 発明者	サバディーニ、ロジャー、エー。
審査請求日	平成26年11月17日 (2014.11.17)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2
(31) 優先権主張番号	60/940,964		0 4 0, レイクサイド、デル ソル ロー
(32) 優先日	平成19年5月30日 (2007.5.30)		ド 1 2 5 0 9
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リゾホスファチジン酸結合のための組成物と方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生理的環境下でリゾホスファチジン酸 (L P A) に結合する単離された抗体、または抗原に結合可能な抗体フラグメントであって、

前記抗体または抗体フラグメントは、下記 a . に示す二つの重鎖可変ドメイン、および下記 b . に示す二つの軽鎖可変ドメインを有する、ことを特徴とする抗体または抗体フラグメント：

a . 各重鎖可変ドメインは、複数の重鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の重鎖相補性決定領域 (C D R) を含み、ここで：

(i) 前記第 1 の重鎖 C D R は、配列番号 5 6 に示されるアミノ酸配列を有し；

(i i) 前記第 2 の重鎖 C D R は、配列番号 5 7 に示されるアミノ酸配列を有し；

かつ

(i i i) 前記第 3 の重鎖 C D R は、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を有する；そして、

b . 前記二つの軽鎖可変ドメインは前記重鎖可変ドメインと機能的に関連しており、各軽鎖可変ドメインは、複数の軽鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の軽鎖 C D R を含み、ここで：

(i) 前記第 1 の軽鎖 C D R は、配列番号 5 9 に示されるアミノ酸配列を有し；

(i i) 前記第 2 の軽鎖 C D R は、配列番号 6 0 に示されるアミノ酸配列を有し；

かつ

10

20

(i i i) 前記第 3 の軽鎖 C D R は、配列番号 6 1 に示されるアミノ酸配列を有する。

【請求項 2】

生理的環境下でリゾホスファチジン酸 (L P A) に結合する単離された抗体、または抗原に結合可能な抗体フラグメントであって、

前記抗体または抗体フラグメントは、下記 a . に示す二つの重鎖可変ドメイン、および下記 b . に示す二つの軽鎖可変ドメインを有する、ことを特徴とする抗体または抗体フラグメント：

a . 各重鎖可変ドメインは、複数の重鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の重鎖相補性決定領域 (C D R) を含み、ここで：

(i) 前記第 1 の重鎖 C D R は、配列番号 6 9 に示されるアミノ酸配列を有し；

(i i) 前記第 2 の重鎖 C D R は、配列番号 7 0 に示されるアミノ酸配列を有し；

かつ

(i i i) 前記第 3 の重鎖 C D R は、配列番号 7 1 に示されるアミノ酸配列を有する；そして、

b . 前記二つの軽鎖可変ドメインは前記重鎖可変ドメインと機能的に関連しており、各軽鎖可変ドメインは、複数の軽鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の軽鎖 C D R を含み、ここで：

(i) 前記第 1 の軽鎖 C D R は、配列番号 7 2 に示されるアミノ酸配列を有し；

(i i) 前記第 2 の軽鎖 C D R は、配列番号 7 3 に示されるアミノ酸配列を有し；

かつ

(i i i) 前記第 3 の軽鎖 C D R は、配列番号 7 4 に示されるアミノ酸配列を有する。

【請求項 3】

生理的環境下でリゾホスファチジン酸 (L P A) に結合する単離された抗体、または抗原に結合可能な抗体フラグメントであって、

前記抗体または抗体フラグメントは、下記 a . に示す二つの重鎖可変ドメイン、および下記 b . に示す二つの軽鎖可変ドメインを有する、ことを特徴とする抗体または抗体フラグメント：

a . 各重鎖可変ドメインは、複数の重鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の重鎖相補性決定領域 (C D R) を含み、ここで：

(i) 前記第 1 の重鎖 C D R は、配列番号 8 1 に示されるアミノ酸配列を有し；

(i i) 前記第 2 の重鎖 C D R は、配列番号 8 2 に示されるアミノ酸配列を有し；

かつ

(i i i) 前記第 3 の重鎖 C D R は、配列番号 8 3 に示されるアミノ酸配列を有する；そして、

b . 前記二つの軽鎖可変ドメインは前記重鎖可変ドメインと機能的に関連しており、各軽鎖可変ドメインは、複数の軽鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の軽鎖 C D R を含み、ここで：

(i) 前記第 1 の軽鎖 C D R は、配列番号 8 4 に示されるアミノ酸配列を有し；

(i i) 前記第 2 の軽鎖 C D R は、配列番号 8 5 に示されるアミノ酸配列を有し；

かつ

(i i i) 前記第 3 の軽鎖 C D R は、配列番号 8 6 に示されるアミノ酸配列を有する。

【請求項 4】

生理的環境下でリゾホスファチジン酸 (L P A) に結合する単離された抗体、または抗原に結合可能な抗体フラグメントであって、

前記抗体または抗体フラグメントは、下記 a . に示す二つの重鎖可変ドメイン、および下記 b . に示す二つの軽鎖可変ドメインを有する、ことを特徴とする抗体または抗体フラグメント：

10

20

30

40

50

a . 各重鎖可変ドメインは、複数の重鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の重鎖相補性決定領域 (C D R) を含み、ここで :

(i) 前記第 1 の重鎖 C D R は、配列番号 1 0 5 に示されるアミノ酸配列を有し ;

(i i) 前記第 2 の重鎖 C D R は、配列番号 1 0 6 に示されるアミノ酸配列を有し ; かつ

(i i i) 前記第 3 の重鎖 C D R は、配列番号 1 0 7 に示されるアミノ酸配列を有する ; そして、

b . 前記二つの軽鎖可変ドメインは前記重鎖可変ドメインと機能的に関連しており、各軽鎖可変ドメインは、複数の軽鎖フレームワーク領域に配された第 1、第 2 および第 3 の軽鎖 C D R を含み、ここで :

(i) 前記第 1 の軽鎖 C D R は、配列番号 1 0 8 に示されるアミノ酸配列を有し ;

(i i) 前記第 2 の軽鎖 C D R は、配列番号 1 0 9 に示されるアミノ酸配列を有し ; かつ

(i i i) 前記第 3 の軽鎖 C D R は、配列番号 1 1 0 に示されるアミノ酸配列を有する。

【請求項 5】

前記抗体または抗体フラグメントは、抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、全長抗体、抗体変異体、多価抗体、および抗体フラグメントからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 6】

前記抗体または抗体フラグメントは、 1×10^{-8} M 以下の親和性で L P A に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 7】

前記抗体または抗体フラグメントは、 1×10^{-9} M 以下の親和性で L P A に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 8】

担体、および、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントを含有する、ことを特徴とする組成物。

【請求項 9】

望ましくない、過剰なまたは異常なレベルの L P A に関連した疾病、疾患または状態に対する薬剤を調製するための請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントの使用であって、

前記疾病または疾患は、癌を含む過剰増殖性疾患 ; 自己免疫疾患・他移植片拒絶・移植片対宿主病を含む免疫関連疾患 ; 神経変性疾患 ; 肥満 ; 2 型糖尿病 ; 黄斑変性症を含む眼疾患 ; 疼痛 ; 異常な血管形成または新血管新生に関連する疾患 ; アポトーシス ; 強皮症・肺線維症・腎線維症・皮膚線維症・心筋線維症・肝線維症を含む線維形成または線維症 ; 創傷の修復および治癒 ; およびクモ咬傷からなる群から選択される、抗体または抗体フラグメントの使用。

【請求項 10】

下記 a . 単離核酸分子、 b . ベクター、または c . 宿主細胞の少なくともいずれか一つを含有する組成物 :

a . 単離核酸分子は、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントの重鎖または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み ;

b . ベクターは、上記 a . に記載の核酸分子を含む核酸分子を備える ;

c . 宿主細胞は、(i) 上記 a . に記載の核酸分子を含む核酸分子、あるいは、(i i) 上記 b . に記載のベクターでトランスフェクションされたものである。

【請求項 11】

試料中のリゾホスファチジン酸 (L P A) を検出する方法であって、

抗体または抗体フラグメントが L P A に結合可能な条件下で、試料中の L P A と請求項

10

20

30

40

50

1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントとの結合を検出し、ここで：

a . 前記試料は、バイオプシー試料である組織試料、または、全血、血漿、血清、尿、精液、胆汁、房水、硝子体液、粘液、気管支肺胞上皮洗浄液、および痰からなる群から選択される体液試料である；および/または

b . 当該方法は、さらに下記 (i) ~ (i i i) の少なくとも一つを含む：

(i) 線維症マーカーの少なくとも 1 つの検出；

(i i) 前記試料中の L P A レベルと同種の健常動物から得た L P A の基準レベルとの比較、ここで、基準レベルよりも相対的に高い L P A レベルが、病気の存在と関連している；

(i i i) 前記試料中の L P A レベルと望ましい L P A レベルとの比較。

10

【請求項 1 2】

試料中のリゾホスファチジン酸 (L P A) を検出するために用いられる E L I S A キットであって、

当該キットは、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントを含む、ことを特徴とする E L I S A キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、本出願者が所有する 2007 年 5 月 30 日に出願された仮出願番号 60 / 940 , 964 の利益および優先権を主張するものであり、その全体を参照により本明細書に援用する。

20

【0002】

本発明は、リゾホスファチジン酸 (L P A) とその変異体に結合する薬剤、特に、生理学的条件下で L P A に対して特異的に反応する、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、抗体誘導体に関する。かかる薬剤は、かかる薬剤を含む医薬品組成物の送達を介して、様々な疾患または障害の治療および/または予防に使用できる。

【0003】

L P A は、多様な細胞タイプにおいて、増殖、分化、血管形成、運動性、アポトーシスからの保護を含む、多数の細胞応答を媒介する生理活性脂質の 1 つである。

L P A は、成長を促す腫瘍のマイクロ環境を提供し、血管形成を促進することにより、ガンの形成と進行に関与する。さらに、L P A は、線維症、黄斑変性症のような眼病、ならびに疼痛に関連する障害にも関連している。したがって、L P A を中和するための抗体を使用するアプローチは、これらの適応症のための現行の治療手段を増やす潜在的可能性を提供する。

30

【0004】

本発明者らは、L P A に対する高親和性、特異的モノクローナル抗体ファミリーを発明したが、その 1 つは、L p a t h o m a b または L T 3 0 0 0 として公知である。ガン、線維症、眼疾患の様々な動物モデルにおける L p a t h o m a b の有効性は、このクラスの抗 L P A 抗体 (およびそれに由来する分子) の、例えば、悪性腫瘍、血管形成、線維症に関連する障害の治療における有用性を強調する。

40

【背景技術】

【0005】

1 . はじめに

以下に記載の説明は、本発明を理解するために役に立ち得る情報を含む。ここに記載するいかなる情報、またはここに明示的または暗示的に引用するいかなる刊行物も、ここで請求される発明の従来技術であること、または特別に関連性があることさえも認めるものではない。

【0006】

2 . 背景

生理活性シグナル伝達脂質

50

脂質とそれらの誘導体は現在、単なる細胞膜中の1つの構造エレメントまたは酸化、解糖などの代謝プロセスの源としてではなく、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、ある種の生理活性脂質は、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。原形質膜に由来する脂質のほとんどは、構造的役割のみを果たしているにもかかわらず、それらの小部分は、細胞外刺激の細胞内への取り次ぎに参与している。これらの脂質は「生理活性脂質」、または「生理活性シグナル伝達脂質」と呼ばれている。「脂質シグナル伝達」とは、細胞膜脂質を第二のメッセンジャーとして使用する多数の細胞シグナル伝達経路のうちのいずれかを意味し、ならびに脂質シグナル伝達分子とその特異的レセプターとの直接的相互作用を意味する。脂質シグナル伝達経路は、増殖因子から炎症性サイトカインに至る様々な細胞外刺激によって活性化され、アポトーシス、分化、増殖のような細胞運命の決定を制御する。生理活性脂質シグナル伝達の研究は、精力的に科学的研究が推し進められている分野であり、ますます多くの生理活性脂質が同定され、その作用が特徴づけられている。

10

【0007】

生理活性脂質の例は、エイコサノイド（カンナビノイド、ロイコトリエン、プロスタグランジン、リポキシン、エポキシエイコサトリエン酸、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、リン脂質およびホスファチジン酸（PA）、ホスファチジルグリセロール（PG）のようなそれらの誘導体、血小板活性化因子（PAF）およびカルジオリピン、ならびにリゾホスファチジルコリン（LPC）および種々のリゾホスファチジン酸（LPA）のようなリゾリン脂質を含む。生理活性シグナル伝達脂質はまた、スフィンゴミエリン、セラミド、セラミド-1-リン酸、スフィンゴシン、スフィンゴシルホスホリルコリン、スフィンガニン、スフィンガニン-1-リン酸（ジヒドロ-S1P）、スフィンゴシン-1-リン酸のようなスフィンゴ脂質を含む。スフィンゴ脂質およびそれらの誘導体は、重要な細胞プロセスに多面発現効果を有する細胞外および細胞内シグナル伝達分子のグループを代表する。生理活性シグナル伝達脂質のその他の例は、ホスファチジルイノシトール（PI）、ホスファチジルエタノールアミン（PEA）、ジアシルグリセリド（DG）、スルファチド、ガングリオシド、セレブロシドを含む。

20

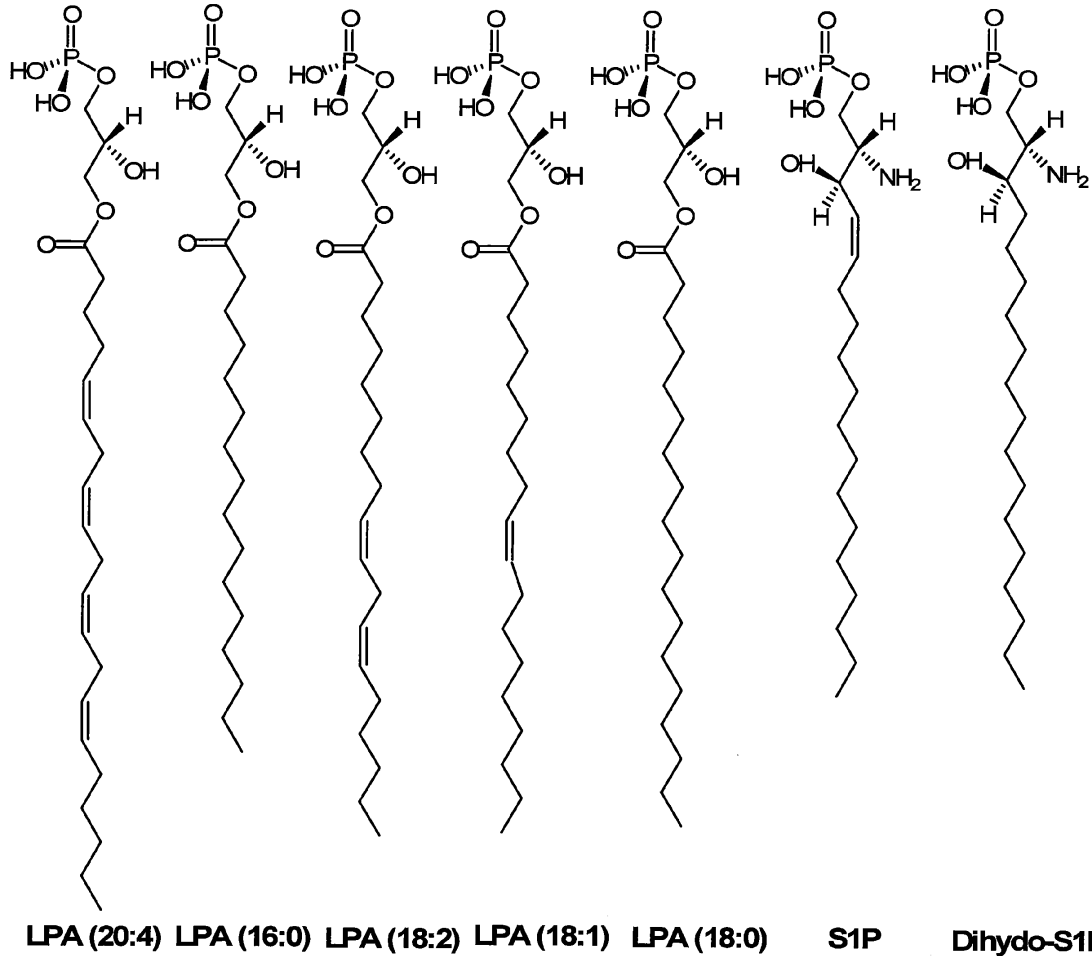
【0008】

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、1つの炭化水素主鎖と1つのリン酸基を含む1つの極性頭基を含む、低分子量（一般的には約500ダルトン未満）の脂質である。リゾ脂質のあるものは、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つの具体的な例は、LPA（グリセロール主鎖）とS1P（スフィンゴイド主鎖）である。特定のLPA、S1P、ジヒドロS1Pの構造を以下に示す。

30

【化1】



10

20

【0009】

LPAの構造主鎖は、ホスファチジルコリン(PC)またはホスファチジン酸(PA)のようなグリセロールを核とするリン脂質に由来する。S1Pのようなリゾスフィンゴ脂質の場合は、セラミド主鎖の脂肪酸が欠失している。S1P、ジヒドロS1P(DHS1P)、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)の構造主鎖は、スフィンゴミエリン由来のスフィンゴシンを核にしている。

30

【0010】

LPAとS1Pは、同一クラスの複数の膜貫通ドメインGタンパク質共役型レセプター(GPCR)に結合することによって、様々な細胞シグナル伝達経路を制御する。S1Pレセプターは、S1P1、S1P2、S1P3、S1P4、S1P5(かつてはEDG-1、EDG-5/AGR16、EDG-3、EDG-6、EDG-8)と呼ばれ、LPAレセプターは、LPA1、LPA2、LPA3(かつてはEDG-2、EDG-4、EDG-7)と呼ばれる。このファミリーの第4のLPAレセプターは、LPA(LPA4)として同定されており、これらのリゾリン脂質のその他の推定レセプターも報告されている。

40

【0011】

LPAとS1Pは、Tリンパ球およびBリンパ球のような免疫関連細胞の調節を介し、免疫応答においてある種の役割を果たしている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制御している。特に、S1Pは、末梢循環中へのリンパ球の放出を制御すると考えられている。したがって、LPAとS1Pに結合する薬剤は、望ましくない、過剰なまたは異常な免疫応答を低減するための方法、ならびに、ある種の血液ガン、およびリンパ球の望ましくない、過剰なまたは異常な関与および/または異常な免疫応答に関連する自己免疫疾

50

患を含む、疾患および状態の治療に有効であると考えられる。

【0012】

a. リゾホスファチジン酸 (LPA)

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、 < 500 ダルトン) は、1つの炭化水素主鎖と1つのリン酸基を含む1つの極性頭基からなる。LPAは、単一分子実体ではなく、異なる長さや飽和度からなる脂肪酸を有する内在性構造変異体の総称である。生物学的に関連性のあるLPAの変異体は、18:2、18:1、18:0、16:0、20:4を含む。飽和脂肪酸 (16:0および18:0) と不飽和脂肪酸 (16:1、18:1、18:2、20:4) の両方を有するLPA種が、血清と血漿中に検出されている。血液中に存在する主な種は16:0、18:1、18:2、20:4のLPAイソ型である。

10

有意な濃度 ($> 1 \mu\text{M}$) の生理活性LPAが、血清、唾液、卵胞液、悪性浸出液を含む様々な体液中に検出できる。

本発明は、その形態の中から、以下に詳細に説明するように、増殖過剰性障害およびその他の様々な疾患の治療または予防に有効な抗LPA薬剤を提供する。特に、本発明の特定の実施態様は、限定はされないが、LPAの18:2、18:1、18:0、16:0、20:4変異体を含む、LPAを標的とする抗体を導出する。

【0013】

LPAは、真核および原核細胞双方におけるリン脂質生合成の前駆体として長く公知であったが、LPAが、活性化された細胞 (特に血小板) によって迅速に生成・放出され、特定の細胞表面レセプターに作用することによって標的細胞に影響を及ぼすシグナル伝達分子として浮上したのは、ごく最近のことである。小胞体中で合成され、より複雑なリン脂質に処理されることに加え、LPAは、細胞活性化後に先在のリン脂質の加水分解によって生成されることができ、例えば、脱アシル化によって、sn-2位は通常、脂肪酸残基を欠失し、その結果、sn-3ヒドロキシル基のみが脂肪酸とエステル結合する。さらに、LPA産生に係わる主要な酵素であるオートタキシン (リゾPLD/NPP2) は、多数の種類の腫瘍がオートタキシンの発現量を増加させるため、発癌遺伝子の生成物であり得る。高感度かつ特異的なLC/MS法を用いた算出を含め、ヒト血漿および血清中のLPA濃度が報告されている。例えば、25°Cで1時間放置された新鮮ヒト血清中のLPA濃度は約1.2 mMと推定されており、LPA類似体16:0、18:1、18:2、20:4が主要種である。同様に、25°Cで1時間放置された新鮮ヒト血漿中のLPA濃度は、約0.7 mMと推定されており、18:1および18:2 LPAが主要種である。

20

30

【0014】

LPAは、複数の膜貫通Gタンパク質共役型レセプター (GPCR) の1つのクラスに結合することによって、その生物学的機能を優先的に媒介する。LPA1~5と呼ばれる5つのLPA特異的GPCRがこれまでに同定されており、それらは、重複的および独特なシグナル伝達特性と組織発現を呈する。LPA1~3レセプターは、GPCRの所謂EDGサブファミリー (EGD2/LPA1、EDG4/LPA2、EDG7/LPA3) に属し、互いに50%の配列類似性を有する。これらのレセプターに最も近いものは、生理活性脂質2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) とアラキドノイルエタノールアミンに結合するカンナビノイドCB1レセプターである。LPA4 (かつてのGPR23/p2y9) とLPA5 (かつてのGPR92) と呼ばれる2つの新しく同定されたLPAレセプターは、P2Yヌクレオチドレセプターにさらに密接に関連している。また、LPAは、細胞内レセプターであるPPRを認識する。

40

【0015】

LPA1は、広範囲の組織と臓器において発現するが、LPA2とLPA3はより限定された発現プロファイルを呈する。しかしながら、LPA2と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ており、これはLPA2とLPA3が病態生理学的状況において主要な役割を果たすことを示唆する。

50

これらのレセプターの役割は、マウスにおけるレセプターノックアウト研究によって一部解明されている。LPA1欠損マウスは、嗅覚障害に起因する吸入異常による一部の出生後死亡率を示している。LPA1欠損マウスはまた、プレオマイシン誘導性肺損傷による肺線維症から保護される。さらに、LPA1レセプター遺伝子を欠損するマウスは、神経損傷誘導性の神経障害性疼痛行動と現象を生じない。

【0016】

これとは対照的に、LPA2レセプターを欠損するマウスは、正常に見える。LPA3レセプターノックアウトマウスは、胚盤胞移植の遅延と胚のスペーシングの改変のために、産仔数が少なく、LPA3欠損動物の子宮は、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)発現とプロスタグランジン合成の低下を示す。LPA3欠損メスマウスへのPGE2投与は、着床異常をレスキューすることが報告されている。

10

LPAは、細胞増殖の誘導、細胞移動の刺激および神経突起の退縮、ギャップ結合の閉鎖、粘菌の走化性を含む、広範な生物学的応答に影響を及ぼす。LPAの生物学に関する知識体系は、より多くの細胞系がLPA応答性について試験されているため、さらに増え続けている。LPAの主要な生理学および病態生理学的作用は、例えば、以下を含む。

【0017】

(創傷治癒)

細胞の成長と増殖を刺激することに加えて、LPAは、創傷の修復と再生における重要なイベントである、細胞張力と細胞表面のフィブロネクチン結合を促進することが現在公知である。

20

アポトーシス：最近では、抗アポトーシス活性もまたLPAに帰するとされ、ペルオキシソーム増殖レセプターは、LPAのレセプター/標的であることが最近報告されている。

【0018】

(血管の成熟)

LPA産生の役割を担う分泌型リゾホスホリパーゼDであるオートタキシンは、血管形成の発達段階に必須である。さらに、不飽和LPAは、血管平滑筋細胞脱分化の誘導に主要な役割を担うことが明らかにされた。

浮腫と血管透過性：LPAは、マウスにおいて、血漿浸出とヒスタミンの遊離を誘導する。

30

【0019】

(炎症)

LPAは、ヒト角膜上皮細胞において炎症メディエーターとして作用する。LPAは、角膜創傷治癒に関与し、水晶体におけるROSの放出を刺激する。LPAはまた、ウサギ角膜において、HSV-1を再活性化できる。

毒蜘蛛、*Loxosceles reclusa* (ブラウンレクルーススパイダー)の咬刺傷は、重篤で長期にわたり持続する組織損傷を起因し、時には死に至ることがある、壊死性潰瘍を引き起こす。この蜘蛛の咬刺傷から生じる創傷の病態は、AAとプロスタグランジンに媒介される激烈な炎症反応からなる。L. reclusa蜘蛛毒素の主成分は、しばしばスフィンゴミエリナーゼD(SMase D)と呼ばれる、スフィンゴミエリンを加水分解してC1Pを生成する、ホスホリパーゼD酵素である。ところが、様々な頭基を有するリゾリン脂質は、L. reclusa酵素によって加水分解されて、LPAを放出することが分かっている。本発明によるもののような抗LPA薬剤は、限定はされないが、L. reclusa毒物注入に起因する炎症を含む、様々なタイプの炎症の低減または治療に有効であると考えられている。

40

【0020】

(線維症および癒痕形成)

LPAは、真皮線維芽細胞において、ERK依存経路を介して、TGFが媒介するI型コラーゲンmRNAの安定性の刺激作用を抑制する。さらに、LPAは、コラーゲン遺伝子発現と線維芽細胞の増殖を刺激することによって、ある程度の直接的な線維形成効果を

50

有する。

【0021】

(免疫応答)

LPAは、S1Pのように、免疫関連細胞の調節を介して、免疫応答に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制御する。

したがって、Lpath社の抗LPAモノクローナル抗体のような、LPAの有効濃度を低下させる薬剤は、望ましくない、または過剰な、または異常なLPA濃度に関連する、創傷治癒および線維症、アポトーシス、血管形成および血管新生、血管透過性、炎症に関連する疾患と状態を治療するための方法において有効であると考えられる。

10

最近、本出願人は、LPA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LPA抗体は、様々なLPAを中和し、それらの生物学的および薬理学的作用を緩和することができる。抗LPA抗体は、したがって、過剰な、望ましくない、または異常なLPA濃度に関連する様々な疾患および状態の予防および/または治療に有効であると考えられる。

【0022】

LPAを迅速かつ特異的に検出する方法も望まれている。薄層クロマトグラフィー(TLC)とそれに続くガスクロマトグラフィー(GC)および/または質量分析(MS)のような技術を使用して、LPAのようなリン脂質を分離し半定量的測定する方法は公知である。例えば、脂質は、体液のテストサンプルから抽出され得る。一方、薄層クロマトグラフィーを使って、様々なリン脂質を分離することができる。リン脂質とリゾリン脂質は、さらに、例えば、紫外線を使用して、プレート上で可視化することができる。他方、リゾリン脂質濃度は、リン脂質から分離後、あるいはリン脂質の一部として、NMRまたはHPLCによって同定することができる。また、卵巣癌患者から採取した腹水中のLPA濃度が、培養真核細胞に対するリゾPA特異的効果に依拠するアッセイを用いて測定されている。ただし、これらの従来の方法は、時間を要し、高価であり、値にばらつきがあり、一般的には半定量的でしかない。生体液中のLPAのようなリゾリン脂質検出のための酵素法、ならびにリゾリン脂質濃度の変化に関連する状態を関連づけ、検出するための酵素法もまた公知である。米国特許第6,255,063号および6,248,553号は当初、Atairgin Technologies, Inc.に譲渡されていたが、現在は本発明と共に所有されている。

20

30

【0023】

3. 定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明との関連において使用されるいくつかの用語の定義を行う。これらの用語に加えて、他の用語も本明細書の他の箇所で、必要に応じて定義されている。本明細書に特に定義しない限り、本明細書に使用する技術用語は、それらの技術分野において認識されている意味を有する。

【0024】

「異常な」という用語は、例えば、タンパク質または生理活性脂質のような細胞内標的物の量または有効濃度に関連して、過剰である、または望ましくないことを意味する。

40

【0025】

「抗体」(Ab)または「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、免疫グロブリン遺伝子、またはそのフラグメントに由来し、それらをモデルとする、またはそれらによってコード化される、抗原またはエピトープと結合可能な、あらゆる形態のペプチド、ポリペプチドを意味する。例えば、Immunobiology(免疫生物学)、第5版、C. A. Janeway, P. Travers, M., Walport, M. J. Shlomchik ed. 編集 Garland Publishing(2001)を参照。「抗体」という用語は、本明細書では最も広範な意味で使用され、モノクローナル、ポリクローナル、多重特異性抗体、ミニ抗体、ヘテロコンジュゲート、二重特異性抗体、三重特異性抗体、キメラ抗体、合成抗体、抗体フラグメント、親抗体のCDR(

50

または抗原結合活性を保有するその変異体)を使用する結合剤を包含する。抗体は、本明細書において、親抗体の所望する活性を少なくとも1つ保有するものとして定義される。望ましい活性には、特異的に抗原に結合する能力、インビトロで増殖を抑制する能力、インビボで血管形成を抑制する能力、ならびにインビトロでサイトカインプロファイルを改変する能力が含まれ得る。本明細書において、抗体および抗体フラグメント、変異体、誘導体は、「免疫由来部分」と呼ばれることもあり、そのような分子、または少なくともそれらの抗原結合部位は、抗LPA抗体に由来している。

【0026】

自然抗体(天然免疫グロブリン)は、通常約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、典型的には、2本の同一な軽(L)鎖と2本の同一な重(H)鎖からなる。各軽鎖は、典型的には、1つの共有結合であるジスルフィド結合によって重鎖に連結されており、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異なる。各重鎖と軽鎖はまた、規則正しく間隔をおく鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端に1つの可変ドメイン(VH)とそれに続く複数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に1つの可変ドメイン(VL)を有し、さらにもう一端に1つの定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖の可変ドメイン間に界面を形成する。

10

【0027】

あらゆる脊椎動物種に由来する抗体(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いて、2つの明らかに異なるタイプ、カッパ()とラムダ()のうち1つに割り当てられ得る。

20

【0028】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に従って、免疫グロブリンは、それぞれ異なるクラスに割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主要クラスがある。IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、そしてこれらのいくつかはさらに、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgA2といったサブクラス(アイソタイプ)に分割され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ()、デルタ()、エプシロン()、ガンマ()、ミュー(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の構造と三次元立体配置は公知である。

30

【0029】

「抗体誘導体」とは免疫由来部分であり、即ち、抗体に由来する分子である。これは、例えば、抗原に対して所望する量の結合活性を保有する、抗体変異体、抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、多価抗体、複合抗体などと理解される。

【0030】

本明細書に使用する場合、「抗体フラグメント」とは、抗原結合部位またはインタクト(無傷)な抗体の可変領域を含む、インタクトな抗体の一部分を意味し、この部分は、インタクトな抗体のFc領域の定常重鎖ドメイン(例えば、CH2、CH3、CH4)を含まなくてよい。一方、定常重鎖ドメイン部分(例えば、CH2、CH3、CH4)は、「抗体フラグメント」に含まれてもよい。抗体フラグメントは抗原結合を保有し、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fvフラグメント、二重特異性抗体、三重特異性抗体、単鎖抗体分子(Sc-Fv)、抗体フラグメントから形成されるミニ抗体、ナノ抗体、多重特異性抗体を含む。抗体をパepsin消化すると、「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一な抗原結合フラグメントが生成され、そのそれぞれが1つの抗原結合部位と、その名が示すように容易に結晶化する能力を有する1つの残「Fc」フラグメントを有する。pepsin処理は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を交差する能力を有する、F(ab')₂フラグメントを産生する。一例として、Fabフラグメントには、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン(CH1)が含まれる。「Fv」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む最も小さな抗体フラグメントである。この領域は、堅

40

50

固に非共有結合する1本の重鎖と1本の軽鎖可変ドメインの二量体からなる。各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用するこの立体構造によって、VH-VL二量体表面の抗原結合部位が決定される。つまり、6つの超可変領域が、抗体に抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、たった1つの可変ドメイン(つまり、抗原に対して特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりは親和性は低いものの、抗原を認識かつ結合する能力を有する。「単鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは、一本のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、Fvポリペプチドはさらに、VHとVLドメイン間に1つのポリペプチドリンカーを含み、これによってsFvは、抗原結合のために望ましい構造を形成できる。sFvについての総説は、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (モノクローナル抗体の薬理学)、vol. 113, Rosenberg and Moore編集。Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)のPluckthunを参照。

10

【0031】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン(CH1)を含む。Fab'フラグメントは、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含むいくつかの残基が付加されている点がFabフラグメントと異なる。Fab'-SHは、本明細書では、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担うFab'の呼称である。F(ab')₂抗体フラグメントは、元来、ヒンジシステインを間に有する1対のFab'フラグメントとして生成された。抗体フラグメントのその他のケミカルカップリングも公知である。

20

【0032】

「変異型」抗LPA抗体は、本明細書では、抗体配列中の1つ以上のアミノ酸残基の付加、欠失および/または置換によって、自然抗LPA抗体アミノ酸配列とアミノ酸配列が異なり、抗結合親抗体の所望する活性を少なくとも1つ保有する分子を意味する。望ましい活性には、特異的に抗原に結合する能力、インビトロで増殖を抑制する能力、インビボで血管形成を抑制する能力、ならびにインビトロでサイトカインプロファイルを改変する能力が含まれ得る。抗体変異体におけるアミノ酸の変化は、軽鎖および/または重鎖の可変領域または定常領域内で、Fc領域、Fab領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、ヒンジ領域を含み得る。1つの実施態様では、変異体は、親抗体の1つ以上の超可変領域に、1つ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、変異体は、親抗体の1つ以上の超可変領域に、少なくとも1つ、例えば、約1~約10個、好ましくは約2~約5個の置換を含み得る。通常、変異体は、親抗体の重鎖または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも65%、より好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは80%、それより好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。ある状況においては、少なくとも50%の配列同一性が好ましく、その場合、分子の他の特徴が、結合および特異性のような所望する属性を備える。この配列に関する同一性または相同性は、本明細書では、配列同一性の割合を最大値にするために、必要に応じて配列を整合しギャップを導入した後の、親抗体残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の百分率(%)として定義される。抗体配列へのN末端、C末端、または配列内部の伸長、欠失、または挿入のいずれも、配列同一性または相同性に影響を及ぼすものとは解釈されない。変異体は、LPAに結合する能力を保有し、好ましくは、親抗体のそれよりも優れた所望活性を有する。例えば、変異体は、より強い結合親和性、血管形成を低下および/または腫瘍の進行を停止させる強力な能力を有し得る。かかる所望の特性(例えば、低免疫性、半減期の延長、強力な安定性、強力な力価)を分析するためには、例えば、抗スフィンゴ脂質抗体の型式が本明細書に開示する生物活性検定法においてその活性に影響を及ぼすことが発見されているため、変異体のFab型を親抗体のFab型と比較したり、変異体の全長型を親抗体の全長型と比較すべきである。本明細書で特に関心の対象となる変異型抗体は、少なくとも

30

40

50

1つの所望する活性を少なくとも約10倍、好ましくは少なくとも約5%、25%、59%またはそれ以上を示すものであり得る。好ましい変異体は、親抗体と比較するとき、インビトロ測定の際に優れた生物物理学的特性を有するか、あるいはインビトロまたはインビボ測定の際に優れた生物活性を有するものである。

【0033】

「抗LPA薬剤」とは、LPAに結合する治療薬を意味し、抗体、抗体変異体、抗体由来分子、またはLPAまたはその変異体に結合する非抗体由来部分を含む。

「生理活性脂質」とは、脂質シグナル伝達分子を意味する。生理活性脂質は、細胞外および/または細胞内シグナル伝達を媒介し、したがって、分化、移動、増殖、分泌、生存、その他のプロセスを調節することによって、多種の細胞の機能制御に参与するという点において、構造脂質（例えば、膜結合リン脂質）と区別される。インビボで、生理活性脂質は、細胞外液中に見出され、その他の分子、例えば、アルブミンおよびリポタンパク質のような血清タンパク質とコンジュゲートを形成するか、「遊離」型、即ち、その他の分子種とコンジュゲートを形成しない状態で存在し得る。細胞外メディエーターとして、生理活性脂質の一部は、膜結合イオンチャネルまたはGタンパク質共役レセプターまたは酵素、あるいは因子を活性化することにより細胞シグナル伝達を改変し、その結果として、複雑なシグナル伝達系を活性化し、細胞機能または生存に変化をもたらす。細胞内メディエーターとして、生理活性脂質は、酵素のような細胞内コンポーネント、またはイオンチャネル、またはアクチンのような構造エレメントと直接相互作用することによって、それらの作用を発揮することができる。

【0034】

生理活性脂質の例は、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)、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)のようなスフィンゴ脂質を含む。スフィンゴ脂質およびそれらの誘導体と代謝物は、(スフィンゴミエリン由来の)スフィンゴイド主鎖によって特徴づけられる。スフィンゴ脂質およびそれらの誘導体と代謝物は、重要な細胞プロセスに多面発現効果を有する、一群の細胞外および細胞内シグナル伝達分子である。それらは、スルファチド、ガングリオシド、セレプロシドを含む。その他の生理活性脂質は、グリセロールを核とする主鎖によって特徴づけられ、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)のようなリゾリン脂質、ならびに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)、ホスファチジン酸、血小板活性化因子(PAF)、カルジオリピン、ホスファチジルグリセロール(PG)、ジアシルグリセリド(DG)である。さらに、その他の生理活性脂質はアラキドン酸に由来し、エイコサノイド(HETE、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(epoxyeicosatrienoic acids)、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を含む。その他のリン脂質とそれらの誘導体を含む、その他の生理活性脂質もまた、本発明に従って使用し得る。

【0035】

本発明のいくつかの実施態様では、抗体産生には、スフィンゴシンを核とする生理活性脂質(スフィンゴシンおよびS1Pのように、スフィンゴイド主鎖を有するもの)に対して、グリセロールを核とする生理活性脂質(LPAのようにグリセロール由来の主鎖を有するもの)を標的にすることが好ましい場合がある。その他の実施態様では、抗体生成にはアラキドン酸由来の生理活性脂質を標的にすることが好ましい場合があり、その他の実施態様では、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の生理活性脂質が好ましい。合わせて、アラキドン酸由来およびグリセロール由来の生理活性脂質は、本明細書では、「非スフィンゴイド生理活性脂質」と呼ぶ。

【0036】

本発明に従う生理活性脂質のクラスから特に除外されるものは、主として細胞膜の内側および/または外側小葉の構造メンバーとして機能する、ホスファチジルコリンとホスホ

チジルセリン、ならびにそれらの代謝物と誘導体である。

抗体または抗体フラグメントあるいは変異体との関連における「生物活性」という用語は、所望するエピトープに結合可能であり、かつ何らかの方法で生物学的作用を発現できる抗体、または抗体フラグメント、または抗体変異体を意味する。生物学的作用は、以下に限定はされないが、成長シグナルの調節、抗アポトーシスシグナルの調節、アポトーシスシグナルの調節、エフェクター機能カスケードの調節、その他のリガンド相互作用の調節を含む。

【 0 0 3 7 】

「バイオマーカー」とは、疾患の進行または治療効果を測定する上で有用となる特定の分子特性を有する、体内に存在する特定の生化学物質である。例えば、S 1 Pは、ある種の増殖過剰および/または心血管系状態のバイオマーカーである。

10

【 0 0 3 8 】

「心血管系治療」とは、心臓治療（心筋虚血症および心不全の治療）、ならびに心臓疾患のような心血管系に関連するその他の疾患の予防および/または治療を包含する。「心臓疾患」とは、心臓または心筋組織に関するあらゆる種類の疾患、障害、外傷または外科処置を包含する。特に関心の対象となるのは、組織リモデリングに関連する状態である。

「心疾患治療剤」とは、心臓および心筋の疾患と障害に起因する、あるいは関連する疾患と障害に対して治療効果のある薬剤を意味する。

【 0 0 3 9 】

「担体」とは、ハプテンに結合し、それによってハプテンを免疫原性とするために用いられる成分である。担体を代表するが、それに限定されることはない担体のクラスはタンパク質であり、その例は、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、血球凝集素、破傷風、ジフテリアトキソイドを含む。本発明に従う用途に適する担体のその他のクラスおよび例は、当該分野に公知である。これら、ならびに将来発見または発明される天然由来または合成担体は、本発明に従う用途に適応され得る。

20

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養」という表現は、互換性を持って使用され、かかるすべての呼称は、プロジェニー（子孫）を含む。したがって、「形質転換体」と「形質転換細胞」という用語は、トランスファー数に関係なく得られた一次的な対象細胞と培養を含む。なお、故意による、あるいは偶発性の突然変異のために、すべてのプロジェニーは、DNA含有量において正確に同一でない可能性もある。当初の形質転換細胞においてスクリーンされるものと同じ機能または生体活性を有する突然変異体プロジェニーは含まれる。個別に呼称することを意図する場合、それは文脈から明らかになるであろう。

30

【 0 0 4 1 】

「化学療法剤」という用語は、抗癌剤およびその他の抗増殖過剰剤を意味する。したがって、化学療法剤は、一般的な治療薬のサブセットである。化学療法剤は、限定されることはないが、以下を含む。DNA損傷剤およびDNA合成阻害剤：アントラサイクリン（ドキシソルピシン、ドノルピシン、エピルピシン）、アルキル化薬（ベンダムスチン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロランブシル、シクロホスファミド、ダカルバジン、ヘキサメチルメラミン、イフォスファミド、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、ミトタン、マイトマイシン、ピポプロマン、プロカルバジン、ストレプトゾシン、チオテパ、およびトリエチレンメラミン）、白金誘導体（シスプラチン、カルボプラチン、シスジアミン - ジクロロ白金）およびトポイソメラーゼ阻害薬（Camptosar）、カペシタピン、クロロデオキシアデノシン、シタラビン（およびその活性化型、ara-CMP）、シトシンアラビノシド、デカルバジン、フロクスウリジン、フルダラピン、5 - フルオロウラシル、5 - DFUR、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、6 - メルカプトプリン、メトトレキサート、ペントスタチン、トリメトキサート、6 - チオグアニンなどの代謝拮抗剤、血管新生阻害薬（ベバシズマブ、サリドマイド、スニチニブ、レナリドマイド、TNP - 470、2 - メトキシエスタンジオール、ラニズマブ、ソラフェ

40

50

ニブ、エルロチニブ、ボルテゾミブ、ペガブタニブ、エンドスタチン)、血管破壊剤(フラボノイド/フラボン、DMXAA、CA4DP、ZD6126、AVE8062Aなどのようなコンプレタスタチン誘導体)、抗体のような生物製剤(ハーセプチン、アバスタチン、パノレックス、リツキサン、ゼバリン、マイロタグ、カンパス、ベクサー、エルビタックス)、内分泌療法、アロマターゼ阻害薬(4-ヒドロアンドロステネジオン、エキセメスタン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、レトロゾール)、抗エストロゲン(タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ファスロデックス)、デキサメタゾンのようなステロイド、免疫調節薬、IFN- およびIL2のようなサイトカイン)、インテグリン阻害薬、その他の接着タンパク質とマトリックスメタロプロテイナーゼ)、スベロイルアニリドヒドロキサム酸のようなヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、イマチニブ(グリベック)のようなチロシンキナーゼ阻害薬のようなシグナル伝達阻害薬、17-N-アリルアミノ-17-脱メトキシゲルダナマイシンのような熱ショックタンパク質阻害薬、オールトランスレチノイン酸のようなレチノイド、成長因子レセプターまたは成長因子の阻害薬、タキソイド(パクリタキセル、ドセタキセル、タキソテール、BAY 59-8862)、ナベルピン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピンのような抗有糸分裂化合物および/またはチューブリン-脱ポリマー化剤、COX阻害薬のような抗炎症薬と細胞サイクル制御薬(例えば、チェックポイント制御薬およびテロメラーゼ阻害薬)。

10

【0042】

「キメラ」抗体(または、免疫グロブリン)という用語は、特定種に由来する、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一または相同である1本の重鎖および/または軽鎖からなり、その一方で、残りの鎖は他種に由来する、または他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一または相同である分子を意味し、さらにそれらが所望する生物活性を提示する限りにおいては、かかる抗体のフラグメントを意味する(Cabillyら, *infra*, Morrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 81: 6851(1984))。抗体配列は、その起源が脊椎動物または無脊椎動物であってよく、例えば、哺乳類、または鳥類、または魚類由来であって、軟骨魚、齧歯類、イヌ、ネコ、有蹄類、ヒトを含む霊長類に由来し得る。

20

【0043】

「併用療法」という用語は、必要な治療効果を達成するために、少なくとも2つの異なる療法の併用を含む、治療手段を意味し、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、速効性化学療法剤と抗脂質抗体の投与を含んでよい。一方、併用療法は、抗脂質抗体および/または1つ以上の化学療法剤を単独、あるいは放射線治療および/または外科手術のような他の治療の送達と合わせて投与することを含み得る。2つ以上の化学的に異なる活性成分の投与の関連において、その活性成分は、同一組成物の一部または異なる組成物として投与することができる。別々の組成物として投与される場合、異なる活性成分を含む組成物は、同時または異なる時に、同一または異なるルートで、同一または異なる投与計画を用いて、特定の状況が必要とする全て、ならびに担当医師の決定に従って、投与され得る。同様にして、1つ以上の抗脂質抗体種(例えば、抗LPA抗体)が、単独であるいは1つ以上の化学療法剤と併用して、例えば、放射線および/または外科手術と組み合わせられる場合、その薬物は、外科手術または放射線療法の前または後で送達されてよい。

30

40

【0044】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において、機能できる形で連結するコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。原核生物に適するコントロール配列には、例えば、プロモーター、任意にオペレーター配列、リボソーム結合部位が含まれる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、エンハンサーを利用することが公知である。

【0045】

50

「誘導体化生理活性脂質」とは、生理活性脂質、例えばLPAのことであり、1つの極性頭基と少なくとも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、ペンダント反応基〔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、酸塩素基、ハロゲン原子〕で誘導体化されており、このペンダント反応基は保護されていても保護されていなくてもよい。この誘導体化は、分子と反応させるために(例えば、担体とコンジュゲートするために)、生理活性脂質を活性化する役割を果たす。

【0046】

「誘導体化生理活性脂質コンジュゲート」とは、担体に共有結合的にコンジュゲートしている誘導体化された生理活性脂質を意味する。担体は、タンパク質分子またはポリエチレングリコール、コロイド金、アジュバント、シリコーンビーズのような部分であり得る。誘導体化生理活性脂質コンジュゲートは、本発明に従って抗体応答を発生させるための免疫原として使用することができ、同一または異なる生理活性脂質コンジュゲートは、そのようにして産生された抗体検出のための検出試薬として使用され得る。いくつかの実施態様では、誘導体化生理活性脂質コンジュゲートは、検出に使用される際の固体支持体に付着する。

10

【0047】

「二重特異性抗体」とは、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを意味し、そのフラグメントは、同一ポリペプチド鎖に存在する1つの軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された1つの重鎖可変ドメイン(VH)からなる(VH-VL)。同一鎖上の2つのドメイン間に対合を形成するには短すぎるリンカーを使用することで、このドメインは他の鎖の相補ドメインとの対合を余儀なくされ、2つの抗原結合部位が創出される。二重特異性抗体は、例えば、EP 404,097、WO 93/11161、およびHollingerらProc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)に詳説されている。

20

【0048】

「有効濃度」とは、例えば、特定の望ましくない生理活性脂質の、絶対的、相対的、および/または利用可能な濃度および/または活性を意味する。換言すれば、生理活性脂質の有効濃度は、利用可能な、そしてその生体機能を遂行することのできる、脂質の量である。本発明においては、例えば、生理活性脂質(例えば、C1Pなど)に対して誘導されたモノクローナル抗体のような免疫由来部分は、その脂質に結合して、その生体機能の遂行を不可能にすることによって、その脂質の有効濃度を低下させることができる。この例では、脂質自体は依然として存在するが(換言すれば、抗体によって分解されない)、そのレセプターまたはその他の標的に結合して下流効果を生じることがもはやできないため、絶対濃度というよりはむしろ「有効濃度」を測定することが適切である。生理活性脂質の有効濃度を直接および/または間接的に測定するための方法とアッセイが存在する。

30

【0049】

「エピトープ」または「抗原決定基」とは、抗体に由来する抗体の抗原結合部分と反応する抗原部分を意味する。

【0050】

「発現カセット」という用語は、構造遺伝子(即ち、本発明による抗体のようなタンパク質コード配列)の発現を、かかる配列に適合性のある宿主内において、影響することができるヌクレオチド分子を意味する。発現カセットは、ポリペプチドをコードする配列、および、任意に、例えば、転写終止シグナルのようなその他の配列と機能できる形で連結する少なくとも1つのプロモーターを含む。発現に影響するために必要または役に立つその他の制御エレメント(例えば、エンハンサー)を使用してもよい。したがって、発現カセットは、プラスミド、発現ベクター、組み換えウイルス、すべての形態の組み換え型「裸のDNA」ベクターなどを含む。

40

【0051】

「完全ヒト抗体」とは、適切な免疫原を提示されたときに、必ずしもCDR部分の移植

50

を必要としないヒト抗体を産生できる、遺伝子改変（即ち、トランスジェニック）動物、典型的には哺乳類、一般的にはマウス（例えば、Medarex社から購入できるような）において産生される抗体を意味する。これらの抗体は、非ヒト抗体遺伝子が置換あるいは抑制され、ヒト免疫グロブリン遺伝子のいくつかまたは全てで置換されている動物（例えば、トランスジェニックマウス）から産生されるという点で、完全に「ヒト」抗体である。換言すれば、本発明による抗体は、関連するCDRのヒトフレームワークを産生するように遺伝子改変されたマウスまたはその他の動物に免疫原性のある形で提示されたときに、生理活性脂質、特にLPAに対して産生される抗体を含む。

【0052】

「ハプテン」とは、非免疫原性であるが、抗体または抗体由来の抗原結合部分と反応できる物質である。換言すれば、ハプテンは、免疫原性ではなく抗原性の特性を有する。「ハプテン」とは、一般的には、ほとんどの状況下で、例えば、タンパク質、ポリエチレングリコール（PEG）、コロイド金、シリコンビーズなどの担体に付着したときのみ、免疫応答を誘導する（即ち、抗原として作用する）ことができる小分子である。担体は、それ自体では免疫応答を誘導できないものであり得る。

10

【0053】

「ヘテロコンジュゲート抗体」という用語は、共有結合で連結された2つの抗体を意味し得る。かかる抗体は、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。本明細書で使用する場合、「コンジュゲート」という用語は、1つ以上の抗体フラグメントまたは結合部分が1つ以上のポリマー分子に共有結合することによって形成される分子を意味する。

20

【0054】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」型とは、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。または、別の見方をすれば、ヒト化抗体は、ヒト配列の代わりに、非ヒト（例えば、マウス）抗体から選択された配列も含む、ヒト抗体である。ヒト化抗体は、その結合および/または生理活性を顕著に改変しない、同種または異種からの保存的アミノ酸置換または非天然残基を含み得る。かかる抗体は、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。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、所望する特性を有するマウス、ラット、ラクダ、ウシ、ヤギ、ウサギのような非ヒト種（ドナー抗体）のCDRからの残基で置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基で置換されている。

30

【0055】

さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または移入されたCDRやフレームワーク配列のいずれにも見られない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精製かつ最大化するために行われる。したがって、一般的には、ヒト化抗体は、全て、または全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、そして全てまたは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1つの可変ドメイン全体、また1つの形態では2つの可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意に免疫グロブリン定常領域（Fc）の一部、またはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む。例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号、Cabillyら、欧州特許第0,125,023 B1号、Bossら、米国特許第4,816,397号、Bossら、欧州特許第0,120,694 B1号、Neubergerら、WO 86/01533、Neubergerら、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ら、欧州特許出願第0,519,596 A1号、Queenら（1989）Proc. Natl Acad. Sci. USA, vol. 86:10029-10033）を参照。詳細については、Jonesら、Nature 321:522-525（1986）、Reich

40

50

mannら、Nature 332:323-329(1988)、およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)およびHansen, WO2006105062を参照。

【0056】

「増殖過剰疾患」という用語は、限定はされないが、癌および良性腫瘍を起因する臓器や組織細胞の制御不能な増殖を含む、細胞の制御不能な増殖に関連する疾患および障害を意味する。上皮細胞に関連する増殖過剰疾患は、血管腫のような血管形成疾患、子宮内膜症、肥満症、加齢黄斑変性、様々な網膜症、アテローム性動脈硬化治療においてステント留置の結果としての再狭窄を起因する上皮細胞と平滑筋の増殖を引き起こし得る。線維芽細胞に関連する増殖過剰疾患（即ち、線維形成）は、限定はされないが、加齢黄斑変性、心筋梗塞に関連する心臓リモデリングと心不全のような過剰な癒着（即ち、線維症）、ならびに外科手術または傷害、ケロイド、類線維腫とステント留置の結果として通常生じる過剰な創傷治癒を含む。

10

【0057】

「免疫原」とは、特定の免疫応答、特に免疫原を投与された動物において抗体応答を誘導できる分子である。本発明では、免疫原は、担体に結合された誘導体化生理活性脂質、即ち、「誘導体化生理活性脂質コンジュゲート」である。免疫原として使用される誘導体化生理活性脂質コンジュゲートは、この免疫原に対する応答において産生される抗体検出のための捕獲物質として使用され得る。したがって、免疫原は検出試薬としても使用できる。他方、捕獲物質として使用される誘導体化生理活性脂質コンジュゲートは、免疫原とは異なるリンカーおよび/または担体部分を備えていてもよい。

20

【0058】

「阻害する」とは、特に生物学的現象との関連において、減少、または抑制、または遅延することを意味する。例えば、「腫瘍形成の阻害」を生じる治療とは、全く腫瘍を形成しないこと、または腫瘍の形成が遅くなること、または治療していないコントロールよりも腫瘍の数が少なくなることを意味し得る。

【0059】

「単離」組成物とは、天然環境の構成成分から同定および分離された、および/または回収されたものである。天然環境の混入成分とは、抗体の診断または治療用途を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、およびその他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施態様では、この組成物は抗体であり、(1)ローリー法によって測定される抗体の95重量%以上、最も好ましくは99重量%以上まで、または(2)スピニングカップシーケネーターの使用により、少なくとも15残基のN末端または中間部アミノ酸配列を得るに十分な程度まで、または(3)クーマシーブルまたは好ましくは銀染色を用いて、還元または非還元条件下でSDS-PAGEにより均一になるまで、精製される。組み換え細胞内インサイツの抗体は、その抗体の天然環境の少なくとも1つの構成成分が存在しないため、単離抗体に含まれる。しかしながら、通常は、単離抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製される。

30

【0060】

本明細書で使用される場合「標識」という用語は、抗体に直接的または間接的にコンジュゲートされるもののような、検出可能な化合物または組成物を意味する。標識はそれ自体によって検出可能であり（例えば、ラジオアイソトープ標識または蛍光標識）、あるいは酵素標識の場合は、検出可能な基質化合物または組成物の化学的改変を触媒し得る。

40

【0061】

「リポソーム」とは、（本明細書に開示されるスフィンゴ脂質抗体、および任意に化学療法剤のような）薬物を哺乳類に送達するために役に立つ、様々な種類の脂質、リン脂質および/または界面活性剤からなる小胞である。リポソームの構成成分は、一般的には、生体膜の脂質配置と同様に、二重層構造に配置されている。「単離」核酸分子とは、抗体核酸の天然原料と通常関連する少なくとも1つの混入核酸分子から同定および分離された核酸分子である。単離核酸分子は、天然で見いだされる形態または設定以外の状態にある

50

。したがって、単離核酸分子は、天然細胞に存在する核酸分子とは区別される。ただし、単離核酸分子は、例えば、核酸分子が非改変細胞とは異なる染色体上の位置にあるような、通常抗体を発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

【0062】

本発明との関連において、「液性組成物」とは、製造元からエンドユーザー（例えば、医師または看護師）に供給されたときの充填/完成形態が、固体に対して、液体または溶液であるものを意味する。本明細書では、「固体」とは、液体または溶液ではない組成物を意味する。例えば、固体は、凍結乾燥、沈降、類似の方法によって調製された乾燥組成物を含む。

【0063】

本願を全体を通して使用される場合の「線状抗体」という表現は、Zapataら、*Protein Eng.* 8(10):1057-1062(1995)に説明される抗体を意味する。簡潔には、これらの抗体は、1対の抗原結合領域を形成する1対のタンデム（直列）型Fdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）から構成される。線状抗体は、二特異性または単一特異性であり得る。

【0064】

「代謝物」という用語は、それからLPAが生成される化合物、ならびにLPAの分解に起因する化合物、即ち、リゾリン脂質代謝経路に關与する化合物を意味する。「代謝前駆体」という用語は、それからスフィンゴ脂質が生成される化合物を指すのに使用される。

【0065】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体(mAb)」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、あるいは前記抗体の集団を意味する。この集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在し得る自然に発生する可能性のある突然変異を除いて、ほぼ同一のものである。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して誘導され、極めて特異的である。さらに、通常は、異なる決定基(エピトープ)に対して誘導される異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体組成物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対して誘導される。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、特定の方法による抗体産生を必要するとは解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら、*Nature* 256:495(1975)によって最初に説明されたハイブリドーマ法、または組み換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照)によって作成し得る。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clacksonら、*Nature* 352:624-628(1991)およびMarksら、*J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)に説明されるテクニク、または当該分野に公知のその他の方法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離され得る。本明細書のモノクローナル抗体は特に、1本の重鎖および/または軽鎖の一部が特定種に由来するまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一または相同であり、残りの鎖(複数でもよい)が他種に由来するまたは他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一または相同であるキメラ抗体、さらにそれらのキメラ抗体が所望する生物活性を提示する限りにおいては、かかる抗体のフラグメントを含む(米国特許番号4,816,567号、およびMorrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

【0066】

「単独療法」とは、単回用量またはある期間にわたって反復用量として投与するにかかわらず、治療効果のある単一の化合物の送達に基づく治療法を意味する。

【0067】

「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して結合特性を有する、抗体、またはモノクローナル抗体を意味し得る。1つの実施態様では、複数

10

20

30

40

50

のエピトープが同一抗原に由来する。他の実施態様では、複数のエピトープが2つ以上の異なる抗原に由来する。多重特異性抗体を作成する方法は、当該分野で公知である。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て、組み換えによって産生し得る。他方、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、当該分野に公知であり得るこれらまたはその他の方法を用いて、多重特異性抗体を産生できる。多重特異性抗体は、多重特異性抗体フラグメントを含む。本発明によって理解される多重特異性（この場合は、二重特異性）抗体の一例は、S1PエピトープとC1Pエピトープに対する結合特性を有し、したがって、S1PとC1Pのどちらも認識かつ結合できる抗体である。本発明によって理解される二重特異性抗体のもう1つの例は、生理活性脂質からのエピトープと細胞表面抗原からのエピトープに対する結合特性を有する抗体である。したがって、抗体は、生理活性脂質を認識かつ結合できるため、例えば、標的目的地、細胞を認識かつ結合できる。

10

【0068】

「新生物」または「癌」とは、異常かつ制御不能な細胞増殖を意味する。「新生物」、または腫瘍あるいは癌は、異常で、制御不能、かつ細胞成長の無秩序な増殖であり、一般的には癌と呼ばれる。新生物は、良性または悪性であり得る。新生物は、破壊的な増殖、侵襲性、転移特性を有する場合は、悪性または癌性である。侵襲性とは、周辺組織の浸潤または破壊、通常、組織の境界を規定する基底膜を破壊し、それによってしばしば身体の循環系に侵入することによる、新生物の局所的な伝播を意味する。転移は通常、リンパ系または血管による腫瘍細胞の播種を意味する。転移はまた、漿液腔、またはくも膜下腔あるいはその他の腔を通じての直接的な伸展による腫瘍細胞の移動を意味する。転移プロセスを通じて、身体の他の部分への腫瘍細胞の移動は、原発部位から離れた場所に新生物を形成する。

20

【0069】

核酸がその他の核酸配列と機能的な関係に配置されている場合、核酸は「機能できる形で連結されている」。例えば、プレ配列または分泌型リーダーのためのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドのDNAと機能できる形で連結されている。プロモーターやエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合、コード配列と機能できる形で連結されている。あるいは、リボソーム結合部位は、翻訳を促進できるように配置されている場合、コード配列と機能できる形で連結されている。一般的に、「機能できる形で連結する」ということは、連結されているDNA配列が近接しており、したがって、分泌型リーダーの場合、近接かつ読み取りフェーズにあることを意味する。ただし、エンハンサーは近接に位置する必要はない。連結は、都合のよい制限部位におけるライゲーション（連結）によって達成される。かかる部位が存在しないならば、従来技術に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

30

【0070】

本明細書において「親」抗体とは、変異体の調製に使用されたアミノ酸配列によってコードされている抗体である。親抗体は、天然抗体または既に、例えばキメラ抗体のように、変異体であってもよい。例えば、親抗体は、ヒト化またはヒト抗体であり得る。

40

【0071】

本発明による「特許性のある」組成物、方法、装置、製品とは、その内容が、鑑定実施時に特許性の全法定要件を満たすことを意味する。例えば、新規性、非自明性などに関して、後の審査によって、1つ以上のクレームが、新規性、非自明性などを打ち消す1つ以上の実施態様を包含することが判明すれば、クレームは、定義上、特許性のある実施態様に限定されるので、特許性のない実施態様を明確に除外する。さらに、本明細書に添付のクレームの範囲は、最も広範で妥当な適用範囲を定め、かつそれらの正当性を保つと解釈されるものである。さらに、本出願の申請時または特許登録時から、1つ以上の付属クレ

50

ームの有効性が疑問視されるまでの間に、1つ以上の特許性の法定要件が補正される場合、またはある特許性の法定要件を満たすか否かを評価するための基準が改変された場合は、クレームは、(1) 有効性を保ち、かつ(2) その条件において最も広範で妥当な解釈を得るように解釈されるものである。

【0072】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明による薬剤および化合物の生物学的有効性と特性を保有し、生物学上であろうがなかろうが望ましくない塩を意味する。多くの場合、本発明による薬剤と化合物は、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の類似基)によって酸および/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、無機および有機塩から調製できる。薬学的に許容される塩についての総説については、B e r g e r (1 9 7 7) J . P h a r m . S c i . , 6 6 , 1 - 1 9 を参照。

10

【0073】

「複数」とは1つ以上を意味する。

「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引き起こすことが可能なすべての配列を含む。したがって、本発明によるコンストラクトで使用されるプロモーターとは、遺伝子転写の時期および/または比率の制御または調節に参与する、シス作用性転写制御エレメントおよび制御配列を含む。例えば、プロモーターは、転写制御に参与する、エンハンサー、プロモーター、転写ターミネーター、複写開始点、染色体組み込み配列、5'および3'非翻訳領域、またはイントロン配列を含む、シス作用性転写調節領域であり得る。本発明の用途に適する転写制御領域は、限定はされないが、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)最初期エンハンサー/プロモーター、SV40初期エンハンサー/プロモーター、E. coli lac または trp プロモーター、原核または真核細胞またはそれらのウィルスの遺伝子発現を調節することが公知であるその他のプロモーターを含む。

20

【0074】

「組み換えDNA」という用語は、人間によって操作、または創出、または改変された核酸とそれから発現する遺伝子産物を意味する。「組み換え」ポリペプチドまたはタンパク質は、組み換えDNA技術によって産生されたポリペプチドまたはタンパク質であり、例えば、所望するポリペプチドまたはタンパク質をコードする外来性DNAコンストラクトによって形質転換された細胞に由来するポリペプチドまたはタンパク質である。「合成」ポリペプチドまたはタンパク質は、化学合成によって調製されたポリペプチドまたはタンパク質である。

30

【0075】

「分離された」、「精製された」、「単離された」などの用語は、試料を収容する容器内に含まれる試料の1つ以上の成分が、容器内に存在する1つ以上のその他の試料成分の存在下で、物理的に除去されたり、希釈されたことを意味する。分離または精製工程中に除去または希釈され得る試料成分は、化学反応生成物、未反応化学物質、タンパク質、炭水化物、脂質、非結合分子を含む。

40

【0076】

「固体相」とは、本発明による抗体が付着できるものなどの非液性マトリックスを意味する。本明細書で包含する固体相の例は、その一部または全体がガラス(例えば、制御多孔質ガラス)、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、シリコンで形成されているものを含む。ある実施態様では、コンテキストに応じて、固体相は、アッセイプレートのウェルを含んでもよく、他の実施態様では、精製カラム(例えば、アフィニティークロマトグラフィカラム)である。この用語はまた、米国特許第4,275,149号に記載の固体相のように、個々の粒子からなる非連続的な固体相も含む。

【0077】

50

本明細書で使用する「種」という用語は、例えば、化学療法剤の特定の種というように、様々なコンテキストで使用される。それぞれのコンテキストにおいて、この用語は、特定のコンテキストで言及されるような、化学的には不明瞭な分子の集団を意味する。

【0078】

抗体 - 抗原相互作用との関連において、「特異的」または「特異性」という用語は、抗体とその標的であるエピトープ間の選択的な、非ランダム相互作用を意味する。ここで、「抗原」という用語は、抗体分子またはその他の免疫由来部分によって認識かつ結合される分子を意味する。抗体によって結合される抗原の特定部分は、「エピトープ」と呼ばれる。この相互作用は、分子間に適切な化学的または分子的相互作用を生じさせるような構造的な、疎水性 / 親水性および / または静電的特性の存在に依存する。したがって、抗体は、一般的に、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」）、あるいは「～に反応性がある」（または「～に特異的に反応性がある」）、あるいは、同様な意味合いで、「～に対して反応性がある」（または「～に対して特異的に反応性がある」と言える。抗原に対する抗体結合を手短に表現する際には、当該分野では、一般的に、抗体は、抗原に「対して」または「に向けて」として説明される。したがって、「C1Pに結合する抗体」、「C1Pに対して反応性のある抗体」、「C1Pと反応性のある抗体」、「C1Pに対する抗体」ならびに「抗C1P抗体」のすべては、当該分野では同一の意味を有する。抗体分子は、所定の一連の条件下で、所望する抗原に対する結合を、非関連抗原または類似抗原あるいは抗原混合物に対する結合と比較することによって、結合の特異性を試験できる。本発明に従う抗体は、非関連抗原、または標的抗原の類似体にさえ顕著な結合を欠如することが好ましい。

10

20

【0079】

本明細書において、「安定な」とは、所望する目的や操作のために十分安定な状態に保つことができる2つの分子（例えば、ペプチドとTLR分子）間の相互作用を意味する。例えば、ペプチドとTLR分子間の「安定な」相互作用とは、所望効果を達成するために十分な期間、ペプチドがTLR分子と会合し、その状態を保っているような相互作用を意味する。

「被験者」または「患者」とは、本発明による分子がもたらすことのできる処置（治療）を必要とする動物を意味する。本発明に従って治療され得る動物は、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、特に好ましい例である霊長類（ヒトおよび非ヒト霊長類を含む）などの哺乳類が属する、脊椎動物を含む。

30

【0080】

「代用マーカー」とは、疾患状態に対する治療効果を間接的に示す、体内の生理活性の検査測定結果を意味する。増殖過剰および / または心血管系症状の代用マーカーの例は、SPHKおよび / またはS1PRを含む。

「治療薬」とは、限定はされないが、以下を含む、治療効果を与えることを意図する薬剤または化合物を意味する。COX阻害薬およびその他のNSAIDsを含む抗炎症薬、抗血管新生薬、上記に定義するような化学療法剤、心血管系作用薬、免疫調節薬、神経変性疾患治療に使用される薬、眼薬など。

【0081】

「治療有効量」（または「有効量」とは、例えば、かかる治療を必要とする被験者に投与した際に治療効果をもたらすために十分な有効成分（例えば、本発明による薬剤）の量を意味する。したがって、何をもって本発明に従う組成物の治療有効量とするかは、当業者によって容易に決定され得る。癌治療との関連において、「治療有効量」とは、特定の癌と相関する1つ以上の遺伝子発現の増加または低下、腫瘍量の減少、癌細胞の溶解、生体試料（例えば、バイオプシー（生検）および全血、血漿、血清、尿などのような体液のアリコート）における1つ以上の癌細胞の細胞死マーカーの検出、アポトーシスの誘導またはその他の細胞の死経路を含む、癌細胞の生存または代謝に関連する1つ以上のパラメータの客観的に計測される変化を生じる量である。勿論、治療有効量は、個々の被験者と治療対象となる病状、被験者の体重および年齢、疾患状態の重症度、選択された特定の

40

50

化合物、従うべき投与計画、投与時期、投与方法などによって異なるが、これら全ては、当業者によって容易に決定され得る。併用療法との関連においては、何をもって特定の有効成分の治療有効量とするかは、単独療法（即ち、有効成分として1つの化学的実体のみを用いる治療法）として投与されるときの治療有効量とは異なる可能性がある。

【0082】

本発明による組成物は、生理活性脂質を用いる治療法において使用される。本明細書で使用される場合、「治療」および「治療の」という用語は、疾患、または障害、または身体的外傷の予防および/または治療の全領域を包含する。本発明による「治療」薬は、リスクにある（薬理遺伝学）と特定され得る個人をターゲットとしてデザインされた手順を組み入れる方法などの予防的な様式で、または事実上寛解または治療するように、または治療対象となる疾患または障害の少なくとも1つの症状の進行速度または度合いを遅延するように、または疾患、または障害、または身体的外傷からの回復に関連する不快感や疼痛、または身体的制限に要する時間、または発症、または度合いを最小限にするように作用できるか、またはその他の治療法や処置に対するアジュバントとして使用することができる。

10

【0083】

疾患または障害の「治療」または「治療すること」という用語は、疾患または障害に対して予防または保護すること（即ち、臨床症状が発現しないようにすること）、疾患または障害を抑制すること（即ち、臨床症状の発現を停止、または遅延、または抑止すること）、および/または疾患または障害を緩和すること（即ち、臨床症状を退行させること）を含む。言うまでもなく、疾患または障害を「予防すること」と「抑止すること」を区別するのは、最終的に誘導するイベントまたは複数のイベントが未知であり潜在的である可能性があるため、いつでも可能であるとは限らない。「治療の必要がある」ものとは、既に障害を罹患しているもの、ならびに障害が予防されるべきものを含む。したがって、「予防法」という用語は、「予防すること」ならびに「抑止すること」の双方を包含するタイプの「治療」を意味する。したがって、「保護」という用語は「予防」を含む。

20

【0084】

「治療法」という用語は、化学療法剤および細胞毒薬、放射線療法、外科手術、遺伝子療法、DNAワクチンとDNA療法、siRNA療法、抗血管新生療法、免疫療法、骨髄移植、アプタマーおよび抗体と抗体変異体、レセプターデコイ、その他のタンパク質基剤の薬物療法のようなその他の生物製剤を用いる、疾患または障害の治療全般を意味する。

30

【0085】

フレームワークおよび相補領域またはCDR（別名、超可変領域として知られている）からなる（抗体の）「可変」領域という用語は、抗体間で配列が広範囲にわたって異なり、特定の抗原に対するそれぞれ特定の抗体の結合および特異性において使用される、可変ドメインの特定の部分を意味する。しかしながら、この可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均一に分布されてはいない。それは、軽鎖と重鎖の両方の可変ドメインの超可変領域（CDR）と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのさらに高度に保存されている部分は、「フレームワーク領域」（FR）と呼ばれる。天然の重鎖と軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、主としてシート立体配置をとり、3つの超可変領域によって連結され、連結するループを形成し、ある場合は、シート構造の一部を形成する、4つのFR（それぞれ、FR1、FR2、FR3、FR4）からなる。本明細書で使用される場合、「超可変領域」という用語は、抗原結合の役割を担う、抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基からなり（例えば、軽鎖可変ドメインの残基24～34（L1）、50～56（L2）、89～97（L3）および重鎖可変ドメインの残基31～35（H1）、50～65（H2）、95～102（H3）、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest（免疫学的関心となるタンパク質配列）、第5版、公衆衛生サービス、国立保健研究所、Bethesda, Md.（1991））、および/または「超可変ループ」からの残基（例えば、軽鎖可変ドメイン

40

50

の残基 26 ~ 32 (L1)、50 ~ 52 (L2)、91 ~ 96 (L3) および重鎖可変ドメインの残基 26 ~ 32 (H1)、53 ~ 55 (H2)、96 ~ 101 (H3) からなる、Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。「フレームワーク」または「FR」残基とは、本明細書に定義されるような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0086】

各鎖の超可変領域は、FR領域によって合わせて近接に保たれており、他の鎖から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ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学的関心となるタンパク質配列)、第5版、公衆衛生サービス、国立保健研究所、Bethesda, Md. (1991)、647-669ページを参照)。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与のような、様々なエフェクター機能を示す。

10

【0087】

「ベクター」、または「プラスミド」、または「発現ベクター」とは、1つ以上の組み換え遺伝子の発現を引き起こすために、細胞内に一時的にまたは安定して維持され得る核酸を意味する。ベクターは、単独の、あるいはその他の化合物と複合体を形成している核酸を含み得る。ベクターは任意に、ウイルスまたは細菌の核酸および/またはタンパク質および/または膜を含む。ベクターは、限定はされないが、それに対してDNAフラグメントが付着しているか、あるいは複製されるレプリコン(例えば、RNAレプリコン、バクテリオファージ)を含む。したがって、ベクターは、限定はされないが、RNA、自律自己複製環状または線状のDNAまたはRNAを含み、発現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、制限されることなく公に入手可能であるか、公開されたプロトコルによって報告されるように、入手可能なプラスミドから構築することができる。さらに、発現ベクターはまた、真核細胞培養に対するジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン抵抗性のような形質転換宿主細胞の選択のための表現型形質を提供する遺伝子を含み得る。

20

【発明の概要】

【0088】

本願は、LPAに結合し、かつ記載の配列を有する規定のアイデンティティのCDRペプチドを少なくとも1つ含む、抗LPA薬を提供する。抗LPA薬は、キメラ抗体、ヒト化抗体、全長抗体、親和性成熟抗体、抗体誘導体、抗体フラグメントのいずれかを含む抗体、あるいは非抗体由来部分であり得る。抗LPA薬は、ポリマー、放射性核種、化学療法剤、検出薬からなる群から選択される部分とコンジュゲートしており、担体や、任意に薬剤として許容できる担体において提供され得る。さらに、抗LPA薬は、抗体、抗体フラグメント、抗体誘導体、抗体変異体のいずれかであり得る、LPA以外の分子に結合し得る第二の薬剤と組み合わせて提供され得る。抗LPA薬と第二の薬剤は、任意に共有結合によって結合され得る。

30

また、少なくとも1つのCDRペプチドをコードする、記載のヌクレオチド配列を有する規定のアイデンティティの配列を含む、単離核酸分子が供給される。この核酸分子は、免疫グロブリン重鎖または軽鎖のフラグメント、または全長免疫グロブリン重鎖または軽鎖をコードし、サカナ、トリ、哺乳類、任意に霊長類、任意にヒトに由来し得る。これらの核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞が供給される。

40

【0089】

さらに、動物免疫グロブリン重鎖または軽鎖からのフレームワーク領域を少なくとも1つ、および与えられた配列を有する規定のアイデンティティのCDRペプチドを少なくとも1つ含む、単離ポリペプチドが供給される。このポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の全長可変ドメイン、全長免疫グロブリン重鎖または軽鎖、または免疫グロブリン重鎖または軽鎖のフラグメントであり得る。また、生理学的状況においてLPAに結合し、免疫グロブリン重鎖の可変領域由来のフレームワーク領域を少なくとも1つ、なら

50

びに与えられた配列を有する規定のアイデンティティのCDRペプチドを少なくとも1つ含む2本の免疫グロブリン重鎖、ならびに、2本の免疫グロブリン重鎖と機能的に会合する、生理学的状況においてLPAに結合し、免疫グロブリン軽鎖の可変領域由来のフレームワーク領域を少なくとも1つ、ならびに与えられた配列を有する規定のアイデンティティのCDRペプチドを少なくとも1つ含む2本の免疫グロブリン軽鎖からなる、単離抗体分子も供給される。これらの単離抗体分子は、ヒト化抗体分子であり得る。

【0090】

さらに、本発明は、少なくとも第一と第二のリガンド結合エレメントを含み、前記第一のリガンド結合エレメントがLPAに結合し、与えられた配列を有する規定のアイデンティティのCDRペプチドを少なくとも1つ含む多価結合分子を供給する。多価結合分子は、全長免疫グロブリン重鎖または軽鎖、あるいはそれらのフラグメントであり得る。第二の結合エレメントはまたLPAに結合し、2つ以上のリガンド結合エレメントがあってもよい。多価結合分子は、リガンド結合エレメントが連結される足場（スキヤフォールド）を含んでもよい。

10

【0091】

本発明では、規定の配列の可変ドメインを有する単離抗LPA抗体重鎖、ならびに規定の配列の可変ドメインを有する単離抗LPA抗体軽鎖が供給される。単離抗LPA抗体中への2本のかかる重鎖と2本のかかる軽鎖の組み合わせ、ならびに薬学的に許容される担体であり得る担体中にかかる抗体を含む組成物が開示される。

【0092】

LPAの異常な量に関連する疾患または障害の治療または予防法が提供され、その方法は、LPAの有効濃度を低下させるために効果のある量の抗LPA抗体を含む本発明による組成物の1つを、被験者に投与することを含む。この疾患または障害は、癌を含む増殖過剰疾患、自己免疫疾患・同種移植片拒絶・移植片対宿主病を含む免疫関連疾患、神経変性疾患、肥満症、2型糖尿病、黄斑変性を含む眼病、疼痛、または異常な血管形成または血管新生に関連する疾患、アポトーシス、強皮症・肺線維症・腎線維症・皮膚線維症・心臓線維症・肝線維症を含む線維形成または線維症、創傷修復および治癒、蜘蛛咬刺症であり得る。動物において、本発明による組成物を使用して、異常な増殖過剰、免疫応答、神経変性、血管形成、血管新生、アポトーシス、線維形成、線維症を低減する方法もまた請求される。治療対象となる線維症は、肝臓、腎臓、肺、心臓、子宮、皮膚の線維症であり得る。ヒトを含む、動物からの試料中に、LPAと同様に、線維症マーカーを少なくとも1つ検出することが望まれる。

20

30

【0093】

さらに、1つの極性頭基と少なくとも1つの炭化水素鎖を含み、前記少なくとも1つの炭化水素鎖内の炭素原子が任意に保護されているペンダント反応基によって誘導体化されている、誘導体化リゾホスファチジン酸を含む、診断用試薬が提供される。このペンダント反応基は、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、酸塩素基、ハロゲン原子であってよく、さらにこの誘導体化リゾホスファチジン酸は、固体支持体と会合していてもよい。この誘導体化リゾホスファチジン酸はさらに、任意に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、タンパク質（ここで前記タンパク質は、任意に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、大豆トリプシン阻害剤である）である担体部分とコンジュゲートしていてもよい。このコンジュゲートは、固体支持体に付着していてもよい。試料中の抗LPA薬を検出する方法が提供され、この方法は、誘導体化LPAを含む診断用試薬に対する試料中の抗LPA薬の結合を検出することを含む。抗LPA薬は、抗体、任意にヒト抗LPA抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗体フラグメント、抗体誘導体、非抗体由来部分のいずれかであってよく、さらにこの試料はバイオプシー試料のような組織試料を含む生体試料、および任意に全血、血漿、血清、尿、精液、胆汁、房水、硝子体液、気管支肺胞上皮洗浄液、粘膜、痰のいずれかである液性試料であり得る。この検出法はさらに、少なくとも1つの線維症マーカー

40

50

の検出を含み得る。L P Aの検出はまた、疾患の存在を示し、またはL P Aの有効濃度調節のための治療法をモニターするために、試料中のL P A量をL P Aの基準量と比較することを含み得る。この検出法はまた、誘導体化L P Aを含む診断用試薬を担う診断デバイスの使用を伴い得る。さらに、L P A検出のためのE L I S Aキットが開示される。

【0094】

本発明の前記ならびにその他の形態は、下記の詳細な説明、付属図面ならびに請求からさらに明確となろう。

特に定義しない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の当業者によって通常理解されるのと同一の意味を有する。本発明の実施または試験には、本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を使用してよいが、適切な方法と材料については以下に記載する。本明細書に言及される全ての出版物、特許出願、特許、その他の参考文献は、その全てが参照により援用される。不一致が生じた場合、定義を含む本明細書が優先される。さらに、材料、方法、実施例は説明を目的とするもので、限定を意図してはいない。

【図面の簡単な説明】

【0095】

本明細書に記載の各図表の簡単な概略を、本願に記載の様々なヌクレオチドおよびアミノ酸配列のリストと合わせて以下に示す。

【図1】本発明に従う免疫原の主要成分として、ならびにE L I S AとB i a C o r e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S 1 P類似体作成の有機合成模式図。

【図2】図3のチオール化L P A類似体の合成において使用されたチオール化関連脂肪酸作成の有機合成模式図。

【図3】本発明に従う免疫原の主要成分であり、ならびにE L I S Aおよびその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、典型的なチオール化L P A類似体作成の有機合成模式図。

【発明を実施するための形態】

【0096】

A．誘導体化および/またはコンジュゲート化L P A

1．組成物

本発明は、免疫原性応答（即ち、抗体産生）を促進するような方法で誘導体化されたL P Aを供給する。1つの実施態様では、L P Aは、L P A分子が担体分子とコンジュゲートするように、誘導体化され得る。1つの実施態様では、L P Aの炭化水素鎖内の炭素原子は、ペンダント反応基によって〔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、酸塩素基、ハロゲン原子〕で誘導体化されており、前記ペンダント反応基は保護されていても保護されていなくてもよい。この誘導体化は、分子と反応させるために（例えば、担体とコンジュゲートするために）、生理活性脂質を活性化する役割を果たす。1つの実施態様では、誘導体化L P Aは、チオール化L P Aである。1つの実施態様では、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つの実施態様では、このチオール化L P Aは、クロスリンカー（例えば、I O AまたはS M C Cなどの二機能性クロスリンカー）を介して、タンパク質であり得る担体にコンジュゲートされる。免疫される種において、L P Aを、免疫原であるタンパク質またはその他の担体、例えば、キーホールイ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、または大豆トリプシン阻害剤に、二機能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイル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ト）、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 l₂またはR¹N = C = N R（ここでRとR¹は異なるアルキル基）を用いてコンジュゲートさせることは有用であり得る。非タンパク質担体（例えば、コロイド金）も、抗体産生における用途が、当該分野では公知である。

誘導体化LPAまたは誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAは、抗LPA抗体（ポリクローナルおよび/またはモノクローナル）を産生するために使用できる。誘導体化LPAまたは誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAはまた、本発明による方法、特に診断法において使用できる。

【0097】

2. 誘導体化LPAの研究ならびに診断的用途

本発明による誘導体化LPAは、抗LPA抗体の検出および/または精製に使用することができ、前述のように担体とコンジュゲートさせることができる。この誘導体とコンジュゲートは、臨床診断法を含む診断法における用途では、固体支持体にコンジュゲートさせることが好ましい。例えば、LPA抗体の検出および/または定量は、LPAが関与する様々な医学的状態の診断に使用できる。LPA抗体の定量はまた、用量、半減期、ならびに、例えば本明細書に説明するLT3000のような抗LPA抗体による治療後の薬の量を評価するために臨床の現場において有用である。

【0098】

1つの実施態様では、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抗体の検出に使用されるELISAのレイダウン材料として使用される。1つの実施態様では、LPAは、BSAにコンジュゲートされたチオール化C12 LPAまたはチオール化C18 LPAである。この実施態様は、例えば、LPA検出のためのELISAアッセイの（プレートをコーティングするための）レイダウン材料として有用である。例えば、LPA競合ELISAでは、プレートは、誘導体化LPAおよび/または誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAでコーティングされる。1つ以上のLPA標準物質と1つ以上の試料（例えば、血清または細胞培養上清）のセットを、本発明によるマウス抗LPA抗体と混合してから、誘導体化LPAでコーティングされたプレートに加える。抗体は、プレートに結合したLPA、あるいは試料または標準物質中のLPAのいずれかに対する結合を競合する。インキュベートならびに幾つかのELISA工程後、450 nmで吸光度を測定し、検量線との比較によって、試料中のLPA濃度を求める。

【0099】

誘導体化LPAまたは誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAはまた、固体支持体（例えば、樹脂またはその他のカラムマトリックス、ビーズ、膜、プレート）に結合されてもよく、例えば、血液または血清から、抗LPA抗体を単離および/または精製するために使用できる。かかる抗LPA抗体は、本発明によるもの（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）のように新しく生成された抗体であるか、天然のヒト抗LPA抗体であり得る。

したがって、本発明による誘導体化LPAおよび誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAは、研究および臨床的診断のどちらにも有用である。

【0100】

3. 本発明による誘導体化LPAを組み込んだ診断キット

便宜上、本発明による誘導体化LPAは、例えば、診断アッセイ実施用の取扱説明書が添付された、規定量の試薬を組み合わせてパッケージした、キット中に供給され得る。

前述のように、1つの実施態様では、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抗体の検出に使用されるELISAキットの（プレートをコーティングするための）レイダウン材料として使用される。かかるキットは、LPAの検出に有用である。例えば、LPA競合ELISAキットでは、（供給の）プレートは、誘導体化LPAおよび/または誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAでコーティングされる。1つ以上のLPA標準物質と1つ以上の試料（例えば、血清または細胞培養上清）の一式を、本発明によるマウス抗LPA抗体と混合してから、誘導体化LPAでコーティングされたプレートに加える。抗体は、プレートに結合したLPA、あるいは試料または標準物質中のLPAのいずれかに対する結合を競合する。インキュベートならびに幾つかのELISA工程（取扱説明書と試薬はキッ

トに含まれる)後、450 nmで吸光度を測定し、検量線との比較によって、試料中のLPA濃度を求める。1つの実施態様では、ELISAキットのレイダウン材料として使用されるLPAは、BSAにコンジュゲートされたチオール化C12 LPAまたはチオール化C18 LPAである。このキット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よいが、モノクローナル抗体が好ましい。

【0101】

本発明によるLpath社の誘導体化かつコンジュゲート化されたLPAと本発明によるLpath社の抗LPA抗体を組み込んだキットは、Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, UT(リゾホスファチジン酸アッセイキット、カタログ番号K-2800)から市販されている。

10

【0102】

B. 抗LPA抗体を含む抗LPA薬剤

1. はじめに

モノクローナル抗体(mAb)は、安全かつ有効な治療薬であることが示されているため、様々な疾患および障害の治療薬としてのその使用が急増している。承認済みの治療用モノクローナル抗体は、アバスタチン(AvastinTM)、エルピタックス(ErbixTM)、リツキサソ(RituxanTM)を含む。その他のモノクローナル抗体は、その大部分が様々な形態の癌を標的とする様々な疾患について、臨床開発の様々なフェーズにある。一般的には、モノクローナル抗体は非ヒト哺乳類で生成される。マウスモノクローナル抗体の治療上の実用性は、非ヒト哺乳類抗体のキメラ化またはヒト化によって改善され得る。ヒト化は、投与された治療用モノクローナル抗体に対する免疫応答の発生を大幅に減少させることによって、半減期、ならびにかかる応答の結果として生じる治療効果の低下を回避する。大部分は、ヒト化プロセスは、マウスの相補性決定領域(CDR)をヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)中に移植することからなる。FRにある選択された残基のマウスアミノ酸残基への逆突然変異が、当初の移植コンストラクトで喪失された親和性を改善または取り戻すためにしばしば必要とされる。

20

【0103】

モノクローナル抗体の製造は、免疫グロブリンタンパク質それ自体の可変性から生じる複雑なプロセスである。この異種性は、代替ジスルフィド対の形成、脱アミド、イソアスパラギン酸残基の形成、メチオニンとシステイン酸化、N末端グルタミン残基のピログルタミン酸への環化、ならびに哺乳類カルボキシペプチダーゼによるC末端リジンの部分的な酵素的切断に帰することができる。安定性の増強、プロテアーゼ抵抗性、凝集挙動、異種系における発現量の増強のような、特性を改善するために、通常、抗体に操作が加えられる。

30

【0104】

2. LPA関連疾患と抗LPA薬の治療用途

LPAは、多数の疾患と障害に関連している。総説としては、Gardellら、(2006)

1264491972164_1.);

12(2):65-75、ならびにChun J. およびRosen, H., (2006) Curr. Pharma. Design 12:161-171を参照。これらは、糖尿病・多発性硬化症・強皮症などの自己免疫疾患、癌を含む増殖過剰疾患、血管形成および血管新生に関連する疾患、肥満症、アルツハイマー病を含む神経変性疾患、統合失調症、移植拒絶および移植片対宿主病などの免疫関連疾患などを含む。

40

【0105】

a. 増殖過剰疾患

本発明の1つの形態は、増殖過剰疾患の治療方法に関する。これらの方法は、LPA関連増殖過剰疾患を罹患していることが知られているまたは疑われる哺乳類(例えば、ウシ、イヌ、ウマ、ヒツジ、ブタなどの動物、特にヒト)に、意図する適用が必要な、好ましくは、薬学的または獣医学的に許容される担体中にあるLPA濃度および/ま

50

たは活性を妨害する薬剤を含む組成物の治療有効量を投与することを含む。LPA関連の増殖過剰疾患は、腫瘍、内皮細胞増殖に関連する障害、線維形成に関連する疾患を含む。多くの場合、腫瘍は癌である。内皮細胞増殖に関連する代表的な疾患は、例えば、固形腫瘍に起因する癌、血液学的腫瘍、加齢黄斑変性のような血管形成依存性疾患である。線維形成に関連する疾患は、心不全のような、異常な心臓リモデリングを伴う疾患を含む。

【0106】

多数の公知の増殖過剰疾患が存在しているが、それらにおいては、様々な組織と臓器の細胞が、成長、増殖、移動、シグナル伝達、老化、死亡の異常なパターンを示す。これらの疾患のいくつかに対応するために、多数の治療法が開発されているが、それら疾患の多くは未だ既存のテクノロジーではほとんど治療不能であり、その他の場合は、治療法はあるが、往々にして最適な治療法とは言い難く、ほとんど治癒不能である。

10

癌は、おそらく最も広く認識されている増殖過剰疾患の部類の代表的なものである。癌は、破壊的な部類の疾患であると共に、心血管系疾患の次に高い致死率を有する。多くの癌は、分子レベルでは完全に理解されていない。その結果、癌は、米国政府ならびに製薬会社双方にとって、研究開発の大きな関心の的である。その結果、癌に対する闘いを支援するために、かつてないほどの研究開発の努力がなされ、多数の価値ある治療薬が製造されている。

【0107】

あいにく、莫大な量の癌研究も、癌に起因する甚大な損傷に打ち勝つには十分でない。米国のみをとっても、未だに、毎年100万を超える癌の新しい症例が生じ、50万人が癌のために死亡している。これは、癌のための新しい治療法を発見するために莫大な努力が払われようとも、この疾患を撲滅するための有効な治療法はまだ実現されていないということを実に表している。

20

癌は現在、主として3種類の治療法（外科手術、放射線療法、化学療法）のうちから1つまたは併用によって治療されている。外科手術は、疾患組織のバルク除去を含む。外科手術は、例えば、乳房、結腸、皮膚のような、特定の部位に局在する腫瘍の除去には往々にして有効であるが、背骨のようなその他の領域に局在する腫瘍の治療、または白血病のような播種性腫瘍状態の治療には使用できない。放射線療法は、生体組織の電離放射線への曝露を含み、曝露された細胞に死または損傷をもたらす。放射線療法の副作用は、急性かつ一過性であり得るが、不可逆的な場合もある。化学療法は、細胞複製または細胞代謝の破壊を含む。

30

更なる痛手は、現在の治療薬は通常、毒性および重篤な副作用の形で、患者にとって著しい難点を伴うことである。したがって、多数のグループが最近、癌と闘うための新しいアプローチに注目し始めた。これらの新しい、いわゆる「革新的療法」は、遺伝子療法およびモノクローナル抗体のような治療用タンパク質を含む。

【0108】

癌の治療のために臨床使用された最初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実証した。そのためそれ以来、癌のために処方される9つのモノクローナル抗体を含む、20個のモノクローナル抗体が、認可されたことは驚くに足りない。これらの製品の成功、ならびに小分子と比較するとモノクローナル抗体開発に要するコストと時間が低いことによって、モノクローナル抗体治療法は、小分子に次いで2番目に大きな候補薬のカテゴリーとなっている。さらに、小分子治療薬と比較して、抗体は鋭敏な特異性を持つが、これは有効性と毒性双方の観点から大きな利点であることが証明されている。癌のみをとってみても、現在企業によって270以上の抗体についての研究開発プロジェクトが進行しており、50社以上が、新しい癌抗体治療薬の開発に携わっている。その結果、モノクローナル抗体は、癌治療の主演となる状態が整っており、癌治療薬のマーケットシェアの増大を掴むと予想されている。一般的に治療用モノクローナル抗体は、タンパク質を標的とする。ごく最近になって、生理活性脂質に対するモノクローナル抗体を産生させることが可能となった（例えば、S1Pに対する抗体、本出願人による米国特許出願第200701

40

50

48168号を参照。)

【0109】

腫瘍の成長と生存を促進する細胞外メディエーターの同定は、癌の罹患率と死亡率を減少させるための治療介入の開発において不可欠な工程である。以下に説明するように、LPAは、多面発現性の、腫瘍原性増殖因子であると考えられている。LPAは、細胞増殖、細胞生存、転移を刺激することで、腫瘍の成長を促進させる。LPAはまた、内皮細胞が腫瘍内で新しい血管を形成するときはその移動と生存を助けることで、腫瘍の血管形成を促進する。まとめると、LPAは、癌の進行に寄与するイベントの増殖性・血管新生誘導性・抗アポトーシス性のシーケンスを開始する。したがって、インビボでLPA量を調節する、そして特に減少させる治療法は、癌の治療に有効であろう。

10

【0110】

典型的に、癌のような増殖過剰疾患の治療または予防のための本発明による方法は、増殖過剰疾患を罹患する被験者に、有効量の本発明に従う各薬剤（または複数の異なる薬種）と細胞毒性薬剤を投与することを含む。細胞毒性薬剤とは、化学療法剤を含む。

関連する形態は、増殖過剰疾患の治療または予防のための治療手段の毒性を減少させる方法に関する。かかる方法は、増殖過剰疾患を罹患する被験者に、その増殖過剰疾患を治療または予防することを意図する治療手段の投与前、投与中、投与後に、本発明に従う薬剤（または複数の異なる薬種）の有効量を投与することを含む。細胞（例えば、癌細胞）を化学療法剤に対して感作することによって、低用量で効力が達成されるため、化学療法剤ゆえの毒性が低くなると考えられる。

20

さらに本発明の他の形態は、増殖過剰疾患を罹患する被験者に、被験者の生存の可能性を高めるために、その増殖過剰疾患を治療または予防することを意図する治療手段の投与前、投与中、投与後に、本発明に従う薬剤（または複数の異なる薬種）を投与することによって、増殖過剰疾患の治療を受けている被験者の生存の可能性を高める方法に関する。

【0111】

3. 線維症、創傷治癒、瘢痕形成

線維芽細胞、特に筋線維芽細胞は、細胞損傷と炎症に対する応答において、瘢痕形成の主要な細胞エレメントである (Tomasekら (2002)、Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63、ならびにViragおよびMurry (2003)、Am J Pathol, vol 163: 2433-40)。

筋線維芽細胞によるコラーゲン遺伝子発現は、リモデリングの特徴であり、瘢痕形成に必要である (SunおよびWeber (2000)、Cardiovasc Res, vol 46: 250-6、ならびにSunおよびWeber (1996)、J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8)。

30

線維症は、正常な創傷治癒または発生とは対照的に、病的な修復または反応過程の一部として、臓器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生として説明できる。線維症の最もよくある形態は、肝臓、肺、腎臓、皮膚、子宮、卵巣線維症である。強皮症、サルコイドーシスなどの状態は、複数の臓器と組織における線維症とみなされる。

【0112】

最近になって、生理活性リゾリン脂質である、リゾホスファチジン酸 (LPA) が組織修復と創傷治癒に役割を果たすことが認識されている。Wattersonら、Wound Repair Regen. (2007) 15: 607-16。生体メディエーターとして、LPAは、組織修復と創傷治癒におけるその役割が認められている (Watterson, 2007)。特に、LPAは、肺と腎臓の炎症および線維症に関連している。LPAは、ベースラインでヒト気管支肺胞上皮洗浄 (BAL) 液中に検出され、アレルギー性炎症中にその発現が増加する (Georas, S.N.ら (2007) Clin Exp Allergy. (2007) 37: 311-22)。さらに、LPAは、気道上皮細胞における炎症を促進する。Barekzi, E.ら (2006) Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 74:

40

50

357-63。最近になって、肺と腎臓の線維症が、LPA放出の増加とLPA1型レセプター(LPA₁)を介するシグナル伝達に関連づけられている。IPF患者からのヒト気管支肺胞上皮洗浄(BAL)試料中では、LPA量が上昇しており、マウスにおけるブレオマイシン誘導性肺線維症は、LPA₁活性化に左右される。Tagerら、(2008) Proc Am Thorac Soc. 5: 363.(2008)。マウスにおける一側性尿管閉塞後、LPA₁ノックアウトマウスでは、尿細管間質性線維症が軽減し、線維化促進性サイトカイン発現は、LPA₁アンタゴニストを投与した野生型マウスにおいて、減弱した。J.P. Pradereら(2007) J. Am. Soc. Nephrol. 18: 3110-3118。LPAは、コラーゲン遺伝子発現と増殖を刺激することによって、心臓線維芽細胞における直接的な線維形成作用を有することが示されている。Chen, ら(2006) FEBS Lett. 580: 4737-45。総合すると、これらの研究は、組織修復と線維症におけるLPAの役割を実証しており、生理活性脂質を、線維性疾患の治療における過去には認識されていなかったクラスのターゲットとして特定している。

【0113】

a. 強皮症

本発明による組成物と方法は、少なくとも部分的には、異常な血管新生、血管形成、線維形成、線維症、癒痕、炎症、免疫応答によって特徴づけられる疾患および障害の治療に有効であろう。かかる疾患の1つは強皮症であり、これは全身性硬化症とも呼ばれる。

強皮症は、皮膚の癒痕または肥厚を起因する自己免疫疾患であり、ときには、肺、心臓および/または腎臓を含む、身体の他の部分も巻き込む。強皮症は、身体の皮膚と臓器における癒痕組織(線維症)の形成によって特徴づけられ、これは、罹患領域の肥厚と硬化を招き、その結果として機能低下に繋がる可能性がある。強皮症財団によれば、現在強皮症を罹患している米国人はおよそ30万人に上る。罹患している人々の三分の一以下は広汎性疾患を患い、残りの三分の二は主に皮膚症状を有する。この疾患が肺に影響を及ぼして癒痕を生じると、肺はもはやこれまで通り拡張できないために、呼吸が制限される可能性がある。呼吸能力を測定するために、医師は、努力肺活量(FVC)を評価する装置を使用する。FVCが期待値の50%未満の人々では、強皮症関連肺疾患による10年死亡率はおよそ42%である。死亡率がこれほど高い1つの理由は、現在有効な治療法がないことである。

【0114】

特定の理論に縛られることを望むものではないが、S1Pおよび/またはLPAのような脂質および/またはそれらの代謝物の不適切な濃度が、強皮症の発症の原因であるか、あるいはその発症の一因であると考えられている。そのため、本発明による組成物と方法は、特に、特定の標的となる脂質(例えば、LPA)の有効インピボ濃度を低下させることにより、強皮症の治療に使用することができる。

LPAは、線維芽細胞の活性化、増殖の一因となり得る線維化促進性増殖因子であり、その結果としての線維芽細胞活性の増加が、不適応な癒痕とリモデリングに関連していたことが立証されている。さらに、皮膚の線維芽細胞活性においてLPAが果たし得る役割が実証されている。例えば、LPAがマウス皮膚線維芽細胞の移動を刺激することが示されている(Hamaら、J Biol Chem. 2004 Apr 23; 279(17): 17634-9)。

【0115】

b. 肺線維症

しばしば間質性肺疾患(ILD)と呼ばれる肺線維症は、全世界で500万人以上の人々が罹患している。米国におけるこの疾患の有病率は、実際よりも低く見積もられているが、10万人当たり3~6症例から、10万人当たり28症例とばらつきがあるようである。欧州では、国によってこの数は異なり、明確な性差はなく、およそ10万人当たり1~24症例と報告されている。この疾患は通常、40歳~70歳で診断される。生存期間中央値は、3~5年である。その有病率にも係わらず、IPFの進行を停止または逆行さ

10

20

30

40

50

せるために利用可能な治療はなく、FDAの承認を受けた治療コースもない。したがって、IPFならびに病的な組織線維症を伴うその他の疾患を治療するための新しい治療戦略について未だ満たされていないニーズがある。

【0116】

間質性肺疾患（ILD）は、180以上の慢性肺疾患を含み、それらは慢性で、非悪性かつ非感染性である。間質性肺疾患は、間質と呼ばれる肺の気嚢の間にある組織線維症に冒される組織（瘢痕）にちなんで名付けられた。間質性肺疾患はまた、間質性肺線維症または肺線維症とも呼ばれることがある。これらの疾患の症状と経過は人によって異なるが、ILDの多くの型の共通点は、それらの全てが炎症、例えば、細気管支炎 - 気管支梢（小気道）を巻き込む炎症、肺炎 - 肺胞（気嚢）を巻き込む炎症、血管炎 - 小血管（毛細管）を巻き込む炎症から始まることである。

10

【0117】

80%以上の間質性肺疾患は、塵肺、または薬剤性疾患、または過敏性肺炎と診断される。その他のタイプは以下に示す。

職業・環境曝露：特に石綿、澱石、金属粉塵を扱う多くの仕事は、肺線維症を起因することがある。小粒子が吸入され、肺胞を損傷し、線維症を起因する。黴びた干し草のような有機物質の一部は肺線維症を惹起することもあり、これは農夫肺として公知である。

【0118】

石綿症は、通常は、石綿の小さな針様粒子が肺に吸入されたときに生じる。これは、肺の瘢痕（肺線維症）を起因し、さらに肺癌に至る可能性がある。石綿症の鍵は、予防である。石綿製品の製造においては、雇用主と雇用人双方が、政府の基準を認識し、この粒子の吸入に対して全ての予防策を講じるべきである。石綿の扱いにおいて最たる危険は、古く、脆い（砕けやすい）石綿含有製品を交換したり壊したりするとき生じる。そのような状況では、粒子が空気中に放出され、肺中に吸い込まれる。しかしながら今日、石綿繊維は通常、セメント、ゴム、プラスチックのような成形剤によって「封じ込め」られているために、その粒子が自由に空気中に浮遊しないようになっている。タバコの喫煙は、石綿との相互作用関係を有し、喫煙する石綿作業員は、非喫煙者よりも肺癌を発症する確率が遙かに高い。

20

【0119】

ケイ肺症は、肺線維症を生じるもう1つの疾患であり、その原因は明らかとなっている。この疾患は、浮遊している結晶性シリカ粉塵を吸い込むことに起因する。鉍石を石英岩から抽出する全タイプの鉍業は、予防策を講じていない場合、ケイ肺症を引き起こす可能性がある。これは、金、鉛、亜鉛、銅、鉄、無煙（硬）炭、いくつかの瀝青（軟）炭についての鉍業を含む。鋳物工場、砂岩粉碎、トンネル堀、サンドブラスト（砂吹き）、コンクリート破碎、御影石彫刻、陶磁器製造に従事する作業員もシリカに接する。

30

【0120】

大きなシリカ粒子は、上気道で停止される。しかしながら、シリカの極小片は肺胞まで運ばれて、そこで肺線維症を誘因する。ケイ肺症は、空気中のシリカの割合と濃度ならびに曝露期間に正比例して、軽症であったり重症であったりする。ケイ肺症は、各産業および各職種で立案された施策によって防止できる。塵埃コントロールが不可欠である。ときには、これは、鉍床を湿潤させたり、換気を改善したり、マスクを着用することによって達成される。

40

【0121】

（特発性肺線維症）

多数の異なる疾患が肺線維症を引き起こし得るが、多くの場合、その原因は不明である。そのような場合、この状態は、「特発性（原因不明の）肺線維症」と呼ばれる。特発性肺線維症では、患者の環境および職業歴を注意深く調査しても原因についての手がかりが得られない。医師と科学者の中には、この疾患を感染性またはアレルギー性の状態とする者もいるが、かかる患者の肺には、細菌およびその他の微生物が常に発見されるわけではない。他方、この状態は確かに、ウィルス様疾病を辿るように見えることもある。したがっ

50

て、多くの症例における肺線維症の原因は知られているにも係わらず、特発性の変種については未だ謎のままである。

【0122】

サルコイドーシスは、身体の中のどの領域も攻撃できるが、ほとんどの場合は肺を冒す、肉芽腫（炎症細胞の部分）の形成によって特徴づけられる。

ある種の医薬品は、肺線維症を発症する望ましくない副作用を有し、その例は、ニトロフラントイン（尿路感染症治療薬としてよく使用される）、アミオダロン（不整脈の治療薬としてよく処方される）、プレオマイシン、シクロホスファミド、メトトレキセート（癌の治療薬としてよく処方される）である。

【0123】

乳癌治療としての放射線療法もまた、肺線維症を発症する可能性がある。少なくとも部分的には、肺線維症によって特徴づけられるその他の疾患は、肺結核、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、穀物作業肺、キノコ栽培者肺、サトウキビ肺、洗剤作業肺、カエデ樹皮剥き肺、麦芽労働者肺、パプリカ裂作業肺、愛鳥家肺、ヘルマンスキー・ブドラック症候群を含む。肺線維症はまた、遺伝的に受け継がれる。

【0124】

（臨床的特徴）

息切れは、肺線維症の特徴である。多くの肺疾患では、息切れがその主要な症状として認められるが、それ故に診断が複雑かつ分かりにくくなる。一般的に、特発性肺線維症では、まず運動中に息切れが生じる。この状態は、労作が不可能な時点まで進行し得る。乾性咳が、よくある症状である。最後には指先が肥大して、球状の外観を呈する。これはしばしば、「ばち状指」と呼ばれる。

【0125】

その他の症状は以下を含み得る。特に、労作、疲労、脱力感を伴う息切れ、食欲不振、体重の減少、痰を伴わない乾性の咳、胸部不快感、呼吸困難、肺出血。

【0126】

（診断）

総合的既往歴ならびに健康診断に加えて、肺線維症の診断を絞り込み、および/または確定するには、以下の検査が必要なことがある。肺機能検査 - 肺の特徴と容量を測定する、肺活量測定 - 強制呼気量を測定する、ピークフローメーター - 呼吸の変化と医薬品に対する反応を評価する、血液検査 - 血液中の二酸化炭素と酸素の量を分析する、X線検査、コンピューター断層撮影（CAT）スキャン、気管支鏡検査 - 気管支鏡と呼ばれる長く細いチューブを使って肺を検査する、気管支肺泡洗浄 - 炎症を特定し、特定の原因を除外するために、下気道から細胞を除去する、肺生検 - 病理臨床検査のために肺から組織を除去する。

【0127】

（治療）

肺線維症の公知の原因のうち1つがある場合、その基礎疾患の治療またはその疾患の原因となる環境から患者を排除することは、有効であり得る。これは、以下による治療を含み得る。副腎皮質ステロイドを含む経口薬物療法、インフルエンザワクチン、肺炎球菌性肺炎ワクチン、ポータブルタンクを使う酸素療法および/または肺移植。

多くの場合、治療は、肺に発生する免疫応答の治療に限られる。これは、炎症を止めることによって、肺の中に瘢痕組織や線維症が根付くことを防止することで、この疾患の進行を止めることを期待して行われる。

【0128】

副腎皮質ステロイドは、通常は炎症を止めるために投与される薬である。この治療の利点は全ての症例において実証されているわけではないが、この薬が疾患過程の早期に投与される場合は、改善の可能性が高いと思われる。副腎皮質ステロイド薬物療法は様々な副作用を生じ得るため、これらの薬物療法を受けている患者は、この療法の安全性と利点を判断するために、担当医師によって頻繁に再評価されなければならない。

10

20

30

40

50

【0129】

その他の薬も試みられているが、それらの効力を納得させるようなエビデンスは欠如している。肺線維症の薬物療法は必ずしも成功するとは限らないが、この状態に伴う息切れを緩和する支持療法という形でできることは多くある。リハビリテーションと教育プログラムは、より効果的な呼吸法、ならびに息切れを少なくするような日常活動を行う方法を患者に教えることで大きく役立ち得る。時には、息切れを治療するために、酸素補給療法が必要とされる。胸部感染症の早期治療が必要とされる。タバコの影響は息切れを悪化させるため、喫煙は止めなければならない。

転帰

【0130】

多くの場合、この疾患はほとんど症状を伴わず、軽症であり、長い間著しい進行は見られない。その他の場合、つまり肺線維症が関節リウマチのようなその他の基礎疾患に起因する場合、肺の状態の進行は、基礎疾患の進行を反映する可能性がある。極めて稀に、肺線維症は、突然発症し急速に進行して、数週間呼吸不全になって死に至る。しかしながら、肺線維症、特に特発性肺線維症の通常の経過は、ゆっくり進行する肺の癒痕形成の1つである。このプロセスの持続期間と速度は不定である。ある患者は治療に応答する。その他の場合、患者は治療に応答せず、数ヶ月から数年の間にゆっくりと増悪し、肺がもはや十分に機能できなくなったときに、結局は死に至る。

【0131】

(LPAと肺線維症)

正確な病因は不明であるが、IPFは、肺損傷後の異常な創傷治癒に起因すると考えられている。Scotton, C. J. および Chambers, R. C. (2007) Chest, 132: 1311-21。特に、肺線維芽細胞の増殖と移動の増加、ならびに癒痕組織を形成する筋線維芽細胞の形成は、IPF発病の主要なイベントである。筋線維芽細胞は、平滑筋アクチン(a-SMA)を発現する平滑筋様線維芽細胞であり、アクチンフィラメントと顕著なストレスファイバーに器質化する関連タンパク質から構成される収縮装置を含んでいる。組織ホメオスタシスと修復におけるこれらの通常的作用に加えて、筋線維芽細胞は数多くの線維性疾患における病態メディエーターである。Hinz, B. (2007) J Invest Dermatol. 127: 526-37。肺線維症の動物モデルの線維性病巣において、筋線維芽細胞数とその密度の増加が認められている。筋線維芽細胞は組織損傷後に形成され、それによって増加した増殖因子、サイトカイン、機械的刺激の量が、常在する組織の線維芽細胞が収縮性の癒痕組織を形成する筋線維芽細胞に変換することを促進する。肺とその他の組織において、TGF- β 、CTGF、PDGF、種々の炎症性サイトカインを含む生化学的メディエーター量の持続的な上昇は、筋線維芽細胞の形成を促進し、癒痕組織の形成を悪化させて、組織線維症に至らしめる (Scotton, 2007)。したがって、IPFおよびその他の線維性疾患治療のための現在の臨床戦略は、筋線維芽細胞形成とそれに続く線維性組織の形成を促進する、生化学的因子を標的としている。

【0132】

最近になって、生理活性リゾリン脂質であるリゾホスファチジン酸(LPA)の、組織修復と創傷治癒におけるその役割が認識されている (Watterson, 2007)。LPAは、1つの炭化水素主鎖と、1つのリン酸基を含む1つの極性頭基を有する、生理活性リゾリン脂質(500ダルトン未満)である。LPAは、EGD2/LPA₁、EDG4/LPA₂、EDG7/LPA₃、LPA₄と呼ばれる特定のGタンパク質共役レセプター(GPCR)との相互作用を介して、数々の細胞効果を惹起する。Anliker B. および J. Chun, (2004) Seminars in Cell & Developmental Biology (細胞および発生生物学に関するセミナー), 15: 457-465。生物学的メディエーターとして、LPAは、組織修復と創傷治癒に参与することが認められている (Watterson, 2007)。特に、LPAは、肺と腎臓の炎症および線維症に関連している。LPAは、ベースラインにおけるヒト

10

20

30

40

50

気管支肺胞上皮洗淨 (BAL) 液中に検出され、アレルギー性炎症中にその発現が増加する (Georas, 2007)。さらに、LPAは、気道上皮細胞における炎症を促進する (Barekzi, 2006)。最近になって、肺と腎臓の線維症が、LPA放出ならびにLPA1型レセプター (LPA₁) を介するシグナル伝達に関連づけられている。IPF患者からのヒト気管支肺胞上皮洗淨 (BAL) 試料中では、LPA量が上昇しており、マウスにおけるプレオマイシン誘導性肺線維症はLPA₁活性化に依存していた (Tagger, 2008)。マウスにおける一側性尿管閉塞後、LPA₁ノックアウトマウスでは尿細管間質性線維症が軽減し、線維化促進性サイトカイン発現は、LPA₁アンタゴニストを投与した野生型マウスにおいて、減弱した (Pradere, 2007)。総合すると、これらの研究は、組織修復と線維症におけるLPAの役割を立証しており、生理活性脂質を、IPFならびにその他の線維性疾患の治療における過去には認識されていなかったクラスのターゲットとして特定している。

10

【0133】

c. 肝 (肝臓) 線維症

肝臓は、優れた再生能力を有しているため、再生による修復プロセスは、*restitutio ad integrum* (完全回復) するように進行する。しかしながら、もし損傷が網状構造に影響を及ぼす場合、修復は癒痕形成 (線維症) によって生じ、これは血液循環の再編成と肝硬変に繋がり得る。

損傷に対する反応は、以下のように進行する。細胞の変化および組織の変化を伴う損傷 (壊死)、炎症反応、修復 (再生 (原状回復) あるいは癒痕 (線維症) のいずれかによる)。

20

慢性肝疾患は、構造の攪乱である門脈高血圧症に至る線維症を誘因し、血液循環に不可逆的な再編成を生じて、肝硬変を起因し得る。線維症と肝硬変は紙一重である。線維症は、壊死、崩壊、癒痕形成のみならず、肝臓においては、以下のカテゴリー、即ち、コラーゲン、糖タンパク質、プロテオグリカンであるマトリックスの様々な成分を合成する間葉細胞が損傷を受けたことによる、マトリックスの合成と分解の攪乱の結果、生じる。

【0134】

(肝線維症の診断)

肝線維症は、例えば、マッソントリクローム染色、鍍銀法、コラーゲン型に対する特異抗体、脂質細胞のデスミンとビメンチン染色、あるいは筋線維芽細胞のビメンチン染色のような組織学的方法、または、例えば、マトリックス中の種々の酵素あるいは良性線維症における血清ラミニンの測定による、生化学的方法によって診断し得る。

30

【0135】

(肝線維症の分類)

肝線維症には、先天性および後天性の2つの主要な型がある。前者は遺伝疾患であり、多嚢胞性肝疾患を起因する。後者には多数の異なるカテゴリーがあり、主として肝細胞の損傷に起因する。病理学的には、線維症は以下のように分類できる。

【0136】

(門脈領域線維症)

門脈領域から小葉に、線維芽細胞が増殖し、線維の伸展を生じる。結局は、これらの線維は連絡して橋架様隔壁を形成する。この種の線維症は、主として、ウィルス性肝炎および低栄養性肝線維症に見られる。

40

【0137】

(小葉内線維症)

正常な小葉には線維芽細胞はほとんど見られない。多数の肝細胞が変性したり壊死を生じる場合、網状線維の枠組みが崩壊して、太いコラーゲン線維になる。同時に、小葉内線維性組織が増殖して、肝細胞を取り囲む。

中央線維症：増殖した線維化組織は、主として中心静脈を取り囲み、中心静脈壁の肥厚を生じる。

(微小胆管周囲の線維症)

50

この種の線維症は、主として、長期にわたる胆管貯留に起因し、主として、胆管周囲に発症する。顕微鏡的には、新しく形成された毛細胆管と胆管栓塞を取り囲む結合組織がある。毛細胆管の基底膜が線維化する。

免疫学的には、肝線維症は、以下のように分類できる。

【 0 1 3 8 】

(受動的線維症)

肝細胞の広範な壊死および副次的な肝構造の崩壊と瘢痕形成が生じ、それが結合組織の増殖を起因する。

(能動的線維症)

リンパ細胞およびその他の炎症細胞の浸潤および再発・一貫性炎症は、結合組織の小葉への浸潤を促進する。原因により、肝線維症は以下のように分類できる。

【 0 1 3 9 】

(ウィルス肝炎による線維症)

ウィルス肝炎による線維症は、通常は、B、C、D型慢性肝炎によって発症する。全世界で、B型肝炎保菌者は3.5億人に上り、1.7億人の人々がC型肝炎に感染している。B型肝炎患者の約15%ならびにC型肝炎患者の約85%が慢性肝炎を発症し、線維症に至る。そのような場合、肝臓は、門脈周辺領域に炎症と漸次壊死ならびに線維化を呈する。そのような多数の人口集団が罹患しているため、これは肝線維症の最も重要なカテゴリーである。

【 0 1 4 0 】

(寄生虫感染症による線維症)

この種の肝線維症は、主として、開発途上国で発症し、住血吸虫症に起因する。アジア、アフリカ、南米、中南米では2.2億人が、この感染症を罹患している。再感染と住血吸虫の卵が肝臓に蓄積して、肝線維症と肝硬変を引き起こす。

(アルコール性線維症)

これは主として、アルコールの酸化代謝物であるアセトアルデヒドに起因する。西欧諸国では、この疾患の発生率は、アルコール摂取量と正比例している。米国におけるアルコール性線維症の総症例数は、C型肝炎患者数の約3倍である。アルコール性線維症は、肝臓に以下の2つの形態学的変化を生じる。脂肪肝と細胞小器官の劣化。線維症は、まず中心静脈周辺に発症し、同時に肝実質細胞の炎症を起こす。徐々に線維症は、肝臓全体に広がる。

【 0 1 4 1 】

(胆管線維症)

胆管線維症には、原発性のものと二次性のものがある。原発性胆汁性肝線維症 (P B H F) は、慢性肝臓内胆汁貯留が肝線維症を起因する、自己免疫疾患である。この疾患は、40~60歳の女性に多く発症する。血清検査では、グロブリン値が上昇し、抗ミトコンドリア抗体に陽性を示す。病理学的研究によって、主として、微小胆管周囲の線維症と門脈周辺領域の線維症ならびに炎症があることが判明した。二次性胆管線維症は、胆管閉塞後に発症し、門脈周囲領域の炎症と進行性線維症を起因する。

【 0 1 4 2 】

(代謝性線維症)

このカテゴリーは一般的ではなく、稀に見られる症例である。ウィルソン病や肝レンズ核変性およびヘモクロマトーシス (血色素症) は、代謝性線維症を起因する主な疾患である。前者は遺伝病であり、銅代謝障害と肝臓沈着を起因する。後者は、鉄代謝障害であり、肝臓にヘモグロビン沈着を起因する。これらの代謝障害のどちらも、肝線維症と肝硬変を起因する。

(中毒性線維症)

四塩化炭素、有機リン、ジメチルニトロソアミン、チオアセトアミドなどの肝臓毒性物質と長期間接触したり、イソニアジド、チオ酸化ピリミジン、ウインタミン、テトラサイクリン、アセトアミノフェンなどの肝臓毒性のある医薬品を服用することは、いずれの場

10

20

30

40

50

合も異なる度合いの肝細胞損傷、壊死、胆管貯留、またはアレルギー性炎症を生じたり、肝線維症を起因する。

【0143】

(低栄養性線維症)

この種の線維症は、主として、不十分またはバランスを欠く栄養摂取によって生じる。長期にわたる低タンパク質または高脂質食は、脂肪肝を起因し、線維症に至る。

心原性線維症：慢性鬱血性心不全は、肝細胞の虚血性変性を起因する、長期間持続する肝静脈鬱血を生じ得る。この種の肝線維症では、結合組織の肥大が、肝臓小葉の中央部から始まり、徐々に小葉の残りの部分に拡大する。

【0144】

肝線維症の診断および病期決定

肝臓の健康を評価するための最も基準となる検査は、肝生検である。しかしながら、この方法は、皮膚に針を挿入する必要があるため、合併症の発生率は極めて低いとはいえ、合併症の可能性がある。肝生検の合併症は、内出血、ならびに肺、胃、腸、肝臓に近いその他の臓器などの他の臓器を穿刺することを含み得る。生検の正確性に関しては、正しく病期を決定し、肝生検をグレード付けするために、肝臓組織の標本サイズが重要である。その他の問題は、肝臓の一部から採取された組織は、肝臓全体を100%代表するわけではないということである。いったん肝臓組織試料が採取されると、専門家(病理学者)によって、グレード付けされ、病期が決定されるが、これは結果の解釈においてヒューマンエラーが生じる可能性に繋がる。さらに、標準化された解釈のプロトコルがないため、別の病理学者によって読解された別の生検結果と比較することが困難である。標準的な肝生検の費用は、1,500~2,000ドルかかることがあるため、費用も1つの問題である。

【0145】

これらの生じ得る問題からして、非侵襲性検査の開発のために多大な研究が実施されていることは驚くに足りない。これまでに開発された検査は、肝生検の結果と比較する場合、正確性に関しては種々異なる結果が得られている。種々の非侵襲性マーカーからの結果を、肝生検の結果と比較する、前向き臨床試験はほとんど実施されていない。

【0146】

線維症の病期を客観的に評価するためには、肝生検、特に一連の生検が今日使用されている主要な方法である。生検から、肝臓炎症のグレードならびに線維症の病期を診断することが可能である。最も頻繁に使用されるスコアシステムは、カーネルスコアシステムであり、これは線維症を0~5の病期に分ける(同時に、この生検診断はまた、炎症グレードを0~4に分類する)。0期：正常、1期：門脈域の線維症拡大(3分の1未満の血路が小束の橋架を伴う)、2期：架橋形成線維症、3期：顕著な架橋形成線維症または初期肝硬変(薄い隔壁線維症を伴う)、4期：50%未満の生検が線維症である明確な肝硬変、5期：50%以上の生検が線維症である明確な肝硬変。

【0147】

肝線維症診断用血液検査：生検は侵襲性手技であるため、多くの患者は、この手技に関しては慎重である。線維症の進行を評価するための方法として、血液検査が研究されている。最も頻繁に使用されている血清化学分析法では、血清中のHA(ヒアルロン酸)、LN(ラミニン)、CIV(IV型コラーゲン)、PCIII(III型プロコラーゲン)の量を測定する。これらは、線維症活性度の指標として使用できる。血液検査から、AST/ALT比が得られ、この値が1以上の場合、線維症の度合いが比較的進行していることがしばしば示されている。脾臓の肥大、血小板数とアルブミン濃度の低下があるかどうかと組み合わせ、線維症の病期を推定することも可能である。進行線維症では、脾臓は通常肥大しており、血小板数が100を下回りでアルブミンは3.5を下回る。血液検査の結果で行えることは、線維症の重症度の診断を、0、1期ならびに3、4、5期に評価することのみである。2期と3期を区別することはできない。

【0148】

10

20

30

40

50

B - 超音波、CT、MRIなどの医療画像診断もまた、肝線維症診断のために使用できる。B - 超音波画像は、脾臓の大きさを調べ、門脈の主要尾部の直径、左右門脈枝の直径、脾臓の門戸での静脈直径、門脈の血流速度を測定するためにしばしば使用される。GI内視鏡検査は、胃と食道に静脈瘤があるかどうかを調べるために使用できる。これらは、肝臓医が、線維症の病期を診断するための参考として使用できる。

【0149】

一般的に、線維症という用語は、線維性（癒痕）組織の異常な形成を意味する。肝炎患者では、線維症は、肝臓がしばらくの間、肝炎による攻撃下にある状態を意味する。線維症の初期は、肝臓の1つの門戸（ゾーン）における、別々の局在化した癒痕領域によって同定される。線維症後期は、肝臓のゾーンを横断する癒痕組織である、「架橋形成」線維症によって同定される。炎症から線維症に進行し、最終的に肝硬変に至る比率は一様ではなく、非常に多様であるが、ほとんどの人ではその進行は極めて遅い。HCV感染に対するインターフェロン療法に应答する人は、組織癒痕の量が減少する可能性があるというかなりのまとまったエビデンスがある。このことは、肝臓の再生能力を物語っている。線維症がかなり進行した状態は、肝硬変と呼ばれる。肝生検は、炎症の度合い（グレード）と癒痕の度合い（病期）を評価するために実施される。

10

【0150】

（診断）

肝臓学界と胃腸病学界が直面する主要な臨床上の問題の1つは、益々その数が増加している、C型肝炎ウイルス（HCV）が同定された患者に対する最良の診断・管理法である。過去10年間における、HCVについての血清学およびウイルス学的検査の進歩ならびに治療法の向上によって、より多くの患者が同定されて、治療を求めるようになった。しかしながら、肝臓損傷、特に線維症の度合いを判定したり、個々の患者について疾患進行のリスクを予見する能力を向上する能力の進歩はほとんど達成されていない。

20

臨床医は、患者の生命に大きなインパクトを持ち得る、予後かつ治療法についての判断については、生検結果に依拠している。シングルパス方式の肝生検は、80%の患者において、線維症の病期または肝硬変の有無を正しく診断することができる。肝生検の診断の正確性を向上する要素は、HCVのように肝臓全体に渡る均一な疾患の存在、複数のパス、使用される生検針タイプ、長さが2cm以上のフラグメント化しない生検コアを含む。経験豊富な医師が肝生検を行い、専門の病理医が生検を解読しても、この最も基準となる検査法では、病期決定に20%以上のエラーを伴う。

30

【0151】

d. 腎（腎臓）線維症

LPAは、腎臓炎症と線維症に関連している。最近になって、腎臓の線維症は、LPA放出の増加とLPA1型レセプター（LPA₁）を介するシグナル伝達に関連づけられている。マウスにおける一側性尿管閉塞後、LPA₁ノックアウトマウスでは尿細管間質性線維症が軽減し、線維化促進性サイトカイン発現は、LPA₁アンタゴニストを投与した野生型マウスにおいて減弱した（Pradere, 2007）。

【0152】

e. その他の線維症

40

子宮線維症は、子宮平滑筋腫（一般的に筋腫と呼ばれる）として公知の非悪性腫瘍である。この腫瘍は、孤立または群発し、リンゴの種のサイズから、グレープフルーツよりも大きなサイズまで、多様なサイズで生じる。子宮筋腫の診断は、一般的には、超音波検査、X線検査、CATスキャン、腹腔鏡検査および/または子宮鏡検査によって達成される。子宮筋腫の治療は、内科的（薬物治療、例えば、非ステロイドケイ炎症剤またはゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト）または外科的（例えば、筋腫切除術、子宮摘出術、子宮内膜切除または筋融解）のいずれかであり、子宮筋腫塞栓術や熱超音波焼灼術のような侵襲性の少ない方法も最近になって開発されている。

【0153】

皮膚線維症は、皮膚の肥厚または硬化として説明でき、強皮症ならびにその他の線維化

50

性皮膚疾患において発症する。重症の場合、線維症は、運動や正常機能を制限することがある。ケロイドは、外傷、ときには耳のピアス形成やニキビのような軽い外傷への応答において形成される過剰な癒痕である。正常な癒痕形成とは異なり、ケロイドは、線維芽細胞の不釣合な増殖を有し、コラーゲン性組織の塊を生じる。それゆえ、この癒痕は、周囲の皮膚表面へ突出し、当初外傷を受けていなかった皮膚にも浸潤する。皮膚の線維芽細胞活性においてLPAが役割を果たすことが実証されている。例えば、LPAがマウス皮膚線維芽細胞の移動を刺激することが示されている(Hamaら、J Biol Chem. 2004 Apr 23; 279(17): 17634-9)。したがって、抗体のような抗LPA薬剤は、ケロイドや皮膚線維症のような異常な皮膚線維症の治療に有効である。

10

【0154】

心筋線維症

LPAはまた、コラーゲン遺伝子発現と線維芽細胞の増殖を刺激することによって、心臓の線維芽細胞において直接的な線維形成作用を有することが示されている。Chen, ら(2006) FEBS Lett. 580: 4737-45。したがって、抗体のような抗LPA薬剤は、心臓細胞においても同様に抗線維化作用を有することが予測され、したがって、心筋線維症の治療に有効であることが期待される。

Lpath社の抗LPAモノクローナル抗体のような、LPAの有効濃度を低下させる薬剤は、異常な線維症によって特徴づけられる疾患と状態を治療する方法において有用であると考えられる。

20

【0155】

4. 心血管系および脳血管系障害

LPAは、肝臓組織の線維形成と創傷治癒(Davaillera, J. Biol. Chem. 275: 34268-34633, 2000、Ikedaら、Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279: G304-G310, 2000)、傷ついた脈管構造の治癒(Leeら、Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278: C612-C618, 2000)、その他の疾患状態、または癌のような疾患・血管形成・炎症に関連するイベント(Pyneら、Biochem. J. 349: 385-402, 2000)に關与するため、本開示による組成物と方法は、これらの疾患のみならず、心臓疾患、特に組織リモデリングに関連する疾患の治療にも同様に適用し得る。LPAは、コラーゲン遺伝子発現と心臓線維芽細胞の増殖を刺激することによって、ある程度直接的な線維形成効果をも有する。Chen, ら(2006) FEBS Lett. 580: 4737-45。

30

【0156】

5. 肥満症と糖尿病

LPA合成を担うホスホリパーゼDであるオートタキシンは、脂肪細胞によって分泌され、肥満症・糖尿病db/dbマウス由来の脂肪細胞、ならびに極度に肥満な女性被験者と2型糖尿病を罹患するヒト患者(肥満とは無関係に)においてその発現が増加していることが発見されている(Ferryら(2003) JBC 278: 18162-18169、Boucherら(2005) Diabetologia 48: 569-577、Pradereら(2007) BBA 1771: 93-102に引用されている)。LPA自体が、前脂肪細胞の増殖と分化に影響を及ぼすことが示されている。Pradereら、2007。合わせて、これは、肥満症と糖尿病の治療における抗LPA薬剤の役割を示唆している。

40

【0157】

3. 抗体の生成とキャラクタリゼーション

下記の実施例は、治療の観点から望ましい特性を有する、抗LPA薬剤、特に抗LPA抗体の生成を説明する。(a) LPAおよび/または18:2、18:1、18:0、16:0、12:0、20:4 LPAを含むその変異体に対する結合親和性。抗体親和性

50

は、下記の実施例において説明するように測定される。抗体は、高親和性でL P Aに結合することが好ましく、例えば、 K_d 値が、決して約 1×10^{-7} Mを超えない、可能であれば、 1×10^{-8} Mを超えない、 5×10^{-9} Mを超えないこと。生理学的状況においては、抗体は、L P Aレセプターに対するL P Aの親和性よりもさらに高い親和性でL P Aを結合することが好ましい。言うまでもなく、診断検査法のような非生理学的状況においては、必ずしもこうである必要はない。

【0158】

L P Aに対する強い結合親和性を有する抗体の他に、治療上の観点からその他の有益な特性を有する、キメラ抗体、ヒト化抗体、変異体抗体を選択することも望ましい。例えば、抗体は、癒痕形成を減少させたり、あるいは腫瘍の進行を改変するものであり得る。本発明による抗L P A抗体の活性を測定するための1つのアッセイは、E L I S Aである。ヒト患者に抗体の治療有効量を投与した際に、免疫原性応答を惹起しないヒト化抗体または変異体抗体が好ましい。免疫原性応答が惹起されるにしても、抗体が、それで治療を受けた患者に治療効果を与えるような応答が好ましい。

【0159】

本発明の1つの実施態様に従って、ヒト化抗L P A抗体は、本明細書に定義するようなエピトープを結合する。関心対象の抗体によって結合されるL P A上のエピトープに結合する抗体(例えば、L P Aに対する抗体の結合をブロックするもの)を選別するために、Antibodies, A Laboratory Manual(抗体、実験マニュアル), Cold Spring Harbor Laboratory, Ed H arlow and David Lane(1988)に記載のような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。あるいは、抗体が関心対象のエピトープを結合するかどうかを判定するために、例えば、Champeira, J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)に説明されるようなエピトープマッピングを行うことができる。

【0160】

本発明による抗体は、以下の式に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを有する。FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4。式中、「FR1-4」は、4つのフレームワーク領域、そして「CDRH1-3」は抗L P A抗体の重鎖可変ドメインの3つの超可変領域を表す。FR1-4は、コンセンサス配列(例えば、ヒト免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の1つのクラス、サブクラス、サブグループの最も共通するアミノ酸)に由来するか、個々のヒト抗体フレームワーク領域または異なるフレームワーク領域配列の組み合わせに由来し得る。多くのヒト抗体フレームワーク領域配列は、例えば、Kabatら、前出に編集されている。1つの実施態様では、重鎖可変FRが、Kabatら、前出にデータがまとめられているように、ヒト免疫グロブリンサブグループのコンセンサス配列によって提供される。

【0161】

このヒト重鎖可変FR配列は、その中に、例えば、ヒトFR残基が対応する非ヒト残基によって置換されている(「対応する非ヒト残基」とは、ヒトと非ヒト配列を整列したとき、関心対象のヒト残基と同じKabatの位置番号を有する非ヒト残基を意味する)ような置換を有してもよいが、非ヒト残基による置換は必須ではない。例えば、対応する非ヒト残基以外の置換FR残基は、ファージディスプレイによって選択され得る。

【0162】

本明細書の好ましい実施態様の抗体は、以下の式に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する。FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4。式中、「FR1-4」は、4つのフレームワーク領域、そして「CDRL1-3」は、抗L P A抗体の軽鎖可変ドメインの3つの超可変領域を表す。FR1-4は、コンセンサス配列(例えば、ヒト免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の1つのクラス、サブクラス、サブグループの最も共通するアミノ酸)に由来するか、個々のヒト抗体フレームワーク領域または異なるフレームワーク領域配列の組み合わせに由来し得る。1つの好ましい

実施態様では、軽鎖可変FRが、Kabatら、前出にデータがまとめられているように、ヒト免疫グロブリンサブグループのコンセンサス配列によって提供される。

【0163】

ヒト軽鎖可変FR配列は、その中に、例えば、ヒトFR残基が、対応するマウス残基によって置換されているような置換を有していてもよいが、非ヒト残基による置換は必須ではない。例えば、対応する非ヒト残基以外の置換残基は、ファージディスプレイによって選択され得る。本明細書に記載する関心対象のヒト化抗LPA抗体を生成する方法を、以下に詳細に述べる。

【0164】

a. 抗体の調製

抗LPA抗体および抗LPA抗体の変異体を生成する方法が、以下の実施例で説明される。ヒト化抗LPA抗体は、非ヒト抗LPA抗体に基づいて、調製し得る。完全ヒト抗体はまた、例えば、遺伝子改変（即ち、トランスジェニック）マウス（例えば、Medarex社から）において、免疫原を提示したときに、必ずしもCDF移植を必要としない、ヒト抗体を生成することができる。これらの抗体は、非ヒト抗体遺伝子が抑制されて、ヒト抗体遺伝子発現で置換されているマウスのような動物に由来する完全ヒト抗体（100%ヒトのタンパク質配列）である。本出願人は、該当するCDRのヒトフレームワークを生成できるようなこのような遺伝子改変マウスやその他の動物に提示したときに、生理活性脂質に対する抗体を生成できると考える。

変異体を生成する場合は、親抗体を調製する。かかる非ヒト抗体および親抗体を生成するための代表的な技術を以下の項に説明する。

【0165】

(i) 抗原の調製

抗体の生成に使用される抗原は、例えば、インタクトなLPAまたはLPAの一部（例えば、エピトープを含むLPAフラグメント）であり得る。抗体を生成するために役に立つ抗原のその他の形態は、当業者には明らかであろう。

【0166】

(ii) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、該当する抗原とアジュバンドの複数回の皮下（sc）または腹腔内（ip）注射によって、動物（哺乳類、鳥類、軟骨魚を含む魚類を含む脊椎動物または無脊椎動物）において惹起することが好ましい。該当する抗原を、免疫される種において免疫原であるタンパク質またはその他の担体、例えば、キーホールインペットヘモシアニン（KLH）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、大豆トリブシン阻害剤に、二機能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスクシンイミドエステル（システイン残基を介してコンジュゲート）、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、 SOCl_2 または、 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ （ここでRと R^1 は異なるアルキル基）、を用いてコンジュゲートさせることが有用であり得る。非タンパク質担体（例えば、コロイド金）も、抗体生成のために、当該分野に公知である。

【0167】

動物は、抗原、免疫原性コンジュゲート、誘導体に対して、例えば、100mgまたは5mgのタンパク質またはコンジュゲート（それぞれ、ウサギまたはマウスに）を3容積のフロイント完全アジュバンドと混合して、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、免疫される。1ヵ月後に、当初の量の1/5～1/10の量のペプチドまたはフロイント完全アジュバンドを、複数部位に皮下注射することによって、動物を追加免疫する。7～14日後、動物から採血して、抗体価について血清を定量する。動物は、抗体価がプラトーになるまで追加免疫を受ける。同一抗原であるが、別のタンパク質および/または異なる交差試薬にコンジュゲートされているコンジュゲートで動物を追加免疫することが好ましい。また、コンジュゲートは、タンパク質融合のような、組み換え細胞培養で調製することができる。さらに、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答の増強を目的とす

10

20

30

40

50

る用途に適する。

【0168】

(iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495(1975)が最初に説明したハイブリドーマ法を用いて作成するか、組み換えDNA法のようなその他の方法によって作成し得る(米国特許第4,816,567号)。ハイブリドーマ法では、マウスまたはその他の好適な宿主動物(ハムスターまたはマカクザルなど)を、免疫に使用したタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する、または産生することが可能なリンパ球を誘導するために、上述のように免疫化する。あるいは、インビトロでは、リンパ球が免疫されてもよい。リンパ球を次に、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような好適な融合剤を用いて、ミエローマ細胞と融合させる(Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice(モノクローナル抗体:原理と手法)、pp.59-103(Academic Press, 1986))。

10

【0169】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは、融合していない親ミエローマ細胞の増殖または生存を抑制する物質を1つ以上含む、好適な培地に播種して増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素であるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠損する場合、ハイブリドーマ用培地は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を阻止する物質である、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含むことになる(HAT培地)。

20

【0170】

好ましいミエローマ細胞は、効率よく融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルな抗体産生をサポートし、HAT培地のような培地に感受性があるものである。これらの中では、好ましいミエローマ細胞株は、米国カリフォルニア州、サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerから入手可能なMOP-21およびM.C.-11マウス腫瘍、米国メリーランド州ロックビルのAmerican Type Culture Collectionから入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞に由来するようなマウスミエローマ株である。ヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について説明されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984)、Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications(モノクローナル抗体産生技術と応用)、pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

30

【0171】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法、あるいは放射性免疫測定法(RIA)または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)などのインビトロ結合アッセイによって測定される。

40

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonら、Anal. Biochem., 107:220(1980)によるスキッチャード分析によって測定することができる。

【0172】

ハイブリドーマ細胞が、所望する特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生することが確認された後で、そのクローンは、限界希釈法によってサブクローンされて、標準法によって増殖され得る(Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice(モノクローナル抗体:原理と手法)、pp.59-103(Academic Press, 1986))。この目的のための好適な培地は、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地などであ

50

る。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物体内の腹水腫瘍としてインビボでも増殖し得る。

【0173】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、培地、腹水、血清から、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析法、アフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製法によって、適宜分離される。

【0174】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の方法（例えば、モノクローナル抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いて）を用いて、容易に単離および配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましいソースとして役立つ。いったん単離されると、そのDNAは、当該分野では公知である発現ベクター中に配置されてから、E coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、免疫グロブリンを産生しないミエローマ細胞などの宿主細胞中にトランスフェクトして、組み換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得ることができる。抗体の組み換え産生については、以下にさらに詳説する。

【0175】

(iv) ヒト化およびアミノ酸配列変異体

抗体のヒト化についての一般的な方法は、米国特許最新5861155、US19960652558、19960606、US6479284、US20000660169、20000912、US6407213、US19930146206、19931117、US6639055、US20000705686、20001102、US6500931、US19950435516、19950504、US5530101、US5585089、US19950477728、19950607、US5693761、US19950474040、19950607、US5693762、US19950487200、19950607、US6180370、US19950484537、19950607、US2003229208、US20030389155、20030313、US5714350、US19950372262、19950113、US6350861、US19970862871、19970523、US5777085、US19950458516、19950517、US5834597、US19960656586、19960531、US5882644、US19960621751、19960322、US5932448、US19910801798、19911129、US6013256、US19970934841、19970922、US6129914、US19950397411、19950301、US6210671、v、US6329511、US19990450520、19991129、US2003166871、US20020078757、20020219、US5225539、US19910782717、19911025、US6548640、US19950452462、19950526、US5624821、US19950479752、19950607に説明されている。

【0176】

ある実施態様では、これらのヒト化抗体のアミノ酸配列変異体、特に、抗体の結合親和性またはその他の生物学的特性を改善したものを作成することが望ましいことがある。

抗LPA抗体のアミノ酸配列変異体は、抗LPA抗体DNA中に適切なヌクレオチドの変化を導入するか、あるいはペプチド合成によって調整される。かかる変異体は、例えば、本明細書の実施例にある抗LPA抗体のアミノ酸配列内からの残基の欠失、および/またはアミノ酸配列内への残基の挿入および/または残基の置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性を有しているという前提で、欠失、挿入、置換の組み合わせが、最終コンストラクトに達するために使用される。また、アミノ酸の変化は、ヒト化抗LPA抗体または抗LPA抗体変異体の、グリコシル化部位の数または位置の変化といった、翻訳後プロセスを改変し得る。

10

20

30

40

50

【0177】

変異誘発に好ましい部位である、抗LPA抗体の特定の残基または領域の同定に役立つ方法は、CunninghamおよびWells、Science、244:1081-1085(1989)によって説明されているように「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、アミノ酸とLPA抗原との相互作用に影響するために、残基または標的残基グループが同定され(例えば、アルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、グルタミン酸のような荷電残基)、中性アミノ酸または負荷電アミノ酸(アラニンまたはポリアラニンが最も好ましい)によって置換される。置換に対する機能的感受性を示すそれらのアミノ酸部位は次に、置換部位に更なる変異体または他の変異体を導入することによって緻密化される。したがって、アミノ酸配列変異を導入するための部位は予め決定されるが、変異自体の本質を予め決定する必要はない。例えば、所定の部位での変異のパフォーマンスを分析するために、標的コドンまたは領域で、アラニンスキャニングまたはランダム変異誘発が行われ、所望する活性について、発現した抗LPA抗体変異体が選別される。アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さを超えるアミノ末端および/またはカルボキシル末端融合、ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基またはエピトープタグ融合抗体を含む。その他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増加させるような酵素またはポリペプチドの、抗体のN末端またはC末端への融合を含む。

10

【0178】

変異体のその他のタイプは、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、少なくとも1つのアミノ酸残基が抗体分子から除去され、異なる残基がその場所に挿入されている。置換性変異誘発についての最も関心対象となる部位は、超可変領域を含むが、FR改変もまた考慮される。保存的置換が好ましいが、より実質的な変化が導入され、生成物の選別が行われてもよい。置換の例を以下に列記する。

20

【0179】

典型的なアミノ酸残基置換

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

30

40

【0180】

50

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、(a)例えば、シートまたはラセン立体構造のような、置換領域におけるポリペプチド主鎖の構造、(b)標的部位の分子の荷電または疎水性、(c)副鎖のバルク、の維持に対する効果において著しく異なる置換を選択することによって達成される。天然残基は、共通の副鎖特性に基づいて、グループに分類される。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン
 - (2) 中性親水性：システイン、セリン、スレオニン
 - (3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸
 - (4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン
 - (5) 鎖の配向性を影響する残基：グリシン、プロリン
 - (6) 芳香族：トリプシン、チロシン、フェニルアラニン
- 【0181】

10

非保存的な置換は、これらのクラスの1つのメンバーを他のクラスと交換することを伴う。

また、分子の酸化安定性を向上させ、異常な交差を防止するために、抗体の正しい立体構造の維持に関与しないシステイン残基はすべて置換され得る。逆に、安定性を向上させるために、(特に、抗体が、Fvフラグメントのような抗体フラグメントである場合)、システイン結合を抗体に付加してもよい。

【0182】

置換変異体の1つのタイプは、親抗体(例えば、ヒト化またはヒト抗体)の1つ以上の超可変領域の置換を含む。一般的には、その結果、さらなる開発のために選択された変異体は、その元となる親抗体と比較して、より改善された生物学的特性を有することになる。かかる置換変異体を作成するための便利な方法は、ファージディスプレイを用いる親和性成熟である。簡単に言うと、各部位ですべての可能なアミノ置換を作成するために、いくつかの超可変領域部位(例えば、6~7部位)に変異を導入する。このようにして生成された抗体変異体は、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物に対する融合物として、糸状ファージ粒子から、一価様式でディスプレイされる。ファージディスプレイによる変異体は次に、本明細書に開示するように、生物学的活性(例えば、結合親和性)について選別される。修飾のために候補となる超可変領域部位を同定するために、アラニンスキニング変異誘発を行って、抗原結合に顕著に寄与する超可変領域残基を同定

20

30

【0183】

抗体のアミノ酸変異体のもう1つのタイプは、抗体の元来のグリコシル化を改変する。改変するとは、抗体中の1つ以上の炭水化物部分を欠失すること、および/または抗体中に存在しないグリコシル化部位を1つ以上付加することを意味する。

40

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型および/またはO結合型である。N結合型とは、アスパラギン残基の副鎖への炭水化物部分の付加を意味する。トリペプチド配列である、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン(ここでXは、プロリン以外のいずれかのアミノ酸)は、アスパラギン副鎖への炭水化物部分の酵素的付加の最も一般的な認識部位である。したがって、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することによって、潜在的なグリコシル化部位が創出される。O結合型グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸(5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもまた使用し得るが、最も一般的にはセリンまたはスレオニン)への糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、キシロースの付加を意味する。

【0184】

50

抗体へのグリコシル化部位の付加は、便利なことに、1つ以上の上記のトリペプチド配列を含むようにアミノ酸配列を改変することによって達成される（N結合型グリコシル化部位の場合）。この改変はまた、元の抗体配列に対する、1つ以上のセリンまたはスレオニン残基の付加、またはセリンまたはスレオニン残基による置換によって行われる（O結合型グリコシル化部位の場合）。

抗スフィンゴ脂質抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野に公知の様々な方法によって調製される。これらの方法は、限定はされないが、天然源からの単離（天然アミノ酸配列変異体の場合）またはオリゴヌクレオチドを介する（または部位特異的）変異誘発、PCR変異誘発、以前に調製された変異体のカセット変異誘発または抗スフィンゴ脂質抗体の非変異体バージョンによる調製を含む。

【0185】

(v) ヒト抗体

ヒト化のほかに選択可能な方法として、ヒト抗体を生成できる。例えば、今では、免疫されると、内在性免疫グロブリンを産生することなく、ヒト抗体の完全なレパトワを生じることができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作成することが可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞系列変異マウスにおける抗体の重鎖結合領域（ J_H ）遺伝子のホモ接合型欠失は、内在性抗体産生の完全な抑制を生じることが説明されている。かかる生殖細胞系列変異マウスへのヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子アレイのトランスファーは、抗原攻撃に際してヒト抗体の産生を生じることになる。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993)、Jakobovitsら、Nature, 362: 255-258 (1993)、Bruggemannら、Year in Immunol., 7: 33 (1993)、ならびに米国特許第5,591,669、5,589,369、5,545,807号。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーからも生成できる(Hoogenboomら、J. Mol. Biol., 227: 381 (1991)、Marksら、J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)、ならびに米国特許第5,565,332および5,573,905号)。ヒト抗体はまた、インビボで活性化されたB細胞によっても生成できる（米国特許第5,567,610および5,229,275号を参照。）

【0186】

(vi) 抗体フラグメント

ある実施態様では、抗LPA薬剤は、抗原結合を含む、少なくとも1つの所望する活性を保持する抗体フラグメントである。抗体フラグメント産生のために、様々な技術が開発されてきている。従来より、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化を介して得られた（例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992)およびBrennanら、Science 229: 81 (1985)を参照。）しかしながら、今では、これらのフラグメントは、組み換え宿主細胞によって直接産生することができる。例えば、Fab'-SHフラグメントは、E. coliから直接回収でき、化学的に結合されて、F(ab')₂フラグメントを形成する(Carterら、Bio/Technology 10: 163-167 (1992))。別の実施態様では、F(ab')₂は、F(ab')₂分子のアセンブリを促進するためにロイシンジッパーGCN4を用いて形成される。別のアプローチに従って、Fv、Fab、F(ab')₂フラグメントは、組み換え宿主細胞培養から直接単離され得る。抗体フラグメント産生のためのその他の技術は、当業者には明らかであろう。

【0187】

(vii) 多重特異性抗体およびその他の薬剤

いくつかの実施態様では、抗LPA薬剤は、第一結合部分と第二結合部分からなり、ここで第一結合部分は、LPAまたはLPA代謝物である第一分子と特異的に反応し、第二結合部分は、第一分子とは異なる分子種である第二分子と特異的に反応する。かかる薬剤

10

20

30

40

50

は、複数の第一結合部分、または複数の第二結合部分、または複数の第一結合部分と複数の第二結合部分を得る。第一結合部分と第二結合部分の比率は、約1000:1~約1:1000の範囲に渡ってもよいが、好ましくは、約1:1であり、ここでこの比率は、原子価に換算して測定することが好ましい。

【0188】

第一部分が抗体である実施態様において、結合部分は抗体でもあり得る。好ましい実施態様では、第一および第二部分は、リンカー部分を介して結合されており、1つまたは別々のケミストリーによる第一および第二結合部分の付着について、2~数百または数千の原子価を有し得る。二重特異性抗体の例は、2つの異なるエピトープに対して反応性のある抗体を含み、ある実施態様では、1つのエピトープはLPAエピトープであり、二番目のエピトープは、例えば、S1Pのような他の生理活性脂質である。他の実施態様では、二重特異性抗体は、LPA上にあるエピトープおよび細胞表面に検出されるエピトープに対して反応性がある。これは、LPA特異性抗体部分を細胞に対して標的させるのに役立つ。

10

【0189】

本発明による組成物はまた、第一薬剤と第二薬剤からなるが、ここで第一薬剤は、LPAとLPA代謝物からなる群から選択される第一分子と特異的に反応する第一結合部分を含み、第二薬剤は、第一分子とは異なる分子種である第二分子と特異的に反応する第二結合部分を含む。第一薬剤および/または第二薬剤は、抗体であり得る。第一薬剤と第二薬剤の比率は、約1,000:1~1:1,000の範囲であってよいが、好ましい比率は、約1:1である。

20

【0190】

好ましい実施態様では、LPA活性を妨害する薬剤は、LPAと特異的に反応する抗体である。いくつかの実施態様では、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する多重特異性(例えば、二重特異性)抗LPA抗体を生成することが望ましいことがある。代表的な二重特異性抗体は、LPAの2つの異なるエピトープに結合し得る。あるいは、抗LPA(抗体の)アームは、例えば、S1Pまたは細胞表面に対する抗体の局在化のための細胞表面特異性抗原のような異なる分子に結合するアームと組み合わせてもよい。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製され得る。

30

【0191】

二重特異性抗体作成のための別のアプローチに従って、一对の抗体分子間の界面を操作することによって、組み換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合(%)を最大化することができる。好ましい界面は、抗体の定常ドメインのC_H3ドメインを少なくとも一部含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの1つ以上の小アミノ酸副鎖が、大型の副鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換されている。大型アミノ酸副鎖を小型副鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置換することによって、この大型副鎖と同一サイズまたは似たサイズの代償「空洞」が、第二抗体分子の界面上に作成される。これは、ホモ二量体のような他の望ましくない最終産物の収率よりもヘテロ二量体の収率を増加させるためのメカニズムを提供する。1996年9月6日に公開されたWO96/27011を参照。

40

【0192】

二重特異性抗体は、交差または「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の1つはアビジンに、他方はビオチンに結合し得る。ヘテロコンジュゲート抗体は、便利な交差方法を用いて作成することができる。好適な交差剤は、当該分野に公知であり、数々の交差技術と共に、米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0193】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を生成するための技術はまた、文献に説明されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて作成することができる。Brenn

50

anら、Science 229:81(1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解によって開裂して、F(ab')₂フラグメントを生成する方法を説明する。これらのフラグメントは、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、近接するジチオールを安定化させて、分子間ジスルフィド形成を阻止する。生成されたFab'フラグメントは次に、チオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。Fab'-TNB誘導体の1つは次に、メルカプトエチルアミンによる還元によって、Fab'-チオールに再変換され、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合されて、二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための作用因子として使用できる。さらに他の実施態様では、E. coliから直接回収されたFab'-SHフラグメントは、インビトロで化学的に結合されて、二重特異性抗体を形成する。Shalabyら、J. Exp. Med. 175:217-225(1992)。

【0194】

組み換え細胞培養から二重特異性抗体フラグメントを直接作成および単離するための様々な技術も説明されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生されてきた。Kostelnyら、J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)。FosおよびJunタンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体のFab'部分に結合された。抗体ホモ二量体は、ヒンジ領域で還元されて、単量体を形成し、次に再酸化されて、抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法はまた、抗体ホモ二量体の産生にも利用できる。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)によって説明された「二機能性抗体」技術は、二重特異性抗体フラグメント作成のための別のメカニズムを提供した。このフラグメントは、同一鎖上にある2つのドメイン間で対合するには短すぎるリンカーによって、軽鎖可変ドメイン(V_L)と結合された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。従って、1つのフラグメントのV_HおよびV_Lドメインは、他のフラグメントの相補V_LおよびV_Hドメインと対合することを余儀なくされ、その結果、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)二量体の使用による、二重特異性抗体フラグメント作成のための他の方法も報告されている。Gruberら、J. Immunol. 152:5368(1994)を参照。あるいは、二重特異性抗体は、Zapataら、Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)によって説明されるように産生される「直鎖状抗体」であり得る。

2価以上を有する抗体が検討されている。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttlら、J. Immunol. 147:60(1991)。

【0195】

アームまたはフラグメントにつき1つ以上の結合部位を含む、本発明による抗体(またはポリマーまたはポリペプチド)を本明細書では、「多価」抗体と呼ぶ。例えば、本発明による「二価」抗体は、そのFabまたはフラグメントにつき2つの結合部位を含むが、本発明による「三価」ポリペプチドは、そのFabまたはフラグメントにつき3つの結合部位を含む。本発明による多価ポリマーにおいて、Fabにつき2つ以上の結合部位が、同一または異なる抗原に結合し得る。例えば、本発明による多価ポリペプチドにおける2つ以上の結合部位は、同一抗原に対して(例えば、当該抗原の同じ部分またはエピトープに対して、あるいは当該抗原の2つ以上の同じまたは異なる部分またはエピトープに対して)、および/または異なる抗原、あるいはその組み合わせに対して作成され得る。従って、本発明による二価ポリペプチドは、例えば、2つの同一結合部位、抗原の第一部分またはエピトープに対する第一結合部位ならびに当該抗原の同一部分またはエピトープまたは当該抗原の別の部分またはエピトープに対する第二結合部位、あるいは抗原の第一部分またはエピトープに対する第一結合部位と、異なる抗原に対する第二結合部位を含み得る。しかしながら、上記の記述から明らかであるように、本発明による多価ポリペプチドは、同一または異なる抗原に対する結合部位をいくつでも含み得るという意味において、本発明はそれに限定されることはない。1つの実施態様では、多価ポリペプチドは、少なく

10

20

30

40

50

とも2つのリガンド結合エレメントを含み、その1つは、本明細書に示すCDRペプチド配列を1つ以上含む。他の実施態様では、多価ポリペプチドは、本明細書に開示されるCDR配列からそれぞれ独立して選択される3つのリガンド結合部位を含む。

【0196】

少なくとも1つのリガンド結合エレメントがLPAを結合する。1つの実施態様では、少なくとも1つのリガンド結合エレメントが他の標的を結合する。1つの実施態様では、多価結合分子中には、最高10,000の結合エレメントが存在し、リガンド結合エレメントは、スキャフォールドに結合してもよい。

Fabまたはそのフラグメントにつき少なくとも2つの結合部位を含み、そのうち少なくとも1つの結合部位が第一の抗原に対し、第二の結合部位が第一の抗原と異なる第二の抗原に対する、本発明による抗体（またはポリマーまたはポリペプチド）もまた、「多重特異性」と呼ぶこととする。したがって、「二重特異性」ポリマーは、第一の抗原に対する少なくとも1つの部位および第二の抗原に対する少なくとも1つの第二の部位を含むが、「三重特異性」とは、第一の抗原に対する少なくとも1つの結合部位、第二の抗原に対する少なくとも1つの更なる結合部位、第三の抗原に対する少なくとも1つの更なる結合部位などを含む。したがって、最も単純な型では、本発明による二重特異性ポリペプチドは、本発明による二価ポリペプチド（Fabにつき）である。しかしながら、前述から明らかであるように、本発明による多重特異性ポリペプチドは、2つ以上の異なる抗原に対する結合部位をいくつでも含み得るという意味において、本発明はそれに限定されることはない。

【0197】

(viii) その他の修飾

抗LPA抗体のその他の修飾が検討されている。例えば、本発明はまた、トキシン（例えば、細菌、真菌、植物、動物由来の酵素活性を有するトキシン、またはそれらのフラグメント）のような細胞毒剤、あるいは放射性同位元素（例えば、放射性コンジュゲート）にコンジュゲートされた本明細書に記載の抗体を含む免疫コンジュゲートに関連する。コンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩(SPD)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二機能性誘導体(ジメチルアジブイミダート塩酸塩など)、活性エステル類(ジスクシイミジルスベリン酸塩など)、アルデヒド類(グルタルアルデヒドなど)、ビスアジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-アゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアナ酸塩(トリエン2,6-ジイソシアナートなど)、ビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)のような様々な二機能性タンパク質カップリング剤を用いて作成される。

【0198】

本明細書で開示される抗LPA抗体はまた、免疫リポソームとして製剤化し得る。抗体を含むリポソームは、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985)、Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980)、ならびに米国特許第4,485,045および4,544,545号などのように、当該分野に公知の方法で調製される。循環時間を改良したリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。例えば、リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、PEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)からなる脂質組成物を用いて、逆相蒸発法によって生成できる。リポソームを規定の孔サイズのフィルターを通して押し出すことによって、所望する直径を有するリポソームを産生する。本発明による抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら、J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に説明されるように、リポソームにコンジュゲートすることができる。もう一つの活性成分が任意に、リポソーム内に含まれてもよい。

【0199】

上記に論述したヘテロ二機能性交差試薬の使用のような当該分野に公知の技術によって、酵素またはその他のポリペプチドは、抗LPA抗体に共有結合され得る。あるいは、本発明による酵素の少なくとも1つの機能的活性部分に結合した、本発明による抗体の少なくとも1つの抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該分野に公知の組み換えDNA法を用いて構築することができる(例えば、Neubergerら、Nature 312:604-608(1984)を参照)。

【0200】

本発明のある実施態様では、例えば、標的組織と細胞への浸透を高めるために、インタクトな抗体よりもむしろ抗体フラグメントを使用することが望ましいことがある。この場合、血清半減期を延長させるために、抗体フラグメントを修飾することが望ましいことがある。これは、例えば、抗体フラグメント中にサルベージレセプター結合エピトープを組み込むことによって(例えば、抗体フラグメントの該当領域の変異、またはエピトープをペプチドタグ内に組み込んでから、それを抗体フラグメントのいずれかの末端または中央部で(例えば、DNAまたはペプチド合成によって)融合させることによって)達成し得る。1996年10月17日に公開されたWO96/32478を参照。

【0201】

抗LPA抗体の共有結合的修飾も、本発明の範囲に含まれる。これらは、化学合成、または該当する場合には、抗体の酵素的または化学的切断によって作成できる。抗体の共有結合的修飾の他のタイプは、抗体の標的アミノ酸残基を、選択された副鎖あるいはN-またはC-末端残基と反応させることが可能な有機誘導化剤と反応させることによって、分子中に導入される。ポリペプチドの代表的な共有結合的修飾は、参考文献として特に本明細書に援用されている、米国特許第5,534,615号に説明されている。抗体の共有結合的修飾の好ましいタイプは、米国特許第4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192、4,179,337号に示すような方法で、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン類のような、種々の非タンパク質性ポリマーの1つに抗体を結合させることを含む。

【0202】

b. ベクター、宿主細胞、組み換え法

本発明はまた、抗LPA抗体をコードする単離核酸、核酸を含むベクターと宿主細胞、抗体産生のための組み換え技術を提供する。

抗体の組み換えによる産生には、それをコードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNAの増幅)と発現のために複製可能なベクター中に挿入することができる。他の実施態様では、抗体は、例えば、参考文献として特に本明細書に援用されている、米国特許第5,204,244号に記載のように、相同組み換えによって産生することができる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の方法を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いて)、容易に単離および配列決定することができる。多数のベクターが使用可能である。ベクターの構成成分は、一般的に、限定はされないが、以下を1つ以上を含む。例えば、1996年7月9日に公布され、参考文献として特に本明細書に組み込まれている米国特許第5,534,615号に記載のような、シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、転写終止配列。

【0203】

本明細書のベクターにおいてDNAのクローニングまたは発現に適する宿主細胞は、前述の原核、またはイースト、または高等真核細胞である。本目的に適する原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性菌、例えば、大腸菌類(例: E. coli)などの腸内細菌科、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属(例: Salmonella typhimurium)、セラチア属(例: Serratia marcescans)、赤痢菌属、ならびにB. subtilisおよびB. licheniformis(例えば、1989年4月12日に出版されたDD

266, 710 に開示される *B. licheniformis* 41P) のような桿菌、*P. aeruginosa* のようなシュードモナス属、ならびにストレプトマイセス属のような真正細菌を含む。1つの好ましい *E. coli* クローニング宿主は、*E. coli* 294 (ATCC 31, 446) であるが、*E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31, 537) および *E. coli* W3110 (ATCC 27, 325) などの他の菌株も好適である。これらの実施例は、限定するものではなく、説明するためのものである。

【0204】

原核生物の他に、糸状菌やイーストのような真核微生物は、抗スフィンゴ脂質抗体をコードするベクターに好適なクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)、または一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物の中で最も一般的に使用される。ただし、例えば、*Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母)、クリベロミセス属宿主(例: *K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilorum* (ATCC 36, 906)、*K. thermotolerans*、*K. marxianus*)、ヤロウシア属 (EP 402, 226)、*Pichia pastoris* (メタノール資化酵母) (EP 183, 070)、カンジダ、*Trichoderma reesi*a (EP 244, 234)、*Neurospora crassa*、*Schwanniomyces occidentalis* などのシュワンニオマイセス属、ならびに例えば、ニューロスポラ属、アオカビ属、トリボクラジウム属などの糸状菌、ならびに *A. nidulans* および *A. niger* のようなアスペルギリウス宿主などの多数のその他の属、種、株が本明細書では使用可能かつ有用である。

【0205】

グリコシル化抗スフィンゴ脂質抗体の発現に適する宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物と昆虫細胞を含む。多数のパキキュロウイルス株と変異体ならびに *Spodoptera frugiperda* (ヨウトガ、イモムシ)、*Aedes aegypti* (ネツタイシマカ、蚊)、*Aedes albopictus* (ヒトスジシマカ、蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、*Bombyx mori* (カイコ) などの宿主に由来する該当する許容昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々なウイルス株が市販されており、その例は、*Autographa californica* NPV (核多角体病ウイルス) の L-1 変異株および *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株であり、かかるウイルスは本発明に従って本明細書のウイルスとして、特に *Spodoptera frugiperda* (ヨトウガ) 細胞のトランスフェクションのために使用し得る。ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、タバコの植物細胞培養もまた、宿主として利用できる。

【0206】

ただし、脊椎動物細胞への関心が最も高く、培養脊椎動物細胞の増殖(組織培養)が常用法となっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651)、ヒト胚腎臓株 (293細胞または浮遊培養によって増殖するためにサブクローンされた 293細胞、Graham ら、*J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)、ベイビーハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL 10)、チャイニーズハムスター卵巢細胞 / - DHFR (CHO、Urlaub ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980))、マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、*Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980))、サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2)、イヌ腎臓細胞

10

20

30

40

50

胞 (MDCK、ATCC CCL 34)、バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)、ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065)、マウス乳房腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51)、TRI細胞 (Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982))、MRC 5細胞、FS4細胞、ヒト肝癌株 (Hep G2) である。

【0207】

宿主細胞は、抗体産生のために、前述の発現またはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導する、または形質転換株を選択する、または所望する配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修正された従来の栄養培地で培養される。

10

【0208】

本発明による抗体を産生させるために使用される宿主細胞は、種々の培地で培養できる。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Sigma) などの市販培地が、宿主細胞の培養に適する。さらに、Hamら、Meth. Enz. 58:44(1979)、Barnesら、Anal. Biochem. 102:255(1980)、米国特許第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号、または第5,122,469号、WO 90/03430、WO 87/00195、または米国再発行特許第30,985号に記載のいずれの培地も宿主細胞のための培養培地として使用し得る。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび/またはその他の増殖因子 (インスリン、またはトランスフェリン、または上皮増殖因子など)、塩類 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩など)、バッファー (緩衝剤) (HEPESなど)、ヌクレオチド (アデノシンおよびチミジンなど)、抗生物質 (GENTAMYCINTMなど)、トレースエレメント (通常最終濃度でマイクロモル範囲で存在する無機化合物として定義される)、グルコースやそれと同等なエネルギー源で補充されてもよい。その他のいかなる必要なサプリメントもまた、当業者には公知である適切な濃度で含まれてよい。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞に以前使用したものと同様であり、当業者には公知であろう。

20

【0209】

組み換え技術を使用する場合、抗体は、細胞膜周辺腔内において、細胞内で産生されるか、培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、最初のステップとして、宿主細胞または溶解されたフラグメントのいずれかである微粒子デブリが、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。Carterら、Bio/Technology 10:163-167(1992)は、E. coliの細胞膜周辺腔に分泌される抗体の単離法を説明する。手短に言うならば、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA、フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下で、約30分分解凍する。細胞デブリは遠心分離によって取り除くことができる。抗体が培地中に分泌される場合、かかる発現系由来の上清は、一般的にはまず、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon超濾過ユニットのような、市販のタンパク質濃縮フィルターを用いて濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、PMSFのようなプロテアーゼ阻害薬を前述のいずれの工程に含んでもよく、外来性汚染菌の増殖を防止するために、抗生物質を含んでもよい。

30

40

【0210】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。プロテインAのアフィニティリガンドとしての適性は、種と抗体中に存在するいずれかの免疫グロブリンFcドメインのアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト重鎖に基づく抗体の精製に使用できる (Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62:1-13(1

50

983))。プロテインGは、全マウスアイソタイプとヒト 3に推奨される(Gussら、EMBO J. 5:15671575(1986))。アフィニティリガンドが付着するマトリックスは、ほとんどの場合アガロースであるが、その他のマトリックスも使用可能である。細孔制御ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースよりもより速いフロー速度と短いプロセス時間で実現できる。抗体がC_{H3}ドメインを含む場合、その精製には、Bakerbond ABX.TM樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)が有用である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ充填クロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSETM充填クロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂(例えばポリアスパラギン酸カラム)充填クロマトグラフィー、クロマト分画、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降などのタンパク質精製のためのその他の技術もまた、回収される抗体によっては使用可能である。

10

予備精製の工程後、関心対象の抗体と混入物を含む混合物は、2.5~4.5のpHで溶出バッファーを用いて、好ましくは、低塩濃度(例えば、約0~0.25M塩)で、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけることができる。

【0211】

c. 医薬品製剤、用量、投与ルート

本発明は、抗LPA抗体および関連する組成物と生理活性脂質LPAの血中および組織濃度を低下させるための方法を提供する。

【0212】

20

本発明による治療法と組成物は、これらの治療が、望ましくないまたは有毒な脂質の相対濃度、または絶対濃度、または有効濃度を改変できることを示すために、「LPAベースの」と呼ばれる。「望ましくない脂質」は、有毒な生理活性脂質、ならびに有毒脂質の代謝物、特に代謝前駆体を含む。特に関心の対象となる望ましくない生理活性脂質の一例は、LPAである。

【0213】

患者において、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を結合する1つ以上の抗LPA抗体を含む組成物を提供することにより、遊離する望ましくないLPA量を低下させる治療上の「スポンジ」として作用することである。化合物が「遊離状態」にあると記載される場合、その化合物は、いかなる方法においても、制限されることなく、それが望ましくない作用を及ぼす部位または複数部位に到達できる。典型的に、遊離化合物は、その作用部位であるか、あるいは作用部位を含んでいるか、またはそこから自由に作用部位に移動し得る、血液および組織中に存在する。遊離化合物はまた、その化合物を望ましくない化合物に変換する酵素によって作用を受けることができる。

30

【0214】

抗LPA抗体は、疾患、または障害、または身体的外傷の治療を含む、様々な目的のために有効な医薬品組成物中に配合し得る。本発明による抗LPA抗体を1つ以上含む医薬品組成物は、かかる治療のためのキットまたは医療用デバイス中に組み込むことができる。医療用デバイスは、本発明による医薬品組成物を、それを必要とする患者に投与するために使用することができ、本発明の1つの実施態様に従って、そのようなデバイスを含むキットが提供される。そのようなデバイスとキットは、自己投与を含め、本発明による医薬品組成物の定期投与のためにデザインされ得る。かかるデバイスとキットはまた、例えば、救急車や救急処置室、または手術中、あるいは傷害が生じる可能性があるにも係わらず、必要なときに総合的な医療処置を直ちに受けられない可能性がある活動(例えば、ハイキングやキャンプ、または戦争のような状況)における救急用としてもデザインされ得る。

40

【0215】

抗体の治療用製剤は、所望の純度を有する抗体を任意の生理学的に許容される担体、または賦形剤、または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences(Remington薬理科学)第16版、Osol, A. 編集(

50

1980))と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の剤形に調製して保管することができる。許容できる担体、または賦形剤、または安定剤は、使用する用量と濃度においてレシピエントに対して無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩、その他の有機酸などのバッファー、アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤、保存剤(塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール、メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、m-クレゾール)、低分子量(約10残基未満)ポリペプチド、血清アルブミン、またはゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジンなどのアミノ酸、単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、デキストリンを含むその他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、ショ糖、マンニトール、トレハロース、ソルビトールなどの糖類、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属複合体(例えば、亜鉛-タンパク質複合体)、および/またはTWEEN™、PLURONICS™、ポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン系界面活性剤を含む。

10

【0216】

本明細書に記載の製剤はまた、特定の治療適応の必要に応じて、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な作用を有する、1つ以上の有効な化合物を含んでもよい。かかる分子は、適宜、意図する目的のために有効な量で配合される。

【0217】

20

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製されるマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルのそれぞれを、コロイド薬物送達システム(例えば、リボソーム、アルブミンマイクロソフィア、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含んで、封入することもできる。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences(Remington薬科学)第16版、Osol, A. 編集(1980)に開示されている。

インビボ投与用で使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、例えば、無菌濾過膜を通して濾過することによって、容易に達成できる。

30

【0218】

徐放性組成物も調製し得る。徐放性組成物の好適な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーによる半透過性マトリックスを含み、そのようなマトリックスは、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルのような成形物の形態をとる。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-メタクリル酸ヒドロキシエチル)、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ー、非分解性酢酸エチレンビニル、Lupron Depot, TM.(乳酸・グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドから構成される注射用マイクロソフィア)などの分解性乳酸・グリコール酸コポリマー、ポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン酢酸ビニルや乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日に渡って分子の放出を可能にする一方、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短期間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長期間残存すると、37

で湿気に曝されることによって変性したり凝集したりすることがあり、その結果、生物活性が失われたり、免疫原性に変化が生じることがある。関連するメカニズムに基づいて、安定化させる合理的な方法を考案することが可能である。例えば、凝集メカニズムが、チオ-ジスルフィド相互交換による分子間S-S結合形成であると分かっていたら、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分量の制御、適切な添加剤の使用、特定のポリマーマトリックス組成物の開発により、安定化を達成することもできる。

40

治療上の適用として、本発明による、抗LPA薬剤(例えば、抗体)は、ボーラスとして静脈内投与、または一定期間にわたって持続注入、あるいは筋肉内、腹腔内、脳脊髄内

50

、皮下、関節内、滑液嚢内、くも膜下腔内、経口、局所、吸入ルートによってヒトに投与し得るものを含む、上記に記載のような、薬学的に許容される剤形で、哺乳類、好ましくはヒトに投与される。

【0219】

疾患の予防または治療のために、抗体の適切な用量は、上記に定義するような、治療される疾患のタイプ、疾患の重症度と経過、抗体が予防または治療目的で投与されるか否か、過去の治療、患者の既往歴と抗体に対する応答、担当医師の判断に基づいて決めることになる。抗体は、一時点または一連の治療にわたって、患者に適宜投与される。

疾患のタイプと重症度に基づき、例えば、1回以上の個別の投与または持続注入による、抗体約 $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg} \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ (例えば、 $0.1 \sim 20 \text{ mg} / \text{kg}$) が、患者への投与のための初回の候補投与量である。典型的な日毎または週毎の用量は、上記に言及する理由に基づき、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 20 \text{ mg} / \text{kg}$ またはそれ以上の範囲である。数日間またはそれ以上にわたる反復投与については、症状によって、疾患症状の所望する抑止が起こるまで治療が反復される。しかしながら、他の投与計画も有益であり得る。この治療の進行は、例えば、X線撮影を含む、従来の技術またはアッセイによって容易にモニターされる。治療用抗体に対する患者曝露を最適化するために、抗体を用いて体液または組織中のLPA濃度を測定する検出方法を使用することができる。

10

【0220】

本発明による他の実施態様に従って、例えば、LPA活性を妨害するモノクローナル抗体のような薬剤を含む組成物が単独療法として投与されるが、他の好ましい実施態様では、LPA活性を妨害する薬剤を含む組成物が併用療法の一部として投与される。場合によっては、疾患の予防または治療における抗体の有効性は、抗体を連続投与、または癌治療のための化学療法剤のような、それらの目的のために有効である他の薬剤と併用投与することによって高められる場合もある。その他の場合、抗LPA薬剤は、化学療法に対して細胞を亢進または感作することによって、低用量、すなわち低毒性で有効になる場合もある。好ましい併用療法は、LPA活性を妨害する薬剤を含む組成物の投与に加えて、化学療法剤、放射線療法、外科手術、前記のいずれかの併用からなる群から選択される第二の治療法を行うことを含む。

20

かかる他の薬剤は、投与される組成物中に含まれていてもよいし、別に投与されてもよい。さらに、抗体は、適宜に連続投与、または、例えば、癌治療のための化学療法剤または放射線のような、その他の薬剤またはモダリティと併用投与される。

30

【0221】

d. 本発明による抗LPA薬剤の研究および臨床診断薬を含む診断薬としての用途

本発明による抗LPA薬剤(例えば、抗体)は、例えば、体液から、LPAを検出および/または精製するために使用され得る。

【0222】

アフィニティ精製剤として抗LPA抗体を使用する場合、抗体は、当該分野に公知の方法を用いて、ビーズ、またはセファデックス樹脂、またはフィルター紙のような固体支持体上に固定化される。固定化抗体は、精製されるべきLPAを含む試料と接触させ、その後、固定化抗体に結合されているLPAを除く、試料中の物質を実質的にすべて取り除く好適な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、抗体からLPAを遊離させる、例えば、 $\text{pH} 3 \sim 5.0$ のグリシンバッファのような、他の好適な溶媒で支持体を洗浄する。

40

【0223】

抗LPA抗体はまた、例えば、特定の細胞、または組織、または体液中のLPAを検出するような、LPAの診断検査法にも有用であり得る。そのような診断方法は、例えば、増殖過剰疾患または障害の診断に有用であり得る。したがって、研究用途に加えて、臨床診断用途がある。これらの方法において、抗LPA抗体は、例えば、ビーズ、カラム、プレート、ゲル、フィルター、膜などのような固体支持体に付着されることが好ましい。

【0224】

診断的適用としては、抗体は、検出可能な成分で標識され得る。多くの標識が使用可能

50

であり、一般的に以下のカテゴリーに分類することができる。

【0225】

(a) ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I などの放射性同位元素。抗体は、例えば、*Current Protocols in Immunology* (免疫学における現在のプロトコル) 第1巻と2巻、Coligenら編集Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)に記載の技術を用いて、放射性同位元素で標識することができ、放射能はシンチレーション計測器を用いて測定され得る。

【0226】

(b) 希有土類キレート(ユーロピウムキレート)またはフルオレセインとその誘導体、ローダミンとその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、テキサスレッドのような蛍光性の標識が利用できる。蛍光標識は、例えば、前出の*Current Protocols in Immunology* (免疫学における現在のプロトコル)に開示される技術を用いて、抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光は、蛍光計を用いて定量し得る。

【0227】

(c) 種々の酵素-基質標識が使用可能であり、米国特許第4,275,149号にそれらのいくつかが概説されている。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定できる発色基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、基質の変色を触媒することがあり、これは分光測定法によって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改変し得る。蛍光の変化を定量するための技術は前述されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、(例えば、化学発光計を用いて)測定可能な光を発するか、蛍光受容体にエネルギーを供与する光を発し得る。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼと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ネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)などのペルオキシダーゼ、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、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、ヘテロサイクリック(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、マイクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivanら、*Methods in Enzymol.* (酵素学方法) (J. LangoneおよびH. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166(1981)中の、*Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay* (酵素免疫アッセイ用途向けの酵素・抗体コンジュゲートの調製法)の項に記載されている。

酵素-基質の組み合わせの例は、例えば、以下を含む。

【0228】

(i) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)、ここで水素ペルオキシダーゼが色素前駆体(例えば、オルソ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。

【0229】

(ii) 発色基質としてp-ニトロフェニルリン酸塩を有するアルカリホスファターゼ(AP)、ならびに(iii)発色基質(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4-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)-D-ガラクトシダーゼを有する-D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)。

10

20

30

40

50

多数の他の酵素 - 基質の組み合わせが当業者には使用可能である。これらの一般概要については、米国特許第 4, 275, 149号および第4, 318, 980号を参照。

【0230】

標識は、間接的に抗体とコンジュゲートされることがある。これを行うための様々な技術は、当業者には公知である。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、前述の3つの大まかな分類のうちのいずれかはアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にアビジンに結合し、したがって、標識は、この間接的な様式で抗体とコンジュゲートされ得る。あるいは、抗体と標識を間接的にコンジュゲートさせるために、抗体を小さなハプテン（例えば、ジゴキシン）とコンジュゲートさせてから、前述した異なるタイプの標識のうち1つを、抗ハプテン抗体（例えば抗ジゴキシン抗体）とコンジュゲートさせる。このようにして、標識と抗体の間接的コンジュゲートを実現することができる。

10

【0231】

本発明による他の実施態様において、抗LPA抗体は標識する必要がなく、例えば、抗LPA抗体に結合する標識抗体を用いて、その存在を検出することができる。

本発明による抗体は、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、免疫沈降アッセイなど任意の公知のアッセイ方法に用いることができる。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* (モノクローナル抗体：技術マニュアル), pp. 147 - 158 (CRC Press, Inc. 1987)。

20

【0232】

競合結合アッセイは、限定量の抗体の結合についてテストサンプル分析物と競合する標識された標準物質の能力に依拠する。テストサンプル中のLPAの量は、抗体に結合する標準物質の量に反比例する。結合する標準物質の測定を容易にするために、一般的に、抗体を競合の前または後に不溶化して、抗体に結合する標準物質と分析物が、抗体に結合しないで残っている標準物質と分析物から都合よく分離するようにすることができる。

【0233】

サンドイッチアッセイは、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それぞれ結合可能な2つの抗体の使用を伴う。サンドイッチアッセイでは、テストサンプル分析物は、固体支持体に固定される第一の抗体によって結合され、その後、第二の抗体が分析物に結合し、その結果、不溶性の3部分からなる複合体を形成する。例えば、米国特許第4, 376, 110号を参照。第二の抗体は、それ自体が検出可能な部分で標識されるか（直接サンドイッチアッセイ）、あるいは検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つのタイプはELISAアッセイであり、その場合には、検出可能な部分は酵素である。

30

【0234】

免疫組織化学的検査では、血液または組織試料は、新鮮なものでも凍結されたものでもよく、あるいはパラフィン包埋されていても、例えば、ホルマリンなどの防腐剤で固定されていてもよい。

40

また、抗体は、インビボ診断検査法にも使用され得る。一般には、結合された標的分子を免疫シンチグラフィを用いて局在化できるように、抗体を放射性核種（例えば ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S ）で標識する。

【0235】

e. 本発明による抗LPA薬剤を組み込む診断用キット

便宜上、本発明による抗体は、例えば、診断検査法を実施するための取扱説明書を添付する、規定量の試薬を組み合わせるパッケージしたキット中に供給され得る。抗体が酵素で標識される場合、キットには、基質と、酵素によって必要とされる補助因子（例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアを生じる基質前駆体）が含まれることになる。さらに、安定剤、バッファー（例えば、ブロックバッファーまたは溶解バッファー）などの他

50

の添加物が含まれてもよい。様々な試薬の相対量は、アッセイの感受性を実質的に最適化する試薬の溶液濃度が得られるように、広範に異なってもよい。特に、試薬は、溶解することによって適切な濃度の試薬溶液が得られるように、賦形剤を含む、通常は凍結乾燥された乾燥粉末として供給され得る。

【0236】

f. 製品

本発明の他の態様では、前述の疾患治療のために有効な物質を含む製品が供給される。この製品は、容器とラベルを具備する。好適な容器は、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、試験管などを含む。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、症状の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを具備し得る（例えば、容器は、静脈内投与用溶液バッグ、または皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアルでありうる）。組成物中の活性薬剤は、抗スフィンゴ脂質抗体である。容器上のラベル、または容器に付随するラベルは、組成物が選択する症状の治療用であることを示す。製品はさらに、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液などの薬学的に許容されるバッファーを含む第二の容器を具備してもよい。他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、使用に関する説明を記載した添付文書を含む、商業上およびユーザーの観点から望ましいその他の資材をさらに含んでもよい。

【0237】

本発明は、以下の実施例を参照することによって深く理解されるであろうが、これらの実施例は、単に本発明の実施に関する現在知られている最良の形態を示すためのものである。本発明の範囲はそれに限定されるものではない。

【実施例】

【0238】

本発明を以下の詳細な実施例を参照してさらに説明する。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものとはみなされない。

【実施例1】

【0239】

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

本実施例で説明する合成的なアプローチでは、主に従来の有機化学を用いて構成要素を連続的に追加して抗原を調製する。本実施例で説明するアプローチのスキームを図1において提供するが、下記の合成の説明における化合物の番号は、図1において番号をふった各構造を示す。

この合成アプローチではまず、市販の15-ヒドロキシペンタデシンである1を用意し、塩化メチルスルホニルによる15-ヒドロキシ基の活性化でヒドロキシル置換を促進してそのスルホン酸塩である2を作成した。t-ブチルチオールでスルホン酸塩を置換し、保護されたチオエーテルである3を得、それをガーナーアルデヒドと縮合することによって4を作成した。アルキン部分を軽度還元してアルケン(5)とし、次いでオキサゾリデン環の酸触媒開環によってS保護およびN保護されたスフィンゴシン・チオール置換体である6を得た。この最後の工程において、二炭酸di-t-ブチルによる再誘導体化を用いることによって、酸触媒開環中のN-BOC基の損失を緩和した。

【0240】

なお、化合物6自体は、スフィンゴシンに対する抗体を生成するためのハプテン調製用抗原として、あるいは、チオール化S1P類似体を調製するための2つの異なった合成アプローチの原料として使用できる。一方のアプローチでは、リン酸トリメチルによる化合物6のリン酸化によって化合物7を得た。化合物7を臭化トリメチルシリルで処理することにより、リン酸塩から両方のメチル基が、また一級アミンからt-ブチルオキシカルボニル基が脱離すると、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が残った。この基を除去するために、このt-ブチル基をNBSで置き換え、その二硫化物である9を形成したのち、これを還元することによりチオール化S1P類似体である10を形成した。

10

20

30

40

50

【0241】

他方のアプローチでは、化合物6を直接NBClで処理的することによりその二硫化物である11を形成したのち、それを還元することによりN保護されたチオール化S1P類似体である12を形成した。この化合物を弱酸処理することによりチオール化スフィンゴシン類似体である13を得、これを、例えば、スフィンゴシンキナーゼによって酵素学的にリン酸化すると、チオール化S1P類似体である10を得ることができる。

記載した合成アプローチは、特に保護用および脱保護用の試薬の選択に関しては、例えば、実施例3に記載の二硫化トリメチル・トリフレートをチオールの脱保護に使用するなど、変更可能である。

【0242】

(化合物2)

1を(10.3 g、45.89 mmol)入れた500 mLのRBフラスコにDCM(400 mL)を添加し、その溶液を0°Cまで冷却した。次に、TEA(8.34 g、82.60 mmol、9.5 mL)を一度に全部添加したのち、10分間かけてMsCl(7.88 g、68.84 mmol、5.3 mL)を滴下した。反応を室温で0.5時間または原料が消失するまで攪拌させた($R_f = 0.65$ 、ヘキサン類/EtOAc = 5:1)。反応をNH₄Cl(300 mL)でクエンチし、DCM(2 X 200 mL)を抽出した。有機層をMgSO₄にて乾燥し、ろ過したる液を蒸発固化した(13.86 g、収率99.8%)。¹H NMR(CDCl₃) δ 4.20(t, J = 6.5 Hz, 2H)、2.98(s, 3H)、2.59(td, J = 7 Hz, 3 Hz, 2H)、1.917(t, J = 3 Hz, 1H)、1.72(五重線, J = 7.5 Hz, 2H)、1.505(五重線, J = 7.5 Hz, 2H)、1.37(br s, 4H)、1.27(br s, 14H)。¹³C {¹H} NMR(CDCl₃) δ 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要イオンは、m/z = 325.1804であった(C₁₆H₃₀O₃Sとしての計算値: M + Na⁺ 325.1808)。

【0243】

(化合物3)

1 Lの三つ首RBフラスコにt-ブチルチオール(4.54 g、50.40 mmol)とTHF(200 mL)を入れたのち、氷浴に入れた。30分間かけてn-BuLi(1.6 Mのヘキサン類溶液31.5 mL)を添加した。次に、化合物2(13.86 g、45.82 mmol)をTHF(100 mL)で溶解した溶液を2分間かけて添加した。反応を、1時間または原料が消失するまで攪拌する($R_f = 0.7$ 、ヘキサン類/EtOAc = 1:1)。反応を飽和NH₄Cl(500 mL)でクエンチし、EtO₂(2 X 250 mL)によって抽出し、MgSO₄で乾燥し、ろ過したる液を蒸発させて黄色油(11.67 g、収率86%)を得た。¹H NMR(CDCl₃) δ 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(五重線, J = 7.5 Hz, 2H)、1.51(五重線, J = 7 Hz, 2H)、1.38(br s, 4H)、1.33(s, 9H)、1.26(s, 14H)。¹³C {¹H} NMR(CDCl₃) δ 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。

【0244】

(化合物4)

化合物3(5.0 g、16.85 mmol)を入れた250 mLのシュレンクフラスコを真空にして窒素を充填する作業を3回繰り返したのち、乾燥THF(150 mL)を添加した。得られた溶液を-78°Cまで冷却した。次に、2分間かけてn-BuLi

10

20

30

40

50

i (1.6 Mのヘキサン類溶液10.5 mL)を添加し、反応混合液を-78 で18分間攪拌したのち、冷却浴を20分間取り除いた。ドライアイス浴を戻した。15分後、ガーナーアルデヒド(3.36 g、14.65 mmol)の乾燥THF(10 mL)溶液を5分間かけて添加した。20分後に、冷却浴を取り除いた。2.7時間後の薄層クロマトグラフィー(TLC)では、ガーナーアルデヒドが消失していることが確認された。反応を飽和NH₄Cl水溶液(300 mL)でクエンチし、Et₂O(2 X 250 mL)で抽出した。合わせたEt₂O相をNa₂SO₄にて乾燥し、ろ過したろ液を蒸発させることにより、粗化合物4およびそのシジアステレオマー(図1に図示せず)を黄色油(9.06 g)として得た。この材料は、これ以上精製せず次の工程に使用した。

10

【0245】

(化合物5)

化合物4の三重結合を還元するために、上記油を窒素下で乾燥Et₂O(100 mL)に溶解した。水素ガス(H₂)の発生を制御するために室温でゆっくりとその溶液にRED-AL(65%のトルエン溶液20 mL)を添加した。反応を、一夜またはTLCで原料(EtOAc/ヘキサン類1:1でR_f = 0.6)の消失が確認されるまで室温で攪拌し、H₂の発生を制御するためにゆっくりとMeOHまたはNH₄Cl水溶液でクエンチした。得られた白色懸濁液をセリットパッドでろ過し、ろ液をEtOAc(2 X 400 mL)で抽出した。合わせたEtOAc抽出液をMgSO₄にて乾燥し、ろ過したろ液を蒸発させると、粗化合物5およびそのシジアステレオマー(図1に図示せず)が黄色油(7.59 g)として残った。

20

【0246】

(化合物6)

化合物5が含まれている上記油をMeOH(200 mL)で溶解し、PTSA水和物(0.63 g)を添加し、その溶液を室温で1日間、その後50°Cで2日間攪拌し、その時点で全原料(5)が消失していることがTLCによって示唆された。しかしながら、いくつかの極性材料が存在していたため、酸がBOC基を一部切断したことが示唆された。反応を、飽和NH₄Cl水溶液(400 mL)を添加してワークアップし、エーテル(3 X 300 mL)で抽出した。混合したエーテル相をNa₂SO₄にて乾燥し、ろ過したろ液を乾燥するまで蒸発させると、5.14 gの油が残った。形成されたアミンを再度保護するため、上記粗産物をCH₂Cl₂(150 mL)に溶解し、それにBOC₂O(2.44 g)およびTEA(1.7 g)を添加した。TLC(ヘキサン類/EtOAc = 1:1)によって、基線に材料が残っていないことが示されたら飽和NH₄Cl水溶液(200 mL)を添加し、有機相を分離したのち、混合液をCH₂Cl₂(3 X 200 mL)で抽出した。合わせた抽出をNa₂SO₄にて乾燥し、ろ液を乾燥するまで濃縮し、黄色油(7.7 g)を得、これをヘキサン類/EtOAcの(1:1までの)勾配を用いたシリカカラムクロマトグラフィーにかけることによって上記ジアステレオマーを分離した。PE/EtOAc = 1:1を用いたTLCにより、化合物6であるアンチ体のR_fは0.45であった。シン体(図1に図示せず)のR_fは0.40だった。化合物6の収率は2.45 g(ガーナーアルデヒドに基づいて総合的に39%)だった。アンチ体の¹H NMR(CDCl₃) δ 1.26(br s, 20H)、1.32(s, 9H)、1.45(s, 9H)、1.56(五重線, 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) δ 156.95、134.80、129.66、80.47、75.46、63.33、56.17、42.44、32.98、31.70、3

30

40

50

0.58、30.32、30.31、30.28、30.20、30.16、30.00、29.89、29.80、29.08、29.03。

【0247】

元素分析値。C₂₇H₅₃NO₄Sとしての計算値：C、66.48；H、10.95；N、2.87。実測値：C、65.98；H、10.46；N、2.48。

【0248】

(化合物7)

化合物6(609.5 mg、1.25 mmol)を乾燥ピリジン(2 mL)で溶解したアルコール溶液にCBr₄(647.2 mg、1.95 mmol、1.56 10
等量)を添加した。フラスコを氷浴で冷却し、2分間かけてP(OMe)₃(284.7
mg、2.29 mmol、1.84 等量)を滴下した。4分後に氷浴を取り除き1
2時間後に混合液をエーテル(20 mL)で希釈した。得られた混合液をHCl水溶液
(10 mL、2 N)で洗浄することによりエマルジョンを形成し、これを水(20
mL)による希釈で分離した。水相をエーテル(2 x 10 mL)、その後EtOAc
Ac(2 x 10 mL)で抽出した。該エーテル抽出液および第1のEtOAc 抽出
液を合わせ、HCl水溶液(10 mL、2 N)、水(10 mL)、および飽和炭酸
水素ナトリウム水溶液(10 mL)で洗浄した。最後のEtOAc抽出液を用いて洗浄
水溶液を逆抽出した。合わせた有機相をMgSO₄にて乾燥し、ろ過したる液を濃縮する
と、粗産物(1.16 g)が残ったため、これをCH₂Cl₂、次いで CH₂Cl₂-E
tOAc(1:20、1:6、1:3、および1:1 - 産物は、6:4、7:3で溶 20
出し始めた)を用いたシリカ(3 x 22 cm カラム)フラッシュクロマトグラフ
ィーにかけた。初期のフラクションは56.9 mgの油を含んでいた。後のフラクショ
ンでは、産物(化合物7、476.6 mg、64%)が透明無色の油として得られた。

元素分析値。C₂₉H₅₈NO₇PS(595.82)としての計算値：C、58.46；
H、9.81；N、2.35。実測値：C、58.09；H、9.69；N、2.41。

【0249】

(化合物8)

化合物7(333.0 mg、0.559 mmol)と攪拌棒を入れたフラスコを真
空にして窒素を充填した。アセトニトリル(4 mL、CaH₂から蒸留)を注射器で注
入し、溶液が入ったフラスコを氷浴にて冷却した。注射器を用いて(CH₃)₃SiBr(30
438.7 mg、2.87 mmol、5.13 等量)を1分間かけて添加した。3
5分後、フラスコの上部を追加分のアセトニトリル(1 mL)ですすぎ、氷浴を取り除
いた。さらに80分後、アリコートを取り出し、それに窒素ガスを吹き当てて溶液を乾燥
し、残分をCDCl₃中¹H NMRで分析したが、P-OCH₃部分に起因するピークは
ほんのわずかしきみられなかった。20分後、反応混合液に水(0.2 mL)、次いで
上記アリコートの分析に使うCDCl₃溶液を添加し、混合液を回転蒸発器で約0.5
mLの体積になるまで濃縮した。アセトン(3 mL)を分割して用い、風袋重量を測っ
た試験管に残分を移すと、薄褐色溶液が形成された。水(3 mL)を分割して添加した
。0.3 mLを追加した時点で、濁りが確認された。全体で1 mLになった時点で、
ゴム状の沈殿物が形成された。さらに0.6 mLの水を添加すると、さらに濁りとゴム 40
が析出したが、最後の分の水を添加したところ、混合物の外観は変化しないようであった
。この過程を終了するには全体で数時間かかった。試験管を遠心分離にかけ、ピペットで
上清を除去した。もはやゴム状ではない固体をP₄O₁₀にて減圧乾燥すると、化合物8(
258.2 mg、95%)が一水和物として残った。

元素分析値。C₂₂H₄₆NO₅PS + H₂O(485.66)としての計算値：C、54.
40；H、9.96；N、2.88。実測値：C、54.59；H、9.84；N、2.
95。

【0250】

(化合物9)

グローブボックスにおいて、攪拌棒、乾燥THF(3 mL)および氷HOAc(3 50

mL)が入っている試験管に化合物8(202.6 mg、0.417 mmol)を添加した。NBSCl(90 mg、0.475 mmol、1.14 等量)を添加し、0.5時間後に透明溶液を得た。全9時間後、アリコートを乾燥するまで蒸発させ、残分をCDCl₃中¹H NMRで分析した。CH₂StBuおよびCH₂SSArと一致するピークによって反応が約75%完了していることが示唆され、スペクトルをCDCl₃中の純NBSClのものと比較したところ、反応において試薬が残っていないことが示唆された。したがって、追加分(24.7 mg、0.130 mmol、0.31 等量)を添加し、その3時間後に追加分(19.5 mg、0.103 mmol、0.25 等量)を添加した。さらに1時間後、THF(2 mL)ですすぎながら混合液を新しい試験管に移し、水(1 mL)を添加した。

10

【0251】

(化合物10)

上記化合物9の透明溶液にPMe₃(82.4 mg、1.08 mmol、添加した塩化2-ニトロベンゼンスルフェニル総量の1.52倍)を添加した。混合液は温かくなって白濁し、経時的に沈殿物を形成した。4.5時間後、メタノールを添加し、試験管を遠心分離にかけた。沈殿物は沈殿しにくく、試験管の下方1 cmを占めた。ピペットを用いて透明黄色の上清を除去した。メタノール(5 mL、窒素で脱酸素化)を添加し、試験管を遠心分離にかけ、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。濃縮すると、最後のメタノール洗浄液は4.4 mgしか残らなかった。固体残分の大半をP₄O₁₀にて減圧乾燥すると、化合物10(118.2 mg、68%)が一塩酸塩として残った。

20

元素分析値。C₁₈H₃₈NO₅S + HCl(417.03)としての計算値：C、51.84；H、9.43；N、3.36。実測値：C、52.11；H、9.12；N、3.30。

【0252】

(化合物11)

化合物6(1.45 g、2.97 mmol)をAcOH(20 mL)で溶解し、NBSCl(0.56 g、2.97 mmol)を一度に全部添加した。反応を、3時間あるいは原料が消失し産物の形成がTLC [産物 R_f = 0.65、原料 R_f = 0.45、EtOAc/ヘキサン類 = 1:1]によって観察されるまで攪拌させた。反応を高真空管で濃縮して乾燥させ、残分をTHF/H₂O(10:1を100 mL)で溶解した。

30

【0253】

(化合物12)

化合物11を含有する上記溶液にPh₃P(0.233 g、8.91 mmol)を一度に全部添加し、反応を3時間または原料が消失するまで攪拌させた。粗反応混合液を高真空管で濃縮して乾燥させると、化合物12を含有する残分が残った。

【0254】

(化合物13)

化合物12を含有する上記残分をDCM(50 mL)およびTFA(10 mL)で溶解した。混合液を室温で5時間攪拌し、濃縮して乾燥させた。残分をシリカゲル入りのカラムに注入し、純DCM、次いで5% MeOH含有DCM、その後10% MeOHでクロマトグラフィーを実施して最終産物である化合物13(0.45 g、5からの収率46%)を粘着性の白色固体として得た。¹H NMR(CDCl₃) δ 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)。¹³C{¹H} NMR(CDCl₃) δ 1

40

50

36.85、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。

【実施例2】

【0255】

チオール化脂肪酸を製造するための合成スキーム

本実施例に記載の合成アプローチでは、チオール化脂肪酸の調製を詳細に説明するが、これはより複雑な脂質構成に組み込まれ、任意にタンパク質または他の担体とさらに複合化され、免疫応答を誘導させるために動物に投与されるものである。本アプローチには、従来の有機化学を用いる。本実施例でとるアプローチを示すスキームを図2において提供し、下記の合成の説明における化合物番号は、図2において番号をふった各構造を示す。

10

【0256】

二つの合成について説明する。最初のC-12チオール化脂肪酸の合成ではまず、市販の12-ドデカン酸である化合物14を用意する。次に、臭素をt-ブチルチオールで置換して、保護されたC-12チオール化脂肪酸である化合物15を得る。二番目のC-18チオール化脂肪酸の合成ではまず、市販の9-プロモ-ノナノール(化合物16)を用意する。化合物16のヒドロキシ基をジヒドロイラン基の付加によって保護し、その結果得られた化合物である17を、臭素化体の半分をグリニヤール反応によって活性化し、次いで残りの半分の付加によって二量体化する。酸触媒によるジヒドロピラン保護基の脱離後、得られた18-ヒドロキシオクタデカノール(化合物18)を選択的に一臭素化して化合物19を形成する。この反応の際、求核置換のためにアルコール基の約半分をメタンサルホン酸エステル形成によって活性化する。次にアルコールを酸化させ18-プロモカルボン酸である化合物20を形成したのち、それをt-ブチルチオールで処理することによって臭素を置換して、保護されたチオール化C-18脂肪酸である化合物21を形成する。

20

【0257】

それぞれがt-ブチルチオエーテルである上記保護されたチオール化脂肪酸を複合脂質に組み込めることができるが、例えば、実施例1および3に記載の脱保護化アプローチの一つを用いれば、保護基を脱離することができる。そして、得られた遊離チオールを用いてタンパク質または他の担体と複合化させた後、そのハプテンで動物に接種することができる。

30

【0258】

A. C-12チオール化脂肪酸の合成

(化合物15)

乾燥したシュレンクフラスコにt-ブチルチオール(12.93 g、143 mmol)を添加し、シュレンク法を用いて系を窒素下に置いた。脱気した乾燥THF(250 mL)を添加し、フラスコを氷浴において冷却した。10分間かけてn-BuLi(2.5 Mのヘキサン類溶液55 mL、137.5 mmol)を注射器でゆっくりと添加した。混合液を、0°Cで一時間攪拌した。臭化酸である化合物14(10 g、36 mmol)を固体として添加し、反応を加熱して60°Cで24時間攪拌した。反応を2 M HCl(250 mL)でクエンチしてエーテル(2 x 300 mL)で抽出した。合わせたエーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過したる液を回転蒸発により濃縮し、チオエーテル酸である化合物15(10 g、収率99%)をベージュ粉末として得た。¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) 1.25-1.35(br s, 12 H)、1.32(s, 9 H)、1.35-1.40(m, 2 H)、1.50-1.60(m, 2 H)、1.60-1.65(m, 2 H)、2.35(t, 2 H, J = 7.5 Hz)、2.52(t, 2 H, J = 7.5 Hz)。HRMS(ES-TOF)における主要イオンは、M+Na⁺ 311.2015として計算した場合、m/z 311.2020で確認された。

40

【0259】

50

B . C - 1 2 チオール化脂肪酸の合成

(化合物 17)

乾燥したシュレンクフラスコに化合物 16 (50 g、224.2 mmol) を入れ、ナトリウム/ベンゾフェノンから蒸留した脱気した乾燥 THF (250 mL) で溶解した。フラスコを氷浴において冷却したのち PTSA (0.5 g、2.6 mmol) を添加した。次に、脱気した乾燥 DHP (36 g、42.8 mmol) を 5 分間かけてゆっくりと添加した。該混合液を室温まで温め、一夜攪拌し、TLC (PE : EtOAc = 10 : 1) で臭化アルコールのスポットの完全消失によって反応終了とみなされるまで監視した。次に、TEA (1 g、10 mmol) を添加して PTSA をクエンチした。その後、混合液を冷重曹溶液で洗浄し、EtOAc (3 X 250 mL) で抽出した。次いで、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮して粗産物 68.2 g を得、これをカラムクロマトグラフィー (PE : EtOAc = 10 : 1) で精製することによって無色油 60 g (収率 99%) を得た。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) 1.31 (br s、6 H)、1.41 - 1.44 (m、2 H)、1.51 - 1.62 (不明多胎、6 H)、1.69 - 1.74 (m、1 H)、1.855 (五重線、J = 7.6 Hz、2 H)、3.41 (t、J = 7 Hz、2 H)、3.48 - 3.52 (m、2 H)、3.73 (dt、2 H、J = 6.5 Hz)、3.85 - 3.90 (m、2 H)、4.57 (t、2 H、J = 3 Hz)。

【0260】

(化合物 18)

火力乾燥したシュレンクフラスコに削状マグネシウム (2.98 g、125 mmol) 並びにヨウ素結晶を添加した。次いで、ナトリウムから蒸留した乾燥 THF (200 mL) を添加し、シュレンク技法によって系を脱気した。その後、10 分間かけて化合物 17 (30 g、97 mmol) をゆっくりとマグネシウムに添加し、溶液を 65°C の油浴に入れ一夜攪拌した。反応は、アリコートのアセトンでクエンチして、10 : 1 の PE : EtOAc 混合液における RF の変化を観察することで、TLC により完了とみなされた。その後、グリニヤール溶液をカニユーレで追加の化合物 17 (30 g、97 mmol) が入っている窒素下の三つ首フラスコに移した。その得られた混合液が入っているフラスコを氷浴において 0°C まで冷却した後、Li₂CuCl₄ 溶液 (1 M を 3 mL) を注射器で添加した。反応混合液は、数分以内で非常に濃い青色になった。この混合液を一夜攪拌させた。翌朝、反応は TLC (10 : 1 PE : EtOAc) によって完了とみなされ、飽和 NH₄Cl 溶液によってクエンチした後、エーテル (3 X 250 mL) に抽出した。該エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮して粗産物 (40 g) を得、これを MeOH に溶解した。その後、濃 HCl (0.5 mL) を添加した結果、白色のエマルジョンが形成され、それを 3 時間攪拌させた。そして前記白色のエマルジョンをろ過し、純ジオールである化合物 18 を 16 g (収率 58%) 得た。¹H NMR (CDCl₃、200 MHz) 1.26 (br s、2.4 H)、1.41 - 1.42 (m、4 H)、1.51 - 1.68 (m、4 H)、3.65 (t、4 H、J = 6.5 Hz)。

【0261】

(化合物 19)

対称ジオールである化合物 18 (11 g、38.5 mmol) を窒素下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 (700 mL) を添加した。系を脱気し、前記フラスコを氷浴に入れた。注射器でジイソプロピルエチルアミン (6.82 mL、42.3 mmol) を添加し、次いで MsCl (3.96 g、34.4 mmol) をゆっくりと添加、混合液を 1 時間攪拌させた。反応を飽和 NaH₂PO₄ 溶液 (300 mL) で停止したのち、EtOAc (3 X 300 mL) で抽出した。その後、有機層を合わせ、MgSO₄ で乾燥させ、濃縮してジオール、モノメシレート、ジメシレートの混合物 14 g を得た。NMR は、1 : 0.8 の CH₂OH : CH₂OMs プロトンの混合を示した。次いで該混合物を乾燥 THF (500 mL) で溶解し

10

20

30

40

50

、脱酸素して、それにLiBr (3.5 g、40.23 mmol)を添加した。この混合液を一夜還流させ、その時点で反応を水(150 mL)でクエンチし、EtOAc (3 X 250 mL)で抽出した。その後、有機層をMgSO₄で乾燥させ、濃縮してブrom化産物の混合物を得、それをその後フラッシュクロマトグラフィー(DCM)によって精製し、化合物19 (3.1 g、収率25%)を白色粉末として得た。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) 1.26 (br s、26 H)、1.38 - 1.46 (m、2 H)、1.55 (五重線、2 H、J = 7.5 Hz)、1.85 (五重線、2 H、J = 7.5 Hz)、3.403 (t、2 H、J = 6.8 Hz)、3.66 (t、2 H、J = 6.8 Hz)。

【0262】

10

(化合物20)

化合物19 (2.01 g、5.73 mmol)を丸底フラスコに入れ、固体を試薬グレードのアセトン(150 mL)に溶解した。同時に、ジーンズ試薬を、硫酸(4 mL)にCrO₃(2.25 g、22 mmol)を溶解し、冷水を10 mLゆっくりと添加し、溶液を10分間攪拌させることによって調製した。次いで、冷やしたジーンズ試薬を5分間かけて丸底フラスコにゆっくりと添加した後、その溶液を1時間攪拌した。その結果得られたオレンジ色の溶液は数分以内で緑色になった。次に、混合液を水(150 mL)でクエンチし、エーテル(3 X 150 mL)にて2回抽出した。その後、エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮して化合物20 (2.08 g、収率98%)を白色粉末として得た。¹H NMR (CDCl₃、200 MHz) 1.27 (br s、26 H)、1.58 - 1.71 (m、2 H)、1.77 - 1.97 (m、2 H)、2.36 (t、2 H、J = 7.4 Hz)、3.42 (t、2 H、J = 7 Hz)。

20

【0263】

(化合物21)

乾燥したシュレンクフラスコにt-ブチルチオール(11.32 g、125 mmol)を添加し、ナトリウムから蒸留した乾燥THF(450 mL)に溶解した。溶液に窒素を通気することによって脱酸素したのち、フラスコを氷浴に入れた。n-BuLiのヘキサン類溶液(1.6 Mを70 mL)を10分間かけて注射器でゆっくりと添加した。この混合液を1時間攪拌させた後、化合物20(5.5 g、16.2 mmol)を添加し、溶液を60°Cで一夜還流させた。翌朝アリコートワークアップし、NMRで分析し、反応は完了したとみなされた。反応をHCl(2 Mを200 mL)でクエンチし、エーテル(3 X 250 mL)で抽出した。次に、エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過したろ液を濃縮して、産物である化合物21を白色固体として得た(5 g、収率90%)。¹H NMR (CDCl₃、200 MHz) 1.26 (br s、26 H)、1.32 (br s、9 H)、1.48 - 1.70 (m、4 H)、2.35 (t、2 H、J = 7.3 Hz)、2.52 (t、2 H、J = 7.3 Hz)。¹³C NMR (CDCl₃、200 MHz) 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。

30

40

【実施例3】

【0264】

LPAのチオール化類似体を作製するための合成スキーム

本実施例に記載の合成アプローチによってチオール化LPAが調製される。次いでこのLPA類似体は、さらに担体、例えば、タンパク質担体と複合化することができ、そしてそれを動物に投与してLPAに対する免疫原性反応を誘導することができる。このアプローチでは、有機化学および酵素反応の両方を使っており、その合成スキームは図3に示す。下記の合成の説明における化合物番号は、図3において番号をふった各構造を示す。

【0265】

原料は、実施例2の化合物15および鏡像異性的純粋なグリセロホシヨコリン(化合物

50

22)であった。これら二つの化学物質を組み合わせ、DCCを用いてエステル化を促進させることによってジアセチル化産物である化合物23を得た。一つの合成処理の変形例では、その結果得られたジアシル化グリセロホスホコリンをまずホスホリパーゼA2で処理して、グリセロール骨格のsn-2位置から脂肪酸を除去して化合物24を生成した。この物質を別の酵素であるホスホリパーゼDでさらに処理することによりコリンを除去し、化合物26を形成した。また別の合成処理の変形例では、ホスホリパーゼD処理をホスホリパーゼA2処理の先に行なって化合物25を得、ホスホリパーゼDで化合物25を処理することによって化合物26を得た。変形例のどちらを実施しても、同じ生成物であるホスファチジン酸誘導体、化合物26が得られる。その後、化合物26のt-ブチル保護基を、まず二硫化トリメチル・トリフレートを用いて化合物27を生成することによって除去し、次いでジスルフィドを還元して所望のLPA誘導体である化合物28を生成した。当業者なら理解されるように、実施例1に記載のニトロベンジルスルフェニル反応のシーケンスを用いて化合物28を生成することもできる。

10

【0266】

(化合物23)

火力乾燥した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)、DMAP(2.18 g、17.8 mmol)を添加した後、フラスコを真空にして窒素を充填した。最小量の脱気した乾燥DCMを添加したところ(100 mL)、濁った混合液になった。フラスコにホイルを被せ、TLC(シリカ、DCM:MeOH:濃NH₄OH=10:5:1)により完了するまで攪拌させた。化合物16は不溶性のため、その消失をTLCによりモニターすることはできなかったが、産物のスポットR_f 0.1の強度が増加しないと判断された時点で反応を終了させた。これには通常3、4日間かかり、DCCおよびDMAPを更に添加する必要がある場合もある。反応が完了したら、反応混合液をろ過してろ液を濃縮し、黄色油を得、それを上記の溶媒系を用いてフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、(CH₃)₃N部分、-CH₂StBu部分、-CH₂COO部分のピークの積分を比較した計算によると化合物23とモノアシル化産物の割合が5対1である混合物を含んでいる透明ワックスを3.6 g得た(収率50%)。HRMS(ESI-TOF)による油の分析では、M+Na⁺ = C₄₀H₈₀NNaO₈PS₂⁺ 820.4960として計算した場合、顕著なイオンがm/z 820.4972に得られた。

20

30

【0267】

A. 合成変形例1:ホスホリパーゼ-A2による処理

(化合物24)

上記化合物23とモノアセチル化産物の混合物(3.1 g、3.9 mmol)を、Et₂O(400 mL)とメタノール(30 mL)に溶解した。ホウ酸塩緩衝液(100 mL、pH 7.4 0.1M、0.072 mMの塩化カルシウム)、次いでホスホリパーゼA2(八チ毒由来、130単位、シグマ)を添加した。得られた混合液を10時間攪拌させ、その時点で、原料(R_f = 0.7)の欠如と新しいスポット(R_f = 0.2)の発現がTLC(シリカ、MeOH:水=4:1-前記溶媒系DCM:MeOH:濃NH₄OH=10:5:1は効果なし)によって確認された。有機層および水層を分別し、水層をエーテル(2 x 250 mL)で洗浄した。DCM:MeOH(2:1、2 x 50 mL)の混合液によって、水層から産物を抽出した。その後、回転蒸発により有機層を濃縮し、産物を白色ワックス(1.9 g、収率86%)として得、NMRによって純産物であることが確認された(化合物24)。¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) 1.25-1.27(br s, 12 H)、1.31(s, 9 H)、1.35-1.45(m, 2 H)、1.52-1.60(m, 4 H)、2.31(t, 2 H, J = 7.5 Hz)、2.51(t, 2 H, J = 7.5 Hz)、3.28(br s, 9 H) 3.25-3.33(br s, 2 H)、3.78-3.86(m, 1 H)、3.88-3.96(m, 2 H)、4.04-

40

50

4.10 (m, 2 H)、4.26 - 4.34 (m, 2 H)。HRMS (ESI-TOF) によるワックスの分析では、顕著なイオンが m/z 550.2936 に、計算では $M + Na^+$ 550.2943 ($C_{24}H_{50}NNaO_7PS_2^+$)、および m/z が 528.3115 に、計算では MH^+ 528.3124 ($C_{24}H_{51}NO_7PS_2^+$) が得られた。

【0268】

元素分析値。 $C_{24}H_{50}NO_7PS + 2 H_2O$ (563.73) としての計算値：C、51.13；H、9.66；N、2.48。実測値：C、50.90；H、9.37；N、2.76。

(化合物26)

10

【0269】

リソ化合物24 (1.5 g、2.7 mmol) を sec-ブタノール (5 mL) と Et_2O (200 mL) の混合液に溶解し、得られた白濁混合液を白濁がなくなるまで超音波処理した。緩衝液 (200 mL、pH 5.8、0.2 M NaOAc、0.08 M 塩化カルシウム)、次いでキャベツ抽出液 (サボイキャベツの抽出液 (ホスホリパーゼ-D を含有) 80 mL、タンパク質を 9 mg/mL 含有) を添加した。反応を1日間攪拌させ、TLC (C_{18} RP SiO_2 、ACN：水 = 5：1) によって原料および産物を $R_f = 0.3$ および 0.05 でそれぞれモニターした。反応を完了させるために、必要に応じて追加のキャベツ抽出液 (50 mL) を添加し、反応をさらに1日間攪拌させた。このプロセスを必要に応じてさらに2回繰り返し、変換を完了させた。反応が完了したら、混合液を回転蒸発器で濃縮してエーテルを除去し、その後 EDTA 溶液 (0.5 M、25 mL) を添加し、産物を MeOH：DCM = 5：4 の混合液 (300 mL) に抽出した。有機層の濃縮、次いで DCM およびアセトンからの残分の再結晶化により純産物 (0.9 g、収率 75%) が得られた。 1H NMR ($CDCl_3$ 、200 MHz) 1.25 - 1.27 (br s、12 H)、1.33 (s、9 H)、1.52 - 1.60 (m、4 H)、2.34 (t、2 H、 $J = 7.5$ Hz)、2.52 (t、2 H、 $J = 7.5$ Hz)、3.6 - 3.8 (br s、1 H)、3.85 - 3.97 (br s、2 H)、4.02 - 4.18 (m、2 H)。

20

【0270】

30

(化合物27)

保護された LPA 試料である化合物26 (0.150 g、0.34 mmol) をメタノールで洗浄し、グローブボックス内のバイアルに添加した。その後これを AcOH：THF の混合液 (1：1、10 mL) に懸濁したが、1時間超音波処理した後でも完全に溶解することはなかった。その後、固体 $[Me_2SSMe]OTf$ (0.114 g、0.44 mmol) を添加した。これを18時間攪拌させた。真空濃縮乾燥しつつ、アリコート除去することによって反応をモニターし、硫黄と最も近くの CH_2 ピークの 1H NMR 交替を観察するために残分を CD_3OD に再溶解または懸濁した。原料のピークが 2.52 ppm にあるのに対し、この時点で生成した非対称の二硫化物のピークは約 2.7 ppm にあった。この材料 (化合物27) については、これ以上単離もキャラクター化もできなかった。

40

【0271】

(化合物28)

化合物27 が含まれている混合物を水 (100 μ L) で、その直後に PMe₃ (0.11 g、1.4 mmol) で処理した。3時間攪拌した後、溶媒を真空によって除去し、不溶性の白色固体を得た。メタノール (5 mL) を添加し、混合液を遠心分離にかけ、母液をデカントした。減圧濃縮によってベージュ色の固体である化合物28を 120 mg (収率 91%) 得た。化合物28はチオール化 LPA ハプテンであり、ジスルフィド結合形成を介して担体、例えば、アルブミンまたは KLH とコンジュゲートすることができる。化合物28のキャラクター化： 1H NMR (1：1 CD_3OD ：CD

50

$^3\text{CO}_2\text{D}$ 、500 MHz) 1.25 - 1.35 (br s、12 H)、1.32 - 1.4 (m、2 H)、1.55 - 1.6 (m、4 H)、2.34 (t、2 H、J = 7)、2.47 (t、2 H、J = 8.5)、3.89 - 3.97 (br s、2 H)、3.98 - 4.15 (m、2 H)、4.21 (m、1 H)。メタノールに溶解した試料の負イオン ES では、 $m/z = 385.1$ にて顕著なイオンが得られた。

【実施例 4】

【0272】

S1P に対する抗体

治療抗体の一種は、望ましくないスフィンゴ脂質と特異的に結合して、例えば、(1) 心毒性効果、腫瘍形成効果、血管新生効果などの望ましくない効果を促進させるような望ましくない有毒性スフィンゴ脂質の有効濃度(および/またはそれらの代謝前駆体の濃度)を低下させ、(2) 望ましくない、有毒性の、または腫瘍形成性の、または血管新生のスフィンゴ脂質と細胞受容体との結合を抑制し、および/またはかかる受容体との結合に利用可能なスフィンゴ脂質の濃度を低下させるなどの有益な効果を上げる。かかる治療効果の例として、抗 S1P 抗体を使用してインビボで利用可能な S1P の血清中濃度を低下させることによって、S1P の腫瘍形成効果や血管新生効果および心筋梗塞後の心不全、または癌、または線維形成性疾患における役割を阻害または少なくとも抑えることが挙げられるが、これに限らない。

10

【0273】

チオール化 S1P (図 1 の化合物 10) は、S1P の必須の構造的特徴を K L H などの担体部分に架橋できる反応基を含むように合成されている。免疫化の前に、通常の手順を用いて、チオ S1P 類似体を、IOA または S M C C でタンパク質担体(例えば、K L H)と架橋化することによってコンジュゲートした。S M C C は一級アミン類およびスルフヒドリル基と反応する異質二機能性の架橋剤であり、好ましい架橋剤である。

20

【0274】

スイスウェブスターまたは B A L B - C マウスを、注射当たり 50 μg の免疫原(S M C C で促進したチオール化 S1P と K L H のコンジュゲート)で 2 カ月間かけて 4 回免疫化した。2 回目、3 回目、4 回目の免疫化の 2 週間後に血清試料を採取し、直接 E L I S A によって抗 S1P 抗体の存在についてスクリーニングした。その後、抗体の高力価を示した動物の脾臓を使用し、通常の手順でハイブリドーマを生成した。得られたハイブリドーマを密集するまで培養した後、E L I S A 分析のために細胞上清を回収した。免疫化した 55 匹のマウスのうち、8 匹に好適な反応がみられ、S1P に反応する有意な抗体の血清中力価が示された。引き続き、確立されている手順に従い、これらのマウスの脾臓および骨髓腫細胞を用いて融合を行った。次に得られた 1,500 個のハイブリドーマを直接 E L I S A によってスクリーニングし、287 個の陽性ハイブリドーマを得た。直接 E L I S A によってスクリーニングされたこれら 287 個のハイブリドーマのうち、159 個が有意な力価を示した。次いで 159 個のハイブリドーマのそれぞれを 24 ウェルプレートまで拡大培養した。その後、拡大培養したハイブリドーマの細胞馴化培地を再スクリーニングし、対象の抗体を分泌できる安定なハイブリドーマを同定した。力価が最も高い安定ハイブリドーマの 60 個に対して競合 E L I S A を行った。

30

40

【0275】

スクリーニングした 55 匹のマウスと 1,500 個近いハイブリドーマのうち、最終的に真のモノクローナル抗体を生成するために必要とされる限界希釈クローン化を行うのに見合う性能特性を示したハイブリドーマを 1 つ発見した。このプロセスにより、47 個のクローンを得、その大半が S1P 抗体生産について陽性とみなされた。これら 47 個のクローンのうち、6 つを 24 ウェルプレートまで拡大培養した後、競合 E L I S A によってスクリーニングした。残った陽性の 4 つのクローンから、S1P モノクローナル抗体の大量生産を開始するために 1 つを選んだ。これらの細胞を S C I D マウスに注射し、得られた腹水をプロテイン A によって精製し(収率 50%)、内毒素量について分析した(< 3 E U / m g)。腹水生産の 1 回につき、50 匹のマウスに注射し、合計 125 mL の

50

腹水を得た。抗体のアイソタイプはIgG1とされ、HPLCによって>95%純粋とみなされた。抗体は、150 mM 塩化ナトリウムを含有する20 mM リン酸ナトリウム溶液(pH 7.2)にて調製し、-70℃で保存した。

【0276】

陽性ハイブリドーマクローン(クローン 306D326.26と命名)は、ATCCに寄託されたが(寄託番号SD-5362)、S1Pに対する最初のマウスモノクローナル抗体(Sphingomab™)である。さらに、クローンには、「ヒト化」抗体変異体の生成に使用しうる抗体の軽鎖と重鎖可変部、並びにキメラ抗体を作成するために必要となる配列情報も含まれる。

【0277】

S1P特異的抗体についての血清および細胞上清のスクリーニングは、実施例1に記載のチオール化S1P類似体(すなわち、化合物10)を抗原として用いる直接ELISAによって行った。一次インキュベーション中に50 µlの試料(血清または細胞上清)を同量のPBS/0.1% Tween-20(PBST)で希釈したこと以外は下記のようにして通常のELISAを行った。ELISAは、0.1 mgの化学合成した化合物10を結合緩衝液(33.6 mM Na₂CO₃、100 mM NaHCO₃、pH 9.5)にてBSAとコンジュゲートしたものでコーティングした96ウェルの高結合型ELISAプレート(コスター)で行った。ELISAプレートウェルにおいてチオール化S1P-BSAを37℃で1時間、4℃で一夜インキュベートした。その後、プレートをPBS(137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.14 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄、pH 7.4)で4回洗浄し、PBSTによって室温で1時間ブロッキングした。一次インキュベーション工程では、75 µlの試料(測定するS1Pを含める)を、PBSTで希釈した0.1 µg/mLの抗S1Pモノクローナル抗体25 µlとインキュベートし、ELISAプレートのウェルに添加した。各試料につき3つのウェルで行った。室温で1時間インキュベートした後、ELISAプレートをPBSで4回洗浄し、ウェル当たり100 µlの0.1 µg/mL HRPヤギ抗マウス二次(ジャクソン・イミュノリサーチ)と室温で1時間インキュベートした。その後プレートをPBSで4回洗浄し、テトラメチルベンジジン(シグマ)に1~10分曝露した。同量の1 M 硫酸の添加によって検出反応を停止した。EL-X-800 ELISAプレートリーダー(Bio-Tech)を用い、試料の吸光度を450 nmで測定することによって求めた。

【0278】

交差反応性については、以下の変更以外は上記のようにして競合ELISAを行った。一次インキュベーションは、競合体(S1P、SPH、LPAなど)およびビオチンコンジュゲート化抗S1Pモノクローナル抗体で行った。精製したモノクローナル抗体のビオチン化は、EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation kit(ピアス)を用いて行った。ビオチンの取り込み量は、キットの手順に従って求め、抗体当たり7~11個のビオチン分子の範囲であった。競合体は、以下の通り調製した。脂質のストックを超音波処理し、アルゴン下で乾燥した後、DPBS/BSA[1 mg/mL 無脂肪酸 BSA(カルバイオケム)のDPBS(インビトロゲン 14040-133)溶液]に再構成した。精製した抗S1Pモノクローナル抗体を必要に応じてPBS/0.5%トリトンX-100で希釈した。競合体溶液と抗体溶液を競合体3部に対して抗体1部となるように混合した。HRPコンジュゲート化ストレプトアビジン二次抗体(ジャクソン・イミュノリサーチ)を用いて信号を発生させた。

【0279】

競合ELISAのデータのもう一つの形態は、データが、抗S1Pモノクローナル抗体では競合実験において添加した天然S1Pとチオール化S1P類似体(化合物10)との区別ができないことを示していることである。また、データは、類似体が二重結合を全く含まず構築された(実施例3記載のLPA類似体も同様)ため、抗体がいずれの酸化物も認識しないことも示している。抗S1Pモノクローナル抗体は、48時間室温で放置

10

20

30

40

50

させた二重結合含有の天然産物に対しても検討された。天然 S 1 P の逆相 H P L C を、以前報告された方法 (D e u t s c h m a n ら、(2 0 0 3 年 7 月)、1264491972164_2. ');

、146巻(1):62-8)に従って行ったが、結果では、保持時間における差異は示されなかった。さらに、検討された各種脂質に対するモノクローナル抗体の結合特性の比較によれば、抗体が認識するエピトープには、天然 S 1 P の炭化水素鎖領域に含まれている二重結合が関与していないことが示されている。一方、モノクローナル抗体によって認識されるエピトープは、スフィンゴシン基本骨格のアミノアルコールを含む領域と遊離リン酸である。遊離リン酸をコリンと連鎖した場合 (S P C の場合と同様)、結合はいくらか減少した。アミノ基を脂肪酸とエステル化した場合 (C 1 P の場合と同様)、抗体結合はみられなかった。スフィンゴシンアミノアルコール骨格をグリセリン骨格で置換した場合 (L P A の場合と同様)、ここでは S I P 特異的モノクローナルは結合を示さなかった。これらエピトープマッピングのデータは、S 1 P には、モノクローナル抗体によって認識されるエピトープが1つだけあり、このエピトープが S 1 P の唯一の極性頭部基によって定義されていることを示す。

【0280】

同様の E L I S A 測定を用いた実験において、この抗 S 1 P モノクローナル抗体がタンパク質担体または架橋剤のいずれも認識しないことを確実にするために適した対照材料を評価した。例えば、E L I S A の下地材料としてのチオール化 S 1 P を B S A とコンジュゲートするのに際して、通常の架橋剤である S M C C を I O A に置き換えた。I O A を用いても抗体の結合特性は B S A - S M C C - チオール化 S 1 P を用いたときとほぼ同じであった。同じく、下地材料としてのチオール化 S 1 P と複合化されるタンパク質として、K L H を B S A に置き換えた。この実験においても、抗体の結合特性において有意差はなかった。

【0281】

結合動態学：受容体または他の部分との S 1 P の結合動態学には、脂質の性質のため従来から問題があった。多くの問題が脂質の不溶性に関連していた。B I A c o r e 測定において、これらの問題は、S 1 P を直接 B I A c o r e チップ上に固定することによって克服した。そして、抗体をそのチップの表面上に流し、吸光度の変化を測定することによって抗体の S 1 P との結合特性を求めた。抗体の二価結合性質を回避するために、S 1 P でチップを低密度に覆った。さらに、チップを様々な密度 (7、20、1000 R U) の S 1 P でコーティングすると、抗体結合データは 1 : 1 の相互作用モデルにほぼフィットした。吸光度の変化は、3つの異なった S 1 P 密度でモノクローナル抗体が S 1 P と結合したことによるものであった。全体的に、モノクローナル抗体の S 1 P に対する親和性の判定は、結合データの解析に一価または二価のいずれの結合モデルを用いたかによって、約 88 ピコモル (p M) から 99 n M と高かった。

【実施例 5】

【0282】

S 1 P に対するキメラモノクローナル抗体

本明細書で使用する「キメラ」抗体 (または「免疫グロブリン」) という用語は、特定種に由来するまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である 1 本の重鎖および/または軽鎖を含み、それと同時に残りの鎖は他種に由来するまたは他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一または相同であり、ならびにそれらが所望する生物活性を提示する限りにおいては、かかる抗体のフラグメントを意味する (C a b i l l y ら、上記参照、M o r r i s o n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 1 : 6 8 5 1 (1 9 8 4))。抗体配列は、哺乳類、トリ、軟骨魚類も含むサカナを含め、脊椎動物または無脊椎動物に由来してもよい。

【0283】

S 1 P に対するキメラ抗体を、特定のハイブリドーマ (A T C C 貸金庫格納庫番号 S D

- 5362) 由来のマウス抗体の活性のあるS1P結合領域を含む可変部(Fv)をヒトIgG1免疫グロブリンのFc領域と使用して生成した。Fc領域はヒト抗体のCL、CH1、CH3ドメインを含む。方法は特に限られないが、キメラ抗体は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgMのいずれかのFc領域からも生成することはできる。「ヒト化」抗体は、IgG1のフレームワーク領域などのヒト抗体フレームワーク領域(例えば、Fr1、Fr4など)とマウス抗S1Pモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR、例えば CDR 1~4)を移植することによって生成することができることを当業者らは理解されよう。

【0284】

直接ELISA実験において、S1Pに対するキメラ抗体は、全部がマウス由来のモノクローナル抗体と同様の結合特性を示した。ELISAは、化学合成したチオール化S1PをBSAとコンジュゲートしたもの0.1ugで覆った96ウェルの高結合型ELISAプレート(コスター)において、結合緩衝液(33.6mM Na2CO3、100mM NaHCO3、pH 9.5)中で実施した。チオール化S1P-BSAを37で1時間、あるいは4で一夜、ELISAプレートでインキュベートした。その後プレートをPBSで4回洗浄し(137mM NaCl、2.68mM KCl、10.14mM Na2HPO4、1.76mM KH2PO4、pH 7.4)、PBSTで1時間室温にてブロッキングした。一次インキュベーション工程では、75uLの試料(測定するS1Pを含んでいる)を0.1mg/mLのPBSTに希釈した抗S1Pモノクローナル抗体25uLとインキュベートし、ELISAプレートの1ウェルに添加した。各試料を三つのウェルで実施した。室温で1時間インキュベーションした後、ELISAプレートをPBSで4回洗浄し、ウェル当たり100uLの0.1ug/mL HRPヤギ抗マウス2次(ジャクソンイミュノリサーチ)と室温で1時間インキュベートした。その後プレートをPBSで4回洗浄し、テトラメチルベンジジン(シグマ)に1~10分間曝露した。検出反応は、同量の1M H2SO4の添加によって停止した。試料の吸光度は、EL-X-800 ELISAプレートリーダー(Bio-Tech)を用いて450nmで測定することにより求めた。

【0285】

免疫化動物の血清またはハイブリドーマなどの抗体産生細胞の細胞馴化培地(すなわち、上清)において抗体価を測定する好ましい方法として、BSAなどのタンパク質担体に共有結合された標的リガンド(例えば、S1P、LPAのチオール化類似体など)でELISAプレートをコーティングすることが挙げられる。

【実施例6】

【0286】

LPAに対するモノクローナル抗体
抗体の産生

天然のLPAに対するポリクローナル抗体は、文献(Chen JHら、Bioorg Med Chem Lett. 2000年8月7日、10(15):1691-3)で報告されているが、モノクローナル抗体は記載されていない。実施例4に記載されたアプローチと同様のアプローチを用いて、C-12チオLPA類似体(実施例3の化合物28)を、架橋薬剤としてIOAまたはSMCCを用いた標準的な化学架橋によって反応性SH基を介してタンパク質担体(KLH)と類似体を架橋して形成されるハプテンの重要な成分として、LPAに対するモノクローナル抗体を生成した。そのために、実施例4に記載の抗S1Pモノクローナル抗体の生成に関する方法を用いてマウスをチオLPA-KLHハプテン(この場合、チオール化LPA:SMCC:KLH)によって免疫化した。LPA類似体に対して免疫化した80匹のマウスのうち、LPAに対して最高の力価を示した5匹のマウス(SMCCを用いてハプテンに使用したものと同様のLPA類似体(化合物28)をBSAとコンジュゲートし、ELISAプレートに敷いたELISAを用いて判定した)をハイブリドーマの発生段階に進ませるために選んだ。

【0287】

標準的な技法によってこれら5匹のマウスの脾臓を収穫し、ハイブリドーマを生成した。つまり、1匹のマウスからハイブリドーマ細胞株(504Aと命名)を得た。プレートに播いた504A系のハイブリドーマ全部のうち、前記スクリーニングELISAによる測定により66個が陽性抗体産生を示した。

【0288】

異質二機能性架橋薬剤を用いてチオール化LPA類似体をKLHに架橋したLPA類似体ハプテンに反応した2匹のマウスの脾臓から作成したハイブリドーマの細胞上清における抗体価を以下の表1に示す。これらのデータは、抗LPA抗体が架橋剤、タンパク質担体のいずれにも反応しないことを示している。なお、データではハイブリドーマが、S1PではなくLPAに対する抗体を産生することが示されている。

表1：LPAハイブリドーマ

【表1】

マウス番号	3度目の出血の力価の1:312,500でのOD	24ウェルの上清	LPA結合1:20でのOD	S1P結合1:20でのOD	S1Pとの交差反応性*
1	1.242	1.A.63	1.197	0.231	低い
		1.A.65	1.545	0.176	なし
2	0.709	2.B.7	2.357	0.302	低い
		2.B.63	2.302	0.229	低い
		2.B.83	2.712	0.175	なし
		2.B.104	2.57	0.164	なし
		2.B.1B7	2.387	0.163	なし
		2.B.3A6	2.227	0.134	なし

* S1Pとの交差反応性24ウェルの上清：高い=[1:20]でのOD >1.0~2.0、中度=[1:20]でのOD 0.4~1.0、低い=[1:20]でのOD 0.4~0.2、なし=[1:20]でのOD < 0.2 OD。

【0289】

マウスにおける抗LPAモノクローナル抗体の発生は、ELISA(12:0と18:1 LPAとの直接結合および競合ELISA)によってモニターした。少なくとも半分の免疫化マウスにおいて有意な免疫反応が確認され、最高抗体価のマウス5匹を選び、脾臓融合後にハイブリドーマ細胞株の発生を惹起した。

【0290】

これら5個の融合より生成した2000個を超えるハイブリドーマ細胞株を初期スクリーニングした後、合計29個の抗LPA分泌ハイブリドーマ細胞株が18:1 LPAに対して高い結合を示した。これらハイブリドーマ細胞株のうち、24個をさらにサブクローニングし、ELISA検定用パネル上でキャラクタリゼーションを行った。陽性を保持した24個のクローンより6つのハイブリドーマクローンを選び、さらにキャラクタリゼーションを行った。これらクローンの選択は、それらの優れた生化学的および生物学的特性に基づいて行った。マウスハイブリドーマ細胞株504B3-6C2、504B7.1、504B58/3F8、504A63.1、504B3A6(本明細書でそれぞれB3、B7、B58、A63、B3A6と呼ぶクローンに対応する)は、LPath Inc.代理の特許寄託を目的として、2007年5月8日、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC特許保管所、ユニバーシティ通り10801番地、マナッサス、バーモント州20110)が受領し、それぞれ寄託番号PTA-8417、PTA-8420、PTA-8418、PTA-8419、PTA-8416を付与された。

【0291】

本明細書で言及する全ての抗LPA抗体およびそれらの部分は、これらの細胞株に由来したものである。

【0292】

10

20

30

40

50

直接結合動態

6つの抗LPAモノクローナル抗体（B3、B7、B58、A63、B3A6、D22）の12:0および18:1 LPA（0.1 μM）に対する結合をELISAによって測定した。精製したモノクローナル抗体の増加する6つの濃度（0~0.4 μg/ml）を用いて滴定曲線よりEC₅₀値を計算した。EC₅₀は、最大結合量50%での抗体の有効濃度を表す。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 - 抗LPAモノクローナル抗体の直接結合動態

【表2】

		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 (OD450)	1.809	1.395	1.352	0.449	1.269	1.316
18:1 LPA	EC ₅₀ (nM)	1.067	0.274	0.245	0.176	0.298	0.469
	Max (OD450)	1.264	0.973	0.847	0.353	1.302	1.027

10

【0293】

BIAcore 3000 バイオセンサーを用いて、6つの最有力候補につき動態パラメータであるk_a（会合速度定数）、k_d（解離速度定数）、K_D（会合平衡定数）を求めた。この研究では、LPAをセンサー表面上に固定し、抗LPAモノクローナル抗体を溶液として表面上に流した。表のとおり、6つのモノクローナル抗体の全てが0.34~3.8 pM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LPAを結合した。抗LPAマウスモノクローナル抗体はLPAに対して高親和性を示す

20

【0294】

LPAは、150共鳴単位範囲の密度でセンサーチップに固定した。各モノクローナル抗体を希釈したものを固定化LPA上に流し、会合相・解離相の非線形回帰により動力学定数を得た。誤差は、二通りの実験で少なくとも3回判定し、標準偏差として示した。結果を表3に示す。見かけの親和性は、K_D = k_a / k_dにより求めた。

k_a = M⁻¹s⁻¹単位の会合速度定数 k_d = s⁻¹単位の解離速度定数

表3 - LPAに対する抗LPAモノクローナル抗体の親和性

【表3】

mAbs	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (pM)
A63	4.4 ± 1.0 x 10 ⁵	1 x 10 ⁻⁶	2.3 ± 0.5
B3	7.0 ± 1.5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁻⁶	1.4 ± 0.3
B7	6.2 ± 0.1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁻⁶	1.6 ± 0.1
D22	3.0 ± 0.9 x 10 ⁴	1 x 10 ⁻⁶	33 ± 10
B3A6	1.2 ± 0.9 x 10 ⁶	1.9 ± 0.4 x 10 ⁻⁵	16 ± 1.2

30

【0295】

6つの抗LPAモノクローナル抗体の特異性プロファイル

LPAは、多くのアイソフォームに生物学的に活性があることが確認されており、モノクローナル抗体がそれらの全てをある程度認識することが、治療関連上好ましい。抗LPAモノクローナル抗体の特異性は、抗体に固定化された脂質の混合物に競合体脂質を添加した競合的検定を用いて評価した。

【0296】

6つのモノクローナル抗体で競合ELISA検定を行い、特異性を検討した。18:1 LPAをELISAプレート上で捕捉した。各競合体脂質（10 μMまで）をBSA（1 mg/ml）・PBSで連続希釈した後、モノクローナル抗体（3 nM）とイン

40

50

キュベートした。次いで混合液をLPAでコーティングしたウェルに移し、結合した抗体の量を二次抗体によって測定した。データを最大信号(A₄₅₀)に規格化し、抑制%として表した。検定は三通りで行った。IC₅₀：最大半減抑制濃度、MI：最大抑制(阻害剤の非存在下の結合%)、---：抑制が弱いため推測なし。抑制が高いという結果になった場合は、抗体が競合体脂質を認識していることを示す。表4に示すように、全ての抗LPAモノクローナル抗体が各種LPAアイソフォームを認識した。

表4. 6つの抗LPAモノクローナル抗体の特異性プロファイル

【表4】

	14:0 LPA		16:0 LPA		18:1 LPA		18:2 LPA		20:4 LPA	
	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI	IC ₅₀	MI
	uM	%	uM	%	uM	%	uM	%	uM	%
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

10

【0297】

興味深いことに、抗LPAモノクローナル抗体は、12:0(ラウリル)、14:0(ミリストイル)、16:0(パルミトイル)、18:1(オレオイル)、18:2(リノレオイル)、20:4(アラキドノイル)のLPAを区別することができた。EC₅₀の順番は、不飽和脂質では18:2 > 18:1 > 20:4、飽和脂質では14:0 > 16:0 > 18:0であった。最終的な薬物の発生には特異性が高い方が望ましい。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、S1P、セラミド、セラミド-1-リン酸などのLPA関連生物脂質の結合について、抗LPAモノクローナル抗体の特異性を評価した。6つの抗体のいずれも、LPAの直接の代謝前駆体であるジステアロイルP AおよびLPCに対する交雑反応性を示さなかった。

20

【実施例7】

【0298】

抗LPAモノクローナル抗体の抗癌作用
癌細胞増殖

LPAは、GPCR受容体を介するG_i、G_q、G_{12/13}の刺激および下流の情報伝達現象の活性化による細胞の残存および増殖を支援する強力な成長因子である。細胞株を、それらのLPA(0.01 mM ~ 10 mM)に対する増殖性応答について検討した。細胞増殖は、ケミコン社(テメクラ、カリフォルニア州)の細胞増殖分析キット(Panc-1)、ピアス社のCell-Blue力価(Caki-1)によって分析した。各データ点は、3つの独立実験の平均とした。LPAは、SKOV3およびOVCAR3(卵巣癌)、Panc-1(膵癌)、Caki-1(腎癌細胞)、DU-145(前立腺癌)、A549(肺癌)、HCT-116(結腸直腸腺癌)の細胞を含む7つのヒト由来腫瘍細胞株および1つのラット由来の腫瘍細胞株であるRBL-2H3(ラット白血病細胞)の増殖を濃度依存的に増加させた。腫瘍由来細胞は通常増殖の基礎レベルが高いが、LPAは、ほとんどの腫瘍細胞株において増殖をさらに増大させるようにみられた。選択したヒト癌細胞株においてLPA誘導性増殖を抑制する能力について、抗LPAモノクローナル抗体(B7およびB58)を検討した。LPAによる増殖誘導の増加は、抗LPAモノクローナル抗体の添加によって抑制されることが確認された。

30

40

【0299】

抗LPAモノクローナル抗体は腫瘍細胞を化学療法剤に対して感作させる

臨床的に意義のあるレベルの化学療法剤であるパクリタキセル(タキソール)に曝露した場合の、卵巣腫瘍細胞をアポトーシスから保護するLPAの能力を研究した。SKVO

50

3細胞を1% FBS(S)、タキソール(0.5 mM)、+/-抗LPAモノクローナル抗体によって24時間処理した。LPAは、タキソール誘導のアポトーシスからSKVO3細胞を保護した。アポトーシスは、製造元(プロメガ)の推薦通りカスパーゼ活性の測定によって分析した。予測通り、LPAは、試験した癌細胞株のほとんどをタキソール誘導の細胞死から保護した。選択したLPA応答性細胞に抗LPA抗体LT3000を添加すると、細胞毒性化学療法剤によって誘導された死亡から細胞を保護するLPAの能力が遮断された。さらに、抗LPA抗体は、血清によってもたらされた保護力を除去することもできた。血清は約5~20 μMのLPAを含有していると推定される。タキソールは、SKOV3細胞においてカスパーゼ-3,7活性化を誘導し、細胞へ血清を添加することにより、細胞がアポトーシスから保護された。タキソール誘導のカスパーゼ活性化は、LT3000を培地に添加することによって促進された。これは、血清中に存在するLPAの選択的な抗体による中和によって、LPAによる保護および抗アポトーシス効果が除去されたことを示唆する。

10

【0300】

抗LPAモノクローナル抗体はLPAによる腫瘍細胞の転移を抑制する

転移性癌の重要な特徴は、腫瘍細胞が接触障害を逃れ、由来する組織から離れて移動することである。LPAは、複数の癌細胞タイプにおいて転移の可能性を促進させることが示された。従って、細胞単層スクラッチアッセイを用いて、LPA依存性細胞移動に対する抗LPAモノクローナル抗体の遮断能を複数のヒト癌細胞株において試験した。細胞を96ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで増殖させた。24時間の飢餓後、ウェルの中央をピペットの先端でスクラッチした。従来から許容されているこの「スクラッチアッセイ」では、細胞がスクラッチ領域へ移動して創傷を閉鎖することによって、細胞単層に付いたスクラッチ創傷に対して画一的に反応する。移動および創傷閉鎖の進行は所望の時点で倍率10xのデジタル撮影によってモニターした。細胞は未処理(NT)であったが、Ab B7(10 μg/ml)アイソタイプが一致した非特異性抗体(NS)(10 μg/ml)の存在下または非存在下でLPA(2.5 mM)によって処理された。未処置細胞では、スクラッチ後の単層縁の間に大きい間隙が残存していた。それに対してLPA処理細胞では、同時点で小さい間隙が残存しているだけで、わずかな細胞が間隙を超えて接触していた。LPAと抗LPA抗体B7の両方で処理した細胞では、この時点で間隙がLPAのみの処理より数倍大きいものの、未処置の対照細胞ほど大きくはなかった。これは抗LPA抗体がLPA刺激による腎細胞癌(Caki-1)細胞の移動に対して抑制効果を有することを示す。同様なデータがモノクローナル抗体B3、B58でも得られた。このことは、元は転移性癌に由来する細胞株のLPAによる移動を抗LPAモノクローナル抗体が減少させられることを示す。

20

30

【0301】

抗LPAモノクローナル抗体は腫瘍細胞からの腫瘍形成促進性サイトカインの放出を抑制する

LPAは、増殖促進性の腫瘍微小環境を提供し、血管形成を促進することによって癌の成立および進行に関与している。特にIL-8およびVEGFなどの成長促進因子の増加が癌細胞において観察された。IL-8は、癌の進行および予後に強く関係している。IL-8は、新血管形成を促進し、好中球および内皮細胞の走化性を誘導することによって、癌において効果を発揮し得る。さらに、IL-8の過剰発現は、多数のヒト癌タイプにおいて薬抵抗性表現型の発生と相関していた。

40

【0302】

非特異性抗体(NS)に対して3つの抗LPAモノクローナル抗体(B3、B7、B58)を、インビトロでIL-8産生を減少させるそれらの能力について試験した。Caki-1細胞を96ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで増殖させた。一夜の血清飢餓後、細胞を抗LPAモノクローナル抗体B3、B7、B58またはNS(非特異性)の存在または非存在で18:1 LPA(0.2 mM)で処理した。24時間後、抗LPAモノクローナル抗体B3、B7、B58の増加する濃度の存在下、LPA

50

の存在または非存在で処理した腎癌細胞 (C a k i - 1) の培養上清を採取し、市販の E L I S A キット (H u m a n Q u a n t i k i n e K i t、R & D システムズ、ミネアポリス、ミネソタ州) を用いて I L - 8 量について分析した。抗 L P A モノクローナル抗体で前処理した細胞において、I L - 8 発現は用量依存的に (0 . 1 ~ 3 0 μ g / m L モノクローナル抗体より) 有意に減少したが、L P A は、未処理細胞において I L - 8 の発現を平均で 1 0 0 % 増加させた。他の血管形成促進因子である V E G F についても同様な結果を得た。抗 L P A モノクローナル抗体による I L - 8 放出の抑制は、膵細胞株 P a n c - 1 などの他の癌細胞株においても確認された。これらのデータは、血管形成促進因子の放出の遮断が、抗 L P A モノクローナル抗体の追加効果であり潜在的に重要なものであることを示唆する。

10

【 0 3 0 3 】

抗 L P A モノクローナル抗体はインビボで血管形成を抑制する

マトリゲルプラグアッセイを用いて、抗 L P A モノクローナル抗体のうち 1 つ (B 7) を、インビボで血管形成を軽減させるその能力について試験した。このアッセイでは、マウス腫瘍に由来する基底膜を含めた腫瘍残遺物の専有混合物であるマトリゲルを使用する。マトリゲル、またはその由来物である低成長因子型 (g r o w t h f a c t o r - r e d u c e d、G F R) マトリゲルを動物に皮下注射すると、固体化して「プラグ」を形成する。配置前に血管形成促進因子をマトリックスと混ぜておくと、プラグが血管内皮細胞に侵入され、最終的に血管が形成される。マトリゲルは、単独で、または組み換え成長因子 (b F G F、V E G F) あるいは腫瘍細胞と混合して調製し、6 週齢メスヌード (N C r N u / N u) マウスの脇腹に皮下注射することができる。本実施例では、C a k i - 1 (腎癌) 細胞をマトリゲル内に導入して、V E G F および / または I L 8 および十分な L P A 量を産生している。マトリゲル移植 1 日前から 3 日ごとに食塩水または 1 0 m g / k g の抗 L P A モノクローナル抗体 - B 7 で処理したマウス由来の C a k i - 1 細胞を 5×10^5 個含有しているマトリゲルプラグを作成した。プラグを内皮 C D 3 1 について染色した後、プラグ内に形成された微小脈管構造の定量化を行った。定量化データは、3 つのプラグより 1 断面当たり少なくとも 1 6 個の視界の平均 + / - S E M で行った。C D 3 1 の内皮染色による検定から、抗 L P A モノクローナル抗体 B 7 で処理したマウスのプラグは、食塩水で処理したマウスのプラグと比較して、顕著な血管形成の減少を示した。染色した血管の定量化では、食塩水で処理した動物と比較して、モノクローナル抗体 B 7 で処理した動物の C a k i - 1 含有プラグにおいて血管形成が 5 0 % 以上低下したことが示された。これは、抗 L P A モノクローナル抗体処理の結果としての腫瘍細胞血管形成における統計的に有意な低下である (食塩水に対するモノクローナル抗体 B 7 についてスチューデントの T 検定による判定は $p < 0 . 0 5$) 。

20

30

【 0 3 0 4 】

抗 L P A モノクローナル抗体は腎・膵異種移植片において腫瘍の進行を減少させる

抗 L P A 抗体は、L P A 誘導による腫瘍細胞の増殖、移動、細胞死に対する保護、サイトカイン放出を減少させる効果を持つことが多数のヒト腫瘍細胞株において (上記で) 確認された。今度は、モノクローナル抗体 B 5 8、B 7 を腎膵癌の異種移植片モデルにおいて試験した。抗 L P A 抗体アプローチの潜在的な抗腫瘍形成効果を示す予備的結果を以下に記述する。

40

【 0 3 0 5 】

標準的な手順を用いて C a k i - 1 および P a n c - 1 ヒト腫瘍細胞を 4 週齢のメスヌード (N C r N u / N u) マウスの左脇腹に皮下注射して腫瘍を生じさせた。C a k i - 1 の場合は 1 0 日後、P a n c - 1 の場合は 3 0 日後、固形腫瘍が形成された (~ 2 0 0 m m 3) 時点で、マウスを投与群に無作為化した。処理は 2 5 m g / k g の抗 L P A モノクローナル抗体または媒体 (食塩溶液) を腹腔内投与することによって開始した。抗体は研究期間中 3 日ごとに投与した。処理は、C a k i - 1 腫瘍には 2 5 m g / k g の抗 L P A モノクローナル抗体 B 5 8、P a n c - 1 にはモノクローナル抗体 B 7、または食塩水だった。データは、C a k i - 1 の研究では 7 匹の食塩水処理マウスおよび 6 匹の B 5

50

8 処理マウス、Panc - 1 の研究では 4 匹の食塩水処理マウスおよび 5 匹の B 7 処理マウスの平均 \pm SEM だった。腫瘍の体積は、一日おきに電子ノギスで測定し、腫瘍体積を式 $W^2 \times L / 2$ によって求めた。引き続き、食塩水群において腫瘍が 1500 mm^3 に達した後に動物を殺した。腫瘍の最終体積、重量を記録した。

【0306】

この予備段階の実験において、腫瘍の体積を減少させる抗 LPA モノクローナル抗体の能力は、腫瘍が約 $400 \sim 500 \text{ mm}^3$ に達した後で明らかとなった。その時点で、対照動物の腫瘍は増殖し続けたが、抗 LPA モノクローナル抗体で処理した動物の腫瘍は両方の異種移植片モデルにおいて増殖の速度が遅かった。さらに、データから、食塩水で処理した動物の腫瘍重量と比較して、Caki - 1、Panc - 1 腫瘍の最終腫瘍重量が抗 LPA モノクローナル抗体によって減少したことも示された。

10

【0307】

抗 LPA モノクローナル抗体は腫瘍を有する動物において循環している血管形成促進性サイトカインの量を変調させる

抗 LPA モノクローナル抗体 (B58、B7) は、循環している血管形成促進性サイトカインの量にも影響を及ぼした。抗 LPA モノクローナル抗体 7 (Panc - 1) で処理した動物では、抗体で処理したいずれの動物においてもインターロイキン 8 (IL - 8) の血清中の量は検出できなかったのに対して、Panc - 1、Caki - 1 の異種移植片においては、それぞれ 85 日後、63 日後に IL - 8 の血清中の量が検出可能だった。より重要なことに、腫瘍の大きさと IL - 8 量の間には強い相関 ($r = 0.98$) があつた。さらに、Caki - 1 腫瘍を持つ動物においてヒト IL - 8 の血清中の量が、食塩水による処理 ($r = 0.55$) と比較して、抗 LPA モノクローナル抗体 58 の処理により減少した ($r = 0.34$)。上記のごとく、循環しているサイトカインの量の低下は、腫瘍細胞自体からのサイトカイン放出が直接抑制されていることに起因しているとされている。これらのデータにより、抗 LPA モノクローナル抗体には腫瘍の進行を減少させるとともに、循環している血管形成促進性化合物の量も減少させる能力があることが示されている。

20

【0308】

抗 LPA モノクローナル抗体はマウス転移モデルにおいて腫瘍進行を減少させる

腫瘍進行の重要な特徴の一つは、腫瘍は、転移して二次的な腫瘍結節を遠隔部位に形成する能力を持っているということである。本明細書に記載のインビボ研究では、腫瘍細胞が接触障害を逃れるように誘導して移動を促進する LPA の能力を細胞運動についてのスクラッチアッセイによって実証した。これらの研究において、抗 LPA モノクローナル抗体は LPA の腫瘍増殖を促進する作動体も抑制した。インビボで腫瘍転移を抑制する抗 LPA モノクローナル抗体の効果も評価された。腫瘍転移の現象を動物モデルにおいて模倣するのは困難である。多くの研究者は、腫瘍細胞を直接血流中に注射する「実験」転移モデルを用いる。

30

血管数が増加することは、循環に到達するまで細胞がより短い距離を移動することを意味するため、血管形成は転移において不可欠な過程である。抗 LPA モノクローナル抗体が転移過程における複数の不可欠なステップを遮断できるという所見に基づくと、抗 LPA モノクローナル抗体は、インビボで腫瘍細胞転移を抑制すると思われる。

40

【0309】

(研究)

高転移性マウス黒色腫 (B16 - F10) を用いて、3 つの抗 LPA モノクローナル抗体が転移に及ぼす治療効果をインビボで検討した。このモデルは、オートタキシンの cPA 系阻害剤に対して高度な感受性を示した。4 週齢のメス (C57BL / 6) マウスに、B16 - F10 マウスの黒色腫腫瘍細胞 (動物当たり 5×10^4 個の細胞を $100 \mu\text{L}$) を尾静脈経路で注射した。マウス (1 群 10 匹) に 25 mg / kg の抗 LPA モノクローナル抗体 (B3 または B7 のいずれか) あるいは食塩水を 3 日おきに腹腔内注射で投与した。18 日後、肺を採取して分析した。肺器官は、黒色腫細胞にとって好ましい転移部

50

位であるため、転移結節について精密に検討した。膨張と固定を同時に行うために、気管を經由して10%緩衝ホルマリンで肺を膨らませ、転移巣が小さくても組織学的検査によって検出可能になるようにした。肺を5つの葉に分けて、解剖顕微鏡下で腫瘍を大きさによって分類して(大 5 mm、中 1 - 4 mm、小 < 1 mm)数えた。肺を検査してみると、腫瘍数は抗体で処理した動物において明らかに減少していた。モノクローナル抗体B3で処理した動物については、大きい腫瘍が21%、中程度の腫瘍が17%、小さい腫瘍が22%減少していた。スチューデントのT検定による統計分析では、食塩水に対してモノクローナル抗体B3で処理した動物における小さい腫瘍の数について $p < 0.05$ を得た。

【0310】

上記実施例で示したように、LPAの腫瘍形成効果は、腎癌(例えばCaki-1)および膵癌(Panc-1)の細胞株に広がっていることが分かった。LPAは、腫瘍細胞の増殖、移動、さらにVEGFやIL-8などの血管形成促進因子および/または転移促進作用因子の放出を、両方の細胞株において誘導する。3つの高親和性・特異性モノクローナル抗LPA抗体が、一連のインビトロ細胞アッセイおよび血管形成や転移のインビボ腫瘍モデルにおいて効力を示すことが実証された。

【実施例8】

【0311】

マウス抗LPA抗体のクローン化 概要

ハイブリドーマ由来の3つのマウス抗体のうち一つの、活性のあるLPA結合領域を含む可変領域(Fv)とヒトIgG1免疫グロブリンのFc領域とを使用して、LPAに対するキメラ抗体を生成した。Fc領域はヒト抗体のCH1、CH2、CH3ドメインを含んだ。方法は特に限定するわけではないが、キメラ抗体は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgMのいずれかのFc領域から産生することもできる。「ヒト化」抗体は、IgG1のフレームワーク領域などのヒト抗体フレームワーク領域(例えば、Fr1、Fr4など)とマウス抗LPAモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR、例えばCDR1~4)を移植することによって生成することができることは、当業者なら理解されよう。

【0312】

LPAに対するマウスモノクローナル抗体のクローン化の全体的な戦略は、各抗体の軽鎖(VL)と重鎖(VH)両方のマウス可変ドメインをクローン化することからなる。遺伝子の共通配列は、定常領域フラグメントがアイソタイプと一致し、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は、軽鎖の定常ドメイン(CL)と重鎖の定常ドメイン(CH1、CH2、CH3)と一緒にクローニングした結果、キメラ抗体構築物を得た。

【0313】

抗LPA抗体の可変ドメインは、ヒト抗体定常領域を有するグルタミン合成酵素(GS)発現pCONベクター(ロンザ社、アレンデール、ニュージャージー州)からなる発現系にクローニングした。この発現系は、抗体遺伝子の定常ドメインおよび選択可能なマーカーであるGSを担持する発現ベクターからなる。グルタミン合成酵素(GS)は、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを生合成する役目を果たす酵素である。両方の抗体遺伝子および選択可能なマーカーを担持するベクターをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株にトランスフェクションすると、外来グルタミンがなくとも細胞が残存するのに十分なグルタミンが提供される。さらに、特異的なGS阻害剤であるメチオニンシルホキシミン(MSX)を培地に添加することにより内生GS活動を抑制し、ベクターによってGS活動が提供される細胞株のみが残存するようにした。トランスフェクションされた細胞は、MSXの存在下、グルタミン不含培地で増殖する能力によって選択した。

【0314】

pCONベクターの定常領域遺伝子は、ヒト末梢血細胞のゲノムDNAから単離された。ベクターpCON 1fはIgG1f定常領域の重鎖を含み、ベクターpCON 2は

10

20

30

40

50

軽鎖の定常ドメインを含む。

【0315】

軽鎖および重鎖の変域ドメインは、PCRによって増幅した。増幅したフラグメントは、中間ベクター(pTOPO)にクローニングした。配列を確認した後、変域ドメインをそれぞれの定常ドメインと組み合わせた。軽鎖のヒト化可変ドメインはpCON₂にクローニングし、重鎖のヒト化可変ドメインはpCON_{1f}にクローニングした。クローニングの手順には、シグナルペプチド配列、翻訳開始を促進するためにATG開始コドンの前方にコザック共通配列、5'切断部位であるHindIIIを含むようにした上流プライマ設計が含まれた。下流プライマは、重鎖でApaIを、軽鎖でBsiWIを3'切断部位として含むように設計した。

10

【0316】

それぞれの定常ドメインと一緒に可変ドメインを含んでいるベクターを、哺乳類細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションしてから3日後、上清を採取し、LPA結合についてELISAによって分析した。キメラ抗体の結合特性を表5に示す。「HC」と「LC」は、それぞれ重鎖、軽鎖の識別を示す。

表5：キメラ抗LPA抗体B3、B7、B58の結合特性

【表5】

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

20

【0317】

表5を見ると、別々のハイブリドーマ(すなわち、別々のクローン)由来の軽鎖と重鎖を組み換えてキメラ分子とすることによって、LPAに対する抗体結合を最適化できることが分かる。

30

【0318】

抗LPA抗体可変領域のクローニング、発現、キャラクタリゼーション用の材料および方法
ハイブリドーマ細胞株の可変領域のクローニング

抗LPAハイブリドーマ細胞株のクローンをDMEM(Glutamax™ I、4500mg/LのDグルコース、プルビン酸ナトリウム入りダルベッコのダルベッコ変法イーグル培地、ギブコ・インビトロジェン、カルスバッド、カリフォルニア州、111-035-003)、10% FBS(無菌胎児クローンI、Perbio Science)、1X グルタミン・ペニシリン・ストレプトマイシン(ギブコ・インビトロジェン)で増殖させた。RNeasy Mini kit(キアゲン、ドイツ・ヒルデン)に基づいた手順を用いて全RNAを10⁷個のハイブリドーマ細胞から単離した。SMART RACE cDNA Amplification Kit(クローンテック)の製造元による手順に従ってRNAを用いて第1鎖cDNAを生成した。

40

【0319】

表6に示したプライマを用いて免疫グロブリン重鎖の可変領域(VH)cDNAをPCRによって増幅した。重鎖可変領域のPCR設定は次の通りに行った。MHCG1(既存のIgG1定常領域プライマー)を全5個の抗体のグループ1およびグループ2のV領域プライマと組み合わせた。TOPO-TA cloning^(R)キットと配列を用いて、各反応産物をpCR2.1^(R)-TOPO^(R)ベクター(インビトロジェン、カリフォ

50

ルニア州カルスバッド)内に連結した。

【0320】

同様に、表7に示したプライマを用いて免疫グロブリン軽鎖の可変領域(VK)を増幅した。軽鎖可変領域のPCR設定は次の通りに行った。2つの定常領域プライマをそれぞれ全5個の抗体のグループ1、グループ2、グループ3のV領域プライマと組み合わせた。TOPO-TA cloning^(R)キットと配列を用いて、各反応産物をpCR2.1^(R)-TOPO^(R)ベクター内に連結した。

【0321】

オリゴヌクレオチドのリストは、文献に従って作成した(Dattamajumdar、A.K.、Jacobson、D.P.、Hood、L.E.およびOsman、G.E.(1991)再構成した任意のマウス免疫グロブリン可変遺伝子の高速クローニング法[Rapid cloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes]免疫遺伝学[Immunogenetics]43(3):141-51、Coloma、M.J.、Hastings、A.、Wims、L.A.およびMorrison、S.L.(1992)ポリメラーゼ連鎖反応によって生成された可変領域を用いた抗体分子発現用新規ベクター[Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction]J Immunol Methods、152(1):89-104、Coronella、J.A.、Telleman、P.、Truong、T.D.、Ylera、F.およびJunghans、R.P.(2000)単ヒト形質細胞およびB細胞のIgGVHおよびVL(Fab)の増幅[Amplification of IgGVH and VL(Fab) from single human plasma cells and B cells]Nucleic Acids Res.、28(20):E85.)。

【0322】

表6：抗LPAモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインのクローン化用オリゴヌクレオチドのリスト

10

20

【表 6】

	可変	重鎖	配列番号
グループ 1	MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC	1
	MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	2
	MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT	3
	MHV4	ATGRACCTTTGGGYTCAGCTTGRTTT	4
	MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT	5
	MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTTCTGC	6
グループ 2	MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTMTCTT	7
	MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	8
	MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG	9
	MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG	10
	MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	11
	MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG	12
	MH1:	ATATCCACCA TGGRATGSAG CTGKGMATS CTCTT	13
	定常		
	MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	14
	MHCG2a	CAGTGGATAGACCGATGGGGC	15
	MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG	16
	MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC	17
	MVG1R	5'-GGCAGCACTAGTAGGGGCCAGTGGATA- 3'	18

10

20

【 0 3 2 3 】

表 7 : 抗 L P A モノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインのクローン化に使用したオリゴヌクレオチドのリスト

【表 7】

	可変	軽鎖	配列番号
グループ 1	MLALT1	GGGCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	19
	MLALT2	GGGCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG	20
	MLALT3	GGGCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA	21
	MLALT4	GGGCACCATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKGT	22
	MLALT5	5'-CACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3'	23
グループ 2	MKV1a	ATGAAGTTGVVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	24
	MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG	25
	MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGS GTG	26
	MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG	27
	MKV5	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	28
	MKV6	ATGAGGKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG	29
	MKV7	ATGGGCWTC AAGATGGAGTCACAKWYYCWGG	30
	MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTYTCMMTTTTTCAATTG	31
	MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	32
	MKV10	ATGTATATATGTTTGTGCTATTTCT	33
	MKV11	ATGGAAGCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	34
	VK8	TGGGTATCTGGTRCSTGTG	35
	MKV20	ATGGAGWCAGACACACTSCTG	36
グループ 3	CL12A	ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT	37
	CL12B	ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT	38
	CL13	ATGGATTCACAGGCCAGGTCTTAT	39
	CL14	ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTCTT	40
	CL15	ATGAATTTGCCTGTTTCTCTCTTGGTGCT	41
	CL16	ATGGATTTTCAATTGGTCTCTCTCTT	42
	CL17A	ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG	43
	CL17B	ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG	44
	CL17C	ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG	45
定常			
	MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	46
	33615:	5'GAAGATCTAGACTTACTA TGCAGCATCAGC-3'	47

【 0 3 2 4 】

重鎖および軽鎖の可変領域を含有する T O P O 2 . 1 クローンの配列決定を行い、C D R 領域を決定した。その後、ロンザ社の軽鎖発現ベクター p C O N 2 にクローニングするためのロンザ社提案のリーダー配列と切断部位を追加して、軽鎖の可変ドメインを P C R で増幅した (5 ' H i n d I I I 、 3 ' B s i W I 、 L C リーダー配列 A T G T C T G T G C C T A C C C A G G T G C T G G G A C T G C T G C T G C T G C T G T G G C T G A C A G A C G C C C G C T G T 、 配列番号 4 8) 。その後、ロンザ社の重鎖発現ベクター p C O N 1 f にクローニングするためのロンザ社提案のリーダー配列と切断部位を追加して、重鎖の可変ドメインを P C R で増幅した (5 ' H i n d I I I 、 3 ' A p a I 、 H C リーダー配列 A T G G A A T G G A G C T G G G T G T T C C T G T T C T T T C T G T C C G T G A C C A C A G G C G T G C A T T C T 、 配列番号 4 9) 。次いで最終産物を、Rapid Ligation Kit (ロシュ)、消化およびライゲーションで定常領域を含有する軽鎖または重鎖発現ベクターに挿入した。

【 0 3 2 5 】

10

20

30

40

50

重鎖および軽鎖プラスミドでOne Shot^(R) TOP10 化学的コンピテント細菌細胞（インビトロジェン）を形質転換させ、グリセリンにて保存した。大規模のプラスミドDNAを製造元の記載通り（キアゲン、内毒素不含MAXIPREPTM キット）調製した。DNAサンプルをキアゲン社のQIAprep Spin Miniprep KitまたはEndoFree Plasmid Mega/Maxi Kitを用いて精製し、蛍光信号をそれらに対応するヌクレオ塩基配列に翻訳もするABI 3730 x1 自動シーケンサーを用いて配列決定した。プライマの5'末端と3'末端は、得られた配列が重なるように設計した。

【0326】

可変領域のPCR増幅

インビトロジェン社のPfx DNA ポリメラーゼ・キットを10X 緩衝液、50 mM MgSO₄（カタログ番号11708-013）、10 mM dNTP（インビトロジェン、カタログ番号18427-013）と共に使用してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。反応混合液は、10X pfx 増幅用緩衝液を5 uL、10 mM dNTPを1.5 uL、50 mM MgSO₄を1 uL、オリゴヌクレオチド1を1.5 uL、オリゴヌクレオチド2を1.5 uL、テンプレート（~50 ng）を0.5 uL、Pfx DNA ポリメラーゼを0.5 uL、無菌水を38.5 uL含んだ。Pfxを除いた全ての試薬を添加した後、サーマルサイクラーを開始する直前にPfxを添加した。テンプレートを95 °Cで3分間変性した後、95 °Cで30秒間、55 °Cの+/-勾配で58 °Cにおいてアニーリング、68 °Cで30秒間の伸展のサイクルを35回行った。68 °Cで5分間最終伸展した後、試料を4 °Cに保った。

【0327】

可変領域をクローニングするための制限消化およびライゲーション反応

ライゲーション用、または分子配列を確認する前のクローニング確認用のフラグメントを調製するためにDNAに対して制限消化を行った。制限酵素はすべてインビトロジェンまたはニュー・イングランド・バイオラボより購入したが、各酵素には必要な対応緩衝液がついてくる。DNA（通常、陽性クローンの確認には5~10 uL、連結するDNAには20~26 uL）を酵素緩衝液、制限酵素0.5~1.0 uL、無菌水と混合した（合計30 uLの反応）。酵素に適した温度で反応を1時間インキュベートした。ほとんどの酵素が37 °Cで活性があったが、酵素によってはインキュベーション温度が室温から55 °Cの範囲で変動することもあった。適切に制限酵素消化した後、GeneCleanキットを用いてアガロースゲルや酵素、緩衝液などから挿入フラグメントおよびベクターを除去した。ライゲーションは、T4 DNA 2X連結緩衝液、5X DNA希釈緩衝液、T4 DNAリガーゼを含有するロシュ社のRapid Ligation Kit（カタログ番号11635379001）を用いて行った。最良の結果を出すために3:1の最終モル比でインサートとベクターを結合した。効率的なライゲーションのために挿入フラグメントを適切に希釈した。反応の5~7 uLを用いてE. coli TOP10 化学的コンピテント細胞を形質転換させた。

【0328】

定量的ELISA

マイクロタイターELISAプレート（コスター、カタログ番号3361）を37 °Cで1時間、1 M 炭酸緩衝液（pH 9.5）で希釈したウサギ抗マウスIgGのFab'）₂フラグメント特異性抗体（ジャクソン、315-005-047）で覆った。プレートをPBSで洗浄し、PBS/BSA/Tween-20で1時間、37 °Cでブロッキングした。一次インキュベーションでは、非特異性のマウスIgGまたはヒトIgG、分子全体（検量線に使用）、測定する試料を希釈したものをウェルに添加した。プレートを洗浄し、ウェル当たり100 uLの1:50, 000希釈のHRPコンジュゲート化抗ヒト（ジャクソン 109-035-003）を1時間、37 °Cでインキュベートした。洗浄後、酵素反応をテトラメチルベンジジン（シグマ、カタログ番号T0440）で検出し、1 M H₂SO₄を添加することにより停止した。Thermo Multisk

10

20

30

40

50

an EXを用いて吸光度(OD)を450 nmで測定した。生データをGraphPadソフトウェアに移して分析した。

【0329】

直接ELISA

マイクロタイターELISAプレート(コスター、カタログ番号3361)を1M炭酸緩衝液(pH 9.5)に希釈したLPA-BSAで1時間、37°Cでコーティングした。プレートをPBS(137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.1 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄、pH 7.4)で洗浄し、PBS/BSA/Tween-20により室温で1時間または4°Cで一晩ブロッキングした。試験する試料を0.4 ug/mL、0.2 ug/mL、0.1 ug/mL、0.05 ug/mL、0.0125 ug/mL、0 ug/mLに希釈して、各ウェルに100 ul 添加した。プレートを洗浄し、ウェル当たり100 ulの1:50,000希釈のHRP抗ヒト(ジャクソン 109-035-003)を1時間、37°Cでインキュベートした。洗浄後、酵素反応をテトラメチルベンジジン(シグマ、カタログ番号T0440)で検出し、1 M H₂SO₄を添加することにより停止した。Thermo Multiskan EXを用いて吸光度(OD)を450 nmで測定した。生データをGraphPadソフトウェアに移して分析した。

【0330】

一時的発現

293フェクチンを用い、培養に293F-FreeStyle Mediaを用いて、ヒト胎児由来腎臓細胞株293Fをベクターでトランスフェクションした。トランスフェクションは、5 ug/mLで、10⁶細胞/mLの細胞密度で行った。トランスフェクションより3日後に、1100 rpm、25°C、5分間の遠心分離によって上清を採取した。発現量は定量的ELISAによって定量し、結合は上記のように結合ELISAにおいて測定した。

常法でマウスのV_HおよびV_Lドメインを配列決定した。5つのマウス抗LPAモノクローナル抗体のクローンについて、マウスのV_HおよびV_Lドメインの核酸およびアミノ酸配列を表8~17に示す。各CDRH1アミノ酸配列について、Kabataにより定義されたCDRは、示された10アミノ酸の配列である。Kabata配列の太字で示された5アミノ酸の部分は、標準のCDRH1配列である。

【0331】

表8: マウス抗LPAモノクローナル抗体のクローンB3におけるマウスV_HおよびV_LドメインのマウスLPA CDR核酸配列

【表8】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
B3	GGAGACGCCTTCACAAATTACTTA ATAGAG	CDRH1	50
B3	CTGATTTATCCTGATAGTGGTTACATTA ACTACAATGAGAACTTCAA GGGC	CDRH2	51
B3	AGATTTGCTTACTACGGTAGTGGC TACTACTTTGACTAC	CDRH3	52
	V _L CDR		
B3	AGATCTAGTCAGAGCCTTCTAAA AACTAATGGAAACACCTATTTAC AT	CDRL1	53
B3	AAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG	CDRL2	54
B3	TCTCAAAGTACACATTTTCCATTC ACG	CDRL3	55

【0332】

表 9 : マウス抗 L P A モノクローナル抗体のクローン B 3 におけるマウス V_H および V_L ドメインのマウス L P A C D R アミノ酸配列

【表 9】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
B3	GDAFTNYLIE*	CDRH1	56
B3	LIYPDSGYINYENFKG	CDRH2	57
B3	RFAYYGSGYYFDY	CDRH3	58
	V _L CDR		
B3	RSSQSLKLTNGNTYLH	CDRL1	59
B3	KVSNRFSG	CDRL2	60
B3	SQSTHFPFT	CDRL3	61

*Kabat により定義された CDRH1 は、示された 10 アミノ酸の配列である。Kabat 配列の太字で示された 5 アミノ酸の部分 (NYLIE、配列番号 62) は、標準の CDRH1 配列である。

【 0 3 3 3 】

表 1 0 : マウス抗 L P A モノクローナル抗体のクローン B 7 におけるマウス V_H および V_L ドメインのマウス L P A C D R 核酸配列

【表 1 0】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
B7	GGATACGGCTTCATTAATTACT TAATAGAG	CDRH1	63
B7	CTGATTAATCCTGGAAGTGATT ATACTAACTACAATGAGAACT TCAAGGGC	CDRH2	64
B7	AGATTTGGTTACTACGGTAGC GGCAACTACTTTGACTAC	CDRH3	65
	V _L CDR		
B7	ACATCTGGTCAGAGCCTTGTC ACATTAATGGAAACACCTATT TACAT	CDRL1	66
B7	AAAGTTTCCAACCTATTTTCT	CDRL2	67
B7	TCTCAAAGTACACATTTTCCAT TCACG	CDRL3	68

【 0 3 3 4 】

表 1 1 : マウス抗 L P A モノクローナル抗体のクローン B 7 におけるマウス V_H および V_L ドメインのマウス L P A C D R アミノ酸配列

【表 1 1】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
B7	GYGFINYLIE*	CDRH1	69
B7	LINPGSDYTNYNENFKG	CDRH2	70
B7	RFGYYGSGNYFDY	CDRH3	71
	V _L CDR		
B7	TSGQSLVHINGNTYLH	CDRL1	72
B7	KVSNLFS	CDRL2	73
B7	SQSTHFPFT	CDRL3	74

*Kabat により定義された CDRH1 は、示された 10 アミノ酸の配列である。Kabat 配列の太字で示された 5 アミノ酸の部分 (NYLIE、配列番号 62) は、標準の CDRH1 配列である。

10

20

30

40

50

【0335】

表12: マウス抗LPAモノクローナル抗体のクローンB58におけるマウスV_HおよびV_LドメインのマウスLPA CDR核酸配列

【表12】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
B58	GGAGACGCCTTCACTAATTACTTGATC GAG	CDRH1	75
B58	CTGATTATTCTGGAAGTGGTTATACT AACTACAATGAGAAGTTCAAGGGC	CDRH2	76
B58	AGATTTGGTTACTACGGTAGTAGCAAC TACTTTGACTAC	CDRH3	77
	V _L CDR		
B58	AGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGT AATGGAAACACCTATTTACAT	CDRL1	78
B58	AAAGTTTCCAACCGATTTTCT	CDRL2	79
B58	TCTCAAAGTACACATTTCCATTCCT	CDRL3	80

10

【0336】

表13: マウス抗LPAモノクローナル抗体のクローンB58におけるマウスV_HおよびV_LドメインのマウスLPA CDRアミノ酸配列

【表13】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
B58	GDAFTNYLIE*	CDRH1	81
B58	LIIPGTGYTNYNENFKG	CDRH2	82
B58	RFGYYGSSNYFDY	CDRH3	83
	V _L CDR		
B58	RSSQSLVHSHNGNTYLH	CDRL1	84
B58	KVSNRFS	CDRL2	85
B58	SQSTHFPFT	CDRL3	86

20

30

*Kabatにより定義されたCDRH1は、示された10アミノ酸の配列である。Kabat配列の太字で示された5アミノ酸の部分(NYLIE、配列番号 62)は、標準のCDRH1配列である。

【0337】

表14: マウス抗LPAモノクローナル抗体のクローン3A6におけるマウスV_HおよびV_LドメインのマウスLPA CDR核酸配列

【表 1 4】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
3A6	GGAGACGCCTTCACTAATTACTTGATCG AG	CDRH1	87
3A6	CTGATTATTCCTGGAAGCTGGTTATACTA ACTACAATGAGAAGCTTCAAGGGC	CDRH2	88
3A6	AGATTTGGTTACTACGGTAGTGGCTACT ACTTTGACTAC	CDRH3	89
	V _L CDR		
3A6	AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTA ATGGAAACACCTATTTACAT	CDRL1	90
3A6	AAAGTTTCCAACCGATTTTCT	CDRL2	91
3A6	TCTCAAAGTACACATTTCCATTACAG	CDRL3	92

10

【 0 3 3 8】

表 1 5 : マウス抗 L P A モノクローナル抗体のクローン 3 A 6 におけるマウス V_H および V_L ドメインのマウス L P A C D R アミノ酸配列

【表 1 5】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
3A6	GDAFTNYLIE*	CDRH1	93
3A6	LIIPGTGYTNYNENFKG	CDRH2	94
3A6	RFGYYGSGYYFDY	CDRH3	95
	V _L CDR		
3A6	RSSQSLVHSNGNTYLH	CDRL1	96
3A6	KVSNRFS	CDRL2	97
3A6	SQSTHFPFT	CDRL3	98

20

*Kabat により定義された CDRH1 は、示された 10 アミノ酸の配列である。Kabat 配列の太字で示された 5 アミノ酸の部分 (NYLIE、配列番号 62) は、標準の CDRH1 配列である。

【 0 3 3 9】

表 1 6 : マウス抗 L P A モノクローナル抗体のクローン A 6 3 におけるマウス V_H および V_L ドメインのマウス L P A C D R 核酸配列

【表 1 6】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
A63	GGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGA CC	CDRH1	99
A63	TACATAGGCTACGATGGTAGCAATGACTCC AACCCATCTCTCAAAAAT	CDRH2	100
A63	GCGATGTTGCGGCGAGGATTTGACTAC	CDRH3	101
	V _L CDR		
A63	AGTGCCAGCTCAAGTTTAAGTTACATGCAC	CDRL1	102
A63	GACACATCCAAACTGGCTTCT	CDRL2	103
A63	CATCGGCGGAGTAGTTACACG	CDRL3	104

40

【 0 3 4 0】

表 1 7 : マウス抗 L P A モノクローナル抗体のクローン A 6 3 におけるマウス V_H および V_L ドメインのマウス L P A C D R アミノ酸配列

【表 17】

クローン	V _H CDR	CDR	配列番号
A63	GFSITSGYYWT*	CDRH1	105
A63	YIGYDGSNDSNPSLKN	CDRH2	106
A63	AMLRRGFDY	CDRH3	107
	V _L CDR		
A63	SASSLSYMH	CDRL1	108
A63	DTSKLAS	CDRL2	109
A63	HRRSSYT	CDRL3	110

*Kabatにより定義されたCDRH1は、示された10アミノ酸の配列である。Kabat配列の太字で示された5アミノ酸の部分(GYYWT、配列番号 111)は、標準のCDRH1配列である。

10

【0341】

表18～27にV_HおよびV_L抗LPA抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【0342】

表18 リーダー配列および切断部位を追加したクローンB3の核酸配列

【表18】

配列	配列番号
B3 重鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTTCTGTCCGTG ACCACAGGCGTGCATTCTCAGGTCAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTA AGGCTTGGGACTTCAGTGAAGGTGCTGCACGGCTTCTGGAGACGCCTTCACA AATTACTTAATAGAGTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGACTGATTTATCCTGATAGTGGTTACATTAACAATGAGAATTCAAGGGC AAGGCAACACTGACTGCAGACAGATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGCTTAC TACGGTAGTGGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	112
B3 軽鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTG TGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG CCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTT CTAAAAACTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG TCTCCAAACTCCTAATCTTCAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCGGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGACTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTC ACGTTCCGGCACGGGGACAAAATTGGAAATAAACGTACG	113

20

30

【0343】

表19 リーダー配列および切断部位を追加したクローンB3のアミノ酸配列

【表19】

配列	配列番号
B3 重鎖	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVKLQQSGPELVPRGTSV KVSCTASGDAFTNYLIEWVKQRPQGLEWIGLIYPSGYINYENENFK GKATLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRFAYYGSYYF DYWGQGTTLTVSSASTKG	114
B3 軽鎖	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLLKTNNGTYLHWYLQKPGQSPKLLIFKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTGKLEI KRT	115

40

【0344】

表20 リーダー配列および切断部位を追加したクローンB7の核酸配列

50

【表 2 0】

配列	配列番号
B7 重鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTTCTGTCCGTG ACCACAGGCGTGCAATTCTCAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTA AGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGGCTTCATT AATACTTAATAGAGTGGATAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGACTGATTAATCCTGGAAGTGATTATACTAACTACAATGAGAACTTCAAGGGC AAGGCAACACTGACTGCAGACAAGTCCCTCCAGCACTGCCTACATGCACCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGGTTAC TACGGTAGCGGCAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	116
B7 軽鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTG TGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG CCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCACATCTGGTCAGAGCCTT GTCCACATTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG TCTCCAAAGCTCCTCATCTACAAAGTTTCCAACCTATTTTCTGGGGTCCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTC ACGTTTCGGCACGGGGACAAAATTGGAATAAAACGTACG	117

10

20

【 0 3 4 5】

表 2 1 リーダー配列および切断部位を追加したクローン B 7 のアミノ酸配列

【表 2 1】

配列	配列番号
B7 重鎖	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVK VCKASGYGFINYLIIEWIKQRPQGLEWIGLINPGSDYTNYNENF K GKATLTADKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSGNY FDYWGGTTLTVSSASTKG	118
B7 軽鎖	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNFLSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTGTKLEI KRT	119

30

【 0 3 4 6】

表 2 2 リーダー配列および切断部位を追加したクローン B 5 8 の核酸配列

【表 2 2】

配列	配列番号
B58 重鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCTTTCTGTCCGTG ACCACAGGCGTGCATTCTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTC AGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACGCCTTCACT AATTACTTGATCGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGACTGATTATTCTGGAAGTGGTTATACTAACTACAATGAGAAGTCAAGGGC AAGGCAACACTGACTGCAGACAAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGGTTAC TACGGTAGTAGCAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	120
B58 軽鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTG TGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG CCTGTCACTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTT GTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG TCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC AGGTTCACTGTCAGTGGACCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG GAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTCCATTC ACTTTCGGCACGGGGACAAAATTGGAATAAAAACGTACG	121

10

20

【0347】

表 2 3 リーダー配列および切断部位を追加したクローン B 5 8 のアミノ酸配列

【表 2 3】

配列	配列番号
B58 重鎖	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVK VSCKASGDAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGLIIPGTGYTNYNENF K GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSSNY FDYWGQGTTLTVSSASTKG	122
B58 軽鎖	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLT DARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFGV PDRFSGSGP GTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHFPFTFGTGTKLEIKRT	123

30

【0348】

表 2 4 リーダー配列および切断部位を追加したクローン 3 A 6 の核酸配列

【表 2 4】

配列	配列番号
3A6 重鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCTTTCTGTCCGTG ACCACAGGCGTGCATTCTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTC AGGCCTGGGACTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACGCCTTCACT AATTACTTGATCGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGACTGATTATTCCTGGAAGTGGTTATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGC AAGGCAACACTGACTGCAGACAAGTCCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGGTTAC TACGGTAGTGGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	124
3A6 軽鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTG TGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG CCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTT GTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG TCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC AGTTTCAGTGGCAGTGGACCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTC ACGTTCCGCACGGGCACAAAATTGGAAATAAAAACGTACG	125

10

20

【0349】

表 2 5 リーダー配列および切断部位を追加したクローン 3 A 6 のアミノ酸配列

【表 2 5】

配列	配列番号
3A6 重鎖	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKASGDA FTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGLIIPGTGYTNYNENFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSGYYFDYWGQTTTLTVSSASTKG	126
3A6 軽鎖	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTARCDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQ SLVHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGPGTDFTLK ISRVEAEDLGVIYFCSQSTHFPFTFGTGTKLEIKRT	127

30

【0350】

表 2 6 リーダー配列および切断部位を追加したクローン A 6 3 の核酸配列

【表 2 6】

配列	配列番号
A63 重鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTTCTTTCTGTCCG TGACCACAGGCGTGCATTCTGATATACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCT CGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCTTCTCC ATCACCAGTGGTTATTACTGGACCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAAC TGGAGTGGGTGGCCTACATAGGCTACGATGGTAGCAATGACTCCAACCCATC TCTCAAAAATCGAATCTCCATCACCCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTC CTGAAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAA GAGCGATGTTGCGGCGAGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	128
A63 軽鎖	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGC TGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAAT CATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCA AGTTTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCTCCCCAAAA GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCGGCGGAGTAGTTACACGTTCCGGAG GGGGACCAAGCTGGAATAAAACGTACG	129

10

20

【 0 3 5 1】

表 2 7 リーダー配列および切断部位を追加したクローン A 6 3 のアミノ酸配列

【表 2 6】

配列	配列番号
A63 重鎖	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIQLQESGGLVKPSQSLSLTCSVTGFS ITSGYYWTWIRQFPNGKLEWVAYIGYDGSNDSNPSLKNRISITRDTSKNQFF LKLNSVTTEDTATYYCARAMLRGFDYWGQGTTLTVSSASTKG	130
A63 軽鎖	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLT DARCQIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASS SLSYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSK LASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEA EDAATYYCHRRSSYTFGGGTKLEIKRT	131

30

【実施例 9】

【 0 3 5 2】

L p a t h社のリードマウス抗体 L p a t h o m a b™ (L T 3 0 0 0) : 概要

マウス抗体クローン B 7 は、リード化合物として選ばれ、L p a t h o m a b™と改名され、L T 3 0 0 0としても知られている。上記のように、このマウス抗 L P Aモノクローナル抗体は、タンパク質で誘導体化した L P A免疫原によるマウス免疫化後のハイブリドーマ細胞株に由来している。有利な特性を持つハイブリドーマ細胞株が同定されたため、これを使用して、標準的なハイブリドーマ培養法を用いてモノクローナル抗体を産生した。

40

【 0 3 5 3】

本出願者は、抗 L P A抗体に基づいたアプローチの有用性を確認するための包括的な一連の前臨床薬効試験を行った。抗体による細胞外 L P Aの中和(例えば有効濃度の低下)によって、ヒトにおける疾患の進行は顕著に低下すると考えられている。癌については、L P Aを中和すると、腫瘍の増殖活動および腫瘍の増殖を支援するのに必要な脈管構造の成長が抑制される。さらに、近年の研究によると、多くの血管形成阻害剤が抗侵入性・抗転移性化合物として作用し、癌が原発腫瘍から遠距離の部位に広がることを軽減し得るこ

50

とも示唆されている。線維症については、LPAを中和することによって、組織傷害後の異常な創傷治癒応答に伴う炎症および線維症が軽減し得る。したがって、Lpathomab™は以下のような複数の作用機構を含み得る。

- 腫瘍細胞の増殖、移動、化学療法剤に対する感受性への直接的作用
- 抗血管形成作用による腫瘍への間接的作用
- さらに、相乗的な血管形成促進成長因子の放出妨害および中和による腫瘍への間接的作用
- 線維芽細胞の増殖、移動、筋線維芽細胞表現型への形質変換および筋線維芽細胞によるコラーゲン産生への直接的作用
- 相乗的な血管形成促進性、炎症促進性、線維促進性の成長因子の発現および放出を防ぐことによる組織線維症への間接的作用

10

【実施例10】

【0354】

Lpathomab/LT3000の生物物理学的特性

Lpathomab/LT3000は、情報伝達性脂質LPA高親和性(1~50 pMのK_D)を持ち、さらに、LT3000はLPAに対して高い特異性を示すが、100個を超える様々な生理活性脂質および生理活性タンパク質には結合親和性を示さない(その一部は構造的に類似している)。マウス抗体は、2本の同じ軽鎖と2本の同じ重鎖により構成され、合計分子量が144 kDaの全長IgG1kのアイソタイプ抗体である。生物物理学的特性を表28にまとめた。

20

表28: Lpathomab(LT3000)の一般的特性

【表28】

識別	LT3000
抗体アイソタイプ	マウス IgG1k
特異性	リゾホスファチジン酸 (LPA)
分子量	155.5 ダルトン
1 mg/mL の OD	1.22 (280 nm での溶液)
K _D	1~50 pM
見かけ T _m	pH 7.4 で 67℃
外見	1x PBS 緩衝液 (6.6 mM リン酸、154 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4) に溶解すると透明
溶解度	6.6 mM リン酸、154mM 塩化ナトリウム、pH 7.4 で >40 mg/mL

30

【0355】

LPAに対するLpathomab/LT3000の強力かつ特異的な結合の結果、細胞外LPAの利用能性が低くなり、癌、血管形成、線維性関連の疾患に対する潜在的な治療効果が生じる。Lpathomab/LT3000で行った研究の中からいくつかを選んで以下に記載する。

40

【実施例11】

【0356】

癌および血管形成モデルにおけるLpathomab™

LPAの多面的効果は、細胞外LPAの利用能性(有効濃度)が低くなったことにより(i)原発腫瘍の増殖、転移、血管形成を減少させること、(ii)LPAの腫瘍に対する保護的な抗アポトーシス効果の作用を中和することを示唆している。Lpathomab™/LT3000のLPAとの強力かつ特異的な結合により、癌の前臨床モデルにLT3000のインピボ処理を行うと、様々な治療上の利点が生まれるであろうと仮定した。

【0357】

各種インピトロ系およびインピボ系を使用して前臨床試験を行った結果、Lpatho

50

m a bTM/L T 3 0 0 0 (3 日ごとに1 0 ~ 5 0 m g / k g の用量を投与した) には、以下のような各種作用機構に一致する活性プロファイルを示すことが確認された。

- インビボでの種々のヒト腫瘍異種移植モデルにおける腫瘍増殖の抑制、
- インビトロでのL P Aに依存するヒト腫瘍および内皮細胞株の細胞増殖や浸潤の低下、
- インビボでの腫瘍血管形成の減少に伴う、I L 6、I L 8、G M - C S F、M M P 2、V E G Fを含む腫瘍形成・血管形成成長因子の循環量の低下、
- 転移する可能性の低下、
- 腫瘍細胞死に対するL P A誘導保護の中和。

【 0 3 5 8 】

10

インビトロモデルにおいて

- O V C A R 3 卵巣癌細胞の増殖の低下、
- インビトロでのP a n c - 1 (膵臓)、O V C A R 3、S K O V 3 (卵巣) 腫瘍細胞によるI L - 8、I L - 6、V E G FのL P A誘導放出の中和、
- アポトーシスに対してS K O V 3、P a n c - 1 腫瘍細胞を保護するL P Aの作用の軽減 (このことは、標準の化学療法剤と併用すると効力が増大することを示唆している)、
- 腫瘍によるI L - 8、I L - 6、V E G FのL P A誘導放出の中和、
- L P A誘導の腫瘍細胞の移動、増殖、化学療法剤からの保護の抑制、
- 各種インビトロアッセイにおけるL P A誘導の内皮細胞管形成、移動、細胞死から

20

の保護の中和。

【 0 3 5 9 】

インビボモデルにおいて

- ノードマウスに移植した、S K O V 3 (卵巣、下記実施例を参照)、C O L O 2 0 5 (結腸直腸、下記実施例を参照)、D U 1 4 5 (前立腺)、B 1 6 F 1 0 (マウス黒色腫、下記実施例を参照)、ルイス肺癌細胞 (下記実施例を参照) を含む複数の同所性および皮下ヒト腫瘍の進行の抑制、
- 皮下S K O V 3 異種移植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形成の劇的な減少、
- マウスマトリゲルプラグアッセイにおけるb F G F誘導およびV E G F誘導の血管形成の中和 (下記実施例を参照)、
- 眼のレーザー誘導ブルーフ膜傷害モデルにおける脈絡膜の新血管形成の減少 (下記実施例を参照)。

30

【 実施例 1 2 】

【 0 3 6 0 】

マトリゲルモデルにおけるL T 3 0 0 0 の抗血管形成効果

L T 3 0 0 0 を腹腔内 (I P) 注射でq 2 d投与したところ、メスC 5 7 B L / 6 マウスに移植したマトリゲルプラグのF G F誘導およびV E G F誘導の血管形成が減少した。この研究は、サザン研究所 (アラバマ州バーミングハム) で実施された。

【 0 3 6 1 】

40

(目的)

メスC57/BL6マウスに移植したF G F添加およびV E G F添加のマトリゲルプラグの血管形成を遅延させるL T 3 0 0 0 の抗血管形成効果を評価すること。

(試験デザイン)

マトリゲルのみ、あるいはb F G F、V E G Fのいずれかを添加したもの (N = マウス5 匹 / 投与群) を各マウスの脇腹に皮下 (S C) 注射した。マトリゲルプラグを移植する前の日に、1 0 m g / k g のL T 3 0 0 0 または食塩水のI P投与による処理を開始した。処理は1日おきに (q 2 d) 行った。殺してから、マトリゲルプラグを採取し、C D - 3 1 染色による微小血管密度 (M V D) 分析用に処理した。

【 0 3 6 2 】

50

(結果)

食塩水で処理したマウスと比較してL T 3 0 0 0で処理したマウスでは、b F G F添加およびV E G F添加のプラグにおいて微小血管密度が約41%低下した。この低下は、統計的に有意($p < 0.0001$)でありC D 3 1染色により組織学的に確認された。

(結論)

この研究は、全身投与したL T 3 0 0 0の抗血管形成効果によって、b F G FおよびV E G Fを添加したマトリゲルプラグの新血管形成が有意に減少したことを示す。

【実施例13】

【0363】

C N VモデルにおけるL T 3 0 0 0の抗血管形成効果

10

L T 3 0 0 0を硝子体内注射により投与したところ、メスC 5 7 B L / 6マウスにおけるレーザー誘導ブルーフ膜傷害モデルで脈絡膜の新血管形成が減少した。この研究は、ゲインズビル、フロリダ大学(M a r i a G r a n t医師の研究室)で実施された。

【0364】

(目的)

脈絡膜の脈管構造中の新血管形成を制限するL T 3 0 0 0の効力を研究すること。

(試験デザイン)

マウスをレーザー誘導のブルーフ膜破裂に付した。マウスを抗L P A抗体L T 3 0 0 0 0.5 μ g、アイソタイプが一致した非特異性モノクローナル抗体(N S A)0.5 μ g、同量の食塩水のいずれかで処理した。

20

処理は、レーザー破裂後、研究期間中週1回(q 7 d)硝子体注射して行った。ブルーフ膜の破裂から2~4週間後にマウスを殺し、眼球を採取した。R P E・脈絡膜・強膜複合体を神経網膜から単離し、ローダミンコンジュゲート化トウゴマ凝集素Iで染色することによりC N Vを評価した。判定はすべて動物当たり2~3回の焼却について行った。

【0365】

(結果)

N S A処理したマウス($n = 4$)と比較して、L T 3 0 0 0で処理したマウス($n = 5$)においてC N V傷害の血管形成が 2185014 ± 377010 (平均C N V体積 \pm S E M)から 697924 ± 92182 に減少した。これは、N S A処理したマウスと比較してL T 3 0 0 0処理したマウスでは68%の減少である($p = 0.05$)。

30

(結論)

この研究は、抗L P A抗体の硝子体内投与が、傷害に应答した脈絡膜組織中での新血管形成を有意に低下させることを示す。

【実施例14】

【0366】

L T 3 0 0 0の抗腫瘍形成効果

多数のヒト腫瘍異種移植モデルおよびげっ歯類同系モデルにおける研究により、L T 3 0 0 0が抗腫瘍形成活性を示すことを確認した。

【0367】

A. ヒトS K O V 3 卵巣癌

40

L T 3 0 0 0をI P注射により投与した(10 mg / k g q 3 d)ところ、ヌードN c rマウスにおける同所性S K O V 3 卵巣腫瘍モデルにおける腫瘍の進行が大いに抑制された。この研究は、L p a t h社によって実施された。

【0368】

(目的)

メス無胸腺症ヌードマウスの腹腔に移植したヒト卵巣(S K O V 3)腫瘍の進行を遮断するL T 3 0 0 0の効果を評価すること。

(試験デザイン)

ヌードマウスの腹腔内にS K O V 3腫瘍細胞を移植した。腫瘍が成立したら、I Pで、10 mg / k gのL T 3 0 0 0をq 3 dで、P B S(媒体)をq 3 dで、毎日15 mg

50

/ kg のパクリタキセル (タキソール) を 4 日間のいずれかでマウスを処理した。5 2 日目の研究終了時、血清および腹水液を採取して、サイトカイン量について分析した。腫瘍を収獲して腫瘍の最終重量を量った。

【 0 3 6 9 】

(結果)

この研究は、SKOV3 腫瘍の進行を減少させる LT3000 の能力を示す (表 29) 。 10 mg / kg の LT3000 によって、腫瘍組織量は統計的に有意に減少 (50%) した。予想どおり、PBS で処理した動物と比較して、パクリタキセルで処理した動物は、腫瘍組織量に大きな減少 (88%) を示した。本実験において、腹腔内に腹水液が確認された動物の数は、LT3000 群 (6 / 14) の方が PBS 対照群 (11 / 13) より少なかった。さらに、PBS で処理した動物と比較して、LT3000 群において腹水の蓄積容積に統計的に有意な減少が確認された。また、媒体で処理した動物と比較して、LT3000 は、血管形成促進性サイトカイン IL - 8、IL - 6、GM - CSF、VEGF の血清中濃度の低下を誘導した。最後に、LT3000 は、腹水中 MMP2 (ヒトおよびマウス) の総量を低下させた。H & E および CD31 染色のために選択した腫瘍切片を認定病理学者に分析させた。LT3000 処理群において組織分裂 (網、骨格筋、リンパ節) の低下、微小血管密度の低下が確認された。

10

(結論)

本研究は、抗 LPA 抗体の全身投与が、SKOV3 腫瘍進行に有意な抑制をもたらすことを示す。

20

【 0 3 7 0 】

表 29 : LT3000 の抗腫瘍形成活性を評価するためのマウス SKOV3 モデルについての所見の数値のまとめ

【表 29】

分析#	PBS	mAb LT3000 10 mg/kg	パクリタキセル
腫瘍組織量 (mg)	1510.1 ±94.9	761.0 ±81.9***	185.9 ±21.7***
減少率 (%)	該当せず	49.6	87.7
腹水あり	11/13	6/14	0/14
腹水容積 (ml)	1336.2 ±428.5	31.1 ±12.9	#
IL-8-腹水 (pg/ml)	2368.4 ±346.3	611.5 ±121.2**	#
IL-6-腹水 (pg/ml)	368.0 ±48.3	145.7 ±31.0*	#
GM-CSF-腹水 (pg/ml)	80.2 ±10.5	19.0 ±6.0**	#
VEGF-腹水 (pg/ml)	5441.1 ±662.3	3521.7 ±768.9	#
MMP2-腹水 (pg/ml)	980.1 ±37.6	418.1 ±82.6***	#
IL-8-血漿 (pg/ml)	1516.9 ±179.7	423.6 ±67.8**	7.1 ±2.2***
IL-6-血漿 (pg/ml)	72.5 ±13.2	16.6 ±3.7*	2.0 ±0**
GM-CSF-血漿 (pg/ml)	34.5 ±6.9	8.3 ±1.7*	2.5 ±0.27**
血漿中 VEGF (pg/ml)	15.3 ±2.3	14.5 ±1.5	13.0 ±0.0
MMP2-血漿 (pg/ml)	231.6 ±15.3	230.0 ±10.9	170.3 ±6.4*

30

平均 ±SEM

#試験動物に腹水はなかった

*** p<0.001、**p<0.01、* p<0.05

40

【 0 3 7 1 】

B . ヒトルイス肺癌転移モデル

LT3000 を IP 注射 (q3d で 20 mg / kg) により投与したところ、ヌードマウスでの静脈内ルイス肺腫瘍における腫瘍進行が大きく抑制された。この研究は、Lpath 社によって実施された。

【 0 3 7 2 】

(目的)

50

LT3000は、インビトロで腫瘍細胞移動を低下させること、インビボで内皮細胞の浸潤や血管形成を有意に減少させることが確認されている。この研究の目的は、ルイス肺癌細胞を静脈内（IV）接種されたメスNcr（nu/nu）マウスの肺において腫瘍の転移を遅延させるLT3000の効果を評価することである。

【0373】

（試験デザイン）

肺に播種して腫瘍を発現させるためにルイス肺癌細胞をヌードマウスにIV接種した。20 mg/kgのLT3000または媒体（食塩水）による処理を同日に開始した。19日目の研究終了までマウスをq3dで処理した。研究終了時に生存動物を殺し、体重および肺重量を（腫瘍組織量の測定として）記録した。

10

（結果）

【0374】

結果を体重対肺重量の比（LW/BW）として表した。食塩水対照群と比較して、LT3000で処理した動物において腫瘍組織量は26.5%減少し、体重は16.5%増加していた。LT3000動物のLW/BW比は、食塩水対照群のものより36.5%低かった（表30）。これらのデータを分析すると、LT3000で処理したマウスと食塩水のみを注射した対照群では、肺重量、LW/BW比、体重に有意差があることを示された。

【0375】

（結論）

この研究は、抗LPA抗体の全身投与が、肺腫瘍組織量の減少、体重の増加、低いLW/BW比という結果をもたらすこと示す。

20

【0376】

表30：LT3000の抗腫瘍形成活性を評価するためのマウスルイス肺モデルについての所見の数値のまとめ

【表30】

分析	食塩水*	LT3000*
肺重量 (mg)	768.8 ±139.2 (n=6)	565.4 ±153.6 (n=7)
体重 (g)	15.8 ±1.2 (n=6)	18.4 ±1.7 (n=7)
比 (LW/BW)	49.4 ±11.8 (n=6)	31.4 ±11.9 (n=7)

30

【0377】

C. ヒトCOLO205 結腸直腸癌

LT3000をIP注射（q3dで30 mg/kg）により投与したところ、ヌードNcrマウスにおいて皮下COLO205（結腸直腸）腫瘍異種移植片における腫瘍進行が抑制された。この研究は、サザン研究所（アラバマ州バーミングム）によって実施された。

【0378】

（目的）

メスNcr（nu/nu）マウスに皮下（sc）移植して成立させたヒト結腸直腸（COLO205）癌腫瘍の進行を遅延するLT3000単独の効果を評価すること。

40

（試験デザイン）

COLO205腫瘍片をヌードマウスにsc移植し、腫瘍を成立させた。その後マウスを30 mg/kgのLT3000、40 mg/kgのアバスチン（商標）、15 mg/kgのパクリタキセル（商標）、媒体（食塩水）のいずれかで処理した。LT3000は3日ごとに（q3d）IP注射により投与し、アバスチン（商標）は7日ごとに（q7d）投与し、パクリタキセルは5日間毎日（q1d x 5）ip注射により投与した。研究中の腫瘍の増殖は、腫瘍を3軸に沿って測定し、重量を計算することによってモニターした。

【0379】

（結果）

50

食塩水で処理した動物の腫瘍と比較して、LT3000は有意に ($p < 0.012$) 腫瘍進行を24%抑制した。研究終了時に、LT3000は腫瘍の最終重量を低下させるのにアバスチンと同様の ($p < 0.002$) 効果を示した (それぞれ32%対24%の減少)。陽性対照であるパクリタキセルは、すでに定着していた腫瘍を除去した。

(結論)

この研究は、抗LPA抗体の全身投与によってCLO205腫瘍細胞の腫瘍進行が抑制できることを示唆した。

表31: LT3000の抗腫瘍形成活性を評価するためのマウスCLO205異種移植モデルについての所見の数値のまとめ

【表31】

分析	腫瘍平均重量 (mg) ±SD	有意性 (p値)	媒体で処理したマウスと比較した低下率 (%)
媒体	2378.5 ± 422.2 (n = 8)	該当せず	該当せず
LT3000	1808.1 ± 338.2 (n = 7)	0.012	24.0

*平均 ±SD。 [$p < 0.012$]

【0380】

D. 同種移植黒色腫転移モデル

このモデルは、LT3000を単独で50 mg/kg、q3dで腹腔内注射により投与した処理に対するマウス黒色腫C56B1/6マウスの応答を測定した。この研究は、Lpath社により実施された。

【0381】

(目的)

マウス黒色腫細胞株B16-F10によって誘導された肺転移の進行を減少させるLT3000の効果を評価すること。

(試験デザイン)

B16-F10腫瘍細胞の懸濁液をC57BL/6マウスに尾静脈より静脈内 (IV) 注射した。無作為化した後、動物を2群に分けて媒体 (食塩水) または10 mg/kgのLT3000をIPによってq3dで投与することによって処理し、細胞接種日を開始した。20日後、動物を殺して、心臓穿刺により血漿試料を採取し、肺を単離した。肺の最終重量を量り、体重と相関させた。また、各動物の腹腔および器官 (肝、胃、卵巣、腸など) も転移病巣の存在について分析した。

【0382】

(結果)

表32に示すように、食塩水で処理したマウスに対し、LT3000で処理したマウスでは肺の転移容積が27%減少した。

(結論)

この研究は、抗LPA抗体の全身投与によってB16-F10肺転移の低減をもたらすことができることを示す。

【0383】

表32: LT3000の抗転移活性を評価するためのマウス黒色腫モデルについての所見の数値のまとめ

【表32】

分析	食塩水で処理したマウス*	LT3000で処理したマウス*	低下率 (%)
肺指数 肺重量 (mg) / 体重 (g)	67.00 ± 4.35 (n=11)	48.57 ± 6.44 (n=9)#	27.5%

*平均 ±SD。

[$p < 0.002$]

10

20

30

40

50

【実施例15】

【0384】

肺線維芽細胞におけるLp athomab (LT3000)の抗線維症活性細胞培養および試薬

WI-38ヒト肺線維芽細胞はATCC(バーモント州マナサス)より購入した。肺線維芽細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシン(100単位/ml)を添加した最小必須培地において37°C、5%CO₂で保持した。α平滑筋アクチン(α-SMA)およびFAK Y397抗体はシグマ(ミズーリ州セントルイス)より購入した。LPAはAvanti Polar Lipids社(アラバマ州アラバスター)より購入し、製造元の勧告に従って調製した。

10

【0385】

PCR

RNA分離用に、単一のコンフルエントになったT150フラスコよりトリプシンを用いて細胞を取り出し、遠心によってペレット化して-80°Cで凍結した。全RNAの単離は、Qiagen RNeasy Mini Kit(キアゲン、カリフォルニア州バレンシア)を用いて製造元の動物細胞における全RNA単離手順に従い実施した。つまり、RT-PCR用Superscript III First-Strand Synthesis System(インビトロジェン、カリフォルニア州カルスバッド)を用い、製造元の手順に従ってランダムヘキサマーを第1鎖プライマーとして用いて、2マイクログラムの全RNAを使用して第1鎖cDNAを作成した。LPA₁₋₃受容体用のオリゴを用いて2マイクロリッターの第1鎖cDNAを増幅し、各反応においてGAPDHをコントロールとした。PCRは、Platinum Pfx DNA Polymerase(インビトロジェン、カリフォルニア州カルスバッド)を用いて設定した。その後PCR産物は1%アガロースゲル上で泳動し、エチジウムブロマイド用フィルターとUVPBioImaging Systems EpiChem³ Darkroom(UVP Inc、カリフォルニア州アップランド)を用いて撮影した。

20

【0386】

細胞増殖、コラーゲン産生、細胞に基づいたELISAによるα-SMA発現

肺線維芽細胞を5×10³細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに一晩播いた。播いた細胞を48時間基本培地(最小必須培地、0.1%脂肪酸フリーBSA、100単位/mlのペニシリン・ストレプトマイシン)で血清不足にした後、基本培地のみ(対照)または指示された濃度のLPAを含んでいる基本培地で72時間刺激した。細胞増殖は、製造元の手順に従ってCell Titer 96 Aqueous細胞増殖アッセイ(プロメガ、ウィスコンシン州マディソン)を使用して測定した。吸光度は、OD450で測定し、データは対照に対する変化の倍数によって表した。吸光度の測定は4回実施した。コラーゲン産生については、I型コラーゲンのC末プロペプチド(PICP)の馴化培地での濃度を、PICP酵素免疫吸着分析(ELISA)キット(タカラバイオケミカルズ、大阪、日本)によって製造元の手順に従って測定した。α-SMA発現については、前記の{Micerca、2005 #8093}のようにして細胞に基づいたELISAを実施したが、以下の変更を加えた。細胞を10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、PBS/0.1%トリトンX-100で透過化して、内生ペルオキシダーゼを0.3% H₂O₂でクエンチした。細胞単層をPBS/10% FBSでブロッキングした後、α-SMAに対する一次抗体をPBS/1% BSA/0.1% Tween 20で希釈(1:1000希釈)して細胞と4°Cで一晩インキュベートした。一次抗体とのインキュベーション後、プレートをPBS/0.1% Tweenで3回洗浄し、PBS/1% BSA/0.1% Tween 20で希釈(1:1000希釈)したHRPコンジュゲート化ヤギ抗マウス抗体と室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSで4回洗浄し、TMB比色溶液に1~3分間インキュベートした。同量の1M H₂SO₄を用いて反応を中止し、吸光度をプレートリーダーにより450 nmで読み取った。細胞増殖、コラーゲン生成、α-SMA発現のアッセイはすべて3回ずつ実施した。

30

40

50

【0387】

細胞移動

肺線維芽細胞を 1.5×10^4 細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに一晩播いた。播いた細胞を24時間、基本培地(最小必須培地、0.1%脂肪酸フリーBSA、100単位/mLのペニシリン・ストレプトマイシン)で同期化させた。0時間の時点で細胞をp200ピペットチップで各ウェルの中央に沿ってスクラッチし、最少培地で洗浄し、処理する前に撮影した。その後細胞を濃度0.1~10 μ MのLPA(C18:1)または陽性対照(10% FBS)で処理した。5% CO₂インキュベーターにおいて細胞を37°Cで17時間刺激した。17時間処理した後、再度撮影し、写真を同サイズに調節して0時間と17時間でのスクラッチの幅を測ることによって傷の閉鎖率(%)を求めた。

10

【0388】

LPA₁₋₃受容体の発現および肺内線維芽細胞内 肺線維芽細胞のRT-PCR分析によってLPA₁₋₃受容体の顕著な発現が明らかとなり、LPA₁、LPA₃受容体が最も高度に発現されていた。

LPAは肺線維芽細胞による増殖および移動を刺激する LPAは創傷治癒の制御に関与している。そのため、創傷の修復に寄与している細胞機構の2つである線維芽細胞の増殖および移動に対するLPAの用量依存的な作用を検討した。LPAは線維芽細胞の増殖を用量依存的に刺激し、10 μ M LPAで最大の上昇が確認された。細胞移動に対するこのLPAの作用は、インビトロ創傷治癒アッセイでも検討した。用量依存的な細胞増殖の上昇とは異なり、LPAは低い(0.1 μ M) LPA濃度で細胞移動を刺激するようであった。LPA濃度を増加させると、細胞移動が用量依存的に基礎レベルまで低下することが確認された。このデータは、肺線維芽細胞の増殖に対するLPAの濃度依存的な作用と肺線維芽細胞の移動の間には反比例の関係があることを示唆している。

20

【0389】

LPAは肺線維芽細胞による筋線維芽細胞形質転換およびコラーゲンI型産生を促進する

肺でLPAの線維化促進性の可能性を評価するために、肺線維芽細胞による筋線維芽細胞形質変換およびコラーゲンI型産生のLPAを介した刺激を、ELISAおよび免疫組織化学を用いて検討した。LPAは α -SMA(筋線維芽細胞マーカー)の発現およびプロコラーゲンI型C末ペプチド(PICP)の放出を用量依存的に促進し、10 μ M LPA濃度で最大の刺激をもたらした。さらに、LPAは、 α -SMAの細胞骨格張力繊維への取り込みを増加させ、接着斑キナーゼ(FAK^{Y397})のリン酸化を刺激するが、これらは、筋線維芽細胞形質変換に必要とされる現象である。一貫して、これら形質変換した細胞は、LPA刺激後にコラーゲンI型の細胞発現の増加も示しており、このことは線維化促進性の細胞表現型へ形質変換したことを示す。

30

【実施例16】

【0390】

LT3000は動物においてブレオマイシン傷害後の炎症および線維症を減少させる 動物

20~25 gのC57BL/6Jメスマウスをハーランより入手した。Bioquant社(カリフォルニア州サンディエゴ)の研究機関における動物の管理および使用に関する委員会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)に従って動物を処理した。マウスを空調された12時間の明暗周期の部屋に入れ、標準的な固形飼料と水道水へ自由にアクセスできるようにした。動物には通常の固形飼料(オートクレーブ済み)と水の不断給を提供した。

40

ブレオマイシンによる肺傷害の誘導

ケタミン(20 mg/kg)とキシラジン(2 mg/kg)の混合でマウスに麻酔をかけ、20ゲージの供給針を介して食塩水(0.9%)のみ、またはブレオマイシン(2.5 mg/kg)含有食塩水の気管内滴下(容積50 μ l)を1回行った。14日間後にマウスを殺した。

50

【0391】

実験群

マウスを無作為的に次の投与群に割り当てた。(i)食塩水。マウスに食塩水を気管内(IT)滴下して、無菌PBS(媒体)のi.p注射を打った。(ii)BLEO群。マウスにブレオマイシンをIT滴下して、無菌PBS(媒体)のi.p注射を打った。(iii)BLEO + 25 mg/kg群。マウスにブレオマイシンをIT滴下して、LT3000(25 mg/kg)のi.p注射を打った。(iv)25 mg/kg群。マウスに食塩水をIT滴下して、LT3000(25 mg/kg)のi.p注射を打った。抗体処理はすべて腹腔内(i.p.)注射により2日ごとに行った。各処理の体重およびマウス死亡率に対する効果を研究期間中記録した。

10

【0392】

気管支肺胞洗浄液(BALF)の分離

マウスを殺した後、1 mlの注射器に接続した20ゲージの血管カテーテルでマウス挿管した。気管の周辺にナイロン糸を結ぶことによってカテーテルを固定した。肺を1.0 mlの食塩水で一回洗浄した後、0.8 mlの食塩水で再度洗浄した。洗浄液を合わせ、BALFを1200 rpmで5分間遠心分離にかけた。上清を取り出し、後の分析用に-80 °Cで凍結した。ペレットを0.3 mlのPBS/2%ウシ胎児血清で再懸濁し、流動細胞計測法により細胞を分類して数えた。BALF中のタンパク質量はBCAタンパク質定量試薬(ピアス、イリノイ州ロックフォード)を使用して測定した。

20

【0393】

流動細胞計測法によるBALF細胞の分析

Trucountチューブ(BD Biosciences、カタログ番号340334)を製造元の手順に従って用いて個々の炎症細胞集団を同定し、定量化した。つまり、単細胞の懸濁液を染色緩衝液(PBS/2% FCS)で調製した。約300 µlの細胞懸濁液を12 x 75 ポリプロピレンTrucountチューブに入れた。チューブを250~300 x g、4 で5分間遠心分離にかけた。ピペットを用いてペレットを乱さないよう注意しながら液体を吸引した。各チューブに次のモノクローナル抗体を添加した。PEコンジュゲート化抗CD16(BD Biosciencesカタログ番号555407)、FITCコンジュゲート化抗CD14(BD Biosciencesカタログ番号555397)、PE-Cy5コンジュゲート化抗CD5(BD Biosciencesカタログ番号555354)で3色カクテルを得た。抗体の量は製造元の指示に従った。チューブをボルテックスして蓋をしたバケツ内(暗所で)で氷上に約30分間放置した。2 mlの染色緩衝液を添加することによって懸濁液を洗浄した。懸濁液をボルテックスした後、250~300 x g、4 で5分間遠心分離にかけて上清を削除した。工程6を2回繰り返した。その後ペレットを1 mlの染色緩衝液で再懸濁し、個々の細胞集団を蛍光補助式細胞分得(Fluorescence Assisted Cell Sorting、FACS)分析によって分析した。FACS分析については、染色した細胞を、BD FACScan(カリフォルニア州サンノゼ)を用いて1つのレーザー(488 nm アルゴン レーザー)と3つの検出器で流動細胞計測法により分析した。10,000個の細胞を収集し、データをCellQuest version 3.3ソフトウェアで分析した。

30

40

【0394】

組織学的検討

肺を切除し、個々の葉に分離し、10%緩衝ホルマリンにて室温で一晩固定した。個々の葉を3枚の水平切片に切断し、パラフィンに包埋した。葉は厚さ5 µmに切断し、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)によって染色した。切片はすべて光学顕微鏡(倍率10x)で観察し、線維症の重症度を前記したとおり(Ashcroftら、(1988) J Clin Pathol、41:467-70)Ashcroft法を用いて半定量的に評価した。つまり、各葉の水平切片における線維症の重症度を、0~8の尺度でスコア化した。評価基準は以下の通りだった。程度0:正常な肺、程度1:肺胞壁または細気

50

管支壁の極小線維性肥厚、程度3：構造に明確な損傷がない中等度の壁肥厚、程度5：肺構造に明確な損傷と線維性の帯または線維性の小塊の形成を伴う線維症の増加、程度7：構造の重度の歪みおよび大きい線維性領域、程度8：線維による視界の完全閉塞。各葉の個々の切片の値を平均し、すべての葉の値を平均することにより、各動物について代表的な線維症スコアを出した。

【0395】

免疫組織化学

肺切片を各5分間のキシレン(Richard Allen Scientificカタログ番号9900)洗浄3回によって脱パラフィン化した。スライドの再水和は、100%アルコール(Richard Allen Scientificカタログ番号8101)、95%アルコール(Richard Allen Scientificカタログ番号8201)、80%アルコール(Richard Allen Scientificカタログ番号8301R)の各5分間の一連のアルコール洗浄により実施した。再水和は、水道水の流水下、スライドを5分間洗浄することによって完了した。その後13分間3% H₂O₂(水にて30%希釈、シグマ、カタログ番号H1009)にて外来ペルオキシダーゼをクエンチした。水道水の流水下、スライドを15分間洗浄することによってH₂O₂を削除した。一方、クエン酸緩衝液(10mM クエン酸、pH 6.0(フィッシャー、カタログ番号A940))を蒸し器(ブラック&デッカー、SKU番号HS900)に入れて40分間95℃に予熱した。抗原の回収には、スライドを予熱したクエン酸緩衝液に移し、蒸し器で35分間95℃で加熱した。引き続いて、スライドを5分間PBS(セルグロ、カタログ番号21-040-CM)にて2回洗浄した。平滑筋アクチン(α-SMA)あるいは結合組織成長因子(CTGF)に対してマウスIgGベクタステインABCキット(ベクター社、カタログ番号6102)またはヤギIgGベクタステインABCキット(ベクター社、カタログ番号PK-6105)を製造元の手順に従って使い、スライドを染色した。緩衝液を必要とする工程のすべてにPBSを使用した。製造元提案の手順に従ってアビジン・ビオチンブロッキングキット(ベクター社、カタログ番号SP-2001)をABCキットと併用し、内生ビオチン信号を遮断した。平滑筋アクチンに対して誘導した一次抗体(シグマ、カタログ番号A2547)を1:5000希釈したもの、またはCTGCを再度誘導した一次抗体(サンタクルーズバイオテクノロジー、カタログ番号sc-14939)を1:50希釈したものを、指示に従って適用した。信号は、ペルオキシダーゼ基質キットDAB(ベクター社、カタログ番号SK-4100)を用い、生産者の指示通り調製し、スライドに2分間適用することにより検出した。スライドはdH₂Oで洗浄した。対比染色はヘマトキシリン(シグマ、カタログ番号HHS32)で30秒間染色することにより実施した。スライドを水道水ですすぐことによりヘマトキシリンを除去した後、最初に水和用に使ったアルコールに対するキシレン類を逆にして脱水した。最後に、スライド当たり20μlのパーマウント(フィッシャー、カタログ番号SP15-100)を使用してスライドをガラス製のカバーリップでマウントした。

【0396】

データ分析

試験は全データが揃うまでデータ収集・分析担当者全員に完全に盲検化されていた。データはGraphPadソフトウェアを用いて分析した。実験群間の差異の統計的有意性は、独立スチューデントt検定によって計算した。

結果

LT3000はブレオマイシン傷害後の炎症および線維症を減少させる

マウスのブレオマイシンモデルを用いて、肺傷害後の肺炎症および線維症におけるLPAの役割と、これらの作用を軽減する新規のモノクローナルマウスLPA抗体(LT3000)の効果を検討した。ブレオマイシン滴下後のマウス肺の組織学的検討を行ったところ、肺胞中隔の肥厚、肺炎、肺実質の線維性閉塞など、肺組織への有意な損傷が明らかになった。LT3000で処理したマウスでは、炎症、線維症の劇的な減少と正常な肺形態

の保持が確認された。これらのマウスにおける肺炎症および線維症の半定量的分析を行ったところ、LT3000処理をした場合、これらのパラメータにおいてそれぞれ56%と48%の低下が明らかになった。LT3000単独で処理した健常マウスにおいては、炎症や線維症、正常な肺形態における変化は確認されなかった。

【0397】

LT3000はプレオマイシン肺傷害後のマウスにおいてBAL液の細胞充実度およびタンパク質量を減少させ、体重を維持する

組織の傷害度に合わせて、炎症細胞数は対照のほぼ2倍であり、プレオマイシン滴下マウスのBAL液におけるタンパク質量は、約10倍と有意に上昇した。対照およびプレオマイシン処理マウスの両方で、LT3000の投与によりBAL液の細胞充実度が約95%低下した。さらに、BAL液中のタンパク質量はLT3000を投与されたプレオマイシン滴下マウスにおいて40%低下した。対照マウスと比較すると、プレオマイシン滴下マウスでは、肺傷害度と併せて、16%の体重低下が14日の時点で確認された。それに対して、LT3000処理したマウスで処理したプレオマイシン滴下マウスの体重は対照との有意差を示さなかった。

【0398】

LT3000はプレオマイシン傷害後の肺組織において大食細胞および筋線維芽細胞の密度を低下させる

肺炎症および線維症を減少させるLT3000の能力をさらに研究するために、マウス肺組織における大食細胞の浸潤および筋線維芽細胞の密度を検討した。同様に、-SMA染色により示される筋線維芽細胞の密度はプレオマイシン滴下マウスの線維性領域で増加していた。さらに、LT3000処理により、プレオマイシン滴下マウスの肺における筋線維芽細胞の密度も低下した。肺線維症および炎症に対する効果は、上述の方法を用いて、肺線維症(Ashcroftスコア)、炎症(炎症スコア)の半定量的評価に従って確認した。LT3000処理によって、肺線維症および炎症はそれぞれ48%、56%低下した。

【実施例17】

【0399】

LT3000は介入研究においてプレオマイシン傷害後の炎症および線維症を減少させる

上記実施例に概説した所見では、プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおいてLT3000の消炎性と抗線維性の両効果が示された。したがって、プレオマイシン傷害後に肺線維症の進行に対するLT3000の予防能力または介入能力を評価するための追加研究を行った。この実験では、マウスをランダムで次の投与群に割り当てた(表33)。(i)食塩水。マウスに食塩水を気管内(IT)滴下して、無菌PBS(媒体)のi.p注射を打った。(ii)BLEO群。マウスにプレオマイシンをIT滴下して、無菌PBS(媒体)のi.p注射を打った。(iii)予防群。マウスにプレオマイシンをIT滴下して、LT3000(50 mg/kg)のi.p注射をプレオマイシン滴下と同日から開始してq2dで6日間打った。(iv)介入群。マウスにプレオマイシンをIT滴下して、LT3000(50 mg/kg)のi.p注射をプレオマイシン滴下後から6日目に開始してq2dで打った。抗体処理はすべて腹腔内(i.p.)注射により行った。研究終了時(14日目)に、マウスを殺し、プレオマイシン誘導の肺炎症および線維症に及ぼすLT3000の効果を下記のように評価した。(i)Ashcroftらの方法(J Clin Pathol. 1988 Apr; 41(4): 467-70)を用いて組織線維症をH&E染色した肺切片において半定量的に評価した、(ii)流動細胞計測法を用いて肺洗浄液中の炎症細胞を測定した、(iii)BCAタンパク質量定量試薬(ピアス、イリノイ州ロックフォード)を用いて肺洗浄液中のタンパク質量を評価した、(iv)プレオマイシン滴下後14日目に各マウスの体重を測定した。プレオマイシン誘導肺炎症および線維症に及ぼすLT3000の効果の数値のまとめを表34に示す。

【0400】

表33：投薬スケジュール

10

20

30

40

50

【表 3 3】

気管内滴下	処理	群 (n)	用量 (mg/kg)	投薬回数	経路	処理
食塩水	PBS	10	--	7	IP	開始 0 日目 q2d 投薬
ブレオマイシン	PBS	13	--	7	IP	開始 0 日目 q2d 投薬
ブレオマイシン	介入	13	LT3000 (50 mg/kg)	4	IP	開始 0 日目 終了 6 日目 q2d 投薬
ブレオマイシン	予防	13	LT3000 (50 mg/kg)	4	IP	開始 6 日目 終了 12 日目 q2d 投薬

10

【0401】

表 3 4 : 病態生理学的所見のまとめ

【表 3 4】

	ブレオマイシン単独と比較した低下率 (%)	
	予防研究	介入研究
組織線維症	20% (p>0.05)	22% (p>0.05)
肺洗浄液中の炎症細胞	50% (p<0.01)	41% (p<0.05)
肺洗浄液中のタンパク質	35% (p>0.05)	67% (p>0.05)
体重	食塩水対照と同じ	食塩水対照と同じ

20

【0402】

したがって、抗 L P A 抗体 (L T 3 0 0 0、L p a t h o m a b) は、広く受け入れられている肺線維症の動物モデルにおいて、予防的、介入的な両方の面で有効であることが確認された。これらの所見は、傷害後の細胞外基質生成および組織再構築における生理活性脂質 L P A の著明な役割を示すものである。さらに、これらの研究で L P A は、多くの疾患や器官系に関連している線維症の治療のための新規の治療ターゲットとされた。L P A に対するモノクローナル抗体は、線維症の治療のために臨床的に大きな可能性があると思われ。

30

【実施例 1 8】

【0403】

L T 3 0 0 0 によるサイトカインおよび成長因子の変調

現在の標準治療となっている生検よりも低い侵襲性で線維症 (特に肺および肝の線維症だがこれらに限定しない) をモニターできる方法が長い間望まれていた。研究者らは、疾患のマーカーのモニタリングにより、疾患の進行および/または治療効果をより低い侵襲性でモニターできるようにするために、サイトカインおよび成長因子の循環量と線維症の程度との相互の関連付けを試みた。Moraisら、(2006) Mem Inst Oswaldo Cruz、Rio de Janeiro、第 101 巻 (付録 I) : 353 - 354 を参照。線維症を検出する方法は、L P A 量と一つ以上の線維形成マーカー (例えば、サイトカインまたは成長因子) の量を相互に関連付けることにより、患者試料であり、臨床の場において線維症をモニタリングするのに有用であると思われる。

40

【0404】

L T 3 0 0 0 の抗炎症効果をさらに研究するため、経路特異的サイトカインタンパク質アレイ (Raybiotech社、ジョージア州ノークロス) を使用してサイトカインおよび成長因子の量を B A L 液において評価した。L T 3 0 0 0 による最大レベルの調節が示された炎症性サイトカインに関する予備的 (n = 3) 所見を表 3 5 にまとめた。

表 3 5 : B A L 液中のサイトカイン発現量のまとめ

(N D = ブレオマイシン処置群と比較して有意差なし)

50

【表 3 5】

サイトカイン	プレオマイシン単独と比較した低下率 (%)	
	予防研究	介入研究
インターロイキン 6	79% (p>0.05)	ND
MIP-3β	23% (p>0.05)	28% (p>0.05)
エオタキシン	63% (p>0.05)	53% (p>0.05)
インターロイキン 13	28% (p>0.05)	11% (p>0.05)
顆粒球コロニー刺激因子	45% (p>0.05)	24% (p>0.05)
胸腺および活性化調節性ケモカイン (TARC)	18% (p>0.05)	ND
組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (TIMP-1)	82% (p<0.01)	86% (p<0.01)
腫瘍壊死因子 α (TNFα)	82% (p>0.05)	86% (p>0.05)

10

【0405】

表 3 5 より明らかになように、プレオマイシン肺傷害のマウスは、抗 L P A 抗体 L p a t h o m a b (L T 3 0 0 0) による処理後、I L - 1 3 および T I M P - 1 量の低下、並びに他の関連成長因子の減少、そしてその結果として肺線維症の減少を示した。表 3 5 に示すサイトカインおよび成長因子量のパターンは、処理に応じた線維症の減少を示すものと思われる。従って、表 3 5 に示すものも含め、サイトカインおよび成長因子の変化のパネルは、例えば本発明の抗 L P A 薬による、肺線維症を含めた線維症の有効的な治療に有用な臨床分析およびマーカーであると思われる。これは侵襲性を最小限に抑えた臨床分析になり得る上、組織生検よりコストやリスクが低い。

20

【実施例 19】

【0406】

腎線維症における L P A

L P A は線維症や腎臓疾患に関与している多くの過程を仲介できるため、L P A とその受容体を腎線維症の動物モデルにおいて研究した。一側尿管閉塞 (U U O) モデルは、炎症、線維芽細胞の活性化、細胞外基質の蓄積を含め、腎線維症の進行を加速的に模倣する。J . P . P r a d e r e ら、(2 0 0 7) J . A m . S o c . N e p h r o l . 1 8 : 3 1 1 0 - 3 1 1 8、J . - P . P r a d e r e ら、リゾホスファチジン酸と腎線維症 [L y s o p h o s p h a t i d i c a c i d a n d r e n a l f i b r o s i s]、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a (2 0 0 8)、d o i : 1 0 . 1 0 1 6 / j . b b a l i p . 2 0 0 8 . 0 4 . 0 0 1。

30

【0407】

U U O 後に L P A₁ 受容体の発現を誘導すると、腎臓 L P A 産生が 3 . 3 倍増加した。このことは、U U O に起因する腎線維症における L P A と L P A₁ 受容体の役割を示す。これは、マウスにおける腎線維症の進行が L P A₁ - / - 変異動物において減少したという所見により確認された。また別のより遅い腎線維症のモデルであって、ヒト疾患の緩徐な進行を厳密に模倣する腎毒性血清腎炎モデルでも、L P A₁ 発現が増加した。従って、このエビデンスは、腎線維症において L P A が役割を担っていることを示しており、本発明の抗 L P A モノクローナル抗体などの抗 L P A 薬は腎線維症の治療に適切な候補であると思われる。

40

【0408】

P r a d e r e ら、2 0 0 7 に従い、マウス U U O モデルにおいて L p a t h o m a b (L T 3 0 0 0) を試験した。対照と比較した L T 3 0 0 0 処理後の炎症および細胞外基質の低下を組織学的に検討し定量化した。

【実施例 20】

50

【0409】

Lpathomab (LT3000) のヒト化
材料

3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン液体基質 (TMB) はシグマ・アルドリッチ (ミズーリ州セントルイス) から入手した。脂肪酸フリーウシ血清アルブミン (BSA) はカルバイオケム (カリフォルニア州ラ・ホーヤ) から入手した。固定化プロテインA、固定化パパイン、タンパク質脱塩スピカラムはピラス (イリノイ州ロックフォード) から入手した。抗ヒトIgG (Fc 特異的) 抗体はベチル (テキサス州モンゴメリー) より購入した。参照IgG (非特異性ヒトIgGおよびマウスIgG)、抗ヒトIgG (H+L) 西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲートおよび抗マウスIgG (H+L) 西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲートはジャクソン・イミュノリサーチ・ラボラトリーズ (ペンシルバニア州ウェストグローブ) より入手した。リゾホスファチジン酸 (LPA) および競合ELISAで使用する他の脂質は、アバンティ・ポラー・リピッツ (アラバマ州アラバスター) より購入した。ピオチン化LPAはエシェロン・バイオサイエンス (ユタ州ソルトレイクシティ) より購入した。

10

【0410】

LT3000のヒト化

マウスCDRをヒトフレームワーク領域 (FR) に移植することによってマウス抗LPAモノクローナル抗体LT3000 (Lpathomab) の可変ドメインをヒト化した。Lefranc, M. P. (2003). *Nucleic Acids Res*, 31: 307-10, Martin A. C. および J. M. Thornton, (1996) *J Mol Biol*, 1996, 263: 800-15, Morea V., A. M. Lesk および A. Tramontano (2000) *Methods*, 20: 267-79, Foote J. および G. Winter, (1992) *J Mol Biol*, 224: 487-99, Chothia C. ら, (1985) *J Mol Biol*, 186: 651-63。

20

【0411】

配列アラインメント・分析プログラム (SR v7.6) を用い、LT3000への相同性に基づいてIMG TデータベースおよびKababデータベースより適切な受容ヒトFR配列を選択した。FR残基、バーニア残基、正準残基、VH-VL界面残基 (VCI) で同一性が高い配列をまず選択した。このサブセットより、最も非保存的なVCI置換、異常なプロリンまたはシステイン残基、体細胞変異を有する配列をヒト化から除外した。ヒト化VL-VH配列を含む三次元 (3D) モデルを作成し、CDRを形成する残基と重なるFR残基を同定した。これらFR残基は、CDRループの構成および抗体の抗原に対する高親和性および特異性を保持する能力に影響する可能性がある。この分析に基づき、AJ002773の6つの残基およびDQ187679の3つの残基を同定し、LT3000と有意に異なるとみなし、マウス配列においての変異と考えた。

30

【0412】

哺乳類細胞における抗体の発現および産生

マウス抗体遺伝子をハイブリドーマよりクローニングした。ヒトフレームワーク配列およびマウスCDRを含んでいる合成遺伝子を合成オリゴヌクレオチドより構築し、平滑な制限部位を用いてpCR4Blunt-TOPOにクローニングした。配列決定して100%の配列一致を確認した後、重鎖遺伝子にはpConベクター、軽鎖遺伝子にはpConベクター (ロンザバイオロジックス、ニューハンプシャー州ポーツマス) を用いて、軽鎖と重鎖をクローニングし、全長IgG1キメラ抗体として発現させた。これらの各遺伝子の発現カセットには、プロモータ、コザック配列、転写終結区が含まれた。これらのプラスミドで大腸菌 (One Shot Top 10 化学的コンピテント大腸菌細胞、インビトロジェン、カタログ番号C4040-10) を形質変換させ、LB培地において増殖させ、グリセリンにて保存した。製造元の記載に応じて大規模なプラスミドDNAを調製した (キアゲン、エンドトキシンフリーのMAXIPREP™キット、カタログ番

40

50

号12362)。293フェクチンを用い、293F-FreeStyle Mediaを培養に用いてプラスミドをヒト胎児由来腎臓細胞株293Fにトランスフェクションした。トランスフェクションされた培養は、約2~12 mg/Lのヒト化抗体を発現した。

【0413】

抗体の精製

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培養上清よりモノクローナル抗体を精製した。0.5 mlのProSep-vA-Ultra樹脂(ミリポア、カタログ番号115115827)を含むアリコートを含む自然落下法用使い捨てカラム(ピラス、カタログ番号29924)に添加し、10~15 mlの結合用バッファー(ピラス、カタログ番号21001)で平衡化した。一過性発現したヒト化抗体を含む培養上清を結合用バッファーで1:1に希釈し、樹脂に通過させた。カラムに保持された抗体を15 mlの結合用バッファーで洗浄し、低pHの溶出用バッファー(ピラス、カタログ番号21004)で溶出し、pHを中和するために100 µlの結合用バッファーを含む1 mlのフラクションに収集した。吸光度(280 nm) > 0.1のフラクションを1リットルのPBS緩衝液(セルグロ、カタログ番号021-030)で一晩透析した(Slide-A-Lyzerカセット、3500 MWCO、ピラス、カタログ番号66382)。透析した試料をセントリコンYM50(アミコン社、カタログ番号4225)濃縮器を用いて濃縮し、0.22 µMセルロースアセテート膜(コスター、カタログ番号8160)でろ過した。SDS-PAGEを用いて各産生物の純度を評価した。

10

20

【0414】

SDS-PAGE泳動

各抗体試料を2-メルカプトエタノール(シグマ、カタログ番号M-3148)含有(還元型)または非含有(非還元型)のゲル添加用バッファー0.5 µg/µlで希釈した。還元試料は95 °Cで5分間加熱し、非還元試料は室温でインキュベートした。1レーン当たり2 µgの抗体を4~2%勾配ゲル(インビトロジェン、カタログ番号NP0322)に添加し、室温で1X NuPAGE MOPS SDS泳動用バッファー(インビトロジェン、カタログ番号NP0001)にて170ボルトで1時間泳動した。泳動後、ゲルを50%メタノール、10%酢酸にて10分ほど浸漬することにより抗体を固定した。その後ゲルを200 ml蒸留水で3回洗浄した。最後に、ゲルをGelCode^(R) Blue Stain(ピラス、カタログ番号2490)にて一晩染色し、水で脱染することによりバンドを可視化した。

30

【0415】

定量的ELISA

定量的ELISAを用いて抗体価を求めた。ヤギ抗ヒトIgG-Fc抗体(ベチル社A80-104A、1 mg/ml)を炭酸緩衝液(100 mM NaHCO₃、33.6 mM Na₂CO₃、pH 9.5)にて1:100希釈した。100 µl/ウェルのコーティング溶液を37 °Cで1時間インキュベートすることによりプレートをコーティングした。プレートをTBS-T(50 mMトリス、0.14 M NaCl、0.05% tween-20、pH 8.0)で4回洗浄し、200 µl/ウェルTBS/BSA(50 mMトリス、0.14 M NaCl、1% BSA、pH 8.0)によって37 °Cで1時間ブロッキングした。試料および標準を2回に検定しても十分な容量で非結合型プレートにて調製した。標準はヒト標準血清(ベチル社RS10-110、4 mg/ml)をTBS-T/BSA(50 mMトリス、0.14 M NaCl、1% BSA、0.05% Tween-20、pH 8.0)において次の濃度に希釈することにより調製した。500 ng/ml、250 ng/ml、125 ng/ml、62.5 ng/ml、31.25 ng/ml、15.625 ng/ml、7.8125 ng/ml、0.0 ng/ml。試料の吸光度(OD)が標準の範囲内になるようにTBS-T/BSAで適切に希釈することによって試料を調製した。最も線形の範囲は125 ng/ml ~ 15.625 ng/mlであった。プレートをTBS-Tで4回洗

40

50

浄した後、100 u l の標準 / 試料調製液を各ウェルに添加し、37 °C で1時間インキュベートした。次にプレートをTBS - Tで4回洗浄し、100 u l / ウェルのTBS - T / BSAで1 : 150 , 000に希釈したHRP - ヤギ抗ヒトIgG抗体 (ベチル社 A80 - 104P、1 mg / ml) によって37 °C で1時間インキュベートした。プレートをTBS - Tで4回洗浄し、4 °C に冷却した100 u l / ウェルのTMB基質を用いて展開した。7分後に1M H₂SO₄ (100 u l / ウェル) で反応を停止した。ODを450 nmで測定し、データをGraphpad Prismソフトウェアで分析した。4つのパラメータの方程式を用いて検量線を当てはめ、これを使用して試料におけるヒトIgG含量を計算した。

【0416】

10

直接結合ELISA

ヒト化抗体のLPA結合親和性を直接結合ELISA検定により求めた。37 °C で1時間0.1 M炭酸緩衝液 (pH 9.5) にて希釈したImjectマリエイミド活性化ウシ血清アルブミン (BSA) (ピアス社) とコンジュゲートした1.0 ug / ml のC12 : 0 LPAでマイクロタイターELISAプレート (コスター) を一晩コーティングした。プレートをPBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.1 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄、pH 7.4) で洗浄し、室温で1時間または4 °C で一晩PBS / BSA / tween - 20によりブロッキングした。一次インキュベーション (室温で1時間) については、抗LPA抗体 (0.4 ug / ml、0.2 ug / ml、0.1 ug / ml、0.05 ug / ml、0.0125 ug / ml、0.00625 ug / ml) の希釈系列をマイクロプレート (ウェル当たり100 u l) に添加した。プレートを洗浄し、ウェル当たり100 u l の1 : 20 , 000に希釈したHRPコンジュゲート化ヤギ抗ヒト (H + L) (ジャクソン、カタログ番号 109 - 035 - 003) と1時間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 (シグマ、カタログ番号T0440) で展開し、1 M H₂SO₄を添加することにより停止した。Thermo Multiskan EXを用いて450 nmで吸光度 (OD) を測定した。Graphpad Prismソフトウェアを用いて4つのパラメータの方程式による用量反応曲線の最小二乗を当てはめることによりEC₅₀ (半最大結合濃度) を求めた。

20

【0417】

30

LPA競合ELISA

ヒト化抗体の特異性を競合ELISAによって求めた。C18 : 0 LPA コーティング材料を炭酸緩衝液 (100 mM NaHCO₃、33.6 mM Na₂CO₃、pH 9.5) で0.33 ug / mlに希釈した。プレートを100 u l / ウェルのコーティング溶液でコーティングし、37 °C で1時間インキュベートした。プレートをPBS (100 mM Na₂HPO₄、20 mM KH₂PO₄、27 mM KCl、1.37 mM NaCl、pH 7.4) で4回洗浄し、150 u l / ウェルのPBS、1% BSA、0.1% tween - 20で室温で1時間ブロッキングした。5 u M、2.5 u M、1.25 u M、0.625 u M、0.0 u Mの脂質競合体 (14 : 0 LPA (アバンティ社、カタログ番号857120)、18 : 1 LPA (アバンティ社、カタログ番号857130)、18 : 1 LPC (アバンティ社、カタログ番号845875)、cLPA (アバンティ社、カタログ番号857328)、18 : 1 PA (アバンティ社、カタログ番号840875)、PC (アバンティ社、カタログ番号850454) に対してヒト化抗LPA抗体を試験した。抗体をPBS、0.1% tween - 20にて0.5 ug / mlに希釈し、非結合型プレート上で、試料対抗体の比率1 : 3で脂質試料と合わせた。プレートをPBSで4回洗浄し、100 u l / ウェルの一次抗体・脂質の複合体と室温で1時間インキュベートした。次に、プレートをPBSで4回洗浄し、100 u l / ウェルのPBS、1% BSA、0.1% tween - 20において1 : 20 , 000に希釈したHRPコンジュゲート化ヤギ抗ヒト抗体と室温で1時間インキュベートした。再度プレートをPBSで4回洗浄し、4 °C でTMB基質

40

50

(100 μ l / ウェル) を用いて展開した。8分後に反応を100 μ l / ウェルの1M H_2SO_4 によって停止した。Thermo Multiskan EXを用いて450 nmで吸光度(OD)を測定した。生データをGraphPadソフトウェアに移して分析した。

【0418】

耐熱性

加熱後の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、ヒト化抗体の耐熱性を検討した。PBS(セルゴ社、カタログ番号021-040)にて溶解した抗体を25 μ g/mlに希釈し、60、65、70、75、80で10分間インキュベートした。温度を上昇させる前に各試料を10 μ l取り出し、90 μ lのPBSで希釈して氷上保存した。その後試料を短時間ボルテックスし、13,000 rpmで1分間遠心分離することにより不溶材料を除去した。直接LPA結合ELISAを用いて上清の結合活性を求め、加熱処理なしの同試料である対照と比較した。

10

【0419】

表面プラスモン共鳴

結合データはすべてProteOn光学バイオセンサ(バイオラド、カリフォルニア州ハーキュリーズ)で収集した。12:0 LPAチオールおよび18:0 LPAチオールをマレイミド修飾GLCセンサー・チップ(カタログ番号176-5011)とコンジュゲートした。まず、GLCチップをスルホNHS/EDCの同量混合で7分間活性化し、次いでエチルジアミンによる7分間のブロックング工程を実施した。次にスルホMBS(ピアス社、カタログ番号22312)をHBSランニングバッファー(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% tween-20、pH 7.4)において0.5 mMの濃度で表面上に流した。LPAチオールをHBSランニングバッファーにおいて10、1、0.1 μ Mの濃度に希釈して7分間注入し、3つの異なった密度のLPA表面を得た(約100、約300、約1400 RU)。次に、最高濃度として25 nMをはじめとして(元のストックをそれぞれ100対1に希釈した)、3倍希釈の系列を使用してヒト化抗体の結合データを収集した。100 mM HClの10秒のパルスによって表面を復元した。データはすべて25で収集した。対照は、標準表面を使用し、ブランクを注入することにより処理した。各表面の応答データは、複雑な結合挙動を示すが、これはおそらく様々な程度の多価結合に起因する。結合定数の推定値を抽出するために、様々な抗体濃度のデータを、1部位および2部位のモデルを用いて全体的に当てはめた。これにより二価部位(部位1)と一価部位(部位2)の親和性の推定値を得た。

20

30

【0420】

LPAのモル結合能

置換アッセイを用いてLPA:モノクローナル抗体のモル比を求めた。乾燥窒素気流を用いてハウケイ酸チューブ(フィッシャーブランド社、カタログ番号14-961-26)を5ナノモルのピオチン化LPA(50 μ gの脂質(エシェロン・バイオサイエンヌ、カタログ番号L-012B、ロット番号F-66-136を705 μ lのクロロホルム:メタノール=1:1に懸濁して100 μ Mの溶液を得た)でコーティングした。コーティングしたチューブを75 μ l(125ピコモル)のPBS(セルゴ社、カタログ番号021-030)に溶解した抗体と室温でインキュベートした。インキュベーション3時間後、タンパク質脱塩カラム(ピアス、カタログ、番号89849)を用いてLPA:モノクローナル抗体複合体を遊離脂質から分離し、HABA/アビジン置換アッセイ(ピアス、カタログ番号28010)を製造元の指示に従って使用し、結合したピオチン化LPAのモル濃度を求めた。

40

【0421】

SKOV3細胞におけるLPA誘導性IL-8放出の測定

抗LPA抗体はSKOV3卵巣細胞馴化培養においてLPA依存のヒトCXCL8/I

50

L-8放出を抑制する。SKOV3細胞(ロット番号4255558、継代14)を2 mlの1XトリプシンEDTA(メディアテック社、カタログ番号25-053-CV)で収穫し、8 mlの完全培地(10% FBS、メディアテック社カタログ番号35-011-CV)にて再懸濁した。細胞を5分間(11,000 rpm)遠心分離にかけ、5 mlの完全培地にて再懸濁した。血球計を用いて0.4%トリパンプルー(100 µl細胞に900 µlトリパンプルーを添加、インビトロジェン、カタログ番号15250-061)で細胞を二回計数した。96ウェルプレートにおいて、ウェル当たり1×10⁵個の細胞を播種した(最終容積100 µl/ウェル)。一晚37°Cでインキュベートすることにより、細胞を定着させ、コンフルエントな単層を形成させた。翌日、細胞を最小培地(1 mg/ml BSAのL-グルタミン含有マッコイ培地、メディアテック社、カタログ番号10-050-CV)で2回軽く洗浄した。培地を1%ペニシリン/ストレプトマイシン(メディアテック社、カタログ番号30-002-CI)2.2 g/L重炭酸ナトリウム(Media Tech社、カタログ番号25-035-CI)に調整した。次に細胞を37°Cで正確に24時間血清不足にし、次いで1 mg/ml BSA/PBS(カルバイオケム、カタログ番号126575)にて溶解した100 µM C18:1 LPA(アバンティ社、カタログ番号857130)によりサイトカイン刺激をLPA抗体存在下・LPA非存在下で行った。22時間の刺激後、細胞を5分間(13,500 rpm)4°Cで遠心分離にかけ上清を収集した。Quantikine human CXCL8/IL-8キットを販売者の指示に従って使用し(R&Dシステムズ社、カタログ番号D8000C)、各上清のCXCL8/IL-8量を測定した。

10

20

【0422】

スクラッチアッセイにおける腫瘍細胞移動の測定

SKOV3細胞をウェル当たり15,000細胞で96ウェルプレートに播いた。翌日、細胞を最少培地(L-グルタミン、2.2 g/L重炭酸ナトリウム、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1 mg/ml BSAを含むように調整したマッコイ5a培地)で24時間血清不足にさせた。0時間の時点で細胞をp200ピペットチップで各ウェルの中央をスクラッチし、最少培地で洗浄し、処理する前に撮影した。その後、150 µg/mlの抗体存在下・150 µg/mlの抗体非存在下で1.0 µM LPAと37°Cで予めインキュベートした0.2 µM、1.0 µM、10 µMの濃度のLPA(C18:1)で細胞を処理した。陽性対照(10%FBS処理した細胞)と抗体単独も試験した。5%CO₂インキュベーターにおいて細胞を37°Cで17時間刺激した。17時間処理した後、再度撮影し、写真を同サイズに調節して0時間と17時間でのスクラッチの幅を定規で測ることによって傷の閉鎖率(%)を測定した。

30

【0423】

マトリゲルアッセイ

約8~10週齢のメスC57BL/6マウスおよびBD Biosciences((BDの)ニュージャージー州フランクリンレイクスより購入したマトリゲルマトリックス高濃度[Matrigel Matrix High Concentration]を、血管形成刺激として50 ng/ml VEGFおよび50 ng/ml bFGF、ヘパリン3 ng/mlと混合し、この研究に使った。マウス群は5つあり、0日目に10個のマトリゲルプラグを各群の5匹のマウスに接種した。一つのマウス群を対照とし、他の4つは異なった4つの用量でip注射による薬剤処理を1日おきに受けた。処理はすべて-1日目に開始し、8日目に終了した。

40

【0424】

適切な形状のマトリゲルプラグをマウス1匹当たり2つ使用して、25匹の健常マウスを得るために、マトリゲルプラグを30匹のC57bl/6マウスに移植した。0日目に、マウスの左右の横腹に40個のマトリゲルを500 µl皮下注射し、注射領域を剪毛した。注射したマトリゲルの皮下組織への接触領域を増加させて丸い形状のプラグを形成するために、通常の皮下刺入後、針先を左右往復させることにより広い皮下ポケットを形成した。注射は、中身の全部が1つのプラグとして供給されるように適切なサイズの針(2

50

1 G - 2 5 G) ですばやく行った。注射したマトリゲルはすぐに単一の固体のゲルプラグになった。

【 0 4 2 5 】

動物を、マトリゲルプラグの移植の1日前から8 mg / kg または2 mg / kg の抗体または食塩水で、あるいは媒体で処理した。処理は、i p により、q 2 d のスケジュールで行った。

1 2 日目に各群のプラグを収集した。マウスを安楽死させ、マウスの皮を引き下げてプラグを露出させた。切開してプラグを取り出し、組織学分析用に固定した。パラフィン包埋プラグの5 μ m 切片を抗 C D - 3 1 抗体で染色した。各マトリゲルプラグの断面領域における血管密度を分析した。各投与群について、少なくとも6個以上のマトリゲルプラグを定量的に分析し、微小血管密度に関して群間に統計的有意差があるかどうか評価した。

10

結果

L P A に対する高親和性、特異性、結合能を保持する抗体を産生する目的でマウス抗 L P A モノクローナル抗体 L T 3 0 0 0 の配列をヒト化した。

【 0 4 2 6 】

ヒト化変種の操作

L T 3 0 0 0 の V H および V L の K a b a t C D R を受容体ヒトフレームワークに移植することによってマウス抗 L P A 抗体をヒト化した。7つのヒト化変種を H E K 2 9 3 細胞において無血清条件下で一過性発現させ、精製した後、一連のアッセイによってキャラクタリゼーションを行った。各軽鎖および重鎖の配列を含むプラスミドを哺乳類細胞にトランスフェクションして産生した。培養5日間後に定量的 E L I S A を用いてモノクローナル抗体の力価を求めた。軽鎖と重鎖のすべての組み合わせで細胞培養 1 m l 当たり 2 ~ 1 2 μ g の抗体を得た。

20

【 0 4 2 7 】

ヒト化変種のキャラクタリゼーション

ヒト化抗 L P A モノクローナル抗体変種のいずれもがキメラ抗 L P A 抗体 (別名 L T 3 0 1 0) およびマウス抗体 L T 3 0 0 0 と同様の低ピコモル範囲の結合親和性を示した。ヒト化変種のいずれもが L T 3 0 0 0 と同様またはそれ以上の T_M を示した。特異性に関しては、ヒト化変種は L T 3 0 0 0 と同様の特異性プロファイルを示した。例えば、L T 3 0 0 0 は、リゾホスファチジルコリン (L P C) 、ホスファチジン酸 (P A) 、リゾホスファチジン酸の各種アイソフォーム (1 4 : 0 および 1 8 : 1 L P A 、環状ホスファチジン酸 (c P A)) 、ホスファチジルコリン (P C) に対して交差反応性を示さなかった。

30

【 0 4 2 8 】

ヒト化変種の活性

インビトロ細胞アッセイにより5つのヒト化変種をさらに評価した。L P A は、癌細胞からのインターロイキン8 (I L - 8) 放出の誘導において重要な役割を果たしていることが知られている。L T 3 0 0 0 は、卵巣癌細胞からの I L - 8 放出を濃度依存的に低下させた。L T 3 0 0 0 と比較して、ヒト化変種は同様な I L - 8 放出の低下を示した。

さらに、微小血管密度 (M V D) に対するそれらの効果について、ヒト化変種の一部を新血管形成用マトリゲルチューブ形成アッセイにおいて試験した。両方とも M V D 形成を低下させることが確認された。

40

【 0 4 2 9 】

表 3 6 : マトリゲルプラグにおいて C D 3 1 免疫染色と H & E 対比染色を用いた微小血管密度の定量化

【表 3 6】

	対照	LT3000 マウス (8 m g/kg)	LT3000 マウス (2 mg/kg)	ヒト化変種 第 1 号 (8mg/kg)	ヒト化変種 第 1 号 (2mg/kg)	ヒト化変種 第 2 号 (2mg/kg)
平均	64.2	41.5	34	34.4	49	50.8
S. E.	8.0	14.2	13.7	4.2	31.5	18.8
N=	5	4	5	5	5	6
抑制率 (%)		35.4	47.0	46.4	23.7	20.8

【 0 4 3 0 】

本開示によれば、本明細書において記載された、または請求された組成物および方法のすべてを、過度の実験を要することなく作成・実行することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施様態として記載したが、前記組成物および方法に変更を適用してもよいことは当業者には明らかであろう。当業者には明らかである、かかる同様の置き換えや変更はすべて、最後に追加する請求項に定義される本発明の趣旨および範囲に含まれるものとする。

10

本明細書において述べた特許、特許出願、文献のすべては、本発明に関連する当業者の技量を示すものである。優先権または他の利点が主張されるものも含め、特許、特許出願、文献のすべては、それぞれの文献を個々に、参照により援用されるべく指示されている場合と同じレベルで、本明細書で参照することにより援用されている。

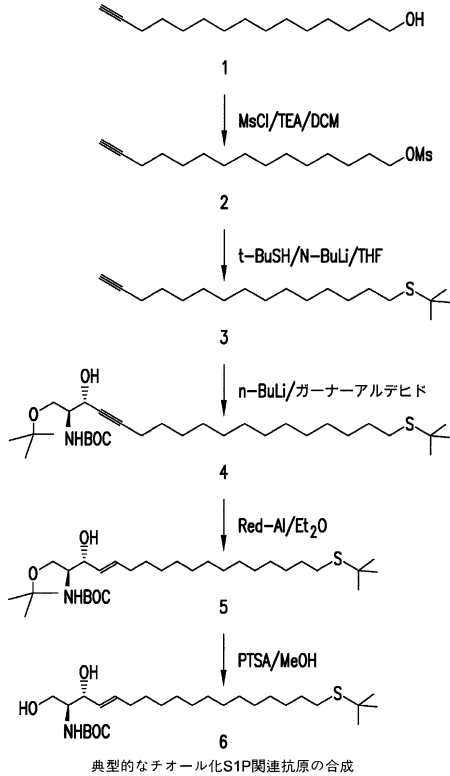
【 0 4 3 1 】

20

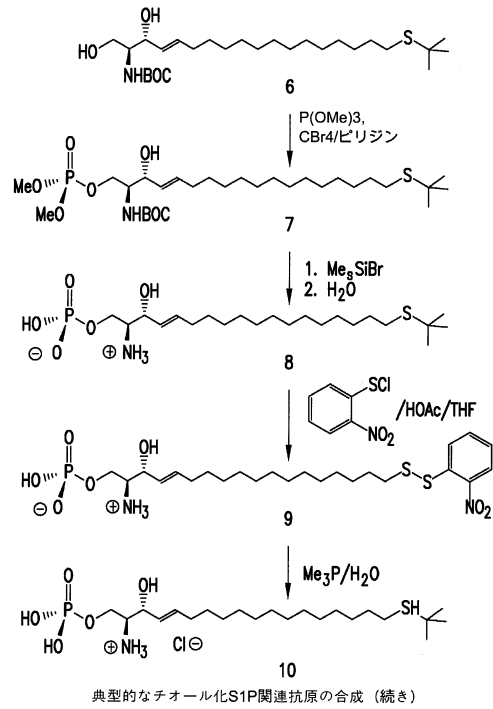
本明細書において例によって説明した本発明は、特に記載されていない限り、任意の要素（複数も可）なしで、実施してもよい。従って、例えば、本明細書における各例の、「を有する」、「から本質的になる」、「からなる」という用語のいずれも一つは、その他の2つの用語のいずれかで置き換えてもよい。用いられた用語および表現は、限定のためではなく、説明のための用語として用いられており、そのような用語および表現の使用には、提示され、説明された特徴と同等のものも、またはその一部を除外する意図はなく、むしろ請求する本発明の範囲内で多様な変更が可能であることを認識されたい。従って、本発明は好ましい実施様態および選択的な特徴によって具体的に説明したが、当業者が本明細書に記載の概念の変更および変形を行ってもよいこと、そのような変更や変形が、最後に追加する請求項に定義されるがごとく、本発明の範囲に含まれるとすることを理解されたい。

30

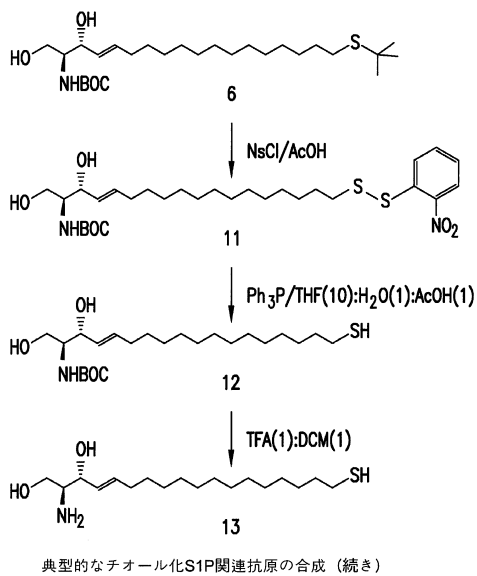
【 図 1 a 】



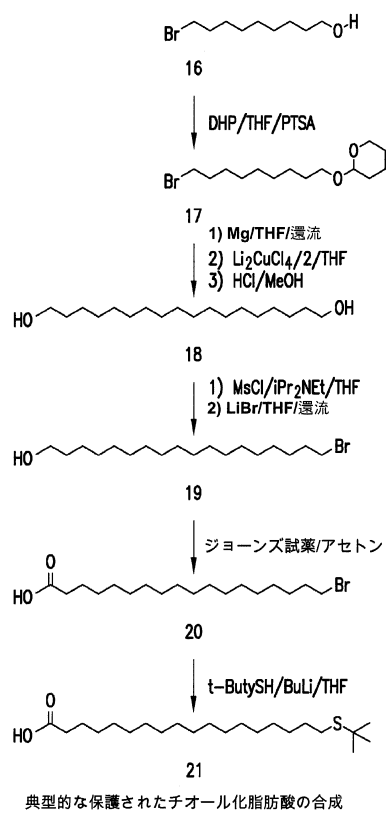
【 図 1 b 】



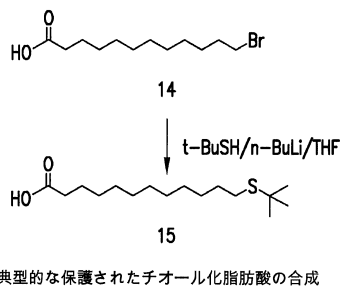
【 図 1 c 】



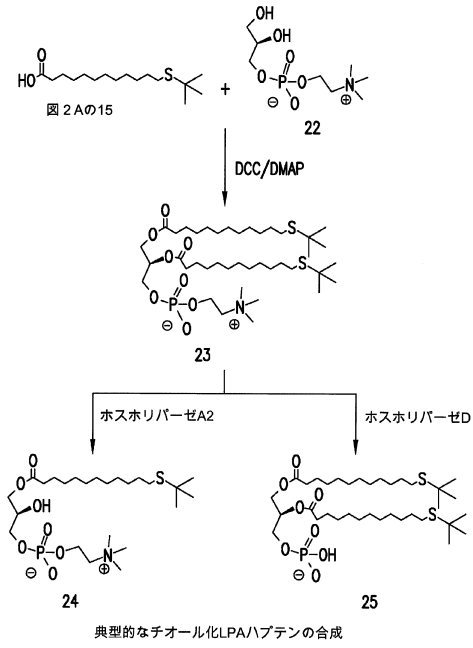
【 図 2 b 】



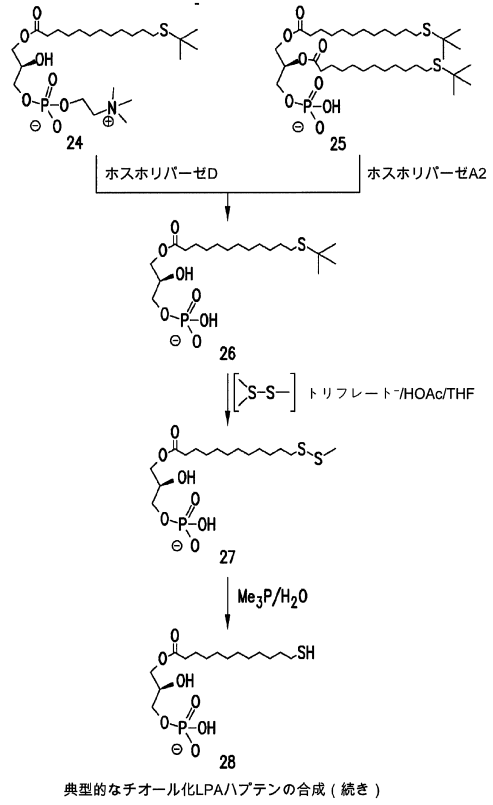
【 図 2 a 】



【図3a】



【図3b】



【配列表】

0005989299000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/04
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P 25/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/04
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P 29/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/02
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
C 0 7 K 16/44	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/44
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
G 0 1 N 33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 N
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 S
G 0 1 N 33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/531 A
		G 0 1 N	33/543 5 4 5 A
		G 0 1 N	33/577 B

- (72)発明者 ガーランド, ウィリアム, エー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 6 7 2, サン クレメンテ, ヴィア コリブリ 3 1 0
- (72)発明者 ハンセン, ジュヌビエーブ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 2 7, サンディエゴ, サン アントニオ ローズ コ
ート 1 7 0 5 0
- (72)発明者 スワニー, ジェームズ, スティーブン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 0 0 9, カールズバッド, カミノ リメロ 3 0 6 9

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 長井 啓子
審判官 松田 芳子

- (56)参考文献 特表2003-530081(JP, A)
国際公開第2007/053447(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

UniProt/GeneSeq
PubMed

专利名称(译)	用于溶血磷脂酸结合的组合物和方法		
公开(公告)号	JP5989299B2	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	JP2010510480	申请日	2008-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	LPATH公司		
申请(专利权)人(译)	Erupasu公司		
当前申请(专利权)人(译)	Erupasu公司		
[标]发明人	サバディーニロジャーエー ガーランドウィリアムエー ハンセンジュヌビエーブ スワニージェームズステイーブン		
发明人	サバディーニ,ロジャー,エー. ガーランド,ウィリアム,エー. ハンセン,ジュヌビエーブ スワニー,ジェームズ,ステイーブン		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/02 A61P35/00 A61P37/00 A61P37 /06 A61P43/00 C07K16/44 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33 /531 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/16 A61P3/04 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P25 /00 A61P25/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/02 A61P35/00 C07K16/3076 C07K16/44 C07K2317/24 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/54386 G01N33/577 G01N33/92 G01N2405/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/02 A61P35 /00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00.105 C07K16/44 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53.N G01N33/53.S G01N33/531.A G01N33/543.545.A G01N33/577.B		
优先权	60/940964 2007-05-30 US		
其他公开文献	JP2010530218A JP2010530218A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

例如，描述了用于制备和使用抗LPA剂如单克隆抗体的组合物和方法。

