

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-506555  
(P2012-506555A)

(43) 公表日 平成24年3月15日(2012.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	2 G O 4 5
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 C O 8 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 H O 4 5
CO 7 K 16/42 (2006.01)	CO 7 K 16/42	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-532726 (P2011-532726)  
 (86) (22) 出願日 平成21年10月26日 (2009.10.26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年6月27日 (2011.6.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2009/051441  
 (87) 国際公開番号 W02010/046716  
 (87) 国際公開日 平成22年4月29日 (2010.4.29)  
 (31) 優先権主張番号 0819634.7  
 (32) 優先日 平成20年10月25日 (2008.10.25)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 503361318  
 イシス イノベーション リミテッド  
 イギリス国、オーエックス2・7エスジー  
 、オックスフォード、サマータウン、エワ  
 ート・ブレイス、エワート・ハウス (番  
 地なし)  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊  
 (74) 代理人 100091351  
 弁理士 河野 哲  
 (74) 代理人 100088683  
 弁理士 中村 誠  
 (74) 代理人 100109830  
 弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経学的な自己免疫性障害

(57) 【要約】

本発明は、哺乳類における自己免疫性の神経学的な障害を診断する方法であって、哺乳類からの体液サンプルにおいて、少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質のエピトープに対する自己抗体を検出する工程を含む方法;および関連する方法, アッセイのキット, 単離または精製された自己抗体または抗体断片, 又はその使用に関する。

All patients	Lgi1	CASPR2	TA3-1	Accessory protein not yet identified
Total number	39	27	4	38
Thyroid malignancies	0	10	0	1
Limbic encephalitis or epilepsy	38	7	1	21
Morvan's syndrome	2	10	0	0
Neuromyotonia	0	8	3	14
Other syndrome	1	2	0	3
VGKC-Ab negative	0	0	1	7

\*The majority were not currently-active

Figure 14

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳類における自己免疫性の神経学的な障害を診断する方法であって、哺乳類からの体液サンプルにおいて、少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質のエピトープに対する自己抗体を検出する工程を含む方法。

**【請求項 2】**

請求項1に記載の方法であって、a) 前記体液を少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質又はその抗原決定基と接触させることと; b) 少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質又はその抗原決定基および前記体液に存在する抗体の間で形成された任意の抗体-抗原複合体を検出することと、を含み、前記複合体の存在は、自己免疫性の神経学的な障害の指標である方法。

10

**【請求項 3】**

請求項1または2に記載の方法であって、さらに哺乳類の臨床症状を評価することを含む方法。

**【請求項 4】**

哺乳類における自己免疫性の神経学的な障害を診断するためのアッセイのキットであって、少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質の少なくとも一つのエピトープおよび前記キットを使用するための説明書を含むキット。

**【請求項 5】**

請求項 4に記載のキットであって、さらにキャリブレーション曲線を作成するための標準液を含むキット。

20

**【請求項 6】**

少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質のエピトープに特異的な単離又は精製された自己抗体または抗体断片。

**【請求項 7】**

抗-Kv1-複合体タンパク質自己抗体に特異的な単離又は精製された抗体または抗体断片。

**【請求項 8】**

請求項 7に記載の抗体または抗体断片であって、さらにタグまたは標識を含む抗体または抗体断片。

30

**【請求項 9】**

前記抗体が抗-IgG抗体である、請求項 7または請求項 8に記載の抗体または抗体断片。

**【請求項 10】**

神経学的な障害の治療のための医薬の調製における請求項7~9の何れか一項に記載の抗体の使用。

**【請求項 11】**

請求項4または5に記載のキットであって、さらに請求項 7, 8または9の抗体または抗体断片を含むキット。

**【請求項 12】**

神経学的な障害を患っている患者を治療する方法であって、前記患者に効果的な量の請求項 7, 8または9に記載の抗体または抗体断片または少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質又はそのエピトープを投与することを含む方法。

40

**【請求項 13】**

神経学的な障害を緩和する又は治療する能力のある化合物を同定する方法であって、候補化合物を少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質又はそのエピトープおよび少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質に結合する能力のある抗体の存在下で接触させる工程を含み、前記抗体の少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質又はそのエピトープへの結合を阻止する化合物は神経学的な障害を治療するための候補である方法。

**【請求項 14】**

上記の請求項の何れか一項に記載の方法, キット, 単離または精製された自己抗体また

50

は抗体断片,または使用であって、前記自己免疫性の神経学的な障害は辺縁系脳炎, モルヴァン症候群, 神経ミオトニーおよび関連する障害を含んでいる群から選択される方法, キット, 単離または精製された自己抗体または抗体断片,または使用。

【請求項15】

上記の請求項の何れか一項に記載の方法, キット, 単離または精製された自己抗体または抗体断片,または使用であって、前記体液は、血漿, 血清, 全血, 尿, 汗, リンパ, 糞便, 脳脊髄液および乳頭吸引物を含んでいる群から選択される方法, キット, 単離または精製された自己抗体または抗体断片,または使用。

【請求項16】

前記哺乳類はヒトである、上記の請求項の何れか一項に記載の方法, キット, 単離または精製された自己抗体または抗体断片,または使用。

10

【請求項17】

前記Kv1-複合体タンパク質は少なくとも一つの Kv1, CASPR2, Lgi1 および TAG1を含む、請求項1~3 および12~16の何れか一項に記載の方法, 請求項4~5 および 11の何れか一項に記載のアッセイのキット,または請求項6~9の何れか一項に記載の単離または精製された自己抗体または抗体断片,または請求項10に記載の使用。

【請求項18】

前記Kv1-複合体タンパク質は少なくとも一つの CASPR2, Lgi1 および TAG1を含む、請求項17に記載の方法, アッセイのキット, 単離または精製された自己抗体または抗体断片,または使用。

20

【発明の詳細な説明】

【発明の説明】

【0001】

本発明は、自己免疫性障害に関する、また特に哺乳類における係る障害を診断する方法に関する。また、本発明により提供される事項は、係る診断に使用するキット, および自己抗体を検出するための方法および組成物である。

【0002】

電位開口型のカリウムチャンネル (VGKC) 抗体は、三つの主な臨床の症候群: 神経ミオトニー (NMT), モルヴァン症候群 (MoS) および 辺縁系脳炎 (LE: limbic encephalitis) と関連する。NMTは、筋痙攣および硬直, および時々疼痛を生じる末梢神経過剰興奮性症候群 (peripheral nerve hyperexcitability syndromes) を記載する。MoSは、NMTに加えて自律神経性の特性、一例を挙げると多汗, 便秘, 心臓の不規則性, および中枢神経系の特性, 特に錯乱 (confusion), 幻覚 (hallucinations) および不眠を記載する。抗-VGKC 抗体と関連するLEは、健忘症の中枢神経系 (CNS)-限定の特性, 人格または精神医学的な障害, および発作 (癲癇) を含む。これらのコンディション (特に、MoS) は、胸腺または他の腫瘍 (肺癌, リンパ腫, 婦人科の悪性疾患) と関連する可能性があるが、抗-VGKC 抗体関連性のLEは主に非-腫瘍随伴性 (non-paraneoplastic) である。全ての三つの症候群は、亜急性に発病し、免疫療法応答性である可能性がある。加えて、他の臨床の症候群 (例えば、特発性の癲癇) を呈している幾つかの患者においてこれらの抗体が認知される。大抵の患者は、これまで成人で認められたが、数例はこれらの抗体をともなう小児であり、LEまたは癲癇と診断されている。既にインビボでNMTで示されたとおり [1]、多くの証拠は LE および MoSの免疫グロブリン G (IgG) の病原性への関与を支持している。第一に、患者は、たびたび血漿交換後に迅速な臨床上の回復を経験する [2,3]。第二に、個々の患者の抗体価は、臨床状態の変化と相関する [2,3]。第三に、患者 IgGは、海馬 (ほとんど全てのCNSの臨床特性を限局化しえる解剖学的な領域) に結合する [2-4]。抗-VGKC 抗体 および CNS 特性をともなう凡そ500の患者は、UKにおいて最近5年で診断された (A Vincent, 未発表の観察)。

30

40

【0003】

ヨウ素標識アルファ-デンドロトキシン ( $1^{125}$ -DTX)-標識したジギトニン可溶性哺乳類脳ホモジネートを免疫沈降する患者血清は、抗-VGKC 抗体を含んでいることが示された

50

[5,6]。電位型カリウムチャンネルは、Kv1 (Shaker) サブタイプを含む幾つかの構造的に異なるファミリーのチャンネルからなる。Kv1 アルファ サブユニットは、排他的に他の Kv1 サブユニットとホモまたはヘテロ四量体化して活性なチャンネルを形成しえる。

DTXはKv1.1, 1.2 および 1.6と結合する、これらKvは脳組織に全て存在し、Kv1.1 および 1.2は末梢神経に見つられる。これらの 3 サブユニットは、Kv1.4により及びKv 1, 2 および 3により変更された機能および表面発現を有することができる、Kv 2は脳組織において最も多く存在するKv メンバーである。

#### 【0004】

LE および MoSを有する患者は、一般にNMT患者よりも高い抗-VGKC抗体価を有する。NMT 抗-VGKC 抗体の抗原性の標的および機能的な効果は、以前に詳細に研究された。NMT IgG は、発現したKv1sと結合することが示されており、Kv1 電流をダウンレギュレートする[5-7]。しかし、LEまたはMoSの抗-VGKC 抗体を検査した研究は、僅か一例のみ存在する[8]

10

#### 【0005】

最近、幾つかの新規のKv1-相互作用タンパク質が記載された[9, 10]。本発明は、Kv1-複合体タンパク質〔例えば、三つのKv1-複合体タンパク質CASPR2 (contactin associated protein 2), Lgi1 (leucine-rich glioma inactivated gene 1), TAG1 (transient axonal glycoprotein-1, contactin 2としても知られる) (必ずしもKv1タンパク質自身であるとは限らない)〕がLE および MoSを有する幾つかの患者の自己抗体の標的であることを示している。

20

#### 【0006】

第一の側面によると、本発明は、哺乳類における自己免疫性の神経学的な障害を診断する方法を提供し、該方法は哺乳類の体液サンプルにおいて、少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質のエピトープに対する自己抗体を検出する工程を含む。

#### 【0007】

少なくとも一つの Kv1-複合体タンパク質は、Kv1-複合体の他のタンパク質と複合体化/結合しえる。或いは、少なくとも一つの Kv1-タンパク質は、Kv1-複合体の分離体 (例えば、共局在しない、複合体と物理的に結合しない) であってもよい。自己抗体は、複合型/結合状態にないときでさえ、通常の複合型/結合タンパク質と結合しえる。

30

#### 【0008】

Kv1-複合体タンパク質は、Kv1に必須または非必須のアクセサリタンパク質であってもよい。Kv1-複合体タンパク質は、少なくとも一つのKv1, CASPR2, Lgi1 および TAG1を含んでもよい。Kv1-複合体タンパク質は、少なくとも一つのCASPR2, Lgi1 および TAG1を含んでもよい。一態様において、Kv1-複合体タンパク質は、Kv1を含まなくてもよい。

#### 【0009】

CASPR2, Lgi1 および TAG1は、Kv1と相互作用する又は物理的に連結することが示されたタンパク質である。例えば、CASPR2 および Tag1は、Kv1 タンパク質がランビエ絞輪に局在するため必要である。

#### 【0010】

Kv1-複合体タンパク質は、CASPR2を含む又はそれから本質的になっていてもよい。Kv1-複合体タンパク質は、Lgi1を含む又はそれから本質的になっていてもよい。Kv1-複合体タンパク質は、TAG1を含む又はそれから本質的になっていてもよい。Kv1-複合体タンパク質は、CASPR2, Tag1, Lgi1, および Kv1以外のKv1-複合体のタンパク質を含む又はそれから本質的になっていてもよい。

40

#### 【0011】

好ましくは自己免疫性の神経学的な障害は、辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、神経ミオトニー又は関連するコンディションである。好ましくは前記神経学的な障害は、辺縁系脳炎またはモルヴァン症候群、又は神経ミオトニーである。神経学的な障害が辺縁系脳炎である場合、神経学的な障害の優性な特性は、発作、例えば、てんかん、又は健忘症又は精神医学的な障害単独を含みえる。

50

## 【0012】

自己免疫性の神経学的な障害がモルヴァン症候群および/または神経ミオトニーである場合、Kv1-複合体タンパク質はCASPR2を含みえる。CASPR2に対する自己抗体は、胸腺の悪性疾患(thymic malignancies)および/または他の悪性疾患のリスクの増加を示す又はリスクの増加と関連する可能性がある。

## 【0013】

自己免疫性の神経学的な障害が辺縁系脳炎または優勢的(predominantly)に癲癇である場合、Kv1-複合体タンパク質はLgi1を含みえる。

## 【0014】

自己免疫性の神経学的な障害が神経ミオトニーおよび/または辺縁系脳炎および/または癲癇である場合、Kv1-複合体タンパク質はTAG1を含みえる。

10

## 【0015】

自己免疫性の神経学的な障害が\_\_\_\_\_である場合、Kv1-複合体タンパク質はCASPR2 および TAG1を含みえる。

## 【0016】

好ましくは、本発明の方法は、さらに以下の工程：

a) 体液をKv1-複合体タンパク質又はその抗原決定基と接触させることと；

b) Kv1-複合体タンパク質又はその抗原決定基および体液に存在する抗体の間で形成された任意の抗体-抗原複合体を検出することと、を含み、

前記複合体の存在は、自己免疫性の神経学的な障害、好ましくは辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、神経ミオトニー又は関連するコンディションの指標(indicative)である。

20

## 【0017】

好ましくは、本発明の方法は、臨床症状の評価と組み合わせて行われる。本発明の方法及び臨床症状の分析の組み合わせを使用して個体が有する特定の神経学的な障害を決定しえる。

## 【0018】

自己抗体は、当該技術において周知の免疫学的なアッセイ技術により検出しえる。適切な技術の例には、ELISA、ラジオイムノアッセイ、競合アッセイ、阻害アッセイ、サンドイッチアッセイなどが含まれる。一般的に言えば、係るアッセイは抗原を使用し、抗原は固体の支持体に固定化されてもよい。試験されるサンプルは、抗原と接触させられる。また、抗原に特異的な自己抗体がサンプルに存在する場合、それらは免疫学的に抗原と反応して自己抗体-抗原複合体を形成し、これを次に検出又は定量的に測定しえる。代わりに、抗原は、細胞の表面に又は透過化した細胞内に発現できる[16]。自己抗体-抗原複合体の検出は、それぞれ全てのヒト IgGsまたはIgMsに共通の一般的な特性を認識する二次的な抗-ヒト免疫グロブリン抗体(典型的には、抗-IgGまたは抗-ヒトIgM)を用いて実施してもよい。通常、二次抗体は、酵素〔例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)〕に結合されて、自己抗体/抗原/二次抗体の複合体の検出が酵素基質の付加および引き続く酵素反応産物の比色定量、化学発光または蛍光検出により達成される、または蛍光シグナルと結合されえる[16]。好ましくは、前記方法は、タグをつけた又は標識した抗-IgG抗体である二次抗体を使用する。好ましくは抗-IgG抗体は、レポーター分子で標識される。レポーター分子は、重金属、蛍光または発光性の分子、放射性のタグ又は酵素タグによるものであってもよい。酵素タグは、HRPであってもよい。

30

40

## 【0019】

好ましくは、抗-IgG抗体からのシグナルの強度は、ポジティブコントロールまたはネガティブコントロールと比較した際に体液におけるKv1-複合体タンパク質自己抗体の相対的な量の指標である。

## 【0020】

更なる側面によると、本発明は、少なくとも一つのKv1-複合体タンパク質の少なくとも一つのエピトープを含む哺乳類における自己免疫性の神経学的な障害を診断するアッセイのキットを提供する。

50

## 【0021】

更なる側面によると、本発明は、少なくとも一つの Kv1-複合体 タンパク質の少なくとも一つのエピトープを含む哺乳類における自己免疫性の神経学的な障害のリスクの増加を検出するアッセイのキットを提供する。

## 【0022】

好ましくは、キットは、キットを使用するための説明書を含む。好ましくは、キットは、少なくとも一つの Kv1-複合体タンパク質の少なくとも一つのエピトープを哺乳類からの体液サンプルと接触させるための手段も含む。好ましくは神経学的な障害は、辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、神経ミオトニー又は関連するコンディションである。

## 【0023】

関連するコンディションは、重い発作のない健忘症、重い健忘症のない癲癇および/または重い健忘症のない人格/精神医学的な障害および/または胸腺の悪性疾患を含みえる。

## 【0024】

本発明のキットは、さらにキャリブレーション曲線を作成するための規準液を含みえる。

## 【0025】

別の側面によると、本発明は、少なくとも一つの Kv1-複合体タンパク質のエピトープに特異的な単離又は精製された自己抗体を提供する。係る抗体は、体液サンプル (bodily fluid sample) から単離されてもよい。

## 【0026】

なお別の側面によると、本発明は、少なくとも一つの Kv1-複合体 タンパク質 自己抗体に特異的な単離又は精製された抗体または抗体断片を提供する。係る抗体は、神経学的な障害および/または関連するコンディションの治療のための医薬として又は医薬の調製に使用しえる。好ましくは前記神経学的な障害は、辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、又は神経ミオトニーである。係る抗体は、薬学的組成物に薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤と共に含まれてもよい。関連するコンディションは、重い発作のない健忘症、重い健忘症のない癲癇および/または重い健忘症のない人格/精神医学的な障害および/または胸腺の悪性疾患を含みえる。

## 【0027】

モノクローナルまたはポリクローナル 抗体または抗体断片は、当業者に周知の技術を用いて調製されえる。

## 【0028】

また、Kv1-複合体 タンパク質自己抗体に特異的な抗体は、神経学的な障害 (例えば、辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、神経ミオトニー、または関連するコンディション) を検出するため又は係るコンディション又は胸腺の悪性疾患のリスクの増加を決定するための診断キットに使用しえる。

## 【0029】

本発明の任意の側面において使用する体液は、血漿、血清、全血 (whole blood)、尿、汗、リンパ、糞便、脳脊髄液、又は乳頭吸引物 (nipple aspirate) を含みえる。好ましくは、体液は、血清または血漿である。

## 【0030】

更なる側面によると、本発明は、神経学的な障害 (例えば、辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、または関連するコンディション) を患っている患者を治療する方法を提供し、該方法は前記患者に効果的な量の本発明の抗体又は少なくとも一つの Kv1-複合体タンパク質又はそのエピトープを投与することを含む。

## 【0031】

なお更なる側面によると、本発明は、神経学的な障害 (例えば、辺縁系脳炎、モルヴァン症候群、または関連するコンディション) を緩和 (alleviating) する又は治療する能力のある化合物を同定する方法を提供し、該方法は候補化合物を少なくとも一つの Kv1-

10

20

30

40

50

複合体 タンパク質又はそのエピトープおよび少なくとも一つの Kv1-複合体タンパク質に結合する能力のある抗体の存在下で接触させる工程を含み、前記抗体の少なくとも一つの Kv1-複合体 タンパク質又はそのエピトープへの結合を阻止する化合物は神経学的な障害を治療するための候補である。

【0032】

当業者は、上記で議論した任意の好ましい特性が本発明の任意の側面に適用できることを認識するだろう。

【0033】

本発明の好適な態様を以下に説明する図面および例を参照して単なる例示として記載する。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】LEまたはMoS 血清は、ウサギ皮質抽出物からKv1sを沈降させるが、直接的にKv1sと結合しない。

【0035】

A. LEおよびMoS血清のタイトレーションによって、可溶化したウサギ皮質ホモジネート中で高いレベルの $^{125}$ I-DTX-標識Kv1sが沈降する。

【0036】

B. 細胞内エピトープと結合する抗-Kv1.1, 1.2 および 1.6 抗体 (1:500)は、透過化したKv1.1, 1.2 または1.6のトランスフェクト細胞に結合する。抗-ウサギ IgG (1:750; 568nm)で視覚化した。抗-Kv1抗体の良好な特異性が観察された。

【0037】

C. HEK 細胞はKv1.sおよび増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) (488nm)でコトランスフェクションされた。Kv1.1-EGFP共発現HEK 細胞に適用されたLE (n=15) および MoS (n=6) 血清 (1:20)は、抗-ヒト IgG Alexa 蛍光 (568nm)を用いて表面への結合が検出されなかった。1.1, 1.2, 1.4, 1.6 および 2を含むKv1 サブユニットの組み合わせのコトランスフェクション後に結合は認められなかった。しかしながら、Kv1.1の細胞外エピトープに対する抗体(1:100)は、Kv1.1 トランスフェクト細胞に結合した。

【図2】機能的な DTX-感受性 Kv1電流は、LE および MoS IgGの短期の適用 (acute application)により影響されなかった。

【0038】

A. Kv1.1でトランスフェクトされたHEK-293 細胞は、DTX-感受性の電流を示す。

【0039】

B. 同様に、Kv1.6でトランスフェクトされたHEK-293 細胞は、大きい振幅 (large amplitude) の DTX-感受性電流をしめした; これらの電流は、Kv1.1-媒介性電流よりも有意に大きい振幅の電流であった。

【0040】

C および D. Kv1.1 (C) および Kv1.6 (D) 電流は、コントロール又は患者の血清の短期の適用により影響されない。

【図3】 DTX-感受性のKv1電流は、Le および MoS IgGの長期の適用 (chronic application)により影響されない。

【0041】

A および B: DTX-感受性 Kv1.1 (A) および Kv1.6 (B) 媒介性の電流は、患者の血清との1日のインキュベーションに続いて有意に低下しなかった(p>0.05, 一元配置 ANOVA)。

【0042】

C および D: 同様に、Kv1.1 (C)又はKv1.6 (D) 媒介性の電流における有意な減少は、患者血清との3-日のインキュベーション後に観察されなかった(p>0.05, 一元配置 ANOVA)。

【図4】患者の血清と抗-Kv1sは異なる量の $^{125}$ I-DTX-標識 Kv1sをウサギ皮質抽出物から沈降させ、患者の血清は $^{125}$ I-DTX-標識 Kv1sをトランスフェクト細胞抽出物から沈降

10

20

30

40

50

させなかった。

【0043】

A. 各アッセイ(n=3 実験)において抽出されたウサギ皮質からの50,000 cpmの $I^{125}$ - DTX-標識 Kv1sでの複数の抗-Kv1の市販抗体, LE (n=5) および MoS (n=3) 血清のタイトレーション。健常コントロールの値を差し引いて比較データ (specific data) をつくった。

【0044】

B. 一部位結合の双曲線で予測された図 4Aの各抗-血清により沈降した $I^{125}$ - DTX 結合部位の最大数(GraphPad Prism V5)。

【0045】

C. トランスフェクト細胞から抽出された $I^{125}$ - DTX-標識 Kv1.1/1.2/1.4/1.6/ 2はLE またはMoS 血清 (5ul)により沈降されなかったが、抗-Kv1 抗体 (5ul; n=5 実験)により沈降された。健常コントロールの血清または無関係の抗-ウサギ抗体を用いて非特異的な結合が減じられた。

10

【図5】LE および MoS血清結合部位は、 $I^{125}$ - DTX-複合体から解離する。CASPR2 抗体は、脳抽出物から $I^{125}$ - DTXを免疫共沈降し、LE/MoS 血清と同様に解離する。

【0046】

A.  $I^{125}$ - DTX-標識, ジギトニン-可溶化ウサギ皮質複合体と結合するLE(n=5) および MoS (n=3) IgGは、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)に抗-Kv1.1/1.2 IgGの結合よりも大きい感受性を示した(全て8血清の組み合わせの結果)。

【0047】

B. 抗-CASPR2 抗体は、標識した脳ホモジネートからトータルの $I^{125}$ - DTX 結合部位の20%を沈降させ、LE および MoS 血清で認められた結果と類似していた(図 4a)。加えて、抗-Lgi1抗体はトータルの $I^{125}$ - DTX 結合部位の>60%を沈降させ、また抗-TAG1抗体はトータルの $I^{125}$ - DTX 結合部位の<10%を沈降させた。このようにトータルの $I^{125}$ - DTX 結合部位の高い比率がLgi1と複合体化し、小さい比率がTAG1と複合体化する。

20

【0048】

C. Aで示された実験と類似する実験において、CASPR2抗体(2 実験の平均)の及びLgi1 抗体(3 実験の平均)の解離パターンは、抗-Kv1.1/1.2 IgG 結合と比べてLE 患者のIgG (n=5)のものと同様である。

【図6】幾つかのLE/MoS 血清は、直接的にCASPR2の細胞外ドメインと結合する。溶液における結合は高度に特異的であり、これらのタイターは $I^{125}$ - DTX免疫沈降のタイターと相関する。

30

【0049】

A. LE および MoS血清(1:100)は、発現したCASPR2の細胞外ドメインと結合する(x1000 拡大率)。

【0050】

B. CASPR2-EGFP抽出物の100fU (蛍光単位)を、5ulの患者血清とインキュベーションし、免疫沈降した。 $I^{125}$ - DTX-標識した脳ホモジネートを免疫沈降することが知られている188の血清のうち、32 (18%)がCASPR2-EGFPも沈降させた。 $I^{125}$ - DTX-結合部位を沈降させなかった他の神経疾患を有する患者からの血清は、CASPR2-GFP 蛍光免疫沈降アッセイ (FIPA)を用いて陽性ではなかった。これらの疾患には脳症(EN), 胸腺腫, 多発性硬化症 (MS), 自律神経性の疾患(ANS) および健常コントロール(HC)が含まれる。これらの血清は、MuSK-EGFPの細胞外ドメインを沈降または結合しない(図 6a, 下部パネル)。

40

【0051】

C. 抗-CASPR2 FIPAのタイターは、 $I^{125}$ - DTX脳ホモジネート免疫沈降のタイターと直線的に相関する (Spearmanの相関係数  $r^2=0.89$ ,  $P<0.0001$ )。

【0052】

D. CASPR2の細胞外ドメインに対する抗-CASPR2陽性の血清の免疫吸着によって、 $I^{125}$ - DTX-脳抽出物からの沈降が未然に防がれる\*。

【0053】

50

しかしながら、Kv1.1-1.2-1.6 発現HEK細胞の細胞外ドメインに対する吸着は、I<sup>125</sup>- DT X-脳抽出物の沈降物を除去しない。

【図7】CASPR2 抗体は、IgG1 および IgG4 サブクラスであり、高親和性である。それらは直線化したCASPR2にウエスタンブロットで結合しない。

【0054】

A. 既にCASPR2-GFP 発現HEK 細胞に結合した抗-CASPR2 抗体に結合するサブクラス特異的な抗-IgGs二次抗体によって、抗-CASPR2抗体サブクラスの相対量の定量が可能である。

【0055】

B. 抗体親和性のスキッチャード分析は、CASPR2-GFP抽出物を非-飽和容量の患者血清(n=5)とタイトレーションすることにより計算された。1.2 x10<sup>-8</sup>MのKd値(± 標準偏差 0.54 x10<sup>-8</sup>M)が得られた。

10

【0056】

C. CASPR2は180KDaの分子量を有する。マウス 抗-CASPR2 抗体は、CASPR2 抽出物中の180kDa のバンドを検出するが(+, 囲み)、Kv1.1/1.2/1.6 抽出物では検出しない(\*)。試験済みの抗-CASPR2 陽性血清は、CASPR2 抽出物 (+)においてウエスタンブロットで一致するバンドと結合しない。

【図8】血清 IgGのTAG1トランスフェクトHEK細胞への結合。

【0057】

A. TAG1 トランスフェクト細胞に結合する市販の抗体によって、TAG1が細胞表面で発現されることが示された。

20

【0058】

B. TAG1-HEK (EGFP 陽性) 細胞の表面に結合するNMTの患者血清IgGの例。臨床診断が確認された患者から試験された108 血清のうち、僅か4つが明らかにTAG1に結合した。これらのうち三つは、神経ミオトニーの患者からのものであった。

【0059】

C. コントロール血清(n=40)は、結合しなかった。

【図9】血清 IgGのLgi1トランスフェクトHEK細胞への結合。

【0060】

A. Lgi1-HEK 細胞に結合する血清IgGの二つの例。試験された108 血清のうち、39はLgi1-トランスフェクト細胞に結合した。コントロール血清(他の疾患, 健常個体)は、結合しなかった(n=70)。

30

【0061】

B. しかしながら、結合はEGFPコトランスフェクトHEK細胞に独占的なものではなく、(以前の報告[24, 25]のとおり)Lgi1が培地に分泌され、その幾つかがトランスフェクトされた(EGFP 陽性, 緑色) および トランスフェクトされなかった(EGFP陰性, 非緑色) HEK細胞の双方の表面に結合することを示唆している。

【図10】Lgi1 反応性の血清 IgGのトランスフェクトされなかったHEK 細胞への結合。

【0062】

A - Lgi1 培地, Lgi1-トランスフェクト HEK 細胞からの上清で1 時間インキュベーションしたトランスフェクトされなかった HEK 細胞は、前にLgi1に結合すると同定された患者血清 IgGにより結合された(図9)。

40

【0063】

B - MUSK 培地, MUSK-トランスフェクト HEK 細胞上清からの上清で1 時間インキュベーションしたトランスフェクトされなかった HEK 細胞は、これらの 患者のIgGにより結合されなかった。

【図11】ルーチンの臨床検査のVGKC抗体タイターが異なるVGKC Kv1-複合体タンパク質に対する抗体を有する患者において示される。コントロール血清は、<100 pM(ライン)を沈降させる。

【図12】患者におけるVGKC 抗体タイターは、参照する神経学者により提出された質問表から決定された異なる臨床表現型に分けられた。

50

【図 1 3】研究された108 患者のサンプルの臨床特性を示している表。

【図 1 4】抗体の特異性により分類された患者の臨床特性を示している表。Lgi1 抗体を有する36/39 患者は辺縁系脳炎を有し、神経ミオトニーを有する患者はいない、また胸腺の悪性疾患を有する患者もいない。対照的に、CASPR2 抗体を有する10/27 患者はモルヴァン症候群を有し、8患者は神経ミオトニーを有し、10患者は胸腺の悪性疾患を有する。以上のとおり、これらの二つの別個の抗体の認識によって、「VGKC」抗体と関連する臨床上の不均一性の多くの部分が説明される。

【0064】

結果

LE/MoS血清は、 $^{125}\text{I}$ - DTX -VGKCsをウサギ皮質抽出物から免疫沈降するが、VGKC Kv1.1 および 1.6の電流を阻害しない。

10

【0065】

LE/MoS 血清は、本研究に使用された8 血清 (5 LE および 3 MoS)で示されたとおり、 $^{125}\text{I}$ - DTX -標識 VGKCsをウサギ又はヒトの皮質のジギトニン抽出物から免疫沈降する能力により同定される(図 1a)。抗体のタイターは、これらのプロットから決定され、2006 および 6412 pM (正常な 範囲 <100pM)の間で変動した。抗体が個々のVGKCsに結合するかどうかを決定するため、我々はHEK 細胞に個々のKv1.1, 1.2 および 1.6 サブユニットを発現させた。我々は、ウサギ 抗-Kv1 抗血清での間接的な免疫細胞化学を用いて適切なサブユニットの発現が存在することを確認した。これらのウサギ抗体は細胞内エピトープと結合するので、我々は細胞を透過化した。抗体は、抗体の適切なKv1サブタイプに特異性を示した(図 1b)。加えて、細胞は、Kv1.1 の細胞外免疫染色(図 1c)により、また未透過化細胞における $^{125}\text{I}$ - DTX 結合部位の測定により示されたとおり、幾つかのKv1サブユニットを細胞の表面に発現した。しかし、残念なことに我々が試験した21のLE/MoS 血清の何れも同様な検出可能な表面結合を示さなかった(図 1c)。

20

【0066】

血清は依然としてKv1sの機能又は発現に影響するだろう可能性があった。トランスフェクトされた HEK 細胞は、DTXにより阻害された電位依存性の電流を示した(図 2a,b)。我々は、Kv1.1または1.6を発現しているHEK 細胞を血清中(1:50-1:1000に希釈)でインキュベーションし、血清適用の前後で電流を比較した(図 2c,d)。健常な血清は、培地単独と比較してKv1電流を変化させなかった。記録された平均電流にある程度の変動性が存在したにもかかわらず、全体的には健常コントロール血清におけるインキュベーションと比較して、電流における患者血清の有意な影響は存在しなかった(一元配置 ANOVA; 図 2c,d)。

30

【0067】

幾つかの抗体は、直接的に彼等の標的抗原の機能に影響しないが、表面発現の減少をもなうインターナリゼーションの時間および温度に依存的な増加を生じる[12, 13]。患者の抗体が時間が経てば細胞表面発現を減少させるかどうかを確認するため、我々は細胞を1または3 日、37 °Cでインキュベーションし、DTX-感受性の電流を試験した[12]。しかしながら、DTX-感受性の電流に如何なる影響も認められなかった(図 3a-d)。従って、全体的には、これらの結果によって、HEK細胞表面において機能的な、DTX-結合Kv1sの存在が確認されたが、患者の抗体が細胞に結合したこと又はチャンネルの機能または数に影響したことを示すことはできなかった。

40

【0068】

LE/MoS 血清は、脳抽出物から $^{125}\text{I}$ - DTX -VGKCsの亜集団を沈降させない、またKv-トランスフェクトHEK細胞から $^{125}\text{I}$ - DTX -VGKCsを沈降させない。

【0069】

さらに研究するため、我々は患者血清によりウサギ皮質から抽出された $^{125}\text{I}$ - DTX-標識 VGKCの免疫沈降をKv1.1, 1.2, および 1.6に対するウサギ抗体によるものと比較した。全ての哺乳類の脳の $^{125}\text{I}$ - DTX 結合部位には、Kv1.2が含まれると考えられる[14]。抗-Kv1.2は、50,000の最大 $^{125}\text{I}$ - DTX 結合部位の81%を免疫沈降した(図 4a)。Kv1.1またはKv1

50

.6 抗体の付加で、さらなる沈降は達成されなかった(補足データ 図 1B)。それ故、僅か19%の<sup>125</sup>I- DTXがVGKCsに非結合性である。対照的に、抗-Kv1.1, 1.6 および 1.4による沈降は、それぞれ51%, 17% および 7%でプラトーに達した(図 4a)。これらのデータは、代替のKv1抗体を用いた以前の未発表の研究と整合性がある(補足データ 1c)。しかしながら、我々が同じアッセイで個々のLE/MoS 血清を試験した際に、それらは血清過剰でさえも一貫して<sup>125</sup>I- DTXの最大カウント未満を免疫沈降した(図 4a)。プラトーの値は各血清で同一ではなかったにもかかわらず(図 1a)、平均値は試験した全てのLE/MoS血清に関して最大値の32% (23-43%の範囲)であった(図 4b)。

#### 【 0 0 7 0 】

これらのデータは、血清が DTX-標識チャンネルの亜集団に結合しえることを示唆する。さらに探索するため、我々はKv1.1, 1.2, 1.4, 1.6 および 2 サブユニットをHEK細胞において個々に及び共にの両方で発現させ、細胞をウサギ皮質抽出物の調製に使用したものと同一の様式で2% ジギトニンに抽出した。抽出物を、<sup>125</sup>I- DTX 標識し、抗-Kv1s および LE/MoS 血清による免疫沈降で試験した。個々のウサギ抗体の結果は、ウサギ皮質抽出物で認められたものと類似したが、LE/MoS血清による沈殿は存在しなかった(図 4c)。以上、これらの結果は、LE/MoS 抗体がホモマー又はヘテロマーの Kv1 サブユニットのいずれかに直接的に結合しないとの結論に我々を導いた。

#### 【 0 0 7 1 】

LE/MoSは、Kv1-複合型のタンパク質と結合する。

#### 【 0 0 7 2 】

これらの所見の一つの説明は、LE/MoS 抗体がウサギ皮質抽出物においてKv1sと結合するが、トランスフェクトHEK細胞に存在しないタンパク質と結合することであった。この仮説を検証するため、我々は<sup>125</sup>I- DTX-標識ウサギ皮質抽出物をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の濃度を増加させることで処理し、ウサギ 抗-Kv1 抗体 および LE/MoS 血清での免疫沈降を行った。結果は DTX-結合複合体への患者の抗体の結合およびKv1.1 および 1.2 抗体の結合の間の解離を実証し、前者はSDS処理により感受性である(図 5a)。

#### 【 0 0 7 3 】

以前に脳抽出物においてKv1sまたはDTX結合部位と結合することが報告された幾つかのタンパク質が存在し、これにはロイシンリッチ神経膠腫不活化遺伝子 1 (Lgi1: leucine-rich glioma inactivated gene 1), コンタクチン結合タンパク質 2 (CASPR2), 一過性軸索糖タンパク質-1 (TAG1: transient axonal glycoprotein-1) および ポストシナプスデンシティー(PSD: post-synaptic density)メンバーが含まれる[9, 10, 15]。我々がこれらのタンパク質に対する抗体を試験した際、抗-Lgi1は61%の DTX 結合部位を免疫沈降し、TAG1は約5%を免疫沈降した。これに対して、抗-CASPR2 抗体は、ウサギ抽出物から沈降された DTX-結合部位の比率(図 5b)およびSDSの濃度の増加に対する感受性(図 5c)の双方においてLE/MoS 血清のものと非常に類似する反応を示した。これらの所見は、我々のウサギ皮質抽出物において有意な比率の DTX-標識 VGKCsがCASPR2と結合することを示し、LE/MoS 抗体が直接的にCASPR2と結合しえることを示唆する。同様に、Lgi1 抗体による沈殿は、Kv1 特異的な抗体のものよりも大きなSDS感受性(図 5c)を示し、このタンパク質もLE/MoS 抗体の潜在的な標的であることを示唆している。

#### 【 0 0 7 4 】

幾つかのLE/MoS 血清抗体はCASPR2と結合する

LE/MoS 抗体がCASPR2と結合するかどうかを直接的に問うため、我々は細胞内C-末端にEGFPを導入することによりタンパク質をタグ付け後、HEK 細胞において完全長 ヒト CASPR2を発現させた。多くのLE/MoS血清がこれらの細胞の表面に結合し、ベクター単独でトランスフェクトされた細胞の表面に結合しない(図 6a)。EGFP-タグ付けCASPR2を用いる利点は、そのCASPR2によって血清抗体を定量的に溶液中で測定する迅速な方法を提供できることである〔アクアポリン-4 抗体に関して、Waters et al[16]〕。<sup>125</sup>I- DTX-標識 ウサギ 皮質抽出物のコントロール値よりも多く沈降する188の血清を、沈降物における緑色蛍光を測定することによりEGFP-CASPR2を免疫沈降する能力について我々は試験した(図 6b

10

20

30

40

50

)。健常個体または他の神経疾患の個体からの血清によって、感知できる蛍光が沈降されず、10 FUsの値がカットオフとして確立された。全部で18%のLE/MoS血清は、各血清により沈降された12 および 100 FUsの間で変動する値で陽性である。これらの血清は、全てCASPR2の細胞外ドメインと結合した(図 6a)。この抗体に陽性の患者の集団内でウサギ皮質抽出物におけるVGKCsとの結合および直接のCASPR2への結合の間に非常に密接な相関性が存在した(図 6c)。さらに抗体の特異性を確認するため、我々は血清をCASPR2-発現HEK細胞で事前に吸着させた。これによって、CASPR2-EGFP 抽出物からのCASPR2の免疫沈降が無効となり、またウサギ皮質抽出物からの<sup>125</sup>I-DTX-VGKCsの免疫沈降が無効となった(図 6d)。

【0075】

抗-CASPR2抗体の特性。

【0076】

多くの病原性の自己抗体は、高親和性、IgG、補体活性化し、またコンホメーション依存性である。CASPR2-EGFP-発現HEK細胞のアイソタイプ特異的二次抗体での免疫染色によって、CASPR2 IgG サブクラスの相対的な存在量の決定が可能である(図 7a)。大抵のCASPR2抗体は、IgG1 および IgG4 サブクラスであり、僅かにIgG2であり、殆んどIgG3はない。また、我々は、異なる濃度のCASPR2-EGFPと結合する個々の患者の血清の限定量(limiting amounts)を試験し、スキャッチャードプロットで結果を分析した。五患者を分析して $1.2 \pm 0.54 \times 10^{-8}$ の平均Kdを得た(SD; 図 7b)。市販の抗-CASPR2抗体は、ウエスタンブロットティングを用いてCASPR2-トランスフェクト細胞の抽出物において強いバンドを180kDaで同定したが、試験したCASPR2抗体陽性の十患者はこのバンドに結合しなく、CASPR2抗体が変性したCASPR2抽出物に存在しないコンホメーションエピトープに結合することを示唆している(図 7c)。

【0077】

少数のVGKC抗体陽性の血清がTAG1に結合する

我々は最初にTAG1への結合に関して多くの血清を検査しなかった。というのも、抗-TAG1抗体は、僅か<10%の<sup>125</sup>I-DTX 結合部位を脳抽出物から免疫沈降したからである(図 5B)。図 8Aは、ウサギ 抗-TAG1の結合により示されたとおり、TAG1-トランスフェクトHEK細胞が表面にTAG1を有することを示す。二患者の血清からのIgGの結合は、図 8Bに示される。血清は、未透過化のTAG1 トランスフェクト(EGFP コトランスフェクト)細胞の細胞外表面と結合する。我々は、試験した108のうちの四血清にTAG1結合抗体を見つけた。

【0078】

高い比率のLE/MoS血清がLgi1と結合する。

【0079】

Lgi1 トランスフェクト細胞に血清 IgGが結合することを高い比率の血清において我々は見つけた(以下を参照されたい)。しかしながら、結合は、EGFP コトランスフェクトHEK細胞の表面(EGFP陽性、図 9A)のみならず、トランスフェクトされなかった周囲の細胞も検出した(図 9B)。Lgi1が培地に分泌され、次に全てのHEK細胞の表面に結合することが可能であると思われる(というのも、この事項は、以前に報告されているからである[上記の24, 25])。

【0080】

この事項が事実であったのかを検討するため、我々は上清をLgi1-トランスフェクト細胞から取得し、これをトランスフェクトされなかった HEK 細胞と1時間、室温でインキュベーションした。これらの非トランスフェクト細胞を、次にLgi1 反応性を有する血清からのIgGの結合を捜すことにより結合Lgi1に関して試験した(図 9A)。他の抗原(例えば、MuSK)を発現している細胞からではなく(図 10B)、Lgi1-トランスフェクトされたHEK細胞からの上清(図 10A)が、HEK細胞の表面にLgi1を転移でき、そこにLgi1-陽性患者の血清IgGが結合した。これによってLgi1が分泌され、また培養においてPC12細胞の細胞表面に付着できるとの以前の観察が確認され、また拡張された(例えば、[24, 25])。

【0081】

10

20

30

40

50

## CASPR2, TAG1 および Lgi1 抗体の臨床上の関連性

我々の所見の臨床上の関連性を確立するため、我々はVGKC抗体を有する患者からの108の血清を三つの抗原を発現しているHEK細胞への結合に関して試験した。これらのサンプルには、ルーチンの分析に送ったVGKC抗体高値(>400 pM)で主にCNS(LEまたはモルヴァン)疾患の患者を含むことが予想された88血清および付加的な20血清(神経ミオトニーの患者から13およびモルヴァン症候群から7)が含まれる。これらは我々のアーカイブから選択された。というのも、モルヴァン症候群が稀なため、また神経ミオトニー患者が典型的に低レベルの<sup>125</sup>I-DTX-VGKCsに結合する抗体を有し、高い力価の患者中で低く提示されるだろうためである。

## 【0082】

三つの異なる抗体と関連するVGKC抗体のタイターが図11に示される。これは、タイターがLgi1陽性患者において最大であり、CASPR2陽性患者において中等度であり、TAG1陽性患者において低いことを示す(<sup>125</sup>I-DTX-VGKCの免疫沈降で<100 pMであった一つの血清を含む)。

## 【0083】

我々は、主に参照する神経学者の詳細な質問表から臨床情報を得た(Oxford Research Ethics Committee A approval, 07/Q160X/28)。65患者は辺縁系脳炎(そのうち六患者は、癲癇を主要な特性として有する)を有し、12患者はモルヴァン症候群を有し、25患者は神経ミオトニーを有し、僅か六患者が癲癇、ジストニーまたは驚愕症候群(starlike syndromes)(これらの分類に直接的に適合しない)を有していた。これらの患者は、VGKC抗体と関連する障害の周知のスペクトルを代表する。異なる患者の臨床上のサブグループのVGKC抗体タイターの分布が図12に示される。個々の患者における前のデータからの予想のとおり、それらタイターは辺縁系脳炎において最大であり、モルヴァン症候群においてより低く、神経ミオトニーにおいて最低であった。後者のグループは、ルーチンの検査においてVGKC抗体に関して陰性であった八患者を含む。図13は、臨床症候群を示し、各グループの患者の数、非胸腺腫瘍(これらは可変性であり、僅か二人がサンプル参照時に臨床的に活動性であった)の根拠を有する数、および胸腺の悪性疾患の数(VGKC抗体と頻繁に関連する唯一の腫瘍タイプである)を示す[5]。

## 【0084】

図14は、三つの異なる抗体の各々と関連する患者を示す。著しいことにLgi1抗体は殆んど独占的に辺縁系脳炎(39のLgi1陽性血清のうち三血清のみが他の症候群の患者からであった)の患者に認められ、重要なことに胸腺の悪性疾患の患者で認められなかった。対照的に、CASPR2抗体は、モルヴァン症候群の12患者のうち10患者に認められ、胸腺の悪性疾患の患者の10/11に認められた。加えて、CASPR2抗体は、神経ミオトニーの25患者のうち8患者に認められた。TAG1抗体は四患者にのみ認められたが、これらのうち三患者は神経ミオトニーを有し、一患者はVGKC抗体に関して陰性であり;他のTAG1陽性患者は辺縁系脳炎を有していた。

## 【0085】

## 考察

我々は、以前に中枢神経系発現Kv1-タイプカリウムチャンネルに対する抗体を有すると信じられていた患者における新規の自己抗体標的としてCASPR2を記載する。加えて、我々は、他の患者の高い比率がLgi1抗体を有し、少ない比率がTAG1抗体を有していたことを示す(VGKC抗体の検査において陰性であった一患者を含む)。これらの抗体の存在は患者の異なる臨床特性と相関する。これらの結果は、異なる臨床表現型が神経系における異なるVGKC Kv1-複合体タンパク質を標的とする特異的な抗体の存在に依存するらしいことを初めて実証する。我々がここに規定する抗体は、VGKC抗体陽性サンプルの65%を代表する。抗体検出アッセイにおけるさらなる改善によって、このパーセンテージを増加させえる。

## 【0086】

DTXは、Kv1.1, 1.2 および 1.6(哺乳類の脳において最も豊富なKv1サブユニット)を標識する。LE および MoS IgGが DTX-標識した脳タンパク質を免疫沈降するとの観察

10

20

30

40

50

は、LE および MoS IgGのKv1タンパク質への直接の結合を示すと想定されてきた。脳組織の免疫組織化学は、特に、患者の血清でKv1.2の共有化を示すことによりこの仮説を支持している[4], [3], [17]。さらにまた、一つの研究は、LE および MoS IgGの異種性の哺乳類細胞株において発現されたKv1sへの結合を示している[8]。しかしながら、特定の Kv1 サブタイプにLEまたはMoSの血清が優先的であるとのことによって、なぜ末梢性に産生された抗-Kv1抗体を有する患者が中枢神経系の表現型のみを呈示しえるのかについて説明できない。

#### 【0087】

機能上、NMTの患者からのIgGの受動転移 (passive transfer) によって、カリウムチャンネル機能不全に二次的なニューロンの過剰興奮性と整合性が取れた電気生理学的な変化が作られた[1]。同様に、LEおよびMoSの患者は発作、神経ミオトニー およびニューロン欠損 [2], [18]などのニューロン過剰興奮性の特性を示す。また、Kv1.1変異の患者およびKv1.1-ノックアウトマウスは、発作を発生する[19], [20]。これらの証拠によって、Kv1サブユニットはLE および MoS IgGの最も有力な抗原性の標的とされた。しかしながら、分子レベルでのアプローチは、この仮説を納得のゆくように確認していない。

10

#### 【0088】

LEまたはMoS IgGがKv1.1と結合する場合、それらは抗-Kv1.1抗体と同じ量の<sup>125</sup>I- DTXを沈降させると予想される。抗-Kv1.1, 1.2, 1.4 および 1.6 沈降物に関する我々のデータは以前の研究[14, 21]と非常に類似するが、LE および MoS IgGはKv1sの亜集団を沈降させる (何らかの単独の抗-Kv1抗体と類似する量ではない)。この事項は、それらがKv1タンパク質の何れか一つと結合するのではないことを示唆している。

20

#### 【0089】

Kv1は四量体して機能的な DTX-感受性チャンネルをHEK細胞の表面に形成する。しかしながら、我々は、LE および MoS IgGへの曝露後に電流抑制も表面の免疫蛍光で決定される結合も検出できなかった。IgGがKv1sの細胞内ドメインと結合する可能性を除外するため、我々は診断上のアッセイを模倣する条件下で細胞を可溶化し、我々の脳組織中に存在するものと類似するKv1サブユニットのヘテロマーを抽出した。このパラダイムを用いて、我々はLEまたはMoS IgGが<sup>125</sup>I- DTX-標識 Kv1sを沈降させることを実証することができなかった。以上より、Kv1機能不全がLE および MoS 表現型の分子的な相関 (molecular correlate) である可能性があり、またLE および MoS IgGが<sup>125</sup>I- DTX 標識哺乳類脳ホモジネートからカウントを沈降させるにもかかわらず、それらは直接的にKv1タンパク質に結合することにより沈降を行わない。従って、それらはKv1-発現HEK細胞に存在しない脳組織中でKv1と複合体化する別のタンパク質を共沈降する可能性がある。この仮説はKv1.1/1.2 および LE/MoS抗原の差別的なSDS感受性により強められ、特にそれらが<sup>125</sup>I- DTX-結合脳複体内で別々のより末梢性のタンパク質と結合する証拠が提供された。

30

#### 【0090】

CASPR2は、大きい細胞外ドメインを有するKv1-共沈降分子である[9]。加えて、DTX複合体からのCASPR2の解離パターンは、LE および MoS患者のものと類似していた。可溶化したCASPR2-EGFPを用いるFIPAによって、診断アッセイ陽性の患者の32 (18%)において陽性値が得られた。抗-CASPR2抗体は、血清の研究の診断アッセイにおいて陰性である中枢神経系の疾患、自律神経性の機能不全または胸腺腫の患者に存在しなかった。全ての抗-CASPR2 IgGは、CASPR2の細胞外ドメイン内のエピトープと結合した。これらのIgGsは直線化したCASPR2をウエスタンブロットで認識しなく、これらが哺乳類で発現されたCASPR2において利用可能なコンホメーションエピトープに結合することを示唆している。抗-CASPR2抗体は、IgG1 および IgG4 サブクラスが優勢であった。IgG1 サブクラスは、抗-CASPR2抗体-関連疾患の病因において補体結合に役割がある可能性を示唆する。これらの抗体は、高親和性であり、他の神経疾患において認められたものと類似する。CASPR2抗体免疫吸着後の診断アッセイにおいて検出可能な抗体が存在しなく、また抗-CASPR2のタイターおよび診断アッセイのタイターの間の直線的な相関性は、これらの抗-CASPR2が前に電位開口型カリウムチャンネル抗体と称した幾つかの抗体であることを強く示唆する。

40

50

## 【0091】

CASPR2の単独の神経発現によって、ニューロンの表面でのみ発生する抗体媒介性の病状が確立される。この事項は、LE および MoS患者において観察された臨床特性と一致する。CASPR2 および Tag1ノックアウトマウスは、野生型ニューロンに認められた傍パラノド(juxtaparanodal)-クラスター化したKv1sとは対照的にアクソンをとおした拡散性のKv1分布を示す[22]。同様に、CASPR2のC末端短縮体(CASPR2 C-terminal truncations)を保持しているヒトからの脳組織は、対照の脳に認められるものよりもより拡散したKv1発現を示した。これらの患者は、発作、認知障害および腱反射の非存在を呈する[23]。CASPR2の中心および末梢の神経系分布を考慮に入れると、この遺伝的なモデルは、抗-CASPR2陽性患者内にMoSが過剰に存在するとの我々の所見と類似する。

10

## 【0092】

抗-CASPR2抗体は、次の三つの主要な機構により前にクラスター化したKv1sの類似する分散を生じえる：

- i) 補体結合および局所性の組織ダメージ、
- ii) それらの標的タンパク質の直接の刺激または遮断および
- iii) 標的抗原のインターナリゼーション。

## 【0093】

抗-CASPR2抗体がi) および iii)を介して作用を媒介することが最も可能性がある。Kv1sの数の減少によって、相対的に脱分極し過興奮性の膜が作られるえる。

## 【0094】

類似する考慮が、Lgi1またはTAG1に対する抗体に適用される。Lgi1は主に中枢神経系に、特に関心がもたれるのは、CASPR2を発現しない領域(例えば、海馬の苔状線維層)に発現する；このことからこれらの抗体を有する患者がなぜ優勢的に辺縁系脳炎を呈し、側頭葉MRIの高シグナルおよび側頭葉の癲癇と関連するのかが説明さええる[2]。そのうえ、Lgi1をコードしている遺伝子における変異は、末梢神経の機能不全を示さない側頭葉の癲癇のファミリーにおいて認められる[28]。対照的に、TAG1は神経ミオトニーの患者における抗体の標的を提供できるランビエ絞輪でKv1.1およびKv1.2およびCASPR2と共に発現され、またTag1ノックアウトマウスは以前にCNSおよびPNSの近接傍絞輪(juxtaparanodes)でクラスター化したKv1タンパク質の分散(dispersion)を示した[22, 27]。全体的に、これらの所見は、抗-「VGKC」抗体と関連する臨床上の不均一性の重要な新しい理解を提供し、将来的に患者のより正確な同定および分類を提供するだろう。我々がここで使用する細胞に基づくアッセイは、高い頻度で溶液からタグをつけた抗原の免疫沈降に依存するアッセイよりも感度が高い〔例えば、[11, 16]〕。一例を挙げると、神経ミオトニーの14患者の付加的なコホートにおいて、我々は免疫沈降アッセイによりVGKC抗体に関して陰性であった5個体においてCASPR2またはTAG1抗体を見つけた。このように、これらの標的の同定、およびアッセイの開発によって、表現型の差が説明されるのみならず、診断が改善されるだろう。

20

30

## 【0095】

## 方法

## 臨床材料

血清サンプルは、-20 °Cで貯蔵された。臨床医は、患者をサブクラスに分類するため臨床上の詳細な事項を提供した。LE 血清は、健忘症および神経ミオトニーのない発作を有するものに分類された。MoS血清は、中枢神経系の特性に加えて自律神経性の特性および神経ミオトニーを有していた。コントロールには、胸腺腫(n=9)、亜急性に発病する自律神経性の疾患(n=34)、多発性硬化症(n=14)、非-<sup>125</sup>I- DTX沈降性の脳症(n=50)の患者および健常コントロール(n=10)が含まれる。88の血清を、何らかの既知の臨床の表現型に関係なく、中等度から高度のVGKC抗体タイター(全て >400 pM)の血清から選択した。詳細な質問表から臨床情報を得るため、質問表を参照する神経学者に送り、情報をデータベースに照会した(Oxford Research Ethics Committee A approval, 07/Q160X/28)。これによって三つの主な臨床表現型を区別することが可能となった。前記患者のうち六患者は、こ

40

50

これらのカテゴリーにうまく適合しなかった： 四患者は癲癇単独を有し、一患者は過剰驚愕 (excessive startle) をともなうジストニーを有し、一患者は過剰驚愕単独を有していた。既知のモルヴァン症候群 (n=7) または神経ミオトニー (n=13) をともなう患者からの20の付加的な血清を、所見および統計学的分析の確認のためこれらの患者の数を増加するため加えた。

#### 【 0 0 9 6 】

ウサギの皮質から抽出されたVGKCsの放射性免疫沈降

VGKC複合体を、2% ジギトニン (Calbiochem, USA) を用いてDTX-緩衝剤 (100mM NaCl, 20mM Tris, 5mM KCl pH 7.12に調整) 中で37°C、20 分間で可溶化されたウサギ皮質膜から抽出した。上清を、PTX (0.02M リン酸緩衝剤 および 0.1% Triton X100) で1:2に希釈し、<sup>125</sup>I-DTX (Perkin Elmer, USA) でインキュベーションした。この抽出物を、PTXで100万カウントパーミニット (cpm) / ml に希釈した。解離実験に関して、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を<sup>125</sup>I-DTX 標識抽出物に2 時間、RTで加えた。50ulの<sup>125</sup>I-DTX-標識抽出物を、血清または市販の抗体 (PTXで50ulにした) と一晩、4°Cでインキュベーションした。二次抗体 (抗-ヒト IgG (The Binding Site, UK) または抗-ヤギ IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, USA)) を、10ul/1ulで血清に90 分間、RTで添加した。沈降物を0.5ml PTX中で遠心し、生じたペレットをPTXで二回洗浄し、ガンマカウンター (Cobra2, Perkin Elmer) で読み取った。特異的cpm (specific cpm) として表す場合、結果は健常コントロールのデータが差し引かれたものである。

10

20

#### 【 0 0 9 7 】

プラスミド構築物

完全長 ヒト Kv1.1, 1.2, 1.4, 1.6 および 2 をコードしているcDNAsを、pcDNA3.1-hygro (Invitrogen Ltd, CA, USA) にクローン化した。完全長 ヒト MuSK-GFP構築物は、以前に記載された[2]。CASPR2 のcDNAを含んだベクター pCR4-TOPO (IMAGE: 7939625 geneservice, Cambridge, Englandより) をEcoRIで消化した。断片をpcDNA3.1 (+) (Invitrogen, UK) にサブクローンして、哺乳類細胞において発現されるタグ無しのCASPR2を得た。CASPR2をEGFPでタグ化するため、pcDNA3.1 (+)-CASPR2 プラスミドをXhoI および XmaIで消化した。断片をpEGFP-N1 (Clontech Laboratories, CA, USA) にサブクローン化した。

#### 【 0 0 9 8 】

ヒト Lgi-1に関して、cDNAをGeneservice社から購入し、次のプライマーでPCRにより増幅した：

30

FPIgIpcdna: GATCGCTAGCCCACCATGGAATCAGAAAGAAGCAAAAAGG NheI

RPIgIpcdna: GATCCTCGAGTCATGCGCTTAAGTCAACTATGACATG XhoI

精製産物をpGEM-Teasyにサブクローン化した。このクローンおよびClontechからのプラスミド pcDNA3.1(+)をNheI および XhoIで消化した。断片を共にライゲーションし、構築物を精製し、シーケンシングで検証した。

#### 【 0 0 9 9 】

FPIgIpcdna: GATCGCTAGCCCACCATGGAATCAGAAAGAAGCAAAAAGG NheI

RPIgIpcdna: GATCCTCGAGTCATGCGCTTAAGTCAACTATGACATG XhoI

ヒト TAG1 cDNAは、Karagogeos博士 (Dr D Karagogeos, University of Crete; [27]を参照されたい) から供与された。

40

#### 【 0 1 0 0 】

トランスフェクションおよびヒト胚性腎臓細胞の培養

HEK293 細胞をダルベッコ修正イーグル培地 (DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium) に10% 胎児ウシ血清 (FCS, TCS Cellworks Ltd, Buckingham, UK) および各々100単位/mlのペニシリン G および ストレプトマイシン (Invitrogen, CA, USA) を添加した培地で37 °C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気中で培養した。細胞を、免疫吸着およびトキシン結合実験のため6 ウェル培養プレートで、顕微鏡観察のため6-ウェル細胞培養プレートに配置した13mm ガラスのカバーガラスで、またタンパク質抽出のため175cm<sup>2</sup> フラスコで成長させた。ポリエチレンイミン (PEI) を用いて、細胞をKv1.1, 1.2, 1.4, 1.6, 2, EGFP (増強緑色蛍

50

光タンパク質), MuSK-EGFP, CASPR2-EGFP, Lgi1またはTAG1 cDNAで一過性にコトランスフェクトした。EGFPの発現をAxion 200 Zeiss 倒立蛍光顕微鏡を用いて視覚化した。

#### 【0101】

##### 免疫細胞化学

トランスフェクションの48時間後、HEK細胞の免疫蛍光染色を行った。カバーガラスを24-ウェルの培養プレートに移し、DMEM-N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸) (HEPES)に1%ウシ血清アルブミン(BSA)を有するもので希釈したマウス抗-Kv1.1細胞外ドメイン抗体(1:100, Dr J Trimmer, Californiaから供与された)または患者血清(1:20-100)で室温(RT)で1時間インキュベーションした。細胞を引き続いてDMEM-HEPES緩衝剤で3回洗浄し、リン酸緩衝塩類溶液(PBS)中で3%ホルムアルデヒドでRT、15分間固定した。細胞を上記のとおり洗浄し、(i)抗-マウスIgGまたは抗-ヒトIgG Alexa Fluor 568-結合型二次抗体(Invitrogen-Molecular probes, Paisley, UK)を1%BSA-DMEM-HEPES緩衝剤中で1:750希釈したもの又は(ii)マウス抗-ヒトIgG1, 2, 3または4 (Binding Site, Birmingham, UK)を1%BSA-DMEM-HEPES緩衝剤で1:50希釈したもの、引き続いてヤギ抗-マウスアイソタイプ特異的IgG-Alexa Fluor 568-結合型抗体(Invitrogen-Molecular probes, Paisley, UK)で45分間、RTで標識した。細胞透過化に関して、細胞を最初に固定液(上記のとおり)でインキュベーションし、全ての溶液に0.1% TritonX100を含有させた。ウサギ抗-Kv1.1/1.2および1.6抗体(1:500, Alamone, Israel)を、抗-ウサギIgG Alexa Fluor 568-結合型の二次抗体(Invitrogen-Molecular probes, Paisley, UK)で視覚化した。続いて、細胞をPBSで3回洗浄し、スライドを蛍光封入剤(DakoCytomation, Cambridge, UK)にDAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole, 1:1000)を有するものにマウントした。それらをMacProbe v4.3 デジタルイメージングシステムを用いて視覚化した。サブクラス分析に関して、全てのスライドは、以前に確認[11]されたとおり0から4のスコアリングシステムを用いて盲検観察者(blinded observers)により検査された。TAG1およびLgi1に関して、我々は学術的な目的のための発生研究ハイブリドーマバンクから購入したマウス抗TAG1(IgG1)(<http://dshb.biology.uiowa.edu/>からの'3.1C12'), およびSanta Cruz Biotechnology Incから購入したヤギ抗Lgi1, C19(sc-9583)およびN18(sc-9581)を使用した。

10

20

30

40

#### 【0102】

##### 電気生理学

HEK-293細胞をKv1.1およびGFPまたはKv1.6およびGFP(上記のとおり)でトランスフェクトし、ホールセルパッチクランプ記録のためガラスのカバーガラスに直接的に配置した。細胞の電位クランプ記録を145 NaCl, 6 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, および5 グルコース(NaOHでpH 7.4)を(mMで)含んでいる外部緩衝液の定常バス(1 mlの容量)で行った。~2-5Mの抵抗性の記録ピペットを、ハウケイ酸毛細管ガラス(Harvard Apparatus)から調製し、150 KCl, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> および 10 HEPES (KOHでpH 7.4)を(mMで)含んでいる標準の細胞内液を充填した。細胞を倒立蛍光顕微鏡(Nikon)を用いて視覚化し、GFP発現細胞のみを記録した。記録は、室温(20-24)で行われた。CsCl-に基づく細胞内液を用いた予備的な実験によって、示された電流はカリウム媒介性であることが確認された(データ示さず)。

40

#### 【0103】

-DTX-感受性電流は、記録の間に-DTX(1 μM, Sigma-Aldrich)を直接的にバスに適用することにより示された(緩衝液の均等な容量をコントロール実験に使用した)。血清サンプルを使用前に外部記録溶液(external recording solution)に対して透析し、長期的に適用されるサンプルを培養培地に希釈(1:50-1:1000)した。表れる電流における血清の短期の影響を、記録の間に直接的に血清を適用することにより決定した(a-DTXの付加と類似)。患者血清の長期の影響を、記録前のKv1-トランスフェクトHEK-293細胞での1-3日インキュベーションにより決定された。

#### 【0104】

データを1 kHzで低域フィルタ(low-pass filtered)し、10 kHzで獲得した。記録は、

50

Axopatch-1D増幅器, Digidata 1320 シリーズ デジタイザーおよびパルスゼネレーション, データ収集およびデータ分析のためのpClampの一揃いのプログラム(Axon Instruments)を用いて行った。分析に含まれる細胞は、記録の間に30%未満の変化の低いアクセス抵抗( $R_a$ ,  $<20 \text{ M } \Omega$ ); 高いインプット抵抗( $R_i$ ,  $>1 \text{ G } \Omega$ 、 $-70 \text{ mV}$  ( $+10 \text{ mV}$  ステップ)); ベースライン安定性および小さいリーク電流( $< -50 \text{ pA}$ )を有していた。ピーク電流測定は、検査パルスを $-80 \text{ mV}$ の保持電位 (holding potential) から $+40 \text{ mV}$ で $300 \text{ ms}$ で適用することにより行った。また、活性化および定常状態の不活性化の電位依存性を、分析した(データ示さず)。統計学的な有意性を、単独比較に関して両側スチューデントのt-検定および多重比較に関して一元配置 ANOVAsを用いて評価した。

#### 【0105】

##### タンパク質の抽出および標識化

トランスフェクションの48 時間後、コンフルエントな $175 \text{ cm}^2$  フラスコをPBSで洗浄し、1:100のプロテアーゼインヒビターカクテルを有するDTX-緩衝剤中の2% ジギトニン(Sigma-Aldrich, UK)で溶解した。溶解物を、1 時間回転させ、遠心( $13,000 \text{ rpm}$ 、5 分間、 $4^\circ \text{C}$ )し、上記のとおり $^{125}\text{I}$ -DTXで標識した。これら及びGFP-タグをつけた抽出物( $100 \text{ fU/アッセイ}$ )の双方を、 $5 \mu\text{l}$ のヒト 血清またはウサギ抗-CASPR2(Dr E Pelesから供与)抗体での免疫沈降に供試した。ペレットを $180 \mu\text{l}$ のPTXに再懸濁し、96 ウェルプレートに移し、蛍光プレートリーダー (Gemini XS, Molecular Probes) を用いて分析した。この後者のアッセイは、蛍光免疫沈降アッセイ(FIPA: fluorescent immunoprecipitation assay)として知られる。

#### 【0106】

##### ウエスタンブロッティング

トランスフェクトされた細胞の抽出物を、SDSベースのローディングバッファーおよび還元剤(Invitrogen, CA, USA)で煮沸した。 $15 \mu\text{l}$ 抽出物/ウェル(タンパク質濃度で均等化)を4-12%のSDSポリアクリルアミドゲル (Invitrogen, UK)にロードし、90 分間、 $200 \text{ mV}$ で電気泳動した。ゲルを90 分間、 $30 \text{ mV}$ でニトロセルロースペーパーに転写した。個々のストリップをPBS-0.1% tween, 5% ミルクタンパク質溶液でブロックした。引き続いて、膜をブロッキング溶液で希釈(1:100)した一次抗体で1 時間インキュベーションし、PBS-0.1% tweenで3 回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈(1:200)したHRP-結合型の抗-ウサギまたは抗-ヒト IgG 二次抗体(DakoCytomation, UK)で30 分間インキュベーションした。プロットをジアミノベンジジン (DAB)で発色させた。

#### 【0107】

##### [ 参考文献 ]

[1] Sinha S, Newsom-Davis J, Mills K, Byrne N, Lang B, Vincent A. Autoimmune aetiology for acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). *Lancet*. 1991 Jul 13;338 (8759):75-7.

[2] Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Lang B, Rossor MN, Palace J. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain*. 2004 Mar;127(Pt 3):701-12

[3] Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol*. 2001 Jul;50(1):73-8.

[4] Liguori R, Vincent A, Clover L, Avoni P, Plazzi G, Cortelli P, et al. Mor

10

20

30

40

50

van's syndrome: peripheral and central nervous system and cardiac involvement with antibodies to voltage-gated potassium channels. *Brain*. 2001 Dec;124(Pt 12):2417-26.

[5] Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, et al. Autoantibodies detected to expressed K<sup>+</sup> channels are implicated in neuromyotonia. *Annals of neurology*. 1997 Feb;41(2):238-46.

[6] Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, Leys K, Zheng W, van den Berg RJ, et al. Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K<sup>+</sup> channels of peripheral nerves. *Annals of neurology*. 1995 Nov;38(5):714-22.

[7] Tomimitsu H, Arimura K, Nagado T, Watanabe O, Otsuka R, Kurono A, et al. Mechanism of action of voltage-gated K<sup>+</sup> channel antibodies in acquired neuromyotonia. *Annals of neurology*. 2004 Sep;56(3):440-4.

[8] Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K<sup>+</sup> channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain*. 2006 Jun;129(Pt 6):1570-84.

[9] Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, et al. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K<sup>+</sup> channels. *Neuron*. 1999 Dec;24(4):1037-47.

[10] Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, et al. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron*. 2006 Mar 2;49(5):697-706.

[11] Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*. 2008 May 31.

[12] Nagado T, Arimura K, Sonoda Y, Kurono A, Horikiri Y, Kameyama A, et al. Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. *Brain*. 1999 Nov;122 ( Pt 11):2057-66.

[13] Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Roemer SF, Fryer JP, Kryzer TJ, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2007 Dec 11;69(24):2221-31.

10

20

30

40

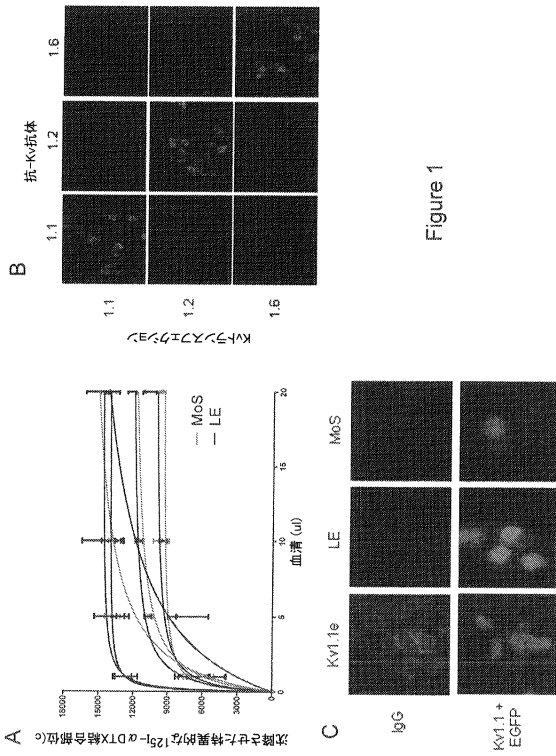
50

- [14] Shamotienko OG, Parcej DN, Dolly JO. Subunit combinations defined for K<sup>+</sup> channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. *Biochemistry*. 1997 Jul 8;36(27):8195-201.
- [15] Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M. Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*. 1995 Nov 2;378(6552):85-8.
- [16] Waters P, Jarius S, Littleton E, Leite MI, Jacob S, Gray B, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Archives of Neurology*. 2008 Jul;65(7):913-9. 10
- [17] Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain*. 2005 Aug;128(Pt 8):1764-77. 20
- [18] Schott JM, Harkness K, Barnes J, della Rocchetta AI, Vincent A, Rossor MN. Amnesia, cerebral atrophy, and autoimmunity. *Lancet*. 2003 Apr 12;361(9365):1266.
- [19] Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, De Silva R, Tolmie J, Wood NW, et al. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain*. 1999 May;122 ( Pt 5):817-25. 30
- [20] Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron*. 1998 Apr;20(4):809-19.
- [21] Scott VE, Muniz ZM, Sewing S, Lichtinghagen R, Parcej DN, Pongs O, et al. Antibodies specific for distinct Kv subunits unveil a heterooligomeric basis for subtypes of alpha-dendrotoxin-sensitive K<sup>+</sup> channels in bovine brain. *Biochemistry*. 1994 Feb 22;33(7):1617-23. 40
- [22] Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, et al. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K<sup>+</sup> channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *The Journal of cell biology*. 2003 Sep 15;162(6):1149-60.
- [23] Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *The New England journal of medicine*. 2006 Mar 30;354(13):1370-7. 50

- [24] Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Perez V, Favell K, Barker PA, Perez-Tur J. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum Mol Genet.* 2006 Dec 1;15(23):3436-45. Epub 2006 Oct 26.
- [25] Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M.. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science.* 2006 Sep 22;313(5794):1792-5. 10
- [26] Pavlou O, Theodorakis K, Falk J, Kutsche M, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Karageos D Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members..*Mol Cell Neurosci.* 2002 Jul ;20(3):367-81.
- [27] Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karageos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol.* 2003 Sep 15;162(6):1161-72. 20
- [28] Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet.* 2002 Mar;30(3):335-41. 30

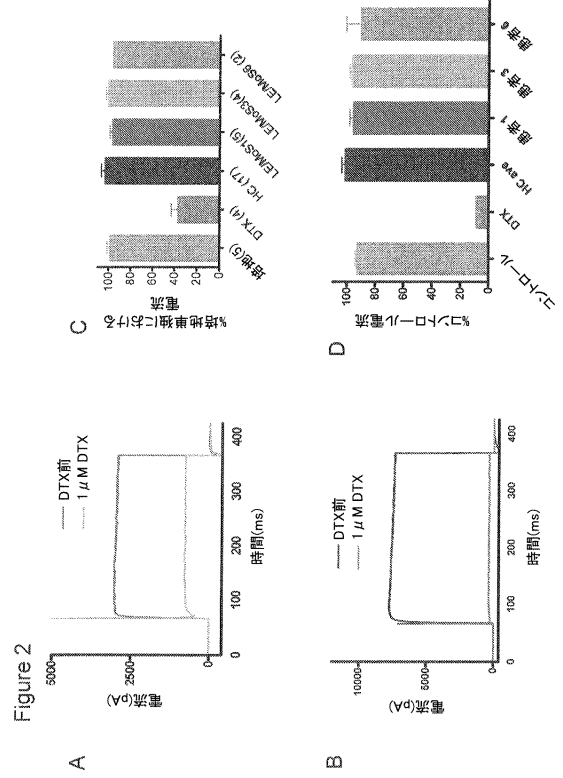
【 図 1 】

図 1



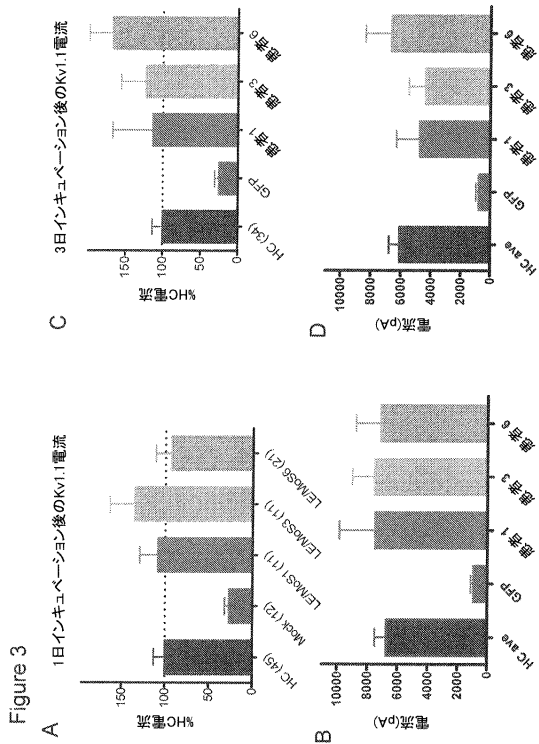
【 図 2 】

図 2



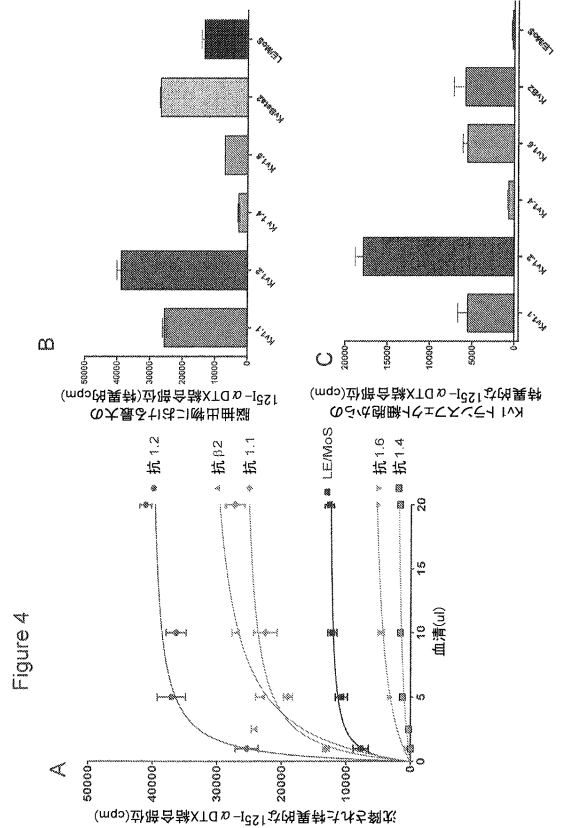
【 図 3 】

図 3



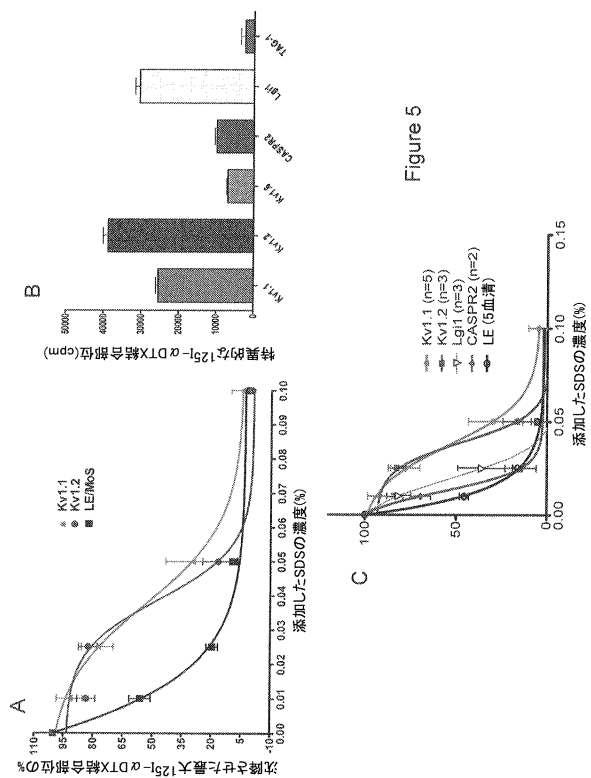
【 図 4 】

図 4



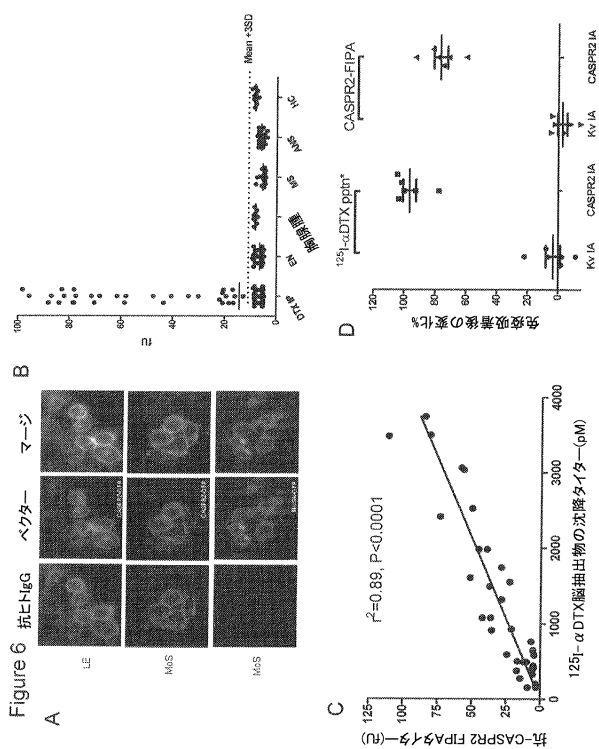
【 図 5 】

図 5



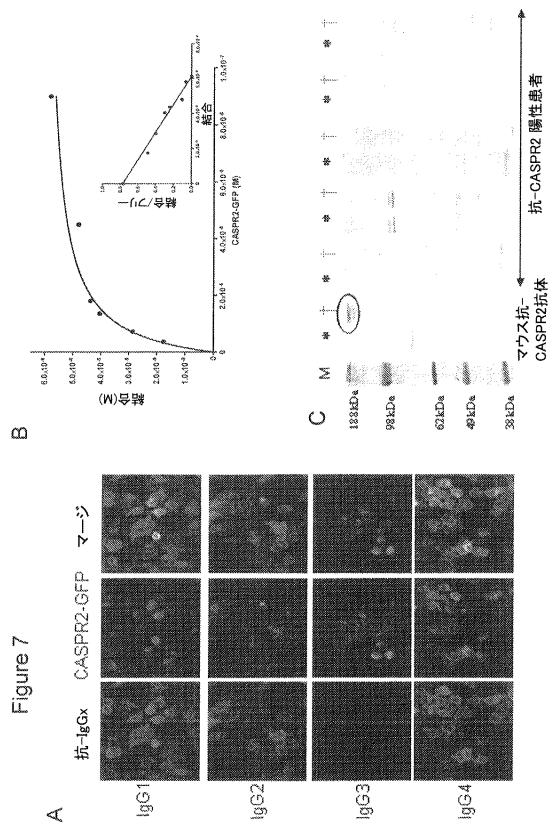
【 図 6 】

図 6



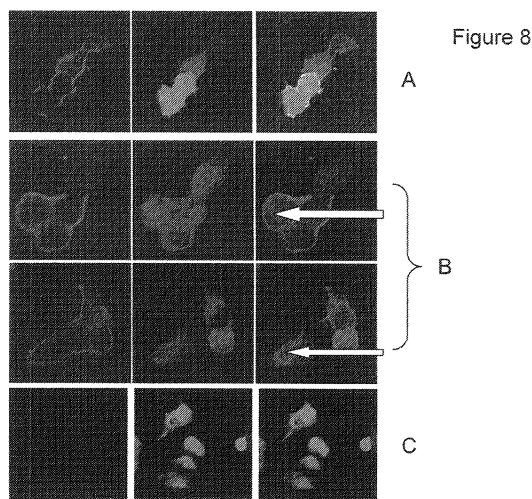
【 図 7 】

図 7



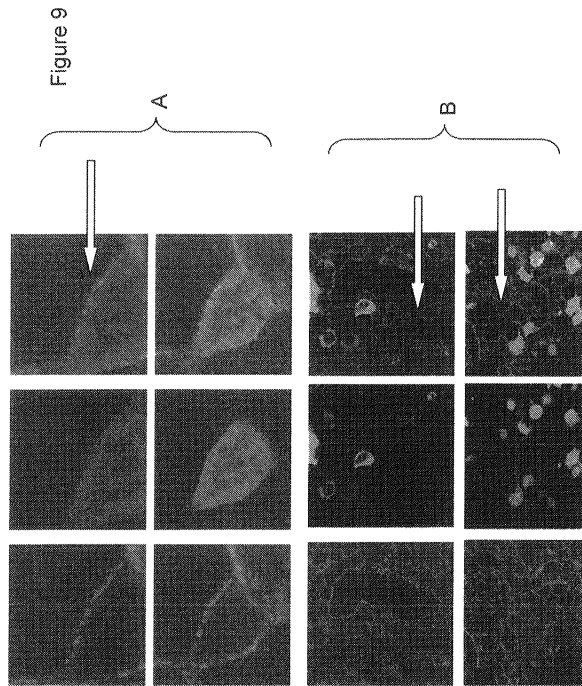
【 図 8 】

図 8



【 図 9 】

図 9



【 図 10 】

図 10

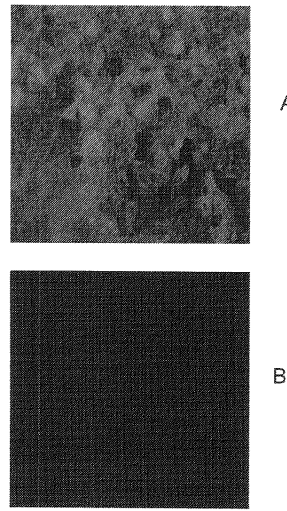
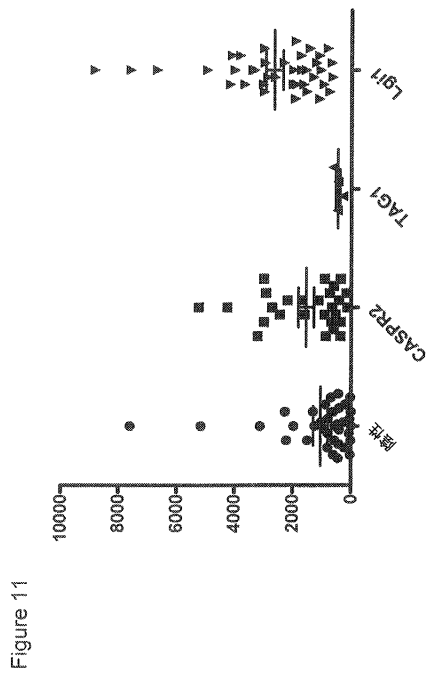


Figure 10

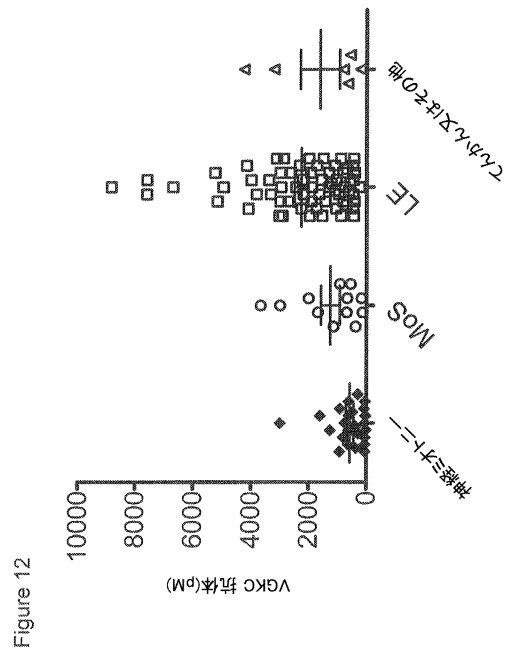
【 図 11 】

図 11



【 図 12 】

図 12



【 図 13 】

図 13

Figure 13

	男性	女性	トータル	VGKC Ab neg
トータル数	78	30	108	8
年齢の中央値 (Median age), 範囲	54, 19-78	60, 17-83	60, 17-83	
非胸腺腫瘍*	5	2	7	0
胸腺腫**	8	3	11	0
辺縁系脳炎 又はてんかん	49	16	65	0
モルヴァン症候群	11	1	12	0
神経ミオトニー	15	10	25	8
てんかん又はその他	3	3	6	0

【 図 14 】

図 14

Figure 14

全患者	Lgi1	CASPR2	TAG-1	同定 されていない アクセサリー タンパク質
トータル数	39	27	4	38
胸腺の悪性疾患	0	10	0	1
辺縁系脳炎 又はてんかん	30	7	1	21
モルヴァン症候群	2	10	0	0
神経ミオトニー	0	8	3	14
他の症候群	1	2	0	3
VGKC-Ab 陰性	0	0	1	7

\*大多数はこれまでのところ活動性ではなかった

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2009/051441
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/564		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. POLIAK ET AL.: "Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K+ channels." NEURON DEC 1999, vol. 24, no. 4, December 1999 (1999-12), pages 1037-1047, XP002569454 Cambridge, MA 02139 USA ISSN: 0896-6273 cited in the application Page 1045, first column, second paragraph ("In summary") and second column, third paragraph ("Generation of antibodies") ----- -/--	6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 February 2010		03/03/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Van Bohemen, Charles

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2009/051441

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>A. VINCENT ET AL.: "Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. (Review)."            NEURON 5 OCT 2006,            vol. 52, no. 1,            5 October 2006 (2006-10-05), pages            123-138, XP002569453            Cambridge, MA 02139 USA            ISSN: 0896-6273            page 125; table 1            page 126; table 2            page 123; first column, first paragraph of            "Introduction"</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-3,            14-17</p>
A	<p>U. SCHULTE ET AL.: "The epilepsy-linked Lgil protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1."            NEURON 2 MAR 2006,            vol. 49, no. 5, 2 March 2006 (2006-03-02),            pages 697-706, XP002569455            Cambridge, MA 02139 USA            ISSN: 0896-6273            cited in the application            abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-18</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/GB2009/051441**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.: 6-12(all partially)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/GB2009/051441

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

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

1. claims: 1-5, 13-18

Methods and kits to diagnose autoimmune neurological disorders and to identify compounds to treat said disorders by detecting autoantibody binding to Kv1-complex proteins or prevention of said binding.

2. claims: 6-12

An autoantibody specific for an epitope of a Kv-1 complex protein or specific fragment thereof and use thereof to treat a patient suffering from a neurological disorder and use thereof in the preparation of a medicament to treat a neurological disorder.

International Application No. PCT/GB2009/051441

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 6-12(all partially)

Present claims 6-12 relate to a large number of unspecified possible proteins, i.e. Kv1-complex proteins. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however, for only a very small proportion of said proteins (cf. PA, page 2, fourth paragraph), notably CASPR2 (i.e. contactin associated protein 2), Lgil (i.e. leucine-rich glioma inactivated gene 1) and TAG1 (i.e. transient axonal glycoprotein-1, also known as contactin 2). The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 6-12 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23). The search of claims 6-12 was restricted to those Kv1-complex proteins which appear to be supported by the description: CASPR2, Lgil and TAG1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 51/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	A
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	A 6 1 K	49/02	A
		C 0 7 K	16/18	

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

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(72)発明者 ビンセント、アンジェラ

イギリス国、オーエックス3・9デーエス、オックスフォードシャー、オックスフォード、ジョン・ラドクリフ・ホスピタル、ウェスト・ウィング・アンド・ウェザーオール・インスティテュート・オブ・モルキュラー・メディシン、ホノラリー・コンサルタント・イン・イムノロジー・ニューロイムノロジー・グループ内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36 DA37 FB03

4C085 AA13 AA14 BB36 EE01 HH03 HH11 HH13 KA03 KA04 LL13

4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	神经性自身免疫性疾病		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012506555A</a>	公开(公告)日	2012-03-15
申请号	JP2011532726	申请日	2009-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	伊西斯井野湾化有限公司		
申请(专利权)人(译)	伊西斯Inobeishon有限公司		
[标]发明人	ビンセントアンジェラ		
发明人	ビンセント、アンジェラ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 C07K16/42 A61K39/395 A61P25/00 A61P9/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P35/00 A61K49/00 A61K51/00 C07K16/18		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/6896		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/15.Z G01N33/50.Z C07K16/42 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/00 A61P9/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P35/00 A61K49/00.A A61K49/02.A C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/LL13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	2008019634 2008-10-25 GB		
其他公开文献	JP5642687B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种诊断哺乳动物自身免疫性神经病症的方法，包括在哺乳动物的体液样品中检测至少一种Kv1复合蛋白的表位的自身抗体的步骤；和相关方法，测定试剂盒，分离或纯化的自身抗体或抗体片段，或其用途。

All patients	Lgi1	CASPR2	TAG-1	Accessory protein not yet identified
Total number	39	27	4	98
Thymic malignancies	0	10	0	1
Limbic encephalitis or epilepsy	30	7	1	21
Morvan's syndrome	2	10	0	0
Neuromyotonia	0	8	3	14
Other syndrome	1	2	0	3
VGKC-Ab negative	0	0	1	7

\*The majority were not currently-active

Figure 14