

【公報種別】公表特許公報の訂正  
【部門区分】第3部門第2区分  
【発行日】平成30年12月13日(2018.12.13)

【公表番号】特表2018-531248(P2018-531248A)

【公表日】平成30年10月25日(2018.10.25)

【年通号数】公開・登録公報2018-041

【出願番号】特願2018-517133(P2018-517133)

【訂正要旨】国際特許分類のXMLデータの誤載により下記のとおり全文を訂正する。

【国際特許分類】

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 38/17 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/564 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 39/00 Z

A 6 1 P 25/28

A 6 1 K 39/395 Y

A 6 1 K 38/17 1 0 0

G 0 1 N 33/53 N

G 0 1 N 33/564 Z

【記】別紙のとおり

(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2018-531248

(P2018-531248A)

(43) 公表日 平成30年10月25日(2018.10.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 Z	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Y	
<b>A 6 1 K 38/17 (2006.01)</b>	A 6 1 K 38/17 1 0 0	
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-517133 (P2018-517133)	(71) 出願人	501324834
(86) (22) 出願日	平成28年9月30日 (2016. 9. 30)		ザ・フェインスタイン・インスティテュー
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月30日 (2018. 5. 30)		ト・フォー・メディカル・リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/054651		The Feinstein Institute for Medical Research
(87) 国際公開番号	W02017/062270		アメリカ合衆国、ニューヨーク州、マンハ
(87) 国際公開日	平成29年4月13日 (2017. 4. 13)		セット、コミュニティ・ドライブ 350
(31) 優先権主張番号	62/237, 150		350 Community Drive
(32) 優先日	平成27年10月5日 (2015. 10. 5)		, Manhasset, NY 110
(33) 優先権主張国	米国 (US)		30, U. S. A.
		(74) 代理人	100110423
			弁理士 曾我 道治
		(74) 代理人	100111648
			弁理士 梶並 順
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 母性脳反応性抗体に対するおとり抗原を使用する自閉スペクトラム症の抑制

(57) 【要約】

母性脳反応性抗体に対するおとり抗原を使用する自閉スペクトラム症の診断方法並びに自閉スペクトラム症の治療方法及び予防方法。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であって、胎児を身ごもっている母親又は妊娠中で胎児が小児として産まれる前の母親に、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少のために有効な量の、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、内皮インテグリンリガンド(EDIL3)、IVD、脳特異的スルホトランスフェラーゼ(SULT4A1)、TNIP2、レチノイン酸誘導性タンパク質16(RAI16)又はGDP D5に対する抗体に結合する作用物質を投与することを含む、方法。

**【請求項 2】**

胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であって、胎児を身ごもっている母親(i)又は妊娠中で胎児が小児として産まれる前の母親(ii)の血液を、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少のために有効な量の、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、内皮インテグリンリガンド(EDIL3)、IVD、脳特異的スルホトランスフェラーゼ(SULT4A1)、TNIP2、レチノイン酸誘導性タンパク質16(RAI16)又はGDP D5に対する抗体に結合する作用物質と体外で接触させることで、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5に対する抗体の血中レベルを減少させ、こうして処理された血液を、前記母親に戻して再循環させることを含む、方法。

**【請求項 3】**

前記作用物質は、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の細胞外部分の配列を含むペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記作用物質は、KCNA B2に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記作用物質は、EDIL3に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記作用物質は、IVDに対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記作用物質は、SULT4A1に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記作用物質は、TNIP2に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記作用物質は、RAI16に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記作用物質は、GDP D5に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記作用物質は、KCNA B1に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記作用物質は、Caspr2に対する抗体に結合する、請求項1～3のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 13】

前記 Caspr2、KCNAB2、KCNAB1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5は、ヒトである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記作用物質は、Caspr2、KCNAB2、KCNAB1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の細胞外部分の配列を含むペプチドを含む融合タンパク質を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記融合タンパク質は、免疫グロブリンFc配列を更に含む、請求項14に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記免疫グロブリンは、IgGである、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記作用物質は、Caspr2、KCNAB2、KCNAB1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の細胞外部分の配列を含む血漿可溶性ペプチドを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記母親は、該母親の血液から試料を取得し、その試料中のCaspr2、KCNAB2、KCNAB1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5に対する抗体のレベルを定量し、こうして定量されたレベルを、それぞれの抗体の予め規定されたコントロールレベルと比較することを含む方法によって、その胎児において自閉スペクトラム症の危険性があると診断されており、ここで、コントロールレベルを上回る該試料中の抗体レベルが測定されることで、前記母親は、その胎児において自閉スペクトラム症の危険性があると診断される、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 19】

母親がその身ごもっている胎児において自閉スペクトラム症の危険性があると特定されたことを受けて、こうして特定された母親に前記量の作用物質を投与する初期工程を更に含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記方法は、胎児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であり、かつ前記量の作用物質は、胎児を身ごもっている母親に投与される、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記方法は、小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であり、妊娠中で胎児が小児として産まれる前の妊娠した母親に投与することを含む、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

妊娠見込みのある母親の胎児又は小児が自閉スペクトラム症を呈する可能性を判断する方法であって、その母親の血液から取得された試料中のCaspr2、KCNAB2、KCNAB1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の1種以上に対する抗体のレベルを定量し、各々の定量されたレベルを、それぞれの抗体について予め決められたコントロールレベルと比較することを含み、ここで、Caspr2、KCNAB2、KCNAB1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の1種以上に対する1種以上の抗体の高められた力価は、妊娠見込みのある母親の胎児又は小児が自閉スペクトラム症を呈する可能性が高いことを示すものである、方法。

40

【発明の詳細な説明】

50

**【技術分野】****【0001】****[関連出願の相互参照]**

本出願は、2015年10月5日付けで出願された米国仮出願第62/237,150号（その内容は引用することにより本明細書の一部をなす）の利益を主張するものである。

**【0002】****[政府支援の表明]**

本発明は、アメリカ国防総省により与えられた助成番号AR130137及びアメリカ国立衛生研究所により与えられた助成番号MH106195による政府支援によりなされたものである。アメリカ合衆国政府は、本発明に関し一定の権利を有する。

10

**【背景技術】****【0003】**

本出願全体にわたり、様々な特許及びその他の刊行物が、括弧内の番号によって参照される。参考資料の全引用は、本明細書の末尾に挙げられている。本明細書で参照されるこれらの参考文献並びに全ての特許文献、特許出願公報及び書籍の開示内容は、引用することによりその全体が本出願の一部をなし、こうして本発明の属する技術分野がより十分に記載される。

**【0004】**

自閉スペクトラム症（ASD）は、コミュニケーション及び社会的相互作用の困難さ、並びに常同行動を特徴とする神経発達症候群の1つの群である。2013年に、アメリカ疾病予防管理センターは、88人のアメリカ人の子供のうち1人がASDを患っており、その診断は、過去40年間で10倍に増えたと見積もっている。ASDの治療法は存在しないけれども、早期検知及び介入は、それに罹患している子供の認知能力及び言語能力を大きく改善することができる。

20

**【0005】**

本発明は、母性脳反応性抗体（maternal brain-reactive antibodies：移行脳反応性抗体）に対するおとり抗原（decoy antigens：デコイ抗原）を使用する自閉スペクトラム症の診断及び抑制的処置の必要性に取り組むものである。

**【発明の概要】**

30

**【0006】**

胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であって、胎児を身ごもっている母親又は妊娠中で胎児が小児として産まれる前の母親に、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少のために有効な量の、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、内皮インテグリンリガンド（EDIL3）、IVD、脳特異的スルホトランスフェラーゼ（SULT4A1）、TNIP2、レチノイン酸誘導性タンパク質16（RAI16）又はGDP D5に対する抗体に結合する作用物質を投与することを含む、方法が提供される。

**【0007】**

また、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であって、胎児を身ごもっている母親又は妊娠中で胎児が小児として産まれる前の母親の血液を、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少のために有効な量の、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、内皮インテグリンリガンド（EDIL3）、IVD、脳特異的スルホトランスフェラーゼ（SULT4A1）、TNIP2、レチノイン酸誘導性タンパク質16（RAI16）又はGDP D5に対する抗体に結合する作用物質と体外で接触させることで、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5に対する抗体の血中レベルを減少させ、こうして処理された血液を、母親に戻して再循環させることを含む、方法が提供される。

40

**【0008】**

50

また、妊娠見込みのある母親の胎児又は小児が自閉スペクトラム症を呈する可能性を判断する方法であって、その母親の血液から取得された試料中の Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の1種以上に対する抗体のレベルを定量し、各々の定量されたレベルを、それぞれの抗体について予め決められたコントロールレベルと比較することを含み、ここで、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の1種以上に対する1種以上の抗体の高められた力価は、妊娠見込みのある母親の胎児又は小児が自閉スペクトラム症を呈する可能性が高いことを示すものである、方法が提供される。

【0009】

本発明の更なる目的は、以下の記載から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】脳反応性モノクローナル抗体C6は、Caspr2に結合することを示す図である。(1A) tGFP-Caspr2を発現するHEK 293T生細胞上のCaspr2(真ん中のパネル)に、C6(左上のパネル)は結合するが、B1コントロール(左下のパネル)は結合しない。tGFPのみを発現する細胞又はトランスフェクションされていない細胞には染色は見られなかった(データは示さず)。(1B)脳反応性C6の、CNTNAP2-/-マウスの海馬中のCA1領域への結合の低下。

【図2】C6曝露された胎児における出生前の皮質異常を示す図である。(2A)ネスチン染色は、B1曝露された雄の脳と比較したC6での薄い皮質板(CP)を示している。(2B)雄の胎児脳及び雌の胎児脳におけるCP及びCP:皮質幅(CW)比。 $**P < 0.0001$ 、 $t = 7.15$ 、 $t$ 検定。(2C)PH3陽性染色は、C6曝露において有糸核分裂細胞がより少ないことを示している。矢印は、脳室帯(VZ)における神経発生領域を特定している。(2D)VZ、中間帯(IZ)及びサブプレート(SP)におけるPH3陽性の定量。単位面積 =  $62.5 \text{ mm}^2$ 。 $*P < 0.05$ 、 $Z = 2.34$ 、マン-ホイットニー検定。(B、D)マウス数: B1 = 5、C6 = 4、各々の抗体につき2匹の同腹子。(Males: 雄、Females: 雌)

【図3】C6曝露された雄のマウスにおける出生後の海馬CA1異常を示す図である。(3A~3E)C6曝露されたマウスのCA1錐体ニューロンは、樹状突起長さ及びスパイン密度の低下を示している。分析は、2週齢のマウス(1群あたり $n = 3$ );ニューロン: B1 = 45、C6 = 49、及び成体動物(1群あたり $n = 4$ );ニューロン: B1 = 70、C6 = 83を含む。各々の群は、2匹の同腹子由来の動物を含んでいる。(3A)2週齢(左)及び成体(16週齢~20週齢)(右)のB1曝露されたマウス及びC6曝露されたマウス由来の代表的なゴルジ染色されたCA1錐体ニューロンのトレース図。(3B)全分枝数の累積確率。2週齢のB1対C6、 $P < 0.003$ 、 $D = 0.35$ 、コルモゴロフ-スミルノフ(KS)検定;成体、 $P < 0.001$ 、 $D = 0.64$ 、KS検定。挿入図のボックスプロットは、全分枝数を、平均及び四分位数として示したデータで表している。(3C)シヨール解析は、樹状突起長さを、細胞体からの距離の関数として示している。左:2週齢のマウス、 $P < 0.005$ 、 $D = 0.44$ 、KS。右:成体マウス、 $P < 0.001$ 、 $D = 0.97$ 、KS検定。(3D)樹状体の起点から出発して終端に向かって続けて、該起点から通過した分節数として遠心的に定義された、分枝順序の関数としての樹状突起分枝数。C6曝露されたマウス及びB1曝露されたマウスは、両齢時に有意差がある:2週齢、 $P < 0.01$ 、 $D = 0.6$ 、KS検定;成体、 $P < 0.03$ 、 $D = 0.45$ 、KS検定。(3E)C6曝露されたマウスのCA1ニューロンにおけるシナプス樹状突起スパインの密度低下;B1 =  $1.18 \pm 0.04$ 個のスパイン/ $\mu$ ;C6 =  $0.92 \pm 0.02$ 個のスパイン/ $\mu$ ; $**P < 0.001$ 、 $t = 4.78$ 、 $t$ 検定。(3F)上方、標識されたPV陽性介在ニューロンを示すCA1野の代表的な顕微鏡写真。下方、成体B1( $n = 1251$ )群及びC6( $n = 998$ )群におけるPV陽性ニューロンの定量、 $**P < 0.001$ 、 $Z = 4.25$ 、マン-ホイットニー、1群あたり4匹の動

10

20

30

40

50

物、2匹の同腹子。

【図4】中核的なASD症状に似た課題におけるC6曝露された雄の子孫の能力低下を示す図である。母性抗体曝露された雄のマウスに、成熟期(10週齢~14週齢)に行動評価を行った。(4A)社会的選好性課題。左側の棒グラフ(物体)、C6曝露されたマウス( $n=15$ )は、B1群( $n=15$ )のマウスと同様の時間量にわたって新奇物体を調べる;右側の棒グラフ(社会性)、C6曝露されたマウスは、見慣れないマウスの近くで有意により短時間しか費やさず、それは社会的選好性の低下を示している; \*  $P < 0.005$ 、 $t = 3.2$ 、 $t$ 検定;1群あたり4匹~5匹の同腹子。(4B)ガラス玉覆い隠し課題。左側、2つの群における覆い隠しパターンの代表的な例。右側、C6曝露されたマウス( $n=14$ )は、B1群( $n=15$ )よりも多くのガラス玉を覆い隠しているので、高められた常同行動を示している; \* \*  $P < 0.0005$ 、 $t = 4.2$ 、 $t$ 検定;1群あたり4匹~5匹の同腹子。(4C)時計状迷路課題。左側のグラフは、迷路の中央から終端部に位置する出口へと逃避する潜時を示している。C6曝露されたマウス( $n=6$ )は、初期段階(出口11)においてB1曝露されたマウス( $n=11$ )と同様の行動を取るが、第二段階において、異なる位置を学習すると(出口7)機能しなくなる。右側の柔軟性の比率(「方法」において定義される)は、C6曝露されたマウスが、見慣れた出口から新しい出口に切り替える可能性が有意により低いことを示し、それは柔軟な学習の低下を示している; \*  $P < 0.02$ 、 $Z = 2.36$ 、マン-ホイットニー検定;1群あたり2匹~3匹の同腹子。

10

【図5】抗CASPR2モノクローナル抗体に曝露された胎児は、薄い皮質を有することを示す図である。抗CASPR2(上方)又は非脳反応性コントロール抗体(下方)を、妊娠マウス(E13.5)に注射し、胎児を36時間後に採取し、処理して、核(Dapi)、ネスチン又はその両方(重ね合わせ)を染色した。皮質の厚さは、白いバーで示されている。

20

【図6】ASDの子の母親からクローニングされた脳反応性モノクローナル抗体は、ASD様行動を引き起こすことを示す図である。抗CASPR2(栗色)又は非脳反応性コントロール抗体(黒色)を、妊娠マウス(E13.5)に注射し、子孫を、成熟期に社会的選好性(上方の柱状図)、運動異常(真ん中のグラフ)又は不安(下方の柱状図)について分析した。雄(左側のグラフ)の子孫はASD関連行動を示すが、雌(右側のグラフ)の子孫はASD関連行動を示さないことが指摘される。

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であって、胎児を身ごもっている母親又は妊娠中で胎児が小児として産まれる前の母親に、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少のために有効な量の、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、内皮インテグリンリガンド(EDIL3)、IVD、脳特異的スルホトランスフェラーゼ(SULT4A1)、TNIP2、レチノイン酸誘導性タンパク質16(RAI16)又はGDP D5に対する抗体に結合する作用物質を投与することを含む、方法が提供される。一実施形態においては、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16及びGDP D5は、それぞれヒトのCaspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16及びGDP D5である。上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の細胞外部分の配列を含むペプチドを含む。一実施形態においては、上記ペプチドは、全てDアミノ酸からできている。

40

【0012】

また、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少の方法であって、胎児を身ごもっている母親又は妊娠中で胎児が小児として産まれる前の母親の血液を、胎児又は小児における自閉スペクトラム症の抑制又は発生減少のために有効な量の、Cas

50

pr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、内皮インテグリンリガンド ( EDIL 3 )、IVD、脳特異的スルホトランスフェラーゼ ( SULT 4 A 1 )、TNIP 2、レチノイン酸誘導性タンパク質 1 6 ( RAI 1 6 ) 又は GDP D 5 に対する抗体に結合する作用物質と体外で接触させることで、Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 又は GDP D 5 に対する抗体の血中レベルを減少させ、こうして処理された血液を、母親に戻して再循環させることを含む、方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

体外で血液と接触させることを含む上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、担体に固定化されていてもよい。無菌条件において、血液を担体上又は担体中に流すことで、血液中の Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 及び / 又は GDP D 5 に対する抗体のレベルを減少させることができ、その後、その血液が母親に戻される。一実施形態においては、Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 又は GDP D 5 に対する抗体の血中レベルは、血液濾過によって低減される。一実施形態においては、Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 又は GDP D 5 に対する抗体の血中レベルは、血液吸着によって低減される。一実施形態においては、Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 又は GDP D 5 に対する抗体の血中レベルは、血漿濾過によって低減される。

10

20

【 0 0 1 4 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、KCNA B 2 に対する抗体に結合する。

【 0 0 1 5 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、EDIL 3 に対する抗体に結合する。

【 0 0 1 6 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、IVD に対する抗体に結合する。

【 0 0 1 7 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、SULT 4 A 1 に対する抗体に結合する。

30

【 0 0 1 8 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、TNIP 2 に対する抗体に結合する。

【 0 0 1 9 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、RAI 1 6 に対する抗体に結合する。

【 0 0 2 0 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、GDP D 5 に対する抗体に結合する。

40

【 0 0 2 1 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、KCNA B 1 に対する抗体に結合する。

【 0 0 2 2 】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、Caspr 2 に対する抗体に結合する。

【 0 0 2 3 】

上記方法の一実施形態においては、Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 又は GDP D 5 は、ヒトである。

50

## 【0024】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の細胞外部分の配列を含むペプチドを含む融合タンパク質を含む。

## 【0025】

上記方法の一実施形態においては、上記融合タンパク質は、免疫グロブリンFc配列を更に含む。上記方法の一実施形態においては、免疫グロブリンは、IgGである。上記方法の一実施形態においては、IgGは、IgG1である。上記方法の一実施形態においては、IgGは、IgG2である。上記方法の一実施形態においては、IgGは、IgG3である。上記方法の一実施形態においては、IgGは、IgG4である。上記方法の一実施形態においては、免疫グロブリンは、IgMである。

10

## 【0026】

上記方法の一実施形態においては、ここで使用される融合タンパク質は、免疫グロブリンの一部と、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16若しくはGDP D5の細胞外部分とから構築された融合タンパク質、又はそれと同一の配列を有するタンパク質を意味する。一実施形態においては、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5は、それぞれヒトのCaspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の配列を有する。一実施形態においては、免疫グロブリンの上記部分は、IgG又はIgMの一部である。一実施形態においては、その免疫グロブリンの上記部分は、IgGの一部である。上記融合タンパク質のIgG部は、例えば、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3若しくはIgG4又はそれらの一部のいずれかであってもよい。一実施形態においては、上記部分は、Fc配列(Fc領域全体の配列)である。一実施形態においては、上記融合タンパク質は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG2a、ヒトIgG2b、ヒトIgG3又はヒトIgG4のFc部と同一の配列を含む。一実施形態においては、上記融合タンパク質は、ヒトIgG1のFc部と同一の配列を含む。

20

## 【0027】

一実施形態においては、上記Fcドメインは、ヒトIgG1のFcドメインと同じ配列を有するか、又はヒトIgG1のFcドメインと95%以上の配列類似性を有する。一実施形態においては、上記Fcドメインは、ヒトIgG2のFcドメインと同じ配列を有するか、又はヒトIgG2のFcドメインと95%以上の配列類似性を有する。一実施形態においては、上記Fcドメインは、ヒトIgG3のFcドメインと同じ配列を有するか、又はヒトIgG3のFcドメインと95%以上の配列類似性を有する。一実施形態においては、上記Fcドメインは、ヒトIgG4のFcドメインと同じ配列を有するか、又はヒトIgG4のFcドメインと95%以上の配列類似性を有する。一実施形態においては、Fcドメインは、変異されていない。一実施形態においては、Fcドメインは、中性のpHではなく酸性のpHでのIgGのFcRnに対する親和性を高めるために、CH2-CH3ドメイン境界域で変異されている。

30

40

## 【0028】

上記方法の一実施形態においては、融合タンパク質は、ヒト免疫グロブリンFc配列と同じ配列を有する免疫グロブリンFc配列を含む。免疫グロブリンFc配列は、当該技術分野で良く知られている。一実施形態においては、本明細書での用語「Fc配列」は、本来の配列のFc領域及び多様体のFc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc配列の境界は変動し得るが、ヒトのIgG重鎖Fcは、通常はCys226位又はPro230位のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで広がるものと定義される。一実施形態においては、FcのC末端リジンは、例えば生成若しくは精製の際に、又は抗体の重鎖をコードする核酸の組換え操作によって取り除かれ得る。

50

## 【0029】

融合タンパク質において、Fcドメインの存在は、結合されたタンパク質の血漿内半減期を著しく高め、それにより治療活性が延長される。さらに、Fcドメインは、融合タンパク質がFc受容体と相互作用することも可能にする。一実施形態においては、上記融合タンパク質は、Fcドメインに連結されたCaspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の部分を含む。一実施形態においては、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の部分は、Fcドメインへとペプチド結合によって直接結合される。上記方法の一実施形態においては、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の部分は、Fcドメインにリンカーを介して連結されている。一実施形態においては、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の部分は、細胞外部分である。一実施形態においては、その部分は、可動性を可能にするペプチドリリンカーを介して連結される。一実施形態においては、リンカーは硬直性である。一実施形態においては、リンカーは開裂可能である。本発明の範囲内の可動性リンカーの例は、限定されるものではないが、Gn、及びGGGS、及び(GGS)nであり、ここで、n=2、3、4又は5である。本発明の範囲内の硬直性リンカーの例は、限定されるものではないが、(EAAAK)n、(XP)nである。本発明の範囲内の開裂可能なリンカーの例としては、限定されるものではないが、ジスルフィド結合及びプロテアーゼ開裂可能なリンカーが挙げられる。好ましい一実施形態においては、上記リンカーは、ペプチドリリンカーである。

10

20

## 【0030】

本明細書に記載される融合タンパク質のFc配列は、変異されていてもよい。好ましい実施形態は、K322A及びN297DのヒトIgG1のKabataナンバリングを含む。変異K322A及びN297Dは、制限(低減)された経胎盤移行を示した。変異K322Aは、Fcのアミノ酸の標準的なKabataナンバリング75-53、K322A、HC1fを基礎としており、322位のリジンがアラニンに変異されている。変異N297Dは、Fcのアミノ酸の標準的なKabataナンバリング75-53、N297D、HC1fを基礎としており、297位のアスパラギンがアスパラギン酸に変異されている。それに対して、P329A(329位のプロリンのアラニンへの変異)は、胎児性Fc受容体(FcRn)結合において、試験抗体、例えばAQP4 IgGと同じ経胎盤移行を示した。

30

## 【0031】

一実施形態においては、本明細書に記載される融合タンパク質は、組換えにより製造される。一実施形態においては、融合タンパク質は、真核細胞発現系において製造される。一実施形態においては、真核細胞発現系において製造される融合タンパク質は、Fc部の残基にグリコシル化を含む。

## 【0032】

一実施形態においては、融合タンパク質は、ホモ二量体である。一実施形態においては、融合タンパク質は、単量体である。一実施形態においては、融合タンパク質は、多量体である。

40

## 【0033】

上記方法の一実施形態においては、上記作用物質は、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の細胞外部分の配列を含む血漿可溶性ペプチドを含む。

## 【0034】

上記方法の一実施形態においては、母親又は胎児は、該母親の血液から試料を取得し、その試料中のCaspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5に対する抗体のレベルを定量し、こ

50

うして定量されたレベルを、それぞれの抗体の予め規定されたコントロールレベルと比較することを含む方法によって、その胎児において自閉スペクトラム症の危険性があると診断されており、ここで、コントロールレベルを上回る該試料中の抗体レベルが測定されることで、母親又は胎児は、その胎児において自閉スペクトラム症の危険性があると診断される。

#### 【0035】

一般に、作用物質（例えば、治療剤、組成物及び／又は製剤、例えば該作用物質又は該作用物質を含む組成物）の「有効な」量は、規定の効果を達成し、所望の生物学的応答を惹起するのに有効な量である。幾つかの実施形態においては、或る物質の治療的有效量は、妊娠した母親に投与される場合に、その妊娠した母親の胎児又はその妊娠した母親から産まれた小児における自閉スペクトラム症の可能性又は程度の低下のために十分な量である。当業者に明らかであるように、或る物質の有効量は、所望の生物学的終点、送達されるべき物質、その化合物の薬物動態、標的細胞又は標的組織、治療される疾患、投与方式及び患者等のような要因に応じて変動し得る。例えば、疾患、疾病及び／又は病態の治療のための組成物及び／又は製剤の有効量は、上記疾患、疾病及び／又は病態の1つ以上の症状又は特徴を緩和する、改善する、軽減する、抑制する、予防する、その発症を遅延する、その重症度を低下させる、及び／又はその発生率を低下させる量である。通例、有効量は、一連の個々の用量全体を通じて投与されることを当業者であれば理解するであろう。幾つかの実施形態においては、医薬的な内容で使用される場合の用語「有効量」（例えば、医薬的有效量）は、或る作用物質が、所望の治療効果を達成するのに十分な量で存在することを意味する。

10

20

#### 【0036】

本発明の方法によって包含される母親への投与経路には、限定されるものではないが、以下の、耳内投与、頬部投与、結膜投与、皮膚投与、皮下投与、子宮頸部投与、洞内投与、気管内投与、腸内投与、硬膜外（epidural）投与、血液透析による投与、間質内投与、腹部内投与、羊膜内投与、動脈内投与、関節内投与、胆管内投与、気管支内投与、卵巣被膜内（intrabursal）投与、心臓内投与、軟骨内投与、仙骨内投与、空洞内投与、腔内投与、大脳内投与、槽内投与、角膜内投与、冠動脈内投与、皮内投与、椎間板内投与、管内（intraductal）投与、表皮内投与、食道内投与、胃内投与、膈内投与、歯肉内投与、回腸内投与、管腔内投与、病巣内投与、リンパ内投与、髄内投与、髄膜内投与、筋内投与、眼内投与、卵巣内投与、心外膜内投与、腹腔内投与、胎盤内投与、胸膜腔内投与、前立腺内投与、肺内投与、副鼻腔内（intranasal）投与、脊髄内投与、滑膜内投与、腱内投与、精巣内投与、鞘内投与、胸腔内投与、尿細管内（intratubular）投与、腫瘍内投与、鼓膜内投与、子宮内投与、血管内投与、静脈内投与、心室内投与、膀胱内投与、硝子体内投与、喉頭内投与、鼻内投与、経鼻胃投与、眼投与、経口投与、口腔咽頭投与、非経口投与、経皮（percutaneous）投与、関節周囲投与、硬膜外（peridural）投与、直腸投与、吸入投与、眼球後投与、くも膜下投与、結膜下投与、舌下投与、粘膜下投与、局所投与、経皮（transdermal）投与、経粘膜投与、経胎盤投与、経気管投与、尿管投与、尿道投与及び膈投与の個々の経路及びその任意の部分集合のそれぞれが含まれる。

30

40

#### 【0037】

上記方法の一実施形態においては、上記方法は、母親がその身ごもっている胎児において自閉スペクトラム症の危険性があると特定されたことを受けて、こうして特定された母親に上記量の作用物質を投与する初期工程を更に含む。母親がその身ごもっている胎児において自閉スペクトラム症の危険性がないと特定される一実施形態においては、その母親には上記量の作用物質は投与されない。

#### 【0038】

また、妊娠見込みのある母親の胎児又は小児が自閉スペクトラム症を呈する可能性を判断する方法であって、その母親の血液から取得された試料中の Caspr 2、KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6 又は GDP D 5 の1種以上に対する抗体のレベルを定量し、各々の定量されたレベルを、そ

50

それぞれの抗体について予め決められたコントロールレベルと比較することを含み、ここで、Caspr2、KCNA B2、KCNA B1、EDIL3、IVD、SULT4A1、TNIP2、RAI16又はGDP D5の1種以上に対する1種以上の抗体の高められた力価は、妊娠見込みのある母親の胎児又は小児が自閉スペクトラム症を呈する可能性が高いことを示すものである、方法が提供される。

【0039】

本明細書で使用される場合に、予め決められたコントロールレベルは、通常は事前にコントロールとして決定又は取得された値である。コントロールの概念は、当該分野では十分に確立されており、限定されるものではないが、一例として、罹患していない被験体から（罹患した被験体に対して）実験的に決定することができ、かつ（限定されるものではないが、例として、容積、質量、年齢、部位、性別が）1つ以上の変数の効果を打ち消すのに望ましいように正規化され得る。

10

【0040】

上記方法の一実施形態においては、被験体はヒトである。

【0041】

本明細書中に記載される様々な要素の全ての組合せは、本明細書中に別段の指示がない限り又は文脈によってはっきりと否定されない限り本発明の範囲内である。

【0042】

本発明は、続く実験の詳細からより理解されるであろう。しかしながら、当業者は、論じられる具体的な方法及び結果が、添付の特許請求の範囲により完全に記載される本発明の例示に過ぎないことを容易く認識するであろう。

20

【0043】

実験結果

序論

自閉スペクトラム症（ASD）は、67件の出生のうち1件に起こり、支障を来すほどの金銭的費用及び感情的なコストをもたらす。病理生物学的メカニズムの理解の進展により、ASD発生において母性脳反応性抗体が関係づけられている。

【0044】

母性抗体は、胎児脳に入ることができ（7）、脳反応性抗体は、胎児脳の発達に影響を及ぼすことがあり、子孫において認知機能障害を引き起こすことがある（8）。本研究所及びその他の研究所は、ASDの子の母親が、任意抽出した妊娠可能年齢の女性又は定型発達している子の母親と比較して、脳抗原に対して反応性である循環抗体をかなり多く有していることを実証した（9、10）。血清又は選択された脳抗原特異抗体の妊娠マウス又はサルへの静脈内投与は、子孫において神経発達欠陥及び行動欠陥を引き起こす（11、12）。

30

【0045】

このメカニズムの理解には、モノクローナル抗体の単離及び研究、並びに特異的な脳抗原性の特定が必要とされる。AMPA受容体及びNMDA受容体の膜安定性に必要とされるKv1カリウムチャネルの構成要素であるコンタクチン関連タンパク質様2（Caspr2）に結合する、モノクローナル抗体（C6と呼称される）が単離された。これらの特異抗体の高められた力価が、ASDの子の血清陽性の母親に観察された。ASDへの上記抗体の寄与を裏付けるために、マウスを子宮内で母性C6に曝露した。これは、異常な皮質発達と共に、雄の子孫の海馬における抑制性ニューロンの減少及び興奮性ニューロンの樹状突起複雑性の低下、それと関連して社会的選好性、柔軟な学習の低下、及び反復行動の増加を媒介した。これらの結果は、母親の循環中のモノクローナル抗体が、ASDと関連した脳の異常を媒介し得ることを裏付けている。

40

【実施例】

【0046】

実施例1

ASDの子の母親の、事前に脳反応性ポリクローナル抗体を有することが分かっている

50

血液試料から、モノクローナル抗体を作製した。これらの血液試料は罹患した子供の出生の何年も後に取得されたので、ヒト胎児脳溶解物中に存在する抗原に対して反応性であったメモリー（CD27陽性）B細胞に着目した。これらの細胞の検出を可能にするために、ヒト胎児脳溶解物の断片をビオチン化し、B細胞と一緒にインキュベートした。胎児脳の断片に結合した、ストレプトアビジン結合によって検出された個々のCD19陽性CD27陽性B細胞を単離した。免疫グロブリンの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子を、PCRによって増幅させ、ヒト胚腎細胞（HEK 293）においてIgG1 - 抗体として*in vitro*で発現させた（13）。

#### 【0047】

免疫組織学アッセイ（9）において5 µg/mlでマウス脳に結合した幾つかの抗体を同定した。これらの抗体の抗原特異性を測定するために2つのプラットフォームを使用した：9000種のタンパク質を含むヒト抗原アレイ（Invitrogen社）及びASDにおいて重要であることが以前に示された抗原に対する反応性のための細胞ベースのアッセイ。電位開口型Kv1カリウムチャネルの成分であるCaspr2（図1A）の細胞外部分に結合するC6と呼称されるモノクローナル抗体を調査した（14）。Caspr2は、ニューロンの細胞膜上のチャネルを安定化する膜貫通型タンパク質である（15）。Caspr2は、細胞体、軸索、及び樹状突起スパインに存在し（14、16）、その脳内での発現は、胎児発達の間に始まる〔（14、17）においてもデータは示されず〕。

#### 【0048】

免疫組織化学分析により、C6の野生型マウスの脳切片への結合は、Caspr2をコードする遺伝子であるCNTNAP2の欠失を伴うマウスの脳切片と比較して有意に増大することが明らかとなり（図1B）、そのCaspr2に関する特異性が確認された。重要なことには、C6が取得された女性の血清は、CNTNAP2 - / - マウス脳への結合の減少を示したが、それが存在しないわけではなかった。

#### 【0049】

C6モノクローナル抗体の病原性を調べるために、該抗体を、抗体が胎盤を通過して、まだ胎児脳組織に入ることができ（7）、かつCaspr2が脳内で転写される（14、17）時点である妊娠のE13.5日に雌のマウスに静脈内（200 µg）投与した。コントロールとして、胎児脳発達に影響を及ぼさないことが以前に示された（18）ヒトモノクローナル抗体であるB1を使用した。C6への最初の曝露から2日後に屠殺された母親からの雄の胎児は、薄くなった皮質板を示した。この異常は、雌の胎児では観察されず、またB1に曝露された雄又は雌の胎児にも見られなかった（図2A、図2B）。産後における雄の皮質板が雌の皮質板よりも厚いことを示す以前の報告（19）と一致して、B1抗体に曝露された雌の胎児と比較して雄においてより厚い皮質板が観察された。C6に曝露された雄の胎児は、B1に曝露された雄の胎児と比較して、発達中の皮質において有糸核分裂細胞の減少も示した。この異常は、C6曝露された雌の胎児では観察されなかった（図2C、図2D）。

#### 【0050】

C6又はB1への子宮内での曝露を経験した雄のマウスの脳を、16週齢～20週齢の時に分析した。クレシルバイオレット染色された脳切片の評価では、脳構造における主要な変化は示されなかった。より高解像度の分析により、C6曝露されたマウスの海馬ニューロンが、B1曝露されたマウスの海馬ニューロンよりも少ない樹状突起及び樹状突起スパイン、並びにより少ない樹状突起分枝を示すことが実証された（図3A～図3E）。海馬CA1ニューロンは、約4週齢までは完全に発達しておらず、その時間の前には該ニューロンは、より少ない樹状突起長さ及び分枝を有している（20）。構造的病変の時間的経過を評価するために、2週齢のマウスにおいてCA1ニューロンを調査した。B1曝露された2週齢のマウス由来のCA1ニューロンは、B1曝露された8週齢のマウスと比べて未熟な樹状突起構造を示した。C6曝露された2週齢のマウスは、より少ない先端樹状突起分枝を示し、C6曝露された成体マウスは、B1曝露された2週齢のマウスと同じ分枝数を示している（図3B～図3D）。興味深いことに、培養されたニューロンにおける

10

20

30

40

50

Caspr2のダウンレギュレーションは、*in vitro*で樹状突起の減少をもたらす(21)。

【0051】

またC6又はB1に子宮内で曝露された雄の成体マウスのGABA作動性のパルブアルブミン陽性(PV陽性)ニューロンを染色した。PV陽性ニューロンの減少が、C6曝露された雄のマウスの海馬のCA1領域において観察され(図3F)、それは、CNTNAP2-/-マウスが、海馬におけるGABA作動性のPV陽性介在ニューロンの数の20%の減少を示すという報告と一致している。

【0052】

C6への子宮内での曝露の行動への潜在的な効果を調べるために、子宮内でC6又はB1に曝露されたマウスを、成体として、ASDの中核的な症状に着目する様々な課題において研究した(22)。C6曝露されたマウスはどちらの性別も、病的行動、又は体重、毛並み、握力強度、身体の感触若しくは反射、自発歩行(*unsupervised locomotion*)における変化( $P > 0.4$ 、*t*検定  $n = 17$ 、5匹の同腹子)、又はオープンフィールド試験で測定された不安( $P > 0.8$ 、ANOVA  $n = 17$ 、5匹の同腹子)を示さなかった。

【0053】

C6に曝露された雄のマウスは、社会的選好性試験において、別のマウスの近くで有意により短時間しか費やさないが、新奇物体の近くで、B1曝露されたマウスと同様の時間を費やした(図4A)。さらに、C6曝露されたマウスは、常同行動又は脅迫行動を調べるガラス玉覆い隠し試験において、B1曝露されたマウスよりも有意により多くのガラス玉を覆い隠した(図4B)。またそれらのマウスは、時計状迷路において新しい出口の位置の学習の点で機能しなかったが、初期課題においては通常の学習を示し、それにより柔軟な学習における欠陥が示される(図4C)。それに対して、子宮内でC6又はB1に曝露された雌の子孫のいずれも、全ての課題において同等の動作をし、こうして、雌の胎児脳に対して抗体が効果を示さないという組織学的な発達データが裏付けられた。

【0054】

ASDの子を持つ女性の集団におけるこの特異性を有する抗体の頻度を測定するために、脳反応性血清学(9)を有することが以前に示されたASDの子の母親からの血漿を調べた。血漿試料の37%(53件のうち20件)が、Caspr2をトランスフェクションさせたHEK293T細胞の透過処理されていない細胞膜に結合したが、一方で、脳反応性抗体を欠いたASDの子の母親からの試料の12%だけ(63件のうち8件)だけがそのような反応性を示し、任意抽出した妊娠可能年齢の女性からの試料の12%(51件のうち6件)がそのような反応性を示した( $P < 0.001$ 、カイ二乗検定)。

【0055】

これらの結果は、ASDの子の幾らかの母親が、*in vivo*で胎児の脳抗原に結合する抗体を発現することを直接的に立証している。Caspr2に関する特異性を有するC6は、異常な胎児脳発達を媒介し、長期の行動障害をもたらす。胎児の血液-脳関門は抗体を通すので(7)、母親の血液中に存在する病原性自己抗体は、母親に検出可能な疾患が存在しない場合でさえも脳の発達に影響を及ぼすことがある。母性抗体が胎児脳発達と共に長期の認知効果に影響を及ぼすというこのパラダイムは、全身性エリテマトーデスにおいて既に報告されており(18、23)、その場合には、子宮内でのNMDA受容体反応性自己抗体への曝露により、異常な胎児脳発達及び永続的な神経認知欠損がもたらされた(18)。

【0056】

Caspr2をコードする遺伝子であるCNTNAP2の稀な多様体は、ASDと関連している(24)。Caspr2をコードする遺伝子であるCNTNAP2の変異型を有する家系は、てんかん(25)、強迫行動(26)及び脳における様々な性別依存性の構造的異常(27)を示す。CNTNAP2の欠失を有するマウスは、神経細胞移動の中断、阻害的GABA作動性ニューロンの損失、並びにマウスにおいてASD様表現型を表す

10

20

30

40

50

とみなされる行動的特徴、例えば活動過剰、常同行動、モリスの水迷路における柔軟な学習の低下、及び社会的選好性異常を示す(17)。発達の際に、Caspr2は、脳室増殖帯において高度に発現され(14、17)、Caspr2を欠くマウスは、神経細胞移動障害を示す。興味深いことに、皮質厚さの変化だけでなく、ニューロン充填の低下(28)が、ASDにおいて観察された。皮質の薄化及び増殖細胞数の低下は、一過性軸索糖タンパク質-1(TAG1)として知られる、Caspr2と共存し(15)かつ皮質において増殖しているニューロンの移動の役割を担う別のタンパク質によって間接的に媒介される可能性がある。

#### 【0057】

子宮内でC6に曝露された成体マウスが、海馬において樹状突起分枝の減少を示すことも分かった。そのデータは、成熟期においてこれらのマウスが、2週齢の時のB1コントロールマウスと同様のレベルの樹状突起複雑性を示すことを示唆している。海馬におけるGABA作動性PV陽性ニューロンの減少も観察された。並行して、社会的選好性及び柔軟な学習において欠陥が観察され、常同行動の増加が観察された。これらの行動は、皮質線条体回路に介入することが認識されており、海馬入力の影響を受けやすい(29、30)。

10

#### 【0058】

C6抗体に子宮内で曝露された雄のマウスだけが神経発達異常を示すという事実は、ASDにおける強い雄への偏り(31)を考えると特に興味深い。本発明者らは、ASDのマウスモデルにおける性差に取り組んだその他の報告を一切認識していない。それにもか  
かわらず、男性は、ヒトの家系におけるCNTNAP2と言語発達障害との間の連鎖関連  
における重要な要因であった(24)。Caspr2特異性を有する抗体は、ASDの子  
の母親において頻度が高いと思われる。

20

#### 【0059】

##### 実施例2

独自のヒト血液リソース(サイモン・シンプレックス・コレクション、自閉症遺伝学的リソース、及びファインスタイン医学研究所のGAP登録)を利用して、抗脳抗体の頻度が、コントロール群(2%、 $p < 0.0001$ )と比較してASDの子の母親の血液において有意により高い(11%)ことを実証した。脳反応性モノクローナル抗体を同定し、単細胞をASDの子の母親からクローニングした(セルソーティングされたメモリーB細胞由来のIgGドメインの単細胞発現クローニング)。簡潔には、末梢血から単離されたB細胞を、ビオチンで事前に標識されたヒト胎児脳溶解物と一緒にインキュベートし、そしてB細胞-脳抗原複合体を、アビジンクロマトグラフィーを使用して単離した。血液は、ASDの子をもたらした妊娠から何年も後に取得されたので、記憶コンパートメントにおけるB細胞だけに重要性がおかれるものと推論された。幸いにも、そのようなメモリーB細胞は、ヒトにおいては何年から何十年にもわたり存続するため、何年も前に起こった妊娠の間に存在していたかもしれない自己反応性における機会を与えることができる。したがって、後続工程で蛍光マーカー及びフローサイトメトリーを使用して、個々のメモリーB細胞を単独のウェル中にソーティングした。Nussenzweigらによって初めて記載された技術を使用して、IgG重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を、ヒト構築物中にクローニングした(34)。次いでこれらのシーケンシングを行い、発現のためにHEK293T細胞中に同時トランスフェクションさせた。脳に対する免疫反応性を、胎児マウス脳及び成体マウス脳に免疫組織化学を用いて検証し、関心が持たれるモノクローナル抗体を発現させ、プロテインGクロマトグラフィーで精製した。20種の脳反応性モノクローナル抗体のライブラリを作製した。メモリーB細胞の選択と一致して、これらのモノクローナル抗体のほとんどは、胚中心反応により成熟されて、メモリー細胞コンパートメントに入ったB細胞の特徴である可変領域の大規模な体細胞超変異を含む。推定抗原は、プールされた抗原調製物を全長ヒトタンパク質アレイでスクリーニングした後に、抗体の選択のためにイムノプロットを行うことによって同定した。

30

40

#### 【0060】

50

20種のそのような脳反応性モノクローナル抗体のうち、8種の抗体が、神経変性疾患に關与することが知られるターゲット（KCNA B 2、KCNA B 1、EDIL 3、IVD、SULT 4 A 1、TNIP 2、RAI 1 6又はGDP D 5）に対して反応することが測定された。これらの8種の推定抗原のうち、全てが神経変性疾患に關与するタンパク質に存在し、そして4種は、単一のタンパク質複合体であるカリウム電位開口型チャネルのサブユニットに存在する（2種のモノクローナル抗体はKCNA B 1に結合し、2種のモノクローナル抗体はKCNA B 2に結合する）。さらに、配列解析は、2種の抗KCNA B 2抗体が同一の重鎖を利用することを示している。これらの知見は、kcna b 2遺伝子がゲノムワイド関連解析（GWAS）においてASDと関連付けられたので、特に興味をそそられるものである。

10

#### 【0061】

E13.5日目の妊娠マウスに静脈注射する場合に、1種のヒト抗KCNA B 2モノクローナル抗体は、雌の子孫ではなく雄の子孫において異常な皮質発達をもたらし、かつ行動異常を引き起こす。これらの研究のために、その妊娠マウスは、ASDとの関連性が関連付けられた脳構造が形成されている発達段階である13.5日齢の胎児をはらんでいた。抗体投与の36時間後に解析されたときに、非脳反応性コントロールIgGが注射されたマウスからの胎児は、正常な組織学を示した。それに対して、抗KCNA B 2のIgGであるC6が注射されたマウスの胎児は、抗体が胎児脳に入ると一致して、異常に薄い脳皮質層を示した（図5）。この時間窓での並行したホスホヒストン3染色は、抗KCNA B 2抗体に曝露された胎児において有意により少ない有糸核分裂細胞を示している（示さず）。最後に成体（10週齢～14週齢）として解析した場合に、非脳反応性コントロールIgGが注射された妊娠マウスからの雄及び雌の両方の子孫は、様々なマウスASD行動表現型アッセイ（例えば、不安、運動、社会性；図6）を使用して評価した場合に正常な行動を示した。際だったことに、抗KCNA B 2のIgGが注射されたマウスの成体の子孫に対して並行して行われた行動アッセイにより、性別特異的な異常が明らかになった。雌（図6の右側）の子孫ではなく雄（図6の左側）の子孫だけが、全ての3回の標準的ASD行動アッセイ（社会的選好性、ロータロッド及びオープンフィールド）においてASD関連行動を示す。ASDが選択的に雄の子に罹ることを考えれば、これらのマウスにおける性別特異的な行動異常は、特に興味深い。

20

#### 【0062】

##### 方法

調査被験体： ASDの子を持つ母親からの血漿を、サイモン・シンプレックス・コレクション（SSC、[sfari.org/resources/simons-simplex-collection](http://sfari.org/resources/simons-simplex-collection)）から取得した（35）。妊娠可能年齢の女性からのコントロール血漿を、ノース・ショア・L I J・ヘルス・システムの臨床研究所及びファインスタイン医学研究所の登録（[www.gapregistry.org](http://www.gapregistry.org)）における参加者から取得した。両方のコホートは、以前（36）に記載されたものとした。全ての個人から、適切な治験審査委員会を通じてインフォームドコンセントを得た。

30

#### 【0063】

試料採取： 血液は、事前に脳反応性抗体を有すると特定されたSSCに登録された同意した母親からヘパリン化チューブ中に採取された（36）。そのプロトコルは、SSCのみならず、ファインスタイン医学研究所の治験審査委員会によっても承認された。

40

#### 【0064】

シングルセルソーティング： 単一のヒト脳反応性メモリーB細胞の単離を、以前（37）に記載された通りであるが幾つかの変更を加えて実施した。B細胞を、新鮮な単核細胞から、B cell kit（StemCell Technology社）を使用してネガティブセレクションによって精製した。次いでそれらのB細胞を、EZ-Link Sulfo-NHS-ビオチン標識キット（Life Technologies社）を使用してビオチンで標識されたヒト胎児脳溶解物（1mlあたり3mg、Nouvus社）と一緒に室温（RT）で30分間にわたりインキュベートした。ビオチン化された脳抗原が結合した細胞を、ビオチン選択キット

50

(StemCell Technologies社)で単離し、FITC結合抗ヒトCD19、フィコエリトリン(PE)結合抗ヒトCD27及びアロフィコシアニン(APC)ストレプトアビジンで染色することで、CD19陽性CD27陽性脳溶解物陽性メモリーB細胞の分離が可能となった。コントロールとして、非脳反応性であると最初に特定された画分を、ビオチン化された脳抗原と一緒にインキュベートして、上記のように染色した。この画分においては、APC陽性細胞は検出されなかった。最後に、CD19陽性CD27陽性APC陽性単細胞を、BD FACSAriaにおいて(38)に記載されるようにして単離した。

【0065】

cDNA合成及びRT-PCR: 個々のIGH鎖(のみ)及びIGL鎖(k又はl)のcDNA合成を、以前(37、38)に記載されたように実施した。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子を、IGG1又はk定常領域を含むプラスミド(ニューヨーク州のロックフェラー大学のM.Nussenzweig氏による寄贈)中にライゲーションした。

10

【0066】

抗体産生: 抗体は、*in vitro*で、以前(38)に記載された通りであるが、少し変更を加えて発現させた。簡潔には、重鎖プラスミド及び軽鎖プラスミドの両方でトランスフェクションする24時間前に、ヒト胚腎臓線維芽細胞293T(HEK-293T)の細胞を、100mm×20mmの培養皿中に、熱不活性化仔ウシ血清(FBS、10%)、グルタミン(1%)及びペニシリン-ストレプトマイシン(1%、HyClone、GE Healthcare社)を補った高グルコースDMEM(HyClone、GE Healthcare社)中に継代した。引き続き、トランスフェクションの8時間前に、その培地を、グルタミン(1%)及びペニシリン-ストレプトマイシン(1%)を補ったSFM4Transfx-293(HyClone、GE Healthcare社)に変更した。次いで細胞を、リポフェクタミン2000(Life Technologies社)を使用して、IGH鎖及びIGL鎖をコードするプラスミドDNA(5µg)で同時トランスフェクションさせた。培養7日後に上清を回収した。抗体を、プロテインG-セファロース(GE Healthcare社、Life Technologies社)において精製し、グリシンバッファー(0.1M、pH3.5)で溶出させ、そしてTris-HCl(1M、pH8)中で中和した。上清中の抗体濃度を、抗ヒトIGG ELISA(37、38)によって測定した。精製された抗体を、大量のPBSに対して透析し、それらの完全性を、クーマシーブルーで染色された非還元でのSDSゲルによって調べ、それらの濃度を、抗ヒトIGG ELISA(37、38)及びNanodropの両方によって測定した。

20

30

【0067】

トランスフェクションされたHEK-293T細胞を使用する結合アッセイ: 血漿並びにヒトモノクローナル抗体C6及びB1(39)を、以前(40)に記載されたように生細胞ベースの免疫蛍光アッセイを使用してCaspr2に対する結合について分析した。HEK-293T細胞を、Tgfp-Caspr2ベクター又はTgfpベクター(Origene社)を使用してトランスフェクションさせ、そして72時間にわたり培養した。細胞を、C6又はB1(PBS/10%FBS中1mlあたり10mg)で染色した。Caspr2でトランスフェクションさせた細胞への抗体結合を、Alexa594結合ヤギ抗ヒトIGG(Life Technologies社)によって検出した。血漿内での抗Caspr2抗体の存在について試験するために、細胞を、PBS及びFCS(10%)中のヤギIGG(Sigma-Aldrich社)でブロッキングし、吸着処理済み(ウサギ肝臓粉末、Sigma-Aldrich社)血漿試料(希釈1:100及び1:200)と一緒にインキュベートした。IGG結合を、Alexa594結合ヤギ抗ヒトIGG(Life Technologies社)を用いて検出した。死細胞を、DAPI染色(Sigma-Aldrich社)で可視化し、生細胞を、Caspr2-IGG結合について分析した。市販の細胞外エピトープに対する抗Caspr2抗体(NeroMab UC Davis社、カリフォルニア州)を、ポジティブコントロールとして取り扱った。細胞質エピトープに対する抗Caspr2抗体(Abcam社)を、ネガティブコントロールとして取り扱った。tGFPベクターでトランスフェクションさせた細胞及びトランスフェクションされていない細胞もコントロールとして取り扱った。

40

50

## 【0068】

Caspr2タンパク質発現： 胚脳及び胎盤を採取し、そして直ちに液体窒素中で凍結させ、貯蔵（-80℃）した。脳及び胎盤を、ショ糖（0.32M）、HEPES（10mM）、EDTA（2mM）、並びにプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤（Fisher Scientific社）を含有する氷冷均質化バッファー中で均質化し、次いで均質化された脳を15分間にわたり遠心分離（1000×g）した。上清を回収し、200000×gで再び遠心分離した。ペレットをバッファー中で再懸濁し、200000×gで再び遠心分離した。最後に、ペレットを、溶解バッファー（20mMのTris-HCl pH8、137mMのNaCl、10%のグリセロール、1%のNP-40、2mMのEDTA）中で再懸濁し、貯蔵（-80℃）した。タンパク質濃度を測定するために、試料を、Compat-Ab1e（商標）タンパク質アッセイ調製試薬キット（Thermo scientific社）で処理し、BCAタンパク質アッセイキット（Thermo scientific社）によってアッセイした。脳及び胎盤の膜溶解物を、NuPAGE（Invitrogen社）を使用してSDS-PAGE電気泳動に供し、PDVFメンブレンに転写した。メンブレンを、ブロッキングバッファー（4%のミルク、0.1%のPBS-Tween）中にて室温で1時間にわたり染色し、引き続き、抗Caspr2モノクローナル抗体（Abcam社）（ブロッキングバッファー中1:500）と一緒に4℃で一晩インキュベートした。メンブレンを、抗ウサギIR Dye 680CWで染色し、Odyssey Infrared Imaging System（LI-COR Biosciences社）を使用して可視化した。ナトリウムカリウムATPアーゼを、抗体（Abcam社、1:10,000）によって検出し、ローディングコントロールとして使用した。二次抗体単独は、結合を示さなかった。

10

20

## 【0069】

Caspr2のRNA発現： トータルRNAを、脳及び胎盤からRNeasy kit（Qiagen社）を用いて抽出し、iScript cDNA合成キット（Bio-Rad社）を用いて逆転写させた。cDNAを、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）によってLightCycler 480マスターミックスと共にTaqManプロンプを用いて、マウスCNTNAP2及びPolr2A（Applied Biosystems社、Thermo Fisher Scientific社）について分析した。データは、Polr2Aに対して正規化し、相対誘導は、Ctによって計算した。

30

## 【0070】

妊娠母に対する抗体投与： C57BL/6マウス（6週齢～8週齢）を、ジャクソン研究所から入手した。動物使用は、ファインスタイン医学研究所の施設ガイドラインに従った。確定妊娠（timed pregnancy）のために、2匹の雌と1匹の雄を14時間にわたり一緒に収容した。雄のマウスをケージから取りだした時間を、胎生（E）0.5日目と呼称した。E13.5の時に、C6抗体（200mg）又はB1コントロール抗体（200mg）のいずれかを、確定妊娠マウスに浅麻酔のもと眼窩後方注射によって投与した（5）。胚をE15.5の時に採取し、性別検査（（41）に記載）及び胎児脳病理のために処理した。さらに臨月に至るまで妊娠させた。

## 【0071】

胎児脳の免疫組織学： E15.5での脳を、パラホルムアルデヒド（4%）中にて4℃で一晩に続き、ショ糖溶液（30%）中にて4℃で48時間にわたり固定化し、次いでOCTコンパウンド（Sakura社）中にてドライアイス上で凍結させ、貯蔵（-80℃）した。矢状切片を、クライオスタット（Leica社）において切断（12µm厚）し、ゼラチンコートされたスライド上にマウントし、貯蔵（-80℃）した。染色前に、切片を室温に解凍し、PBSで2回すすぎ、Triton X100（0.1%）中のウシ血清アルブミン（BSA）を有するPBS（5%）にて室温で1時間にわたりブロッキングした。抗PH3陽性抗体（1:100、Millipore社）又は抗ネスチン抗体（1:200、Millipore社）及びDAPI（1mlあたり1µg、Life Technologies社）を、4℃で一晩添加した。PBS/0.1%Tween中で洗浄した後に、抗体結合を、Alexa 488ヤギ抗ウサギIgG又は抗マウスIgG（Life Technologies社）を使用して検出し、

40

50

A x i o - I m a g e r ( Z - 1、A x i o - V i s i o n 4 . 7、Zeiss社)で可視化した。PH3陽性細胞の定量は、(39)に記載されるように実施した。皮質板及び皮質幅の測定値は、(39)に記載される各々の動物の多数の切片から取得した。

#### 【0072】

成体の脳の免疫組織学： 脳切片は、灌流前にイソフルランでマウスを麻酔することによって調製した。血液をヘパリン化された予備灌流バッファーで置き換えた後に、マウスにパラホルムアルデヒド(4%)を灌流させた。血漿又は細胞上清からの脳反応性抗体のための免疫染色を、以前に(36)に記載されたように、操作されていないC57BL/6マウス(ジャクソン研究所)又はCNTNAP2-/-マウス(ニューヨーク州のアルベルト・アインシュタイン医学校のBrett S.Abrahams博士からの寄贈)において実施した。

10

#### 【0073】

ゴルジ染色及び分析： 子宮内で抗体に曝露されたマウスを、2週齢又は16週齢~20週齢の時に調査した。脳の調製及びゴルジ染色を、FD Rapid Golgi Stain Kit(メリーランド州、エリコットシティ)によって、製造元のプロトコルに従って行った。海馬のCA1領域の冠状切片(100µm厚)を分析した。スパイン又は樹状突起分枝の分析に含めるために、ニューロンは、先端樹状突起及び細胞体を含む必要があった。分枝は、隣接するニューロンから目視で区別する必要があった。スパイン解析のために、CA1錐体層のZスタック(0.5µm間隔)顕微鏡写真を撮った(N.A.=1.4; A x i o - I m a g e r Z1、A x i o - V i s i o n 4 . 8、Zeiss社)。画像を、Zスタック情報を表示したソフトウェアプログラム(NeuroLucida、MBF社)に転送し、こうして樹状突起上のスパインを可視化し、特定し、かつ計数した。樹状突起解析のために、Zスタック(2.0µm間隔、345µm×273µmのタイル、N.A.=0.75)を収集し、ファイルを解析に送り、樹状突起分枝のトレースを定量及び解析した。

20

#### 【0074】

パルプアルブミン染色： この分析のために、行動評価を行った16週齢~20週齢のマウスが使用された。脳をマイクロームによって切片にし(40µm厚)、3枚の切片おきに収集し、既述(8)のようにマウントした。7枚の切片おきに、抗パルプアルブミン抗体(Abcam社)中でPBS(0.1M、pH7.4)中1:500希釈にて4で一晩インキュベートし、次いで洗浄し、ビオチン化された抗ウサギIgG(1:200、Vector Laboratories社)及びアビジン-ビオチンセイヨウワサビペルオキシダーゼ複合体と一緒に1:100希釈で1時間にわたりインキュベートし、引き続きVectastain Elite ABC Kit(Vector社、PK-6100)からの1:200溶液及び3,3'-ジアミノベンジジン(DAB、0.05%)と共に過酸化水素(0.003%)と一緒にインキュベートした。切片を脱水し、カバースリップを載せた。定量のために、背側海馬のCA1領域の錐体細胞層を横切る整合された冠状断面から、パルプアルブミン抗体染色に対して陽性であったニューロンを計数した(Br-1.20µm~1.80µm)(N.A.=0.45、600µm×200µmのタイル; A x i o - I m a g e r Z1; Zeiss社)。同等の分量を採取した(平均±semで、C6=0.154±0.005mm<sup>2</sup>、B1=0.145±0.003mm<sup>2</sup>、P=0.18)。

30

40

#### 【0075】

行動評価： 子宮内でC6又はB1に曝露されたマウスを、10週齢~14週齢の時に評価した。それらのマウスを、暗所(09:00~21:00)及び明所(21:00~9:00)の逆転スケジュールで、食餌及び水を自由摂取させて飼育した。試験1週間前に、マウスを、その概日周期の暗所期間の間に5分~10分のセッションで5日間にわたり取り扱った。行動的スクリーニング(43)を実施することで、C6曝露されたマウスにおいては自律反応及び神経学的反射が正常であることを確かめた(データは示さず)。オープンフィールド試験を使用して、C6曝露されたマウスにおいて行動が正常であることを調べ、それぞれのマウスを、黒色の壁(30cmの高さ)を備えた正方形のアリーナ

50

(一辺40cm)の中央に置き、10分間にわたり自由に動かした。動物の行動を、中央に置かれたビデオカメラでビデオトラッキングソフトウェア(Ethovision v8.5、Noldus社、米国マサチューセッツ州、アトルボロ)を使用して記録した。またアリーナの中央(10×10平方cm)の居在を不安の尺度として分析し、C6曝露されたマウスが、B1曝露されたマウスと同等であることが判明した(データは示さず)。ASDの中核的な症状に似た行動試験は、ガラス玉覆い隠しアッセイ、社会的選好性試験、及び時計状迷路課題であった。それらを順次実施し、試験の間に少なくとも48時間の休止時間を設けた。ガラス玉覆い隠しアッセイ(44)は、柔らかい床敷き(4.5cmの深さ)を敷いたケージ(38×26cm<sup>2</sup>、18cmの高さの壁)において、20個の黒色のガラス玉(1.2cm直径)を4個×5個の配置で置いて実施した。実験前日に、各々のマウスをケージ(ガラス玉なし)に20分間にわたり慣れさせて、その翌日にそのマウスを、そのケージ(ガラス玉あり)に30分間にわたり入れた。覆い隠されたガラス玉の数(床敷きによって50%超が覆い隠されているガラス玉)を記録した。社会的選好性試験を、薄い床敷き層が床に敷かれたY字型迷路(各々のアームは、27×14cm<sup>2</sup>であり、壁の高さが20cmであり、プレキシガラス製であった)において実施した。Y迷路の1本のアーム部は新奇物体(プラスチック製、約5cmの直径及び5cmの高さ、そのアームの終端部に配置されている)を有し、2本目のアームは、試験マウスと接触したことがないマウス(逆さにしたストレーナーカップ内に入れた)を有し、その一方で3本目のアームは空にした。新奇マウスを収容するストレーナーカップの使用により、社会的アプローチが、被験マウスによってのみ始められたことが確認された。試験1日前に、各々のマウスを、空のY迷路中に10分間にわたり置いて、その翌日にそのマウスを10分間置き、その行動を記録した(Ethovision v8.5)。上記物体は、各々の試験実行の間にエタノール及び水で清浄化した。上記物体及び新奇マウスの探索にかけた時間を、社会的選好性の分析のために使用した。時計状迷路課題(43)を、時計の文字盤にある数字のようにアリーナの壁部に配置された12個の出口を有する円形迷路において実施した。トンネルに通ずる1個の出口を除いて全ての出口を遮断した(黒色の栓)。マウスは、マウスの腹部下側を濡らして、出口を探る欲求を与えるのに十分となる2cmの深さにまで水(20)で満たされたアリーナからの逃避を学習した。第一段階においては、各々の動物に、1日あたり6回の試験を2日連続で、少なくとも20分間の試験間の間隔をあけて受けさせた。第二段階においては、出口の位置を変更し、マウスに1日で6回の試験を受けさせた。それらの試験を、ソフトウェア(Ethovision 8.5)で記録し、逃避までの潜時を、学習の計測のために使用した。柔軟性の比率は、以下の数式： $(L2 - L1) / (L2 + L1)$ によって計算され、式中、L1は、第一段階における最後の3回の試験の場合の潜時の逆数の平均であり、L2は、その課題の第二段階における最初の3回の試験の場合の潜時の逆数の平均であった。

#### 【0076】

統計解析： 正規分布した(10より多くの標本を有する)データセットの場合は、分散分析(ANOVA)だけでなく、スチューデントのt検定を使用した。より小規模なデータセットの場合には、マン-ホイットニー検定を使用した。カテゴリーデータを解析するために、独立性に関するカイ二乗検定を使用した。正規分布していない大規模なデータセットの場合は、ノンパラメトリックなコルモゴロフ・スミルノフ検定を使用した。全ての検定は、統計ツールボックスOrigin(バージョン9及び11)を用いて実施され、本文中に示されている。値は、 $p < 0.05$ の場合に有意であるとみなした。

#### 【0077】

##### 参考文献

1. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). A. P. Association, Ed., (American Psychiatric Publishing., Arlington, VA, 2013).
2. H. O. Atladottir et al., Pediatrics 124, 687 (Aug, 2009).
3. N. Risch et al., Am J Psychiatry, (Jun 27, 2014).
4. H. O. Atladottir, T. B. Henriksen, D. E. Schendel, E. T. Parner, Pediatrics 1

10

20

30

40

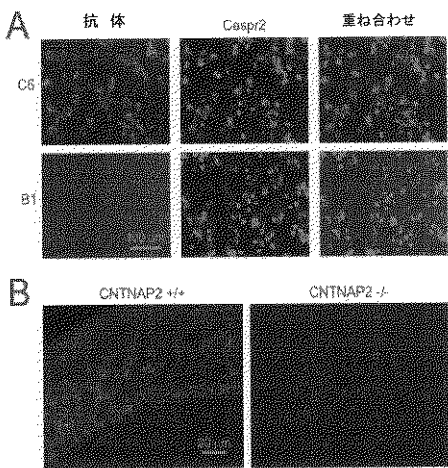
50

- 30, e1447 (Dec, 2012).
5. P. H. Patterson, *Brain Behavior Immunity* 26, 393 (2012).
  6. V. Mazina et al., *J Dev Behav Pediatr* 36, 61 (Feb-Mar, 2015).
  7. V. Braniste et al., *Sci Transl Med* 6, 263ra158 (Nov 19, 2014).
  8. B. Diamond, G. Honig, S. Mader, L. Brimberg, B. T. Volpe, *Annu Rev Immunol* 31, 345 (2013).
  9. L. Brimberg, A. Sadiq, P. K. Gregersen, B. Diamond, *Mol Psychiatry* 18, 1171 (Nov, 2013).
  10. L. A. Croen et al., *Biological psychiatry* 64, 583 (Oct 1, 2008).
  11. P. Dalton et al., *Annals of neurology* 53, 533 (Apr, 2003). 10
  12. M. D. Bauman et al., *Transl Psychiatry* 3, e278 (2013).
  13. T. Tiller et al., *J Immunol Methods* 329, 112 (Jan 1, 2008).
  14. S. Poliak et al., *Neuron* 24, 1037 (Dec, 1999).
  15. S. Poliak et al., *J Cell Biol* 162, 1149 (Sep 15, 2003).
  16. O. Varea et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 6176 (May 12, 2015).
  17. O. Penagarikano et al., *Cell* 147, 235 (Sep 30, 2011).
  18. J. Y. Lee et al., *Nature medicine* 15, 91 (Jan, 2009).
  19. J. A. Markham et al., *Neuroscience* 116, 71 (2003).
  20. J. R. Casanova, M. Nishimura, J. W. Swann, *Brain Res Bull* 103, 39 (Apr, 2014). 20
  21. G. R. Anderson et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18120 (Oct 30, 2012).
  22. J. L. Silverman, M. Yang, C. Lord, J. N. Crawley, *Nature reviews. Neuroscience* 11, 490 (Jul, 2010).
  23. L. Wang et al., *The Journal of experimental medicine* 209, 1083 (Jun 4, 2012).
  24. M. Alarcon et al., *Am J Hum Genet* 82, 150 (Jan, 2008).
  25. K. A. Strauss et al., *N Engl J Med* 354, 1370 (Mar 30, 2006).
  26. A. J. Verkerk et al., *Genomics* 82, 1 (Jul, 2003).
  27. G. C. Tan, T. F. Doke, J. Ashburner, N. W. Wood, R. S. Frackowiak, *Neuroimage* 53, 1030 (Nov 15, 2010). 30
  28. M. L. Simms, T. L. Kemper, C. M. Timbie, M. L. Bauman, G. J. Blatt, *Acta Neuropathol* 118, 673 (Nov, 2009).
  29. R. M. Deacon, *Nat Protoc* 1, 122 (2006).
  30. J. H. Kogan, P. W. Frankland, A. J. Silva, *Hippocampus* 10, 47 (2000).
  31. *MMWR Surveill Summ* 63, 1 (Mar 28, 2014).
  32. E. Lancaster et al., *Ann Neurol* 69, 303 (Feb, 2011).
  33. S. R. Irani et al., *Brain* 133, 2734 (Sep, 2010).
  34. Tiller, T, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329, 112-124 (2008). 40
  35. G. D. Fischbach, C. Lord, *Neuron* 68, 192 (Oct 21, 2010).
  36. L. Brimberg, A. Sadiq, P. K. Gregersen, B. Diamond, *Mol Psychiatry* 18, 1171 (Nov, 2013).
  37. J. Zhang et al., *J Immunol Methods* 338, 79 (Sep 30, 2008).
  38. T. Tiller et al., *J Immunol Methods* 329, 112 (Jan 1, 2008).
  39. J. Y. Lee et al., *Nature medicine* 15, 91 (Jan, 2009).
  40. S. Mader et al., *PLoS One* 5, e10455 (2010).
  41. L. Wang et al., *The Journal of experimental medicine* 209, 1083 (Jun 4, 2012).
  42. L. A. DeGiorgio et al., *Nat Med* 7, 1189 (Nov, 2001). 50

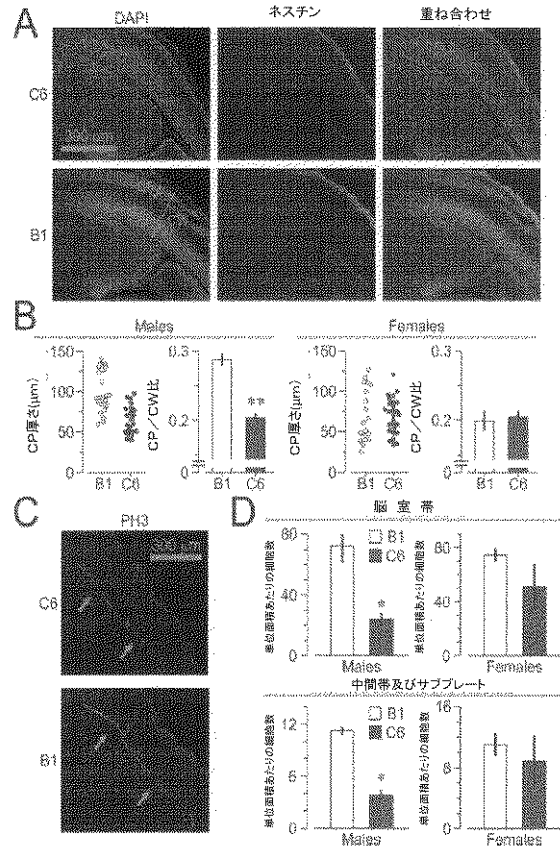
43. S. S. Chavan et al., Mol Med 18, 930 (2012).

44. A. Thomas et al., Psychopharmacology (Berl) 204, 361 (Jun, 2009).

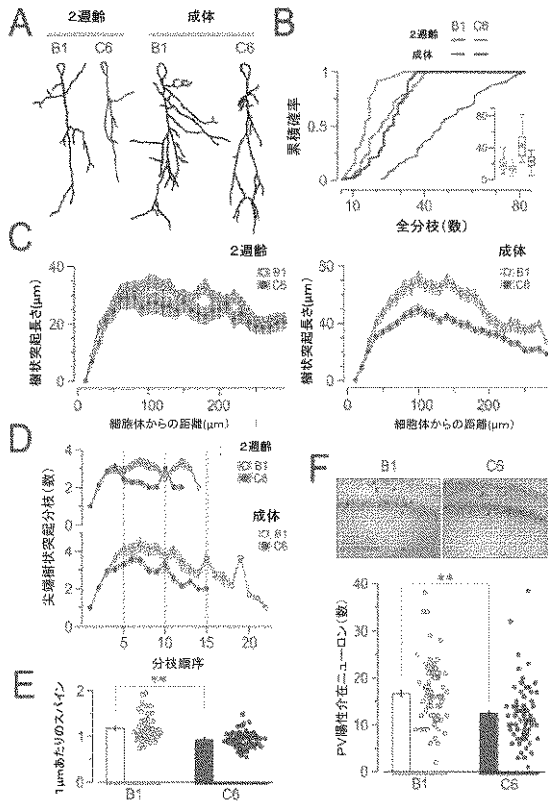
【 図 1 】



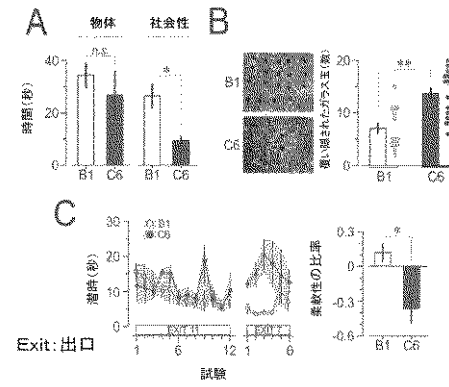
【 図 2 】



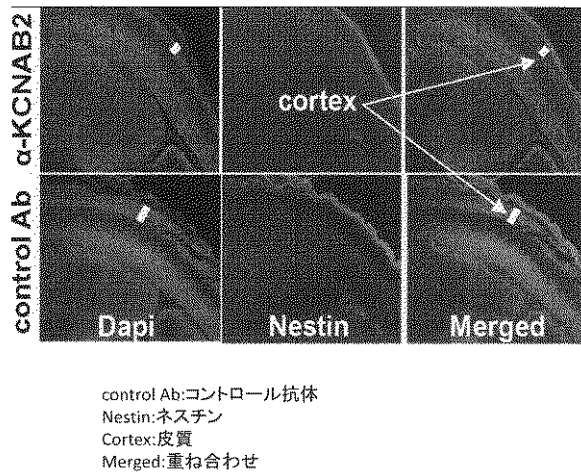
【図3】



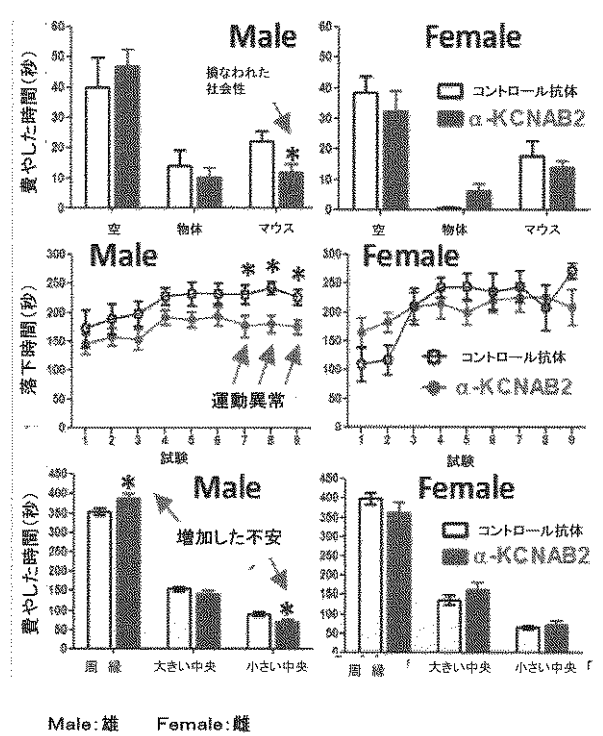
【図4】



【図5】



【図6】



Male: 雄 Female: 雌

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/54651
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00, A61K 38/17, A61P 25/00, A61P 25/28, G01N 33/53 (2017.01) CPC - A61K 38/1709, A61K 38/177, G01N 33/53 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) IPC(8): A61K 39/00, A61K 38/17, A61P 25/00, A61P 25/28, G01N 33/53 (2017.01) CPC: A61K 38/1709, A61K 38/177, G01N 33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K 39/0005, A61K 39/0007 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWest, Google Scholar, Google Patents: autism or autism spectrum disorder, antigen, extracellular, antibody, Caspr2, KCNAB2, KCNAB1, endothelial integrin, ligand (EDIL3), IVD, brain specific sulfatransferase (SUL T4A1), TNIP2, retinoic acid induced 16 (RAI16) or GDP DS, mother, pregnant, fetus or infant, blood, extracorporeal, recircula		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0210037 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 15 August 2013 (15.08.2013); Abstract, para [0013], [0151], [0178]	1-3, 12-13
Y	WO 2012/149472 A2 (IGNITE INSTITUTE FOR INDIVIDUALIZED HEALTH) 01 November 2012 (01.11.2012); para [0004], [0042], [0083]	1-3, 12-13
Y	WO 2014/124396 A1 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 14 August 2014 (14.08.2014); para [0178]	2, (12-13)/2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 January 2017		Date of mailing of the international search report <b>17 FEB 2017</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: <b>Lee W. Young</b> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 16/54651

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.:  
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:
  
- 3.  Claims Nos.: 14-21  
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:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-13, drawn to methods of inhibiting or reducing development of an autism spectrum disorder in a fetus or an infant by administering an agent that binds to an antibody (autoantibody). The therapeutic methods will be searched to the extent that the said antibody encompasses an antibody directed to Caspr2. It is believed that claims 1-3, 12-13, limited to Caspr2, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a therapeutic method comprising administering an agent which binds an antibody directed to Caspr2. Additional antibodies will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antibodies. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "\*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a therapeutic method comprising administering an agent which binds an antibody (autoantibody) directed to KCNAB2, i.e. claims 1-4, 13, limited to KCNAB2. \*\*\*\*\*Continued in extra 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 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.:  
1-3, 12-13, limited to Caspr2

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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/54651

Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking

Group II: Claim 22, drawn to a method of determining the likelihood that a fetus or infant of a pregnant prospective mother will present with an autism spectrum disorder by quantifying the levels of antibodies.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special Technical Features**

Group I+ requires therapeutic method steps for treating or preventing autism spectrum disorder, not required by Group II. Further, the technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific target antibody (autoantibody) recited therein. Each invention requires a target antibody (autoantibody), not required by any of the other inventions.

Group II requires diagnostic method steps for analyzing the levels of antibodies in order to determine the likelihood of a fetus or infant presenting with autism spectrum disorder, not required by Group I+.

**Common Technical Features**

The feature shared by Groups I+ and II is the association between an autism spectrum disorder in a fetus or an infant of a pregnant prospective mother and the presence of antibodies directed to one or more of Caspr2, KCNAB2, KCNAB1, EDIL3, IVD, SULT4A1, TNIP2, RAI16 or GDP D5.

The feature shared by the inventions listed as Group I+ is the method of claim 1.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2013/0210037 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter 'UC') in view of US 2015/0268252 A1 to Banyan Biomarkers, Inc. (hereinafter 'Banyan').

UC teaches [claim 1] a method of inhibiting or reducing development of an autism spectrum disorder in a fetus or an infant comprising administering to a mother pregnant with the fetus or prior to the fetus being born as an infant while the mother is pregnant, an amount of an agent which binds an antibody, effective to inhibit or reduce development of an autism spectrum disorder in a fetus or an infant (Abstract- The present invention provides diagnostic methods for determining the risk of developing an autism spectrum disorder (ASD) in a fetus or child by detecting in a biological sample from the mother antibodies that bind to one or more biomarkers... The invention further provides methods of preventing or reducing the risk of a fetus or child developing an ASD by administering to the mother an agent that blocks the binding of maternal antibodies to the one or more fetal biomarkers listed above or by removing from the mother antibodies that bind to the one or more fetal biomarkers.), however fails to teach wherein the antibody is directed to one or more of Caspr2, KCNAB2, KCNAB1, endothelial integrin ligand (EDIL3), IVD, brain specific sultatransferase (SUL T4A1), TNIP2, retinoic acid induced 16 (RAI16) or GDP D5.

Banyan teaches a "method of detecting a neural injury or neuronal disorder in a subject is provided that includes collecting a biological sample from a subject suspected of having a neural injury or neuronal disorder. The sample or a fraction thereof is measured for an amount of a first biomarker that is a first autoantibody to one or more autoantigen of....KCNAB2" (para [0008]) wherein said "Neural (neuronal) defects, disorders or diseases" comprises....autism" (para [0077]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have applied the method of treating autism spectrum disorder with an agent that binds to an autoantibody of UC to target the autoantibody KCNAB2 of Banyan, because Banyan teaches that KCNAB2 is an autoantibody biomarker of autism spectrum disorder.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Another features shared by the inventions listed as Group I+ is the method of claim 2.

\*\*\*\*\*Continued in next extra sheet\*\*\*\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/54651

## Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by UC in view of Banyan and further in view of WO 2014/124396 A1 to University of Iowa Research Foundation (hereinafter 'Univ Iowa').

UC teaches [claim 2] a method of inhibiting or reducing development of an autism spectrum disorder in a fetus or an infant (Abstract- The present invention provides diagnostic methods for determining the risk of developing an autism spectrum disorder (ASD) in a fetus or child by detecting in a biological sample from the mother antibodies that bind to one or more biomarkers... The invention further provides methods of preventing or reducing the risk of a fetus or child developing an ASD by administering to the mother an agent that blocks the binding of maternal antibodies to the one or more fetal biomarkers listed above or by removing from the mother antibodies that bind to the one or more fetal biomarkers.) comprising extracorporeally contacting blood of a mother (i) pregnant with the fetus or (ii) prior to the fetus being born as an infant while the mother is pregnant, with an amount of an agent which binds an antibody directed to an antibody (para [0013] -In some embodiments, the biological sample from the mother or potential mother is contacted with a polypeptide or antigenic fragment thereof or a mimotope of one, two, three or all biomarkers), however UC fails to teach wherein the antibody is directed to one or more of Caspr2, KCNAB2, KCNAB1, endothelial integrin ligand (EDIL3), IVD, brain specific sultatransferase (SULT4AI), TNIP2, retinoic acid induced 16 (RAI16) or GDP D5 so as to reduce the blood levels of an antibody directed to Caspr2, KCNAB2, KCNAB1, EDIL3, IVD, SULT4AI, TNIP2, RAI16 or GDP D5 and further fails to teach recirculating the blood so treated back into the mother effective to inhibit or reduce development of an autism spectrum disorder in a fetus or an infant. Banyan teaches a "method of detecting a neural injury or neuronal disorder in a subject is provided that includes collecting a biological sample from a subject suspected of having a neural injury or neuronal disorder. The sample or a fraction thereof is measured for an amount of a first biomarker that is a first autoantibody to one or more autoantigen of.....KCNAB2" (para [0008]) wherein said "Neural (neuronal) defects, disorders or diseases" comprises .....autism" (para [0077]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have applied the method of treating autism spectrum disorder with an agent that binds to an autoantibody of UC to target the autoantibody KCNAB2 of Banyan, because Banyan teaches that KCNAB2 is an autoantibody biomarker of autism spectrum disorder. Furthermore, Univ Iowa teaches wherein a maternal blood sample may be recirculated into the bloodstream of the patient after testing (para [0018] - In a sixth aspect, a method of treating preeclampsia in a subject in need thereof includes the steps of a) removing whole blood from a patient, b) reducing or removing vasopressin in the removed blood, and c) recirculating the remaining blood components into the bloodstream of the patient.). In light of the fact that UC teaches treating the mother with anti-biomarker antibody blocking agents in a therapeutic amount, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to administer the therapeutic component with the maternal blood originally tested to treat the fetus.

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## Item 4 (continued)

Claims 14-21 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**G 0 1 N 33/564 (2006.01) G 0 1 N 33/564 Z**

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

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(74)代理人 100209495

弁理士 佐藤 さおり

(72)発明者 ダイヤモンド、ベティ・エイ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、シグマ・プレイス 1

(72)発明者 マダー、シモン

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ウッドサイド、シクスティサード・ストリート 37-35

(72)発明者 ブリンバーグ、リオル

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ベイサイド、トゥーハンドレッドフィフティーンズ・プレイス  
3616

(72)発明者 グレガーセン、ピーター

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ラーチモント、ローカスト・アベニュー 6

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 DA39 NA05 NA10 NA14 ZA151 ZA152

4C085 AA32 AA33 BB11 BB31 BB36 BB42 CC21 CC22 EE01

专利名称(译)	使用诱饵抗原抑制自闭症闭合谱用于母体脑反应性抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018531248A</a>	公开(公告)日	2018-10-25
申请号	JP2018517133	申请日	2016-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	范因斯坦医学研究院		
申请(专利权)人(译)	在党斯坦医学研究所		
[标]发明人	ダイヤモンドベティーエイ マダーシモン プリンバーグリオル グレガーセンピーター		
发明人	ダイヤモンド、ベティー・エイ マダー、シモン プリンバーグ、リオル グレガーセン、ピーター		
IPC分类号	A61K39/00 A61P25/28 A61K39/395 A61K38/17 G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	A61K38/17 A61K38/1709 A61K38/177 A61K38/1774 A61P25/28 G01N33/6893 G01N2800/38 G01N2800/50 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2800/28		
FI分类号	A61K39/00.Z A61P25/28 A61K39/395.Y A61K38/17.100 G01N33/53.N G01N33/564.Z		
F-TERM分类号	4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/DA39 4C084/NA05 4C084/NA10 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084 /ZA152 4C085/AA32 4C085/AA33 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB42 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/EE01		
代理人(译)	Kajinami秩序 佐藤沙织		
优先权	62/237150 2015-10-05 US		
其他公开文献	JP2018531248A6 JP2018531248A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
一种使用针对母体脑反应性抗体的诱饵抗原来诊断自闭症谱系障碍的方法以及治疗和预防自闭症谱系障碍的方法。

(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2018-531248 (2018-531248A)
	(43) 公表日	平成30年10月25日(2018.10.25)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード(参考)
<b>A 6 1 K 3 9 / 0 0 ( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A G I K 3 9 / 0 0	Z
<b>A 6 1 P 2 5 / 2 8 ( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A G I P 2 5 / 2 8	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 ( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A G I K 3 9 / 3 9 5	Y
<b>A 6 1 K 3 8 / 1 7 ( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A G I K 3 8 / 1 7	1 0 0
<b>G O 1 N 3 3 / 5 3 ( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	G O I N 3 3 / 5 3	N
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-517133 (P2018-517133)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成28年9月30日(2016.9.30)	ザ・フェインスタイン・インスティテュー ト・フォー・メディカル・リサーチ The Feinstein Insti tute for Medical Re search
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月30日(2018.5.30)	アメリカ合衆国、ニューヨーク州、マンハ セツト、コミュニティ・ドライブ 350 350 Community Drive , Manhasset, NY 110 30, U. S. A.
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/054651	(74) 代理人
(87) 国際公開番号	W02017/062270	100110423 弁理士 曾我 道治
(87) 国際公開日	平成29年4月13日(2017.4.13)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	62/237,150	100111648 弁理士 梶並 順
(32) 優先日	平成27年10月5日(2015.10.5)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 母性脳反応性抗体に対するおとり抗原を使用する自閉スペクトラム症の抑制