

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-130259
(P2016-130259A)

(43) 公開日 平成28年7月21日(2016.7.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	ZNA 4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A 4B064
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D 4H045

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-77993 (P2016-77993)	(71) 出願人	501083115 メイヨ・ファウンデーション・フォー・メ ディカル・エデュケーション・アンド・リ サーチ アメリカ合衆国、ミネソタ州 55905 、ロチェスター、ファースト・ストリート ・サウスウエスト 200
(22) 出願日	平成28年4月8日 (2016.4.8)		
(62) 分割の表示	特願2013-534892 (P2013-534892) の分割	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成23年10月19日 (2011.10.19)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/455,363	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成22年10月19日 (2010.10.19)	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/546,634		
(32) 優先日	平成23年10月13日 (2011.10.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/537,392		
(32) 優先日	平成23年9月21日 (2011.9.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト抗体ならびに神経疾患の処置のためのその診断的および治療的使用

(57) 【要約】

【課題】 ヒト抗体ならびに神経疾患の処置のためのその診断的および治療的使用

【解決手段】 CNSにおけるニューロンに結合し、それを認識し、かつCNSのニューロンにおける応答を誘発することが可能である特異的結合メンバー、特にヒト抗体、特に組換え抗体、およびそれらの断片が提供される。これらの抗体は、神経保護のために、ならびに神経損傷、神経傷害または神経変性および神経変性疾患と関連する状態の診断および処置のために、有用である。本発明の抗体、それらの可変領域、またはCDRDメイン配列、およびそれらの断片はまた、治療において、化学療法剤、免疫調節剤、もしくは向神経活性剤および/または他の抗体、またはそれらの断片と組み合わせて用いることもできる。抗体は、それらの配列が本明細書で提供されている、抗体IgM12およびIgM4

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

神経疾患における使用のためのヒト抗体およびその特異的結合配列

政府支援についての申告

本明細書に記載の本発明は、米国国立衛生研究所 (Grant Nos. R01 NS 24180、R01 NS 32129、R01 CA104996、R01 CA 096859)、および全米多発性硬化症協会 (Grant No. CA 1011 A8-3) によって、完全または部分的に支援された。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、CNSにおけるニューロンに結合し、これらを認識し、CNSのニューロンにおける応答を誘発することが可能である抗体、特にヒト天然抗体、これらに由来する組換え抗体、およびそれらの断片に関する。これらの抗体は、神経損傷、神経傷害または神経変性、神経変性疾患、慢性神経傷害または慢性神経損傷、および突発的神経傷害または突発的神経損傷と関連する状態の診断および処置に有用である。本発明の抗体、それらの可変領域、またはCDRドメイン配列、およびそれらの断片はまた、治療において、化学療法剤、免疫調節剤、もしくは向神経活性剤および/または他の抗体またはそれらの断片と組み合わせて用いることもできる。本発明は一般に、中枢神経系における神経成長の調節に、より具体的には、CNSにおける神経成長を改善するための方法、ならびに関連する薬剤、構築物、および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

神経再生とは、神経組織、細胞、または細胞産物の再成長または修復を指す。このような機構は、再ミエリン化、新たなニューロン、神経膠、軸索、ミエリン、またはシナプスの発生を包含しうる。末梢神経系 (PNS) と中枢神経系 (CNS) とでは、神経再生が、関与する機能的機構ならびに再生の程度および速さのいずれでも異なる。

【0004】

損傷後における成熟哺乳動物の中枢神経系 (CNS) における軸索の再生は、極めて限定されたものである。その結果、脊髄損傷 (SCI)、外傷性脳損傷、脳卒中、および軸索の断絶を伴う関連状態の後では、機能欠損が遷延する。この状況は、長距離にわたる軸索の再生および実質的な機能回復が成体において生じうる、哺乳動物の末梢神経系 (PNS) における状況とは異なる。細胞外分子およびニューロンの内因性成長能のいずれもが、再生の成功に影響を及ぼす。

【0005】

中枢神経系 (CNS) の軸索が、成体の哺乳動物における損傷後に自発的に再生することはない。これに対し、末梢神経系 (PNS) の軸索は、容易に再生し、末梢神経の損傷後における機能回復を可能とする。Aguyaらは、少なくとも一部の成熟CNSのニューロンは、許容性の末梢神経移植を施されれば、再生する能力を保持することを裏付けた (非特許文献1; 非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4)。この研究は、軸索成長に、PNS環境は刺激性であり、かつ/またはCNS環境は阻害性であることを示唆した。その後の研究では、PNSにおける成長促進因子およびCNSにおける成長阻害因子のいずれもが同定された。再生阻害剤には、CNSミエリンにおける特定のタンパク質および星状膠細胞性瘢痕と関連する分子が含まれる。加えて、CNSにおける、PNSと比べて緩徐な残屑クリアランスは、軸索の再成長を妨げる可能性がある。軸索成長に影響を及ぼす因子の理解は、CNSの再生を促進する治療剤を開発するのに極めて重要である。

【0006】

末梢神経損傷後、軸索は、容易に再生する。細胞体からは断絶している軸索の遠位部は、ウォラー変性を受ける。この活性過程の結果として、軸索の断片化および分解がもたらされる。残屑は、神経膠細胞、主に、マクロファージにより除去される。次いで、近位軸索は、それらの標的を再生および再神経化して、機能回復を可能とする。

【0007】

CNS再生阻害剤の2つの主要なクラスは、ミエリン会合阻害剤(MAI)およびコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)である。これらの分子は、軸索の再生を制限し、それらの機能に干渉することにより、成体におけるCNSのある程度の成長も制限する。細胞自律的な因子もまた、CNS再生失敗の重要な決定因子である。CNSにおけるニューロンは、成長関連遺伝子を上方制御する程度が、PNSにおけるニューロンと同じではない。その結果、それらの再生能は、阻害剤が存在しない場合であっても、限定されたものである。ニューロンの内因性の成長能を増大させることにより、CNSにおける適度な軸索の再生が可能となる(非特許文献5;非特許文献6)。

10

【0008】

MAIとは、CNSミエリンの成分としての希突起膠細胞を介して発現させたタンパク質である。MAIは、*in vitro*において神経突起成長を損ない、CNS損傷後の*in vivo*において軸索成長を制限すると考えられている。MAIには、Nogo-A(非特許文献7;非特許文献8)、ミエリン会合糖タンパク質(MAG)(非特許文献9)、希突起膠細胞ミエリン糖タンパク質(OMgp)(非特許文献10)、エフリン-B3(Benson MDら(2005年)、Proc Nat Acad Sci USA、102巻:10694~10699頁)、およびセマフォリン4D(Sema4D)(Moreau-Fauvarque Cら(2003年)、J Neurosci、23巻:9229~9239頁)が含まれる。これらのうちの3つ(Nogo-A、MAG、およびOMgp)は、ニューロンのNogo-66受容体1(NgR1)と相互作用して、軸索成長を制限する。これらの3つの構造的に類縁でないリガンドはまた、第2の軸索成長阻害受容体であるペア型免疫グロブリン様受容体B(PirB)(Atwal JKら(2008年)、Science、322巻:967~970頁)に対するアフィニティーも示す。

20

【0009】

神経突起成長の促進および/または阻害の根底をなす分子的鍵として作用する複数の認識分子が同定されている。神経突起成長を促進する認識分子の中では、神経細胞接着分子であるL1が、神経突起成長を媒介するのに顕著な役割を果たす(Schachner M(1990年)、Seminars in the Neurosciences、2巻:497~507頁)。L1依存性神経突起成長は、同種親和性相互作用を介する。L1は、L1を発現させる神経突起およびシュワン細胞、ならびにL1でトランスフェクトした線維芽細胞における神経突起成長を増強する(Bixbyら(1982年)、Proc Natl Acad Sci U.S.A.、84巻:2555~2559頁;Changら(1987年)、J Cell Biol、104巻:355~362頁;Lagenaurら(1987年)、Proc Natl Acad Sci USA、84巻:7753~7757頁;Seilheimerら(1988年)、J Cell Biol、107巻:341~351頁;Kadmonら(1990年)、J Cell Biol、110巻:193~208頁;Williamsら(1992年)、J Cell Biol、119巻:883~892頁)。

30

40

【0010】

神経系の損傷に罹患する患者は、毎年90,000例を超え、脳卒中などの脳血管事象を含めると、はるかに大きな数となる。脊髄損傷に罹患する患者だけで、毎年10,000例に上ると推定されている。神経損傷の発症率がこのように高いことの結果として、神経組織工学の亜分野である神経再生および神経修復は、損傷後における神経機能性を回復させる新たな方式の発見に専心する、急速に成長する分野となりつつある。神経系は、脳

50

および脊髄からなる中枢神経系、ならびにそれらに関連する神経節を伴う頭蓋神経および脊髄神経からなる末梢神経系の2つの部分に分けられる。末梢神経系が内因性の修復能および再生能を有するのに対し、中枢神経系は、その自己修復能および再生能において、比較的小さいおよび大方制約されている。現在のところ、中枢神経系への損傷後においてヒト神経機能を回復させるための、許容され、かつ、承認された処置は見られない。

【0011】

脊髄損傷(SCI)後における軸索の保護および修復は、運動ニューロンの喪失および永続的な身体障害を防止するのに有効な戦略としての大きな可能性を保持する。ニューロンの保護は、傷害後における軸索の損傷を防止し、軸索の修復を促進するために標的化される栄養因子を用いて達成されている。これらの分子は主に、特異的な低分子である神経栄養因子の標的化に焦点を当てる*in vitro*系に基づく選択戦略を用いて同定された。これらの分子は、前臨床モデルでは神経保護的な結果を裏付けたが、臨床試験による結果はそれほど好ましいものではない。

10

【0012】

天然の自己反応性モノクローナル抗体は、損傷および疾患の複数のモデルを用いて、CNS細胞における有益な生物学的機能を裏付けている。抗体を介するニューロン生存の促進、軸索の再生、および機能回復が、マウスモノクローナルIgMであるIN-1を用いて、*in vivo*において裏付けられている(Bregman BSら(1995年)、*Nature*、378巻(6556号):498~501頁;Caroni P、Schwab ME(1988年)、*Neuron*、1巻(1号):85~96頁)。同様の結果が、CNS損傷に先立つ脊髄ホモジネート(SCH)の免疫化を用いて得られた(Ellezam B、Bertrand J、Dergham P、McKerracher L(2003年)、*Neurobiol Dis*、12巻(1号):1~10頁;Huang DWら(1999年)、*Neuron*、24巻(3号):639~647頁)。

20

【0013】

多発性硬化症(MS)とは、通常は初期の軸索損傷を伴わない、原発性脱髄を病理学的特徴とする、慢性でしばしば進行性で炎症性の中枢神経系(CNS)疾患である。MSの病因および発症機序は未知である。MSの複数の免疫学的特徴、およびその特定の主要組織適合性複合体の対立遺伝子との中程度の会合により、MSが免疫媒介性疾患であるという推論が誘発されている。自己免疫仮説は、特定のミエリン成分を遺伝子的に感受性である動物へと注射することにより、T細胞介在性CNS脱髄をもたらす、実験的な自己免疫性(アレルギー性)脳脊髄炎(EAE)モデルにより裏付けられている。しかし、特異的な自己抗原および病原性のミエリン反応性T細胞が、MS患者のCNSにおいて明確に同定されたこともなく、MSが他の自己免疫疾患と関連付けられることもない。疫学的データに基づく代替的な仮説は、環境因子、おそらくは同定されていないウイルスが、CNSにおける炎症反応を誘発し、これにより、潜在的に誘導性の自己免疫成分による直接的または間接的な(「バスタンダー」的な)ミエリン破壊をもたらされるというものである。この仮説は、ヒトおよび動物の両方における複数の天然ウイルス感染が脱髄を引き起こすという証拠により裏付けられている。一般に用いられる1つの実験的ウイルスモデルは、サイラーマウス脳脊髄炎ウイルス(TMEV)により誘導される(Dal Canto, M.C.およびLipton, H.L., Am. J. Path., 88巻:497~500頁(1977年))。

30

40

【0014】

MSおよび他の脱髄性疾患または神経変性疾患のための現行の療法の有効性が限定されたものであることから、これらの疾患を改善する新規の療法に対する関心が刺激されている。しかし、環境因子および自己免疫因子の両方を伴う可能性がある、これらの疾患の明らかに複雑な原因病理に起因して、これらの脱髄性障害の有効な処置に対する必要がやはり存在する。

【0015】

50

MSの場合、脱髄の最終的な結果として、神経細胞死がもたらされる。しかし、脱髄後における軸索の死滅は、即時的なものではない。適切な支持分子または支持細胞が供給されれば、神経系は、著明な修復能を示す。CNSの軸索の保護は、生存する軸索の喪失を制限し、永続的な身体障害を防止するのに有効な戦略となる見込みがある。神経保護は、病変における潜在的に神経毒性の炎症性環境を調節することにより達成することができる。興奮毒性を制限するか、一酸化窒素を阻害するか、またはイオンチャネルを遮断するようにデザインされた試薬は、危険にある軸索を保護する方法として研究されている (Pitt, D., P. Werner, および C. S. Raine (2000年)、*Nat Med*, 6巻: 67~70頁; Okuda, Y (1997年)、*Journal of neuroimmunology*, 73巻: 107~116頁; Waxman, S. G. (2002年)、*J Rehabil Res Dev*, 39巻: 233~242頁)。これらの試薬の多くが、毒性が裏付けられた低分子であり、全身の全ての細胞に作用する。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ, *Nature*, (1980年) 284巻: 264~265頁

【非特許文献2】Richardson PM, Issa VM, Aguayo AJ, *J Neurocytol*, (1984年) 13巻: 165~182頁

20

【非特許文献3】David S, Aguayo AJ, *Science*, (1981年) 214巻: 931~933頁

【非特許文献4】Benfey M, Aguayo AJ, *Nature*, (1982年) 296巻: 150~152頁

【非特許文献5】Bomze HM, *Nat Neurosci*, (2001年) 4巻: 38~43頁

【非特許文献6】Neumann S, Woolf CJ, *Neuron*, (1999年) 23巻: 83~91頁

【非特許文献7】Chen MS, *Nature*, (2000年) 403巻: 434~439頁

30

【非特許文献8】GrandPre T, *Nature*, (2000年) 403巻: 439~444頁

【非特許文献9】McKerracher L, *Neuron*, (1994年) 13巻: 805~811頁

【非特許文献10】Kottis V, *J Neurochem*, (2002年) 82巻: 1566~1569頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

中枢神経系において活性を呈示し、特に、再ミエリン化の刺激と関連するヒトモノクローナル自己抗体が同定されている。CNSにおける活性を伴うヒトモノクローナル抗体、特に、これらの活性、ならびに神経再生を促進し、かつ/またはニューロンを疾患、傷害、損傷、および/もしくは死滅から保護する能力を伴う組換え抗体を同定し、特徴付け、開発することが所望されるであろう。これは、本発明が対象とする目的に向けたものである。

40

【0018】

本明細書における参考文献の引用は、これらの参考文献が本発明に先行することの容認としてはみなされないものとする。

【課題を解決するための手段】

【0019】

50

本発明は、CNSにおける特定の有効性を伴う神経調節剤であって、IgM垂型の抗体、その活性断片、その単量体、そのアゴニスト、およびこれらの組合せからなる群から選択される物質を含む薬剤に関する。本発明の神経調節剤または抗体は、以下の特徴のうちの1または複数を含む：本発明の神経調節剤または抗体は、ニューロンを保護し、かつ/またはこれを安定化させる；本発明の神経調節剤または抗体は、CNSまたは神経細胞の損傷、障害、または傷害における部位を標的とする；本発明の神経調節剤または抗体は、細胞死、例えば、過酸化水素誘導性細胞死を低減または遮断する。

【0020】

本発明は、中枢神経系における診断目的および治療目的のための、神経突起伸長を促進し、神経再生において作用し、かつ/またはニューロンを損傷から保護する能力を伴うニューロン結合モノクローナル抗体を提供する。特に、特異的な組換え抗体であって、皮質ニューロン、海馬ニューロン、小脳顆粒細胞、および網膜神経節細胞を含めたニューロンを認識し、これらに結合することが可能な抗体が提供される。本明細書では、組換え完全ヒト抗体が提供される。本発明の抗体は、神経の障害、損傷または傷害と関連する状態または疾患において診断的および治療的に用いられる。

10

【0021】

一般的な態様では、本発明が、皮質ニューロン、海馬ニューロン、小脳顆粒細胞、および網膜神経節細胞を含めたニューロンにおける1または複数のエピトープを指向し、これらに結合することが可能な抗体を提供する。広範な態様では、本発明が、単離された特異的結合メンバー、特に、ニューロンを認識し、これらに結合し、かつ/またはこれらを標的とする組換えヒト抗体を含めた抗体またはその断片を提供する。本発明は、ニューロンに特異的に結合し、ニューロンを細胞死から保護し、再ミエリン化を促進しないヒト抗体、特に、ヒト抗体、特に、IgM抗体を提供する。本発明の抗体は、脊髄損傷(SCI)、外傷性脳損傷(traumatic brain injury)(TBI)、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis)(ALS)、多発性硬化症(MS)、アルツハイマー病、脳卒中、パーキンソン病、ハンチントン病、出産前低酸素症/周産期虚血、脳性まひ、脳症、脊髄症、または運動ニューロン疾患における使用、および、特に、これらの疾患におけるニューロンおよび神経の能力の保護、存続、または維持における使用を含め、神経が損なわれているか、傷つけられているか、もしくは損傷しているか、またはその危険性がある哺乳動物における疾患または状態を処置または改善するのに使用される。特定の態様では、本発明が、抗体12または42、特に、血清由来または組換えのIgM12またはIgM42である抗体またはその断片を提供する。

20

30

【0022】

本発明の態様では、図5および/または6に示される可変領域のCDR配列を含む、組換えまたは合成のニューロン結合抗体が提供される。抗体12は、図5に示される、重鎖CDR配列CDR1 GGSVSLYY(配列番号31)、CDR2 GYIYSSGST(配列番号32)、およびCDR3 ARSASIRGWF(配列番号33)、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY(配列番号34)、CDR2 AAS(配列番号35)、およびCDR3 QQSYHTPW(配列番号36)を含む。抗体42は、図6に示される、重鎖CDR配列CDR1 GFTFSTYA(配列番号37)、CDR2 INVGGVTT(配列番号38)、およびCDR3 VRRSGPDRNSSPAD(配列番号39)、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QGIG(配列番号40)、CDR2 TTS(配列番号41)、およびCDR3 QKYNSAPRT(配列番号42)を含む。したがって、本明細書で同定される抗体(複数可)のCDRに基づく組換え抗体は、ニューロン、特に、疾患またはがんにおいて感受性であるか、障害され、損傷されまたは傷害されたニューロンを標的とし、保護するのに有用である。

40

【0023】

したがって、本発明は、神経が損なわれているか、傷つけられているか、もしくは損傷しているか、またはその危険性がある哺乳動物における疾患または状態を処置または改善

50

するのに使用される、ニューロンに特異的に結合し、ニューロンを細胞死から保護し、再ミエリン化を促進しない単離ヒトIgM抗体（複数可）またはその断片（複数可）であって、（a）図5に示される可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GGSVSLYY（配列番号31）、CDR2 GYIYSSGST（配列番号32）、およびCDR3 ARSASIRGWFD（配列番号33）、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY（配列番号34）、CDR2 AAS（配列番号35）、およびCDR3 QQSYPHTPW（配列番号36）、または（b）図6に示される、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GFTFSTYA（配列番号37）、CDR2 INVGGVT（配列番号38）、およびCDR3 VRRSGPDRNSSPADF（配列番号39）、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QGIG（配列番号40）、CDR2 TTS（配列番号41）、およびCDR3 QKYNSAPRT（配列番号42）を含む抗体または断片を提供する。

10

【0024】

さらなる特定の態様では、本発明の抗体が、図5および/または図6に示されるアミノ酸配列を含めた抗体12または42のアミノ酸配列を含む。本発明の組換え抗体であるIgM12は、図5に示される可変重鎖配列（配列番号1）および可変軽鎖配列（配列番号11）を含む。本発明の組換え抗体であるIgM42は、図6に示される可変重鎖配列（配列番号17）および可変軽鎖配列（配列番号27）を含む。本発明の特定の態様では、組換え抗体は、ヒト重鎖可変領域、定常領域、およびヒトJ鎖を含む、完全ヒト組換え抗体である。本明細書では、図5に示される、可変領域（配列番号1）またはそのCDR、ヒト定常領域、特に、カッパ配列（配列番号3、5、7、および9）およびヒトJ鎖（配列番号15）を含むヒト免疫グロブリン重鎖を含む完全ヒト組換えIgM12抗体が提供される。

20

【0025】

さらなる態様では、本発明が、抗原に結合することが可能な単離抗体またはその断片であって、本明細書および図6に実質的に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む抗体またはその断片を提供する。本発明は、ニューロンに結合することが可能な単離されたヒト抗体またはその断片であって、重鎖可変領域（配列番号17）もしくはそのCDR、および軽鎖可変領域（配列番号27）もしくはそのCDRを含む抗体もしくはその断片、または本明細書および図6に実質的に示されるアミノ酸配列を含む抗体もしくはその断片を提供する。

30

【0026】

さらなる態様では、本発明が、抗原に結合することが可能な単離された完全ヒト抗体またはその断片であって、実質的に本明細書および図5に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む抗体またはその断片を提供する。本発明は、ニューロンに結合することが可能な単離された完全ヒト抗体またはその断片であって、重鎖可変領域（配列番号1）もしくはそのCDR、および軽鎖可変領域（配列番号11）もしくはそのCDRを含むか、または実質的に本明細書および図5に示されるアミノ酸配列を含む抗体またはその断片を提供する。本発明は特に、単離ヒトIgM抗体またはその活性断片であって、図5に示される、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GGSVSLYY（配列番号31）、CDR2 GYIYSSGST（配列番号32）、およびCDR3 ARSASIRGWFD（配列番号33）、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY（配列番号34）、CDR2 AAS（配列番号35）、およびCDR3 QQSYPHTPW（配列番号36）を含む抗体またはその活性断片を提供する。特定の態様では、本発明が、単離された完全ヒト組換えIgM抗体またはその活性断片であって、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GGSVSLYY（配列番号31）、CDR2 GYIYSSGST（配列番号32）、およびCDR3 ARSASIRGWFD（配列番号33）、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY（配列番号34）、CDR2 AAS（配列番号35）、およびCDR3 QQSYPHTPW（配列番号36）、ヒト定常領域および配列番号15に示されるヒトJ鎖配列を含む抗体またはその活性断片を提

40

50

供する。

【0027】

さらなる態様では、本発明が、ニューロン結合ポリペプチドまたは上記で規定した抗体をコードする配列を含む単離核酸、および本発明のポリペプチドまたは抗体を調製する方法であって、前記ポリペプチドまたは抗体の発現をもたらす条件下で前記核酸を発現させるステップと、これらのポリペプチドまたは抗体を取り出すステップとを含む方法を提供する。このような一態様では、図5もしくは6に示されるアミノ酸配列を有する抗体の可変領域配列をコードする核酸が提供されるか、または図5もしくは6に示されるCDRドメイン配列を有する抗体が提供される。一態様では、図5または6の核酸配列を含む核酸が提供される。さらなる態様では、図5または6に示される重鎖可変領域であるVH鎖または軽鎖可変領域であるVL鎖をコードする核酸が提供される。本発明はまた、本発明の抗体をコードする組換えDNA分子もしくはクローニングされた遺伝子またはその縮重バリエーション、好ましくは、核酸分子、特に、抗体のVH鎖およびVL鎖、特に、図5または6に示される配列を有するかまたはこれをコードすることが可能なCDR領域の配列をコードする組換えDNA分子またはクローニングされた遺伝子にも関する。好ましい態様では、本発明が、IgM12の重鎖可変領域配列(配列番号2)および軽鎖可変領域配列(配列番号12)をコードする核酸、ならびにIgM42の重鎖可変領域配列(配列番号18)および軽鎖可変領域配列(配列番号28)をコードする核酸を提供する。本発明の態様では、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GGSVSLYY(配列番号31)、CDR2 GYIYSSGST(配列番号32)、およびCDR3 ARSASI
R G W F D (配列番号33)、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY(配列番号34)、CDR2 AAS(配列番号35)、およびCDR3 QQSYHTPW(配列番号36)を含む抗体またはその断片をコードする核酸が提供される。さらなる態様では、核酸が、ヒト定常領域およびヒトJ鎖、特に、配列番号15のJ鎖をさらにコードする。本発明の態様では、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GFTFSTYA(配列番号37)、CDR2 INVGGVTT(配列番号38)、およびCDR3 VRRSGPDRNSSPADF(配列番号39)、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QGIG(配列番号40)、CDR2 TTS(配列番号41)、およびCDR3 QK
Y N S A P R T (配列番号42)を含む抗体またはその断片をコードする核酸が提供される。さらなる態様では、核酸が、ヒト定常領域およびヒトJ鎖、特に、配列番号15のJ鎖をさらにコードする。

【0028】

本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、哺乳動物における神経保護の方法であって、前記哺乳動物に有効量の本発明の抗体、それらの断片、および組換え抗体を投与するステップを含む方法など、ヒトまたは動物の身体に対する処置法、防止法、または診断法において用いることができる。本発明によるCDRドメイン領域の配列を含む組換え抗体またはそれらの断片は、哺乳動物における神経保護の方法であって、前記哺乳動物に有効量の本発明の抗体、それらの断片、および組換え抗体を投与するステップを含む方法において用いることができる。

【0029】

本発明の薬剤、特に、組換え抗体またはそれらの断片は、神経傷害、神経損傷または神経障害、および結果としてCNS損傷をもたらすことが可能であり、可能性があるかまたは実際にもたらす合併症を防止、処置、または改善するための方法における神経保護剤として用いることができる。本発明の処置法または防止法は、脳傷害または脳外傷、脊髄損傷(SCI)、神経傷害、頭部傷害、脳への血液供給が低減されるかまたは障害された状態、脳の感染性疾患、神経変性疾患を含めた、ニューロンの構造、機能、または生存の喪失が関与するかまたは関連する場合に適用可能である。本発明の方法に従い処置、防止、または改善するための例示的なこのような疾患または状態には、脊髄損傷(SCI)、外傷性脳損傷(TBI)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症(MS)、アルツハイマー病、脳卒中、パーキンソン病、ハンチントン病、出産前低酸素症/周産期虚血、

10

20

30

40

50

および/または脳性まひ、脳症、脊髄症、ならびに運動ニューロン疾患が含まれる。したがって、本発明は、神経が障害され、傷害されもしくは損傷した哺乳動物における疾患もしくは状態、または神経もしくはニューロンが障害、傷害もしくは損傷に感受性であるかもしくはこの危険性がある状況を処置または改善する方法であって、I g M 1 2 および I g M 4 2 から選択される組換え抗体もしくは完全ヒト抗体またはその断片を投与するステップを含む方法に関する。

【0030】

本発明の態様では、本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体を、神経が障害され、傷害されもしくは損傷した症例、疾患、もしくは状態、または神経もしくはニューロンが障害、傷害もしくは損傷に感受性であるかもしくはこの危険性がある状況における神経機能または運動機能を改善または安定化させる方法において用いることもでき、このための組成物により投与することもできる。特定の態様では、歩行などの運動または想起もしくは認識などの認知機能を含めた、またはこれらから選択される神経機能または運動機能の改善または安定化を促進するかまたは維持するように、抗体またはそれらの断片を、疾患または状態の早期もしくは初期において用いるかもしくは投与するか、または疾患または状態の経過または持続時間にわたり反復使用する。

【0031】

本発明の方法は、抗体 I g M 1 2 および抗体 I g M 4 2 の組合せを含めた複数の抗体または断片の投与を含みうる。本発明の態様では、1または複数の抗体またはそれらの断片を投与するステップを含み、抗体が (a) 可変重鎖アミノ酸 C D R ドメイン配列 C D R 1 G G S V S L Y Y (配列番号 3 1)、C D R 2 G Y I Y S S G S T (配列番号 3 2)、および C D R 3 A R S A S I R G W F D (配列番号 3 3)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q S I S S Y (配列番号 3 4)、C D R 2 A A S (配列番号 3 5)、および C D R 3 Q Q S Y H T P W (配列番号 3 6)、または (b) 可変重鎖アミノ酸 C D R ドメイン配列 C D R 1 G F T F S T Y A (配列番号 3 7)、C D R 2 I N V G G V T T (配列番号 3 8)、および C D R 3 V R R S G P D R N S S P A D F (配列番号 3 9)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q G I G (配列番号 4 0)、C D R 2 T T S (配列番号 4 1)、および C D R 3 Q K Y N S A P R T (配列番号 4 2) を含む方法が提供される。さらなるこのような方法では、抗体 I g M 1 2 および/または抗体 I g M 4 2 のうちの1または複数、特に、抗体 r H I g M 2 2 および/または抗体 r H I g M 4 6 のうちの1または複数を含めた他の C N S 作用抗体と組み合わせることができる。r H I g M 2 2 抗体は、配列番号 4 3 および 4 4 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列番号の C D R を含む。r H I g M 4 6 抗体は、配列番号 4 5 および 4 6 に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列番号の C D R を含む。したがって、抗体 I g M 1 2 および/または抗体 I g M 4 2 のうちの1または複数は、(a) C D R 1 配列である S S G M H、C D R 2 配列である V (I) I S Y D G S R K Y Y A D S V K G、および C D R 3 配列である G V T G S P T L D Y を含む重鎖可変領域の C D R、ならびに C D R 1 配列である S G S S S N I G N N F V S、C D R 2 配列である D I T K R P S、および C D R 3 配列である G (E) T W D S S L S A V V を含む軽鎖可変領域の C D R ; または (b) C D R 1 配列である S G F T F S S Y W、C D R 2 配列である I K K D G S E K、および C D R 3 配列である A R P N C G G D C Y L P W Y F D を含む重鎖可変領域の C D R、ならびに C D R 1 配列である Q S V L Y S S N N K N Y、C D R 2 配列である Y W A S、および C D R 3 配列である Q Q Y Y N T P Q A を含む軽鎖可変領域の C D R を含む1または複数の再ミエリン化抗体と組み合わせることができる。抗体の組合せは、まとめて投与することもでき、逐次的に投与することもでき、多様な回数および多様な量または濃度で投与することができる。二重特異性抗体を用いることもでき、多重特異性抗体を用いることもできる。特定のこのような態様では、抗体 1 2 および/または抗体 4 2 を、抗体 2 2 および/もしくは抗体 4 6 ならびに/または I g M 2 2 または I g M 4 6 の C D R 領域の C D R 1 配列、C D R 2 配列、および C D R 3 配列を有する抗体と組み合わせ、併用投与を介して、または数時間、数日間、もしくは数週間を含めた短時間もしくは長期間を隔てて逐次的に投与す

10

20

30

40

50

る。このような特定の一態様では、神経変性を伴う疾患または状態、および、特に、脱髄を含めた疾患または状態を処置または改善するために、抗体 1 2 および / または抗体 4 2 を、抗体 2 2 および / または抗体 4 6 と組み合わせて、併用投与を介して、または逐次的に投与する。さらなるこのような態様では、脱髄性疾患または脱髄性状態を処置または改善するために、抗体 1 2 および / または抗体 4 2 を、抗体 2 2 および / または抗体 4 6 と組み合わせて、併用投与を介して、または逐次的に投与する。特定の態様では、多発性硬化症を処置または改善するために、抗体 1 2 および / または抗体 4 2 を、抗体 2 2 および / または抗体 4 6 と組み合わせて、併用投与を介して、または逐次的に投与する。このような一態様では、MS 症の測定可能な臨床的側面において、相乗効果を含めた組合せ効果のために再ミエリン化および神経保護を達成する。

10

【 0 0 3 2 】

本発明の薬剤の神経保護能および / または神経変性能の点から述べると、本発明はさらに、皮質ニューロン、海馬ニューロン、小脳顆粒細胞、および網膜神経節細胞の増殖を含めたニューロンの増殖を、*in vitro* においてもたらし、刺激する方法にも関する。このような増殖したニューロンは、移植および神経細胞の治療プロトコールおよび治療法に適切でありうる。

【 0 0 3 3 】

本発明の診断的有用性は、*in vitro* および *in vivo* における診断アッセイおよび画像化アッセイを含めた、CNS における神経傷害もしくは神経損傷を特徴付けるか、または神経傷害もしくは神経損傷もしくは神経死滅（壊死性死滅またはアポトーシス性死滅を含めた）を伴う疾患もしくは状態についてスクリーニングするかもしくは評価するアッセイおよび方法における本発明の抗体の使用まで拡張される。イムノアッセイでは、対照量の抗体などを調製し、酵素、特異的結合パートナー、リガンド、色素、蛍光タグ、および / または放射性元素で標識し、次いで、細胞試料へと導入することができる。標識した物質またはその結合パートナー（複数可）に試料内の部位と反応する機会を与えた後、結果として得られる物質塊を、結合させる標識の性質と共に変化する公知の技法を介して観察することができる。*in vivo* における診断適用または画像化適用では、抗体またはそのニューロン結合断片を調製し、酵素、特異的結合パートナー、リガンド、色素、蛍光タグ、および / または放射性元素で標識し、次いで、動物へと導入することができる。標識した物質またはその結合パートナー（複数可）に動物内の部位と反応する機会を与えた後、この動物を、結合させる標識の性質と共に変化する公知の技法を介して観察することができる。

20

30

【 0 0 3 4 】

放射性標識した特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらの断片は、*in vitro* の診断法および *in vivo* の放射性画像化法において有用である。本発明のさらなる態様では、放射性標識した特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらの断片、特に、ラジオリポコンジュゲート、特に、放射性標識した抗体としてのラジオリポコンジュゲートが、神経傷害の修復、神経変性の回復、がん、もしくは CNS 腫瘍の治療のための放射性免疫治療、または、代替的に、特定の症例において損傷した神経組織またはニューロンを切除するための放射性免疫治療において有用である。*in vivo* の態様では、抗体またはそのニューロン結合断片を標識し、神経傷害を位置特定するかまたは損傷されもしくは傷害された残りの神経組織を評価するための、定位固定法または侵襲性が最小限の技法を含めた手術もしくは外科法の前、手術もしくは外科法の間、または手術もしくは外科法の後に動物に投与する。このような一態様では、放射性標識した特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらの断片が、放射免疫ガイド下手術法において有用であり、この場合、これらにより、障害され、損傷され、傷害され、または死滅する神経細胞もしくはニューロンまたは神経組織の存在および / または位置を、手術前、手術中、または手術後に同定および指示して、このような細胞を標的とするか、同定するか、または除去することもできる。

40

【 0 0 3 5 】

50

本発明に包含されるイムノコンジュゲートまたは抗体の融合タンパク質であって、本発明の特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらの断片を、他の分子または薬剤にコンジュゲートするかまたは結合させたイムノコンジュゲートまたは融合タンパク質にはさらに、神経活性薬、化学的切除剤、毒素、免疫調節剤、サイトカイン、細胞傷害薬、化学療法剤または化学療法薬にコンジュゲートした結合メンバーも含まれるがこれらに限定されない。

【0036】

本発明は、例として挙げると、ニューロンの損傷、障害、もしくは傷害の程度もしくは存在についての定量的解析のための試験キット、または試料中のニューロンを定量化するための試験キットの形態で調製しうるアッセイ系を包含する。系または試験キットは、本明細書で論じられる放射法および/または酵素法のうちの1つを介して調製される標識された成分と、標識の、抗体、および、場合によって、それらのうちの少なくとも1つを遊離成分（複数可）もしくは固定化成分（複数可）とする1または複数のさらなる免疫化学試薬、またはそれらの結合パートナー（複数可）への連結とを含まう。

10

【0037】

本発明の抗体、ならびに、特定の実施形態では、本明細書の図5および6に示される重鎖配列および/または軽鎖配列を含む組換え抗体（複数可）、またはそれらの活性断片、ならびに、特に、図5および6に示されるCDR領域の配列を含む、これらに由来する単鎖抗体、組換え抗体、または合成抗体を、ニューロンの障害、損傷、傷害、または死滅を伴う状態または疾患を処置または改善するためなど、治療が適切な症例において投与するための、適切なビヒクル、キャリア、または希釈剤を含めた医薬組成物に調製することができる。このような医薬組成物はまた、PEG化など、当技術分野において公知の方法を介する、抗体または断片の半減期を調節する方法も包含する。このような医薬組成物はさらに、さらなる抗体または治療剤も含まう。

20

【0038】

本発明はまた、他の分子または薬剤と共有結合するかまたは他の形で会合する、抗体およびそれらの断片も包含する。これらの他の分子または薬剤には、異なる認識特徴を伴う分子（抗体または抗体断片を含めた）、毒素、リガンド、向神経活性剤、および化学療法剤が含まれるがこれらに限定されない。さらなる態様では、本発明の抗体または断片を用いて、治療用分子または他の薬剤を標的化するかまたは方向付ける、例えば、ニューロン、例えば、創傷部位、虚血部位、腫瘍部位、炎症性領域、または神経変性病変におけるニューロンを含めた、皮質ニューロン、海馬ニューロン、網膜神経節細胞、または小脳顆粒細胞を、分子または薬剤の標的とすることができる。

30

例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

（項目1）

神経が損なわれているか、傷つけられているか、もしくは損傷しているか、または神経が損なわれるか、傷つけられるか、もしくは損傷する危険性がある哺乳動物における疾患または状態を処置または改善するのに使用するための単離ヒトIgM抗体またはその断片であって、該抗体またはその断片は、ニューロンに特異的に結合し、ニューロンを細胞死から保護し、かつ再ミエリン化を促進せず、ここで、該抗体または断片は、以下の配列：

40

（a）図5に示される、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GGSVSLYY（配列番号31）、CDR2 GYIYSSGST（配列番号32）、およびCDR3 ARSASIRGWFD（配列番号33）、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY（配列番号34）、CDR2 AAS（配列番号35）、およびCDR3 QQSYPHTPW（配列番号36）、または

（b）図6に示される、可変重鎖アミノ酸CDRドメイン配列CDR1 GFTFSTYA（配列番号37）、CDR2 INVGGVTT（配列番号38）、およびCDR3 VRRSGPDRNSSPADF（配列番号39）、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QGIG（配列番号40）、CDR2 TTS（配列番号41）、およびCDR3 QKYNSAPRT（配列番号42）

50

を含む、単離ヒト I g M 抗体またはその断片。

(項目 2)

配列番号 1 に示される可変重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 1 に示される可変軽鎖アミノ酸配列を含むか、または配列番号 1 7 に示される可変重鎖アミノ酸配列および配列番号 2 7 に示される可変軽鎖アミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 3)

可変重鎖アミノ酸 C D R ドメイン配列 C D R 1 G F T F S T Y A (配列番号 3 7)、C D R 2 I N V G G V T T (配列番号 3 8)、および C D R 3 V R R S G P D R N S S P A D F (配列番号 3 9)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q G I G (配列番号 4 0)、C D R 2 T T S (配列番号 4 1)、および C D R 3 Q K Y N S A P R T (配列番号 4 2) を含む、項目 1 に記載の単離抗体またはその断片。

(項目 4)

図 6 に示される、配列番号 1 7 に示される可変重鎖アミノ酸配列および配列番号 2 7 に示される可変軽鎖アミノ酸配列を含む、項目 3 に記載の単離抗体。

(項目 5)

組換え抗体 r H I g M 4 2 である、項目 1、3、または 4 に記載の単離抗体。

(項目 6)

項目 3 に記載の単離抗体または断片であって、該単離抗体または断片は、配列番号 1 7 および 2 7 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体もしくは抗体断片、またはそれらの相同性の高いバリエーションであり、該バリエーションは、ニューロン結合活性および神経保護活性を保持する、単離抗体または断片。

(項目 7)

可変重鎖アミノ酸 C D R ドメイン配列 C D R 1 G G S V S L Y Y (配列番号 3 1)、C D R 2 G Y I Y S S G S T (配列番号 3 2)、および C D R 3 A R S A S I R G W F D (配列番号 3 3)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q S I S S Y (配列番号 3 4)、C D R 2 A A S (配列番号 3 5)、および C D R 3 Q Q S Y H T P W (配列番号 3 6) を含む、項目 1 に記載の単離抗体またはその断片。

(項目 8)

ヒト J 鎖配列をさらに含む、項目 1 または 7 に記載の単離抗体。

(項目 9)

前記 J 鎖が配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含む、項目 8 に記載の抗体。

(項目 10)

配列番号 1 に示される可変重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 1 に示される可変軽鎖アミノ酸配列を含む、項目 7 または 8 に記載の抗体。

(項目 11)

組換え抗体 r H I g M 1 2 である、項目 1、7、8、または 10 に記載の単離組換え抗体。

(項目 12)

項目 7 に記載の単離抗体または断片であって、該単離抗体または断片は、配列番号 1 および 1 1 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む完全ヒト抗体もしくはその抗体断片、またはそれらの相同性の高いバリエーションであり、該バリエーションは、ニューロン結合活性および神経保護活性を保持する、単離抗体または断片。

(項目 13)

脊髄損傷 (S C I)、外傷性脳損傷 (T B I)、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、多発性硬化症 (M S)、アルツハイマー病、脳卒中、パーキンソン病、ハンチントン病、出産前低酸素症 / 周産期虚血、脳性まひ、脳症、脊髄症、または運動ニューロン疾患において使用するためのものである、項目 1 から 1 2 のいずれかに記載の単離抗体またはその断片。

。

10

20

30

40

50

(項目14)

中枢神経系の神経が損なわれているか、傷つけられているか、もしくは損傷しているか、または神経が損なわれるか、傷つけられるか、もしくは損傷する危険性がある哺乳動物における疾患または状態を処置または改善するために、再ミエリン化抗体と組み合わせて処方されている、項目1に記載の単離抗体。

(項目15)

組み合わされる前記再ミエリン化抗体がIgM22およびIgM46から選択される、項目14に記載の単離抗体。

(項目16)

組み合わされる前記再ミエリン化抗体が、配列番号43および44に示される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含むか、または配列番号45および46に示される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含む、項目15に記載の抗体。

10

(項目17)

検出可能な標識または機能的な標識で標識されている、項目1から12のいずれかに記載の抗体。

(項目18)

前記標識が酵素、特異的結合パートナー、リガンド、色素、蛍光タグ、および/または放射性元素である、項目17に記載の抗体。

(項目19)

項目1から12のいずれかに記載の抗体または断片をコードする配列を含む、単離核酸。

20

(項目20)

項目1から12のいずれか一項に記載の抗体または断片を調製する方法であって、該抗体または断片の発現をもたらす条件下で、項目17に記載の核酸を発現させるステップと、

該抗体または断片を取り出すステップとを含む、方法。

(項目21)

項目1から12のいずれか一項に記載の抗体または断片と、薬学的に許容されるビヒクル、キャリア、または希釈剤とを含む、医薬組成物。

30

(項目22)

動物被験体における神経細胞の傷害、損傷、または死滅を処置または改善するためのキットであって、

項目21に記載の医薬組成物の医薬投薬形態と、

1または複数のさらなる向神経活性剤もしくは治療用抗炎症剤、神経伝達物質放出調節剤、神経受容体リガンドもしくは神経受容体アゴニストもしくは神経受容体アンタゴニスト、カルシウムチャンネル剤、免疫調節剤、または他のCNS反応性抗体を含む別個の医薬投薬形態と

を含む、キット。

40

(項目23)

前記他のCNS反応性抗体が、IgM22および/またはIgM46から選択される再ミエリン化抗体である、項目22に記載のキット。

(項目24)

CNS損傷を結果としてもたらす疾患、状態、または合併症を患う哺乳動物における神経の傷害、死滅、または損傷の存在または程度を検出するための方法であって、

A. 神経の傷害、死滅、または損傷の存在が疑われる哺乳動物に由来する生物学的試料を、項目1から12のいずれかに記載の抗体または断片と、該抗体または断片の該試料中のニューロンへの結合を可能とする条件下で、接触させるステップと、

B. 該試料に由来する該ニューロンと該抗体との間で結合が生じたか否かを検出するか、

50

または該試料に由来する該ニューロンおよび該抗体により生じた結合の量を決定するステップと
を含み、

該結合の検出により該試料中の神経細胞の傷害、死滅、または損傷の存在が示され、該結合の量により神経細胞の傷害、死滅、または損傷の相対量が示される、方法。

(項目25)

哺乳動物のCNSにおけるニューロンの傷害、死滅、もしくは損傷を、またはニューロンの傷害、死滅、もしくは損傷の危険性がある細胞を標的とするための、および決定するための方法であって、

該哺乳動物に、検出可能に標識したある量の、項目1から12のいずれかに記載の抗体を投与するステップと、

該哺乳動物のCNSにおける該標識の量および/または該標識の位置を決定するステップと

を含む、方法。

【0039】

当業者には、以下の例示的な図面および付属の特許請求の範囲を参照しながらなされる後続の詳細な説明の検討から、他の目的および利点が明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】図1は、複数種類のニューロンの表面に結合するヒトIgMを示す図である。ニューロフィラメント(NF)(BおよびD)を共発現させる生存皮質ニューロンの表面に結合するsHIgM42(A)およびrHIgM12(C)を示す図である。細胞は、培地中に10μg/mlのIgMを伴う10分間のインキュベーションの間、氷上で維持した。細胞を固定し、洗浄し、抗ヒトミュー鎖Fab'2-FITC二次抗体により、ヒトIgMを検出した。内部NFは、特徴的な分節パターンとして存在する。皮質細胞は、ポリオルニチンでコーティングしたガラス製のカバースリップ上のNeurobasal B27培地中で6日間にわたり増殖させた。全ての皮質ニューロンがNFを発現させるわけではないが、IgMは、培養物中の全てのニューロンに結合する。rHIgM12(E:緑色)およびsHIgM42(F:緑色)は、ニューロフィラメント(NF:赤色)を共発現させるマウス生存海馬ニューロンの表面に結合する。海馬ニューロンは、ポリリシンでコーティングしたプラスチック上のNeurobasal B27培地中で1週間にわたり増殖させた。ヒト側頭葉切除部から単離された細胞は、DMEM/F12/N2/B27中で21日間にわたり増殖させた。また、IIIチューブリン陽性でもあった(F:Promega製の抗IIIによる)、細胞表面に結合したrHIgM12(G)を示す図である。

【図2】図2は、ヒトIgMにより、小脳顆粒細胞の表面が異なるパターンで標識されることを示す図である。1日間にわたり培養したラット小脳顆粒細胞を、生存させたまま、氷上で15分間にわたり、培養培地中に10μg/mlのヒト血清に由来するIgM、sHIgM12またはsHIgM42と共にインキュベートした。洗浄し、4%のパラホルムアルデヒドで固定した後、細胞を、室温でFITCコンジュゲート抗ヒトミュー鎖抗体と共にインキュベートし、免疫蛍光顕微鏡を用いて画像化した。これらの2つの抗体を用いるニューロン膜の標識パターンは異なる。神経突起膜の小領域には、sHIgM12が結合する結果として、明確に点状のパターンがもたらされる。神経突起膜の大領域には、sHIgM42が結合する結果として、分節パターンがもたらされる。拡大率は、400倍とする。

【図3】図3は、ニューロンに結合するヒトIgM、rHIgM12、およびsHIgM42は、培養物中の皮質ニューロンを、過酸化水素誘導性細胞死から保護することを示す図である。3日間にわたり培養したマウスニューロンを、500nMのH₂O₂または10μg/mlのヒトIgMを伴うかもしくは伴わない生理食塩液で30分間にわたり処置した。細胞は、新鮮なNeurobasal B27培地で洗浄し、24時間後、カスパー

10

20

30

40

50

ぜ3の発現を、FLICAカスパーゼ3アッセイキット(Immunochemistry Technologies 935)を用いて、96ウェルにおいて3連で検出した。バーは、カスパーゼ3の活性化からの保護%を示す。

【図4】図4は、組換え抗体を産生するための増幅用ベクターを示す図である。この図は、組換えIgM12および組換えIgM42を生成させるために改変したsHIgM22(rHIgM22)に基づき組換え抗体を生成させるのに用いられるベクターのマップである。CHO細胞で発現させるために、VH鎖のプロモーターをE1Aプロモーターで置換した。C 軽鎖の定常領域は、カッパ軽鎖の定常領域であるC 領域で置換した。

【図5-1】図5は、組換えベクターにおけるIgM12抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。ヒトJ鎖をアミノ酸配列および核酸配列により示す。

10

【図5-2】図5は、組換えベクターにおけるIgM12抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。ヒトJ鎖をアミノ酸配列および核酸配列により示す。

20

【図5-3】図5は、組換えベクターにおけるIgM12抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。ヒトJ鎖をアミノ酸配列および核酸配列により示す。

【図5-4】図5は、組換えベクターにおけるIgM12抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。ヒトJ鎖をアミノ酸配列および核酸配列により示す。

30

【図5-5】図5は、組換えベクターにおけるIgM12抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。ヒトJ鎖をアミノ酸配列および核酸配列により示す。

40

【図5-6】図5は、組換えベクターにおけるIgM12抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。ヒトJ鎖をアミノ酸配列および核酸配列により示す。

50

軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。

【図6-6】図6は、組換えベクターにおけるIgM42抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。

【図6-7】図6は、組換えベクターにおけるIgM42抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。

【図6-8】図6は、組換えベクターにおけるIgM42抗体のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。重鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列をグレーとし、Vh配列、ならびに定常領域配列であるCH1配列、CH2配列、CH3配列、およびCH4配列の各々が提示および指示される。軽鎖アミノ酸配列およびコード核酸配列を紫色とし、可変領域のVL配列および定常領域のCL(カッパ)配列の両方を示す。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR領域の配列に言及する。

【図7】図7は、組換えrHIgM12が、TMEV誘導性疾患を伴うマウスにおける欠損を改善することを示す図である。夜間(マウスが通常は活動的な)1時間当たりの平均自発活動は、sHIgM12 100 μ gの単回腹腔内投与の3週間後までに変化する。TMEV感染の90日後におけるSJLマウス5匹の群を、rHIgM12(赤色バー)または対照のヒトIgM(黒色バー)で処置し、Accuscan活動モニタリングボックス内の群として毎週3日間にわたりモニタリングした。3夜間にわたる夜間1時間当たりの水平方向の活動の平均 \pm SEMを、IgM処置の前の3晩にわたる夜間活動と比較した。処置前のレベルと比較した夜間活動の増大が、rHIgM12の単回投与による処置の3週間~7週間後には見られた($P < 0.01$)が、対照による処置後には見られなかった。比較のために、週齢を一致させた非感染マウスの活動レベルをグラフ表示する(緑色バー)。

【図8】図8は、マウス脳幹で収集されたMRSスペクトルを示す図である。上パネルは、シグナルを収集したボクセルを示す図である。この対象の領域を位置特定するには、解剖学的ランドマークを用いた。ごく短時間のMRI走査を用いて、3つの直交平面による画像を得、脳幹にわたり2.5mm³の立方体を位置特定する(上パネル)。マウス脳幹の300MHzによる1Hスペクトルを示す図である(下パネル)。コリン(Cho)、クレアチン(Cr)、およびN-アセチル-アスパラギン酸(NAA)のピークが容易に同定される。スペクトルは、4.7ppmの水を基準とする。

【図9】図9は、脳幹におけるNAAレベルの低下が、軸索喪失の増大と相関することを示す図である。10匹のSJLマウスを、TMEVによる感染の0~270日後から前望的に研究した。MRSは、各マウスの脳幹において得、NAA濃度を決定した(上)。全てのマウスで、断面における直接的なカウンティングを介して大規模な軸索喪失が示される時点であるウイルス感染の90日後に、統計学的に有意な低下に到達するNAAの漸減が記録された(2)。NAAレベルは、疾患の持続期間にわたり、低レベルに保たれた。非感染マウスのT6レベル(黒色バー)、感染の90日後のマウスのT6レベル(グレー)、および感染の270日後のマウスのT6レベル(白色)において、軸索の絶対数をカウントした(下)。

【図10】図10は、ヒトIgMの単回投与後の脳幹におけるNAAを示す図である。NAAレベルが低下し始め、大規模な軸索喪失が検出可能となる時点である、TMEV感染の90日後において、SJLマウス10~15匹の群に、sHIgM12、sHIgM42、対照のヒトIgM、または生理食塩液(PBS)100 μ gずつの単回腹腔内投与を

10

20

30

40

50

施した。脳幹におけるMRSを、処置前ならびに処置の5週間後および10週間後に収集した。NAAレベルは、これらのスペクトルから計算した。sHIGM12による処置群およびsHIGM42による処置群では、5週間後(P=0.005:P=0.029)および10週間後(P<0.001:P=0.037)に、NAAが処置前のレベルと比較して増大した。対照試薬で処置したマウス群は、安定または低下傾向であった。グラフは、脳幹ボクセルにおけるNAAレベルの平均±SEMを表す。

【図11】図11は、ニューロンに結合するヒトIgMが、脱髄、再ミエリン化、または炎症を変化させないことを示す図である。慢性TMEV感染マウス5匹の群を、ヒトIgM 100μgの単回投与で処置した。全ての群が、処置の10週間後に同程度の脊髄炎症(黒色バー)および脱髄(赤色バー)を含有する。予測される通り、希突起膠細胞結合IgMであるrHIGM22で処置したマウスが示した再ミエリン化は大きかった(緑色バー)。sHIGM12およびsHIGM42は、脊髄の再ミエリン化を促進しない。これは、軸索を保護する方法は*in vivo*において複数存在しうることを示唆する。

【図12】図12は、静脈内注射後のCD-1マウスの循環におけるニューロン結合ヒトIgMの血清半減期を示す図である。サンドウィッチELISAを用いて、48時間にわたる、ヒトミュー鎖のマウス血清からの減衰を定量化した。アルカリホスファターゼ基質の(Sigma 104)OD405の値は、平均から得た。1群当たり3匹のマウスに由来する血清および標準誤差をグラフ表示する。

【図13】図13は、³⁵S標識したrHIGM12がTMEV感染SJLマウスおよび非感染SJLマウスの脳および脊髄に入ったことを示す図である。³⁵S標識したrHIGM12は、5カ月齢のTMEV感染SJLマウスおよび月齢を一致させた非感染SJLマウスに腹腔内投与した。4時間後、マウスの対を生理食塩液で灌流し、組織を迅速に採取し、秤量し、カミソリで細断し、10mlのシンチレーション液(Ultima Gold LSC)と混合した。同じ手順を24時間後に繰り返した。48時間後、組織を可溶化させ、Beckmanシンチレーションカウンターにより、1分間にわたりバイアルをカウントした。各マウスの脳および脊髄全体の総カウントをグラフ表示する。バイアル内に組織を伴わないバックグラウンドのカウントは、12カウントであった。

【図14】図14は、ニューロン結合ヒトIgMが、*in vivo*において脊髄病変を標的とすることを示す図である。慢性TMEV誘導性脊髄脱髄を伴うマウスに、腹腔内1.0mgのsHIGM42(A)、rHIGM12(B)、または対照のヒトモノクローナルIgM(C)を施した。4時間後、マウスを4%のバラホルムアルデヒドで灌流し、脊髄を摘出し、凍結切片化し、ヒトミュー鎖を指向するFITC-コンジュゲートFab'2断片(Jackson Immnoresearch)を用いて免疫標識した。sHIGM42またはrHIGM12を施された、マウスに由来する脊髄は、病変中にヒトIgMを含有した。対照のヒトIgMは、病変中にほとんど見出されなかった。下パネルは、炎症性の細胞および病変を可視化するH/E染色を示す図である。本発明者らは、特定のヒトIgMが、TMEVモデルにおいてBBBを越えることを結論付ける。

【図15】図15は、ニューロン結合ヒトIgMが、脊髄病変におけるニューロフィラメント+(NF+)の軸索に局在化することを示す図である。慢性TMEV誘導性脊髄脱髄を伴うマウスに、1.0mgのIgMを腹腔内投与し、4時間後に屠殺した。脊髄を凍結させ、縦方向に切片化し、FITCコンジュゲート抗ヒトミュー鎖Fab'2断片(緑色)および抗NF(SMI-32および34;赤色)の後、TRICTコンジュゲート二次抗体で免疫標識した。共焦点顕微鏡画像を組み合わせるにより、sHIGM42(A)の、長鎖のNF+線維(B)との共同在化が(C)に組み合わせられていることが確認される。rHIGM12(D;緑色)はまた、断面で切断された軸索の神経線維束などのNF+構造(D;赤色)とも共同在化した。

【図16】図16は、rHIGM12およびsHIGM42が、EAE臨床スコアを増悪させないことを示す図である。MOGペプチド誘導性EAEを伴うC57BL/6マウス10匹の群に、rHIGM12、sHIGM42、対照のヒトIgM、または生理食塩液100μgずつの単回静脈内投与を、各マウスが臨床スコア1に到達した(尾の引きずり)

10

20

30

40

50

時点で施し、免疫化の28日後まで1日おきにモニタリングした。グラフは、各処置群の平均臨床スコアの平均±SEMとする。平均臨床スコアのランクについてのANOVAは、群間で差異を示さなかった($P = 0.14$)。

【図17】図17は、rHlgM12およびsHlgM42が、EAEによる脊髄病態を増悪させないことを示す図である。図13における研究の終了時に脊髄を摘出し、1mmのブロックへと切断し、連続するブロックから3つおきに切断される断面をエリクロムで染色して、病態を可視化した。マウス1匹当たり10ずつの断面(40ずつの四半部)を盲検により評価した。群間で、炎症($P = 0.825$)または脱髄($P = 0.766$)における差異は見られなかった。

【図18】図18は、rHlgM12が、神経突起成長を促進することを示す図である。E15の海馬ニューロンを、ポリ-D-リシン(PDL)-ニトロセルロース(A)またはrHlgM12-ニトロセルロース(B)でコーティングしたガラス製のカバースリップ上で増殖させた。細胞を播種した12時間後、これらのニューロンを固定し、3-チューブリン抗体(A1およびB1、緑色)およびTexas-redファロイジン(A2およびB2)で染色した。A3~B3は、A1~A2とB1~B2との重合せであり、ここでは、核をDAPI(青色)で染色した。C、D、およびEは、全神経突起(C: $p = 0.0056$)、最も長い神経突起(D: $p < 0.0001$)、および2番目に長い神経突起(E: $p = 0.0782$)の長さの測定値を示す。rHlgM12上で成長しつつあるニューロンは、保有する神経突起が少なく(F: $p < 0.0001$)、大半が、対照のPDL基質上に播種されたニューロンと比較してステージ3のニューロン(G)であり(72%対18%)、複数の対称的な神経突起を有する。統計学的な解析は、平均±SEMを示す(対応のないt検定)。

【図19】図19は、rHlgM12が、軸索形成を駆動することを示す図である。PDL基質(A)、PDL+ラミニン基質(B)、またはrHlgM12基質(C)上に播種した12時間後における海馬ニューロンを、Tau1(A1~C1:緑色)またはMAP2(A2~C2:青色)で染色したことを示す図である。A3~C3は、A1~C1とA2~C2とを重合せた図であり、F-アクチン(赤色)はTexas-redファロイジンで標識した。D~Fは、A1~C1の細胞体から成長円錐において最も長い神経突起に沿って破線で表された相対Tau1強度を示す図である。Tau1染色は、rHlgM12基質上およびラミニン基質上の両方において成長させたステージ3のニューロンにおける最も長い神経突起の遠位部分において非対称的に濃縮される。

【図20】図20は、rHlgM12の結合が、ニューロン膜を再組織することを示す図である。DIV3の海馬ニューロンを固定した後、rHlgM12、コレラ毒素B(CTB、Alexa Fluor 594)、およびフィリピンで三重染色した(A)。rHlgM12(A1)は、ニューロン表面を、CTBまたはフィリピンのそれぞれで標識したGM1(A2)またはコレステロール(A3)のパターンと同様のパターンで均等に標識する。しかし、37で30分間にわたりrHlgM12で処置した後、膜結合rHlgM12は、ニューロン表面に凝集する(B1~C1)。rHlgM12で処置する結果として、凝集したrHlgM12(B3~C3)と共局在化するコレステロール(B2)およびGM1(C2)両方のクラスター形成がもたらされる。BおよびCの下方のパネルは、枠囲いした高拡大率の領域であり、凝集したrHlgM12(緑色)の、成長円錐領域においてクラスター形成したコレステロール(青色)またはGM1(赤色)との共局在化を示す図である。

【図21】図21は、rHlgM12が、ニューロン膜のマイクロドメイン上のGM1と共局在化することを示す図である。A: DIV1の海馬ニューロンを、まず、4%のパラホルムアルデヒドで固定し、次いで、rHlgM12で染色したことを示す図である。rHlgM12により、小型の点状構造が標識される。B: DIV1の生存海馬ニューロンを30分間にわたり4まで冷却し、次いで、固定した後、rHlgM12で標識するの続き、抗III-チューブリン抗体で染色したことを示す図である。rHlgM12により、ニューロン表面におけるはるかに大型の点状形成物が染色される。C: DIV3

10

20

30

40

50

の生存海馬ニューロンを、37 で30分間にわたりメチル - シクロデキストリンで処置してコレステロールを枯渇させ、次いで、4 まで冷却した。次いで、固定したニューロンを、rH Ig M 1 2 (緑色) およびコレラ毒素B (赤色) で染色したことを示す図である。rH Ig M 1 2 は、コレラ毒素Bで標識したGM 1 を共局在化させる大型の点に結合する。下パネルは、枠囲いした高拡大率の領域を示す図である。

【図22】図22は、rH Ig M 1 2 が、脂質ラフトに結合することを示す図である。DIV 7の生存皮質ニューロンを、rH Ig M 1 2 または対照のIg M 抗体に、4 で30分間にわたり結合させた。A: 抗体を結合させた後、ニューロンを3回にわたり洗浄し、0.5%のNP-40を含有する緩衝液中で溶解させたことを示す図である。溶解物は、4 におけるマイクロ遠心分離を介して分離し、上清およびペレットの両方を、抗ヒトIg M二次抗体でプロットした。rH Ig M 1 2 は、ニューロンには結合せずに洗い流される対照のIg M抗体と比較して、ペレットおよび上清の両方へと分配される。下パネルは、同量のタンパク質をロードされた別個のクーマシー染色ゲルを示す図である。B: 1%のTriton X-100を含有する緩衝液中で溶解させたニューロンを、4 のスクロース勾配下における超遠心分離を介して画分化したことを示す図である。結果として得られる画分は、随時、特異的抗体により、rH Ig M 1 2、カベオリン-1、トランスフェリン受容体、3-チューブリン(B3-Tub)、およびベータ-アクチンについてプロットした。rH Ig M 1 2 は、カベオリン-1および3-チューブリンを含有する低密度画分に局在化する。高密度画分は、トランスフェリン受容体、3-チューブリン、およびアクチンを含有する。一部のrH Ig M 1 2 は、主にチューブリンに富む細胞骨格タンパク質からなる、洗浄剤不溶性ペレットに局在化する。大半のアクチンは、洗浄剤可溶性の高密度画分へと移行する。

【図23】図23は、rH Ig M 1 2 が微小管と会合することを示す図である。A: DIV 1の海馬ニューロンを、まず、37 で30分間にわたりrH Ig M 1 2 で処置し、次いで、4%のパラホルムアルデヒドおよび0.1%のTriton X-100を含有する緩衝液で同時に固定および抽出した後、rH Ig M 1 2 (緑色)、3-チューブリン(青色)、およびF-アクチン(赤色)について染色したことを示す図である。rH Ig M 1 2 は、神経突起軸に沿った束生微小管および成長円錐の中央ドメインにおける束生微小管とは共局在化する(A2および4)が、成長円錐末梢に局在化するF-アクチンとは共局在化しない(A3および4)、洗浄剤不溶性分子に結合する。B: DIV 7の皮質ニューロンを、まず、rH Ig M 1 2 に結合させ、次いで、0.5%のNP-40中で溶解させたことを示す図である。上清を共免疫沈降にかけた。rH Ig M 1 2 および3-チューブリンのいずれもが、互いに共免疫沈降した。

【図24】図24は、rH Ig M 1 2 が軸索形成を促進することを提起した機構を示す図である。A: ニューロン膜が、ラフトマイクロドメインおよび非ラフトマイクロドメインの両方を含有することを示す図である。ニューロン膜に均等に分布するラフトマイクロドメインは、2つのプールへと分別される。それらのうちの1つは、微小管と会合する。B: rH Ig M 1 2 の結合が、微小管の安定化およびニューロン膜へのアンカリングを促進するラフトマイクロドメインのクラスター形成を誘導することを示す図である。C: 神経突起成長の間、成長円錐が環境を探索し、ラフトマイクロドメインが、rH Ig M 1 2 と相互作用することによりクラスター形成することを示す図である。結果として、微小管はrH Ig M 1 2 接触部位において安定化し、ニューロン膜にアンカリングし、このために、液浴で適用したrH Ig M 1 2 が成長円錐の中央ドメインに凝集する図3および6において観察される通り、成長円錐の末梢ドメインから中央ドメインへの移行が増強される。

【図25】図25は、rH Ig M 1 2 がチューブリンと直接会合しないことを示す図である。A: N2A神経芽細胞腫細胞を、rH Ig M 1 2 (A1: 緑色) および3-チューブリン(A2: 赤色) で染色したことを示す図である。核は、DAPI (A3: 青色) で標識した。N2A細胞は、rH Ig M 1 2 による染色については陰性であるが、3-チューブリンは発現させる。B: N2A細胞溶解物の上清を、rH Ig M 1 2 と共にインキュベートし、rH Ig M 1 2 と会合する分子を、プロテインLアガロースでプルダウンし

10

20

30

40

50

、ウェスタンブロット法にかけたことを示す図である。r H I g M 1 2 は、ペレットと会合しない。3 - チュープリンは、上清中に検出されるが、r H I g M 1 2 にはブルダウンされない。

【図26】図26は、r H I g M 1 2 が、アクチンはブルダウンするが、F - アクチンとは共局在化しないことを示す図である。A : D I V 1 の生存海馬ニューロンを固定した後、まず、4 で、r H I g M 1 2 (A 1 : 緑色) により染色し、F - アクチン (A 2 : 赤色) を T e x a s - r e d フアロイジンで標識したことを示す図である。成長円錐領域では、F - アクチンが収縮し、中央ドメインで濃縮されるのに対し、r H I g M 1 2 は、成長円錐表面上の点構造を均等に染色し、これにより、成長円錐の最外縁部が標識される。B : r H I g M 1 2 により少量のアクチンがブルダウンされ、免疫沈降では3つの被験抗

10

アクチン抗体のいずれもが作用しなかった。3 - チュープリンと同様の位置におけるバンドは、白色矢印で指し示される I g G 重鎖である。

【図27】図27 (a) は、細胞膜が、数千個のナノ細孔 (サイズを 2 0 0 n m とする) 穿通された金薄膜により再構成されることを示す図である。 (b) 懸濁させた金膜は、両面において緩衝液と接触していることを示す図である。

【図28】図28は、ニューロンに結合するヒト抗体が、神経突起伸長を促進することを示す図である。ニューロンをヒト I g M でコーティングした基質上に播種し、24時間にわたり成長させ、抗ニューロフィラメント抗体で免疫標識した。s H I g M 4 2 は、非許容性のヒト I g M (B) と比較して成長を誘導した (A) 。

【図29】図29は、ニューロンに結合するヒト抗体が膜ドメインにおいてクラスター形成することを示す図である。神経細胞体および軸索における均一の免疫標識化を、0 で実施した (A) 。細胞を、15分間にわたり15 まで加熱すると、s H I g M 4 2 は、軸索の細胞表面上におけるより個別の斑点へと局在化する (B) 。

20

【図30】図30は、i n v i v o において、神経突起伸長を促進するヒト抗体が、損傷領域を標的とすることを示す図である。慢性 S C I を伴うマウスに、腹腔内を介して抗体を施し、4時間後に脊髄を摘出し、脊髄断面においてヒト I g M を検出した。抗体を施されたマウスに由来する脊髄の損傷領域は、蛍光タグ付けした抗ヒト I g M に結合する並列線維を示す (A) 。対照のヒト I g M を施されたマウスに由来する脊髄の損傷領域は、ヒト I g M を含有しない (B) 。

【図31】図31は、脊髄挫滅損傷を示す図である。顕微鏡写真は、対照マウス (A) または8gのF e j o t a クリップによる圧迫の30日後におけるマウス (B) に由来するH & E 染色した脊髄の典型的な外観を示す。圧迫損傷は、広範な炎症性の細胞浸潤、運動ニューロンの喪失と関連する。

30

【図32】図32は、T M E V 感染マウスの夜間における自発活動の例を示す図である。 (A) 64日間にわたる水平方向の活動についての元の完全な記録を示す図である。夜間活動が活発で、昼間活動が不活発であることが容易に察知される。マウスは、通常夜間において活動性であるため、本発明者らは、解析のために夜間活動 (午後6時 ~ 午前6時) を選択した。しかし、水平方向の活動 (B) または垂直方向の活動 (C) のいずれにおいても、フィルタリングされずに要約された記録を目視することにより、長期にわたる実際の変化を同定することは困難でありうる。

40

【図33】図33は、ニューロン結合抗体 (r H I g M 1 2) の単回腹腔内投与が、慢性感染S J L マウスにおける水平方向の活動を改善することを示す図である。感染の90日後におけるS J L マウス5匹ずつの3つの群を、A c c u S c a n 活動モニタリングボックスに入れた。8日間にわたり、ベースラインの測定値を収集した。処置後、マウスを、8週間にわたり持続的にモニタリングした。パネルA、C、およびEは、水平方向の活動に対応し、パネルB、D、およびFは、垂直方向の活動に対応する。A、B) 各日のピンとして提示される平均の夜間活動により、r H I g M 1 2 処置群だけにおいて水平方向の活動の改善が示唆されることを示す図であり、C) ガウスフィルタリング (G B = 2 日間) を示す図であり、E) Z 値を標準化した6次の多項式近似により、r H I g M 1 2 処置マウスにおける明らかで、かつ、顕著な改善が提示されることを示す図である。B、D、

50

および F) 垂直方向の活動は、いかなる処置によっても影響を受けなかったことを示す図である。活動（垂直方向のスケール）とは、1時間当たりのビーム遮断回数とする。パラメータである GB とは、半高半幅のフィルター値（日単位）として解釈することができる。GB 値が増大すると共に、標準偏差が減少する。各日の各点ごとに 95% の信頼区間を与える。

【図 3 4】図 3 4 は、予測されるモデル値を用いることによる、感染の 90 日後における 3 つの処置の比較を示す図である。処置前および処置後の各日について、統計学的な解析を実施した。r H I g M 1 2 で処置したマウスの水平方向の夜間活動は、対照の I g M および生理食塩液で処置したマウスと比較して、それぞれ、処置後 7 日目 ($p = 0.045$) および 11 日目 ($p = 0.042$) に有意に異なった / 改善された（黒色矢印で示す）。各日の各点ごとに 95% の信頼区間を与える。

10

【図 3 5】図 3 5 は、疾患の早期に施した場合の r H I g M 1 2 が、S J L マウスにおける水平方向および垂直方向のいずれの活動も改善することを示す図である。感染の 45 日後における S J L マウス 5 匹ずつの 3 つの群を、A c c u S c a n 活動モニタリングボックスに入れた。8 日間にわたり、ベースラインの測定値を収集した。処置後、マウスを、8 週間にわたり持続的にモニタリングした。パネル A、C、E、および G は、水平方向の活動に対応し、パネル B、D、F、および H は、垂直方向の活動に対応する。A、B) 水平方向および垂直方向の活動についての、元のフィルタリングされていない記録を示す図であり、C、D) 各日のピンとして提示される平均の夜間活動を示す図であり、E、F) ガウスフィルタリング ($GB = 2$ 日間) を示す図であり、G、H) Z 値を標準化した 6 次

20

の多項式近似により、r H I g M 1 2 処置群の水平方向および垂直方向のいずれの活動においても改善が明らかとなることを示す図である。対照の I g M 処置群および生理食塩液処置群は、研究終了時まで同様レベルの運動活動を示した。各日の各点ごとに 95% の信頼区間を与える。

【図 3 6】図 3 6 は、予測されるモデル値を用いることによる、感染の 45 日後における 3 つの処置の比較を示す図である。処置前および処置後の各日について、統計学的な解析を実施した。A、C) r H I g M 1 2 で処置したマウスの水平方向の夜間活動は、対照の I g M および生理食塩液で処置したマウスと比較して、それぞれ、処置後 13 日目 ($p = 0.015$) および 9 日目 ($p = 0.036$) に有意に異なった。B、D) r H I g M 1 2 で処置したマウスの垂直方向の（後肢による立脚）活動は、それぞれ、処置後 14 日目 ($p = 0.019$) および 6 日目 ($p = 0.037$) に異なった / 改善された。黒色矢印は、有意な改善が生じた日を示す。各日の各点ごとに 95% の信頼区間を与える。

30

【図 3 7】図 3 7 は、正常な非感染 S J L マウスによる自発活動のばらつきが大きく、いかなる処置によっても影響を及ぼされないことを示す図である。非感染 S J L マウス 5 匹ずつの 3 つの群を、A c c u S c a n 活動モニタリングボックスに入れた。8 日間にわたり、ベースラインの測定値を収集した。処置後、マウスを、8 週間にわたり持続的にモニタリングした。いずれの処置も、水平方向の活動（A、C、E、および G）または垂直方向の活動（B、D、F、および H）のいずれにおいても変化を誘導しなかった。各日の各点ごとに 95% の信頼区間を与える。

【図 3 8】図 3 8 は、ヒト抗体の単回投与により、S O D 1 G 8 6 R 変異体のトランスジェニックマウスにおける生存が延長されることを示す図である。55 日齢のマウスを、r H I g M 1 2 または P B S の単回投与で処置した。一部のマウスは、未処置のまま放置した。マウスは、病態に応じて、臨死となるまで追跡し、次いで、屠殺した。一部のマウスは、病死した。全てのマウスは、死滅する前に、体重が甚だしく減少した。生存を、カプラン - マイヤー曲線を用いてプロットし、ノンパラメトリックのマンテル - コックス検定を用いて統計学的な有意性を決定した。r H I g M 1 2 で処置したマウスにおいては、P B S で処置したマウスまたは非処置マウスと比較して生存が延長された ($P = 0.008$)。全ての解析および処置は、マウスを屠殺する決定を下す試験実施者が、処置群について知らされないように、盲検法により実施した。この解析では、45 例のマウス全例について研究した。同腹仔である野生型の S O D + / + マウスは、正常に生存し、体重も減

40

50

少しなかった（データは示さない）。

【図39】図39は、G86R SOD1マウスにおける体重の減少を、PBSを投与される対照マウスと対比した、rHlgM12 200 μ gの単回投与を施される50日齢のマウスにおける時間の関数として示す図である。rHlgM12を投与されたマウスは、抗体の単回注射後60日間にわたり、体重の減少が軽減された。

【図40】図40は、ヒト抗体の単回投与により、SOD1 G86R変異体のトランスジェニックマウスにおける脊髄軸索の変性が減少したことを示す図である。55日齢のマウスを、rHlgM12またはPBS 250 μ gの単回投与で処置した。一部のマウスは、未処置のまま放置した。変性軸索に特徴的なミエリン渦の数を、胸部中央レベルの脊髄においてカウントした。rHlgM12で処置したSOD1変異体マウスにおける変性軸索数は、PBSで処置したマウス（ $P = 0.003$ ；T検定）および非処置マウスの場合と比較して減少した。野生型のSOD-/-マウスの脊髄において変性した軸索の数は、SOD1+/+変異体マウスの場合と比較して最小限となることに注意されたい。屠殺時において、マウスをTrumpの固定剤（4%のホルムアルデヒド、0.1%のグルタルアルデヒド）で灌流し、脊髄を1mmのブロックへと切断した。ブロックをAralditeプラスチック中に包埋し、T6レベルに由来する1ミクロンの切片を、パラフェニレンジアミンで染色して、ミエリン包被を可視化した。野生型のSOD-/-（上パネル右）およびSOD1+/+変異体（下パネル右）の脊髄切片を示す。

【図41】図41は、ヒト抗体の単回投与により、SOD1 G86R変異体のトランスジェニックマウスの脊髄における前角ニューロンおよび後角ニューロンの両方が保存されたことを示す図である。55日齢のマウスを、rHlgM12またはPBSで処置した。一部のマウスは、未処置のまま放置した。ニューロンを特異的に標識するNeuNに対する抗体で染色した前角細胞および後角細胞の数を、胸部中央脊髄のパラフィン切片中でカウントした。rHlgM12処置マウスにおける前角細胞および後角細胞の数は、PBSで処置したマウスまたは未処置のまま放置したマウスより有意に大きかった（T検定で $P = 0.0025$ および $P = 0.018$ ）。rHlgM12で処置したSOD変異体マウスにおける前角細胞および後角細胞の数は、野生型のSOD-/-マウスにおいて観察される数と同様であった。

【図42】図42は、組換えヒト抗体であるrHlgM12が、種を超えてニューロンに結合することを示す図である。マウス皮質ニューロン（A、B、C、D）、マウス海馬ニューロン（E、F）、およびヒト皮質ニューロン（G、H）を生存させたまま、rHlgM12（A、C、E、およびG）で染色し、同じ細胞を、ニロフィラメント（B、D）またはベータチューブリン（F、G）に対する抗体で共標識した。rHlgM12は、蛍光タグ付けした二次抗体で検出した。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明に従い、当技術分野内にある従来分子生物学、微生物学、および組換えDNA技法が用いられうる。このような技法は、文献において完全に説明されている。例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」（1989年）；「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻[Ausubel, R. M. 編（1994年）]；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻[J. E. Celis 編（1994年）]；「Current Protocols in Immunology」I~III巻[Coligan, J. E. 編（1994年）]；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait 編、1984年)；「Nucleic Acid Hybridization」[B. D. HamesおよびS. J. Higgins 編（1985年）]；「Transcription And Translation」[B. D. HamesおよびS. J. Higgins 編（1984年）]；「Animal Cell Culture」[R. I. Freshney 編（1986年）]

10

20

30

40

50

; 「Immobilized Cells And Enzymes」 [I R L P r e s s (1 9 8 6 年)]; B . P e r b a l , 「 A P r a c t i c a l G u i d e T o M o l e c u l a r C l o n i n g 」 (1 9 8 4 年) を参照されたい。

【 0 0 4 2 】

したがって、本明細書に現れる場合、以下の用語は、下記に示される定義を有するものとする。

【 0 0 4 3 】

A . 用語

「特異的結合メンバー」という用語は、互いに結合特異性を有する分子対のメンバーについて記載する。特異的結合対のメンバーは、天然由来の場合もあり、全体的または部分的な合成により生成させる場合もある。分子対の1つのメンバーは、その表面上に領域を有するか、または凹部を有するか、その表面上に、分子対の他のメンバーに特異的な空間構成および極性構成に特異的に結合し、したがってこれと相補的な構成要素を有する。したがって、対のメンバーは、互いに特異的に結合する特性を有する。特異的結合対の種類の例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモン受容体、受容体 - リガンド、酵素 - 基質である。この適用は、抗原 - 抗体型の反応に關与する。

10

【 0 0 4 4 】

「抗体」という用語は、天然の場合であれ、全体的または部分的な合成により生成させる場合であれ、免疫グロブリンについて記載する。この用語はまた、抗体結合ドメインであるか、またはこれと相同的な結合ドメインを有する任意のポリペプチドまたはタンパク質も対象とする。この用語はまた、C D R 移植抗体も想定する。「抗体」とは、特異的エピトープに結合する抗体およびそれらの断片を含めた任意の免疫グロブリンである。この用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびキメラ抗体を包含し、最後に言及された抗体は、米国特許第 4 , 8 1 6 , 3 9 7 号および同第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号においてさらに詳細に記載されている。「抗体 (複数可) 」という用語は、一般に4つの全長ポリペプチド鎖、2つの重 (H) 鎖および2つの軽 (L) 鎖、またはこれらと同等な I g 相同体 (例えば、重鎖だけを含むラクダ科によるナノボディー) を含む野生型の免疫グロブリン (I g) 分子を包含し、これらには、I g 分子の本質的なエピトープ結合の特徴を保持するこれらの機能的な全長変異体、バリエーション、または誘導体が含まれ、これらには、二重特異性 (d u a l s p e c i f i c , b i s p e c i f i c) 抗体、多重特異性抗体、および二重可変ドメイン抗体が含まれ、免疫グロブリン分子は、任意のクラス (例えば、I g G , I g E , I g M , I g D , I g A , および I g Y) , またはサブクラス (例えば、I g G 1 , I g G 2 , I g G 3 , I g G 4 , I g A 1 , および I g A 2) でありうる。「抗体」という用語の意味にはまた、任意の「抗体断片」も包含される。

20

30

【 0 0 4 5 】

「抗体断片」とは、(i) 軽鎖可変 (V L) ドメイン、重鎖可変 (V H) ドメイン、軽鎖定常ドメイン (C L) , および重鎖定常 1 (C H 1) ドメインからなる一価断片である F a b 断片 ; (i i) ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋により連結される2つの F a b 断片を含む二価断片である F (a b ') 2 断片 ; (i i i) V H ドメインおよび C H 1 ドメインからなる F a b の重鎖部分 (F d) 断片 ; (i v) 抗体の1本のアームの V L ドメインおよび V H ドメインからなる可変領域断片 (F v 断片) ; (v) 単一の可変ドメインを含むドメイン抗体 (d A b) 断片 (W a r d , E . S . 5 , N a t u r e , 3 4 1 巻 , 5 4 4 ~ 5 4 6 頁 (1 9 8 9 年)) ; (v i) ラクダ科抗体 ; (v i i) 単離された相補性決定領域 (C D R) ; (v i i i) V H ドメインおよび V L ドメインが、2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能とするペプチドリンカーを介して連結された単鎖 F v 断片 (B i r d 5 , S c i e n c e , 2 4 2 巻 , 4 2 3 ~ 4 2 6 頁 , 1 9 8 8 年 ; H u s t o n 5 , P N A S U S A , 8 5 巻 , 5 8 7 9 ~ 5 8 8 3 頁 , 1 9 8 8 年) ; (i x) V H ドメインおよび V L ドメインを単一のポリペプチド鎖において発現させるが、同じ鎖における2つのドメイン間の対合を可能とするには短すぎるリンカーを用い、これにより、これらのドメインに別の鎖の相補性ドメインと対合させ、2つの抗原結

40

50

合部位を創出する、二価の二重特異性抗体であるダイアボディー (WO 94 / 13804 ; P. Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻、6444~6448頁(1993年)) ; ならびに(x)相補性の軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域の対を形成するタンデムのFvセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を含む直鎖抗体 ; (xi)多価抗体断片(scFvの二量体、三量体、および/または四量体(PowerおよびHudson、J Immunol. Methods、242巻:193~204頁(2000年)) ; ならびに(xii)単独または任意の組合せによる、重鎖および/もしくは軽鎖、またはそれらの変異体、バリエーション、もしくは誘導体の他の全長でない部分を含めた、全長でない少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む分子を意味する。

10

【0046】

抗体は多くの方法で修飾しうるので、「抗体」という用語は、任意の特異的結合メンバー、または要請される特異性を伴う結合ドメインを有する物質を対象とするものとして解釈されるべきである。したがって、この用語は、天然であれ、全体的または部分的に合成であれ、免疫グロブリンの結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含めた抗体断片、抗体の誘導體、機能的同等物、および相同体を対象とする。したがって、別のポリペプチドに融合させた免疫グロブリンの結合ドメインまたは同等物を含むキメラ分子が包含される。キメラ抗体のクローニングおよび発現については、EP-A-0120694およびEP-A-0125023、ならびに米国特許第4,816,397号および同第4,816,567号において記載されている。

20

【0047】

「抗体の結合部位」とは、抗原に特異的に結合する、軽鎖または重鎖および軽鎖可変領域および超可変領域を含む抗体分子の構造的部分である。

【0048】

本明細書で用いられるその多様な文法的形態における「抗体分子」という語句は、完全免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫的活性部分の両方を想定する。

【0049】

例示的な抗体分子は、完全免疫グロブリン分子、実質的な完全免疫グロブリン分子、ならびにFab部分、Fab'部分、F(ab')₂部分、およびF(v)部分など、当技術分野において公知の部分であって、本明細書で記載される治療法に用いるのに好ましい部分を含めた、パラトープを含有する免疫グロブリン分子の部分である。

30

【0050】

抗体はまた、抗体の1つの結合ドメインが、本発明の特異的結合メンバーであり、他の結合ドメインが異なる特異性、例えば、エフェクター機能などを動員する特異性を有する二重特異性の場合もある。本発明の二重特異性抗体は、抗体の1つの結合ドメインを、その断片を含めた本発明の特異的結合メンバーとし、他の結合ドメインを、異なる抗体または異なる抗がん特異的抗体もしくは抗腫瘍特異的抗体の断片を含めたその断片とする二重特異性抗体を包含する。他の結合ドメインは、神経細胞特異的抗体または神経膠細胞特異的抗体における場合の通り、特定の細胞型を認識する抗体の場合もあり、これを標的とする抗体の場合もある。本発明の二重特異性抗体では、本発明の抗体の1つの結合ドメインを、他の結合ドメイン、または特定の細胞受容体を認識する分子および/もしくは細胞を特定の形で調節する分子、例として挙げると、免疫調節剤(例えば、インターロイキン(複数可))、増殖調節剤、またはサイトカイン(例えば、腫瘍壊死因子(TNF))、および、特に、その全体において本明細書に組み込まれる、2002年2月13日に出願されたU.S.S.N.60/355,838において裏付けられている、TNF二重特異性モダリティー)、または毒素(例えば、リシン)、または抗有糸分裂剤もしくは抗アポトーシス剤、または因子と組み合わせることができる。したがって、本発明の抗FAP抗体を用いて、薬剤、標識、他の分子、もしくは化合物、または抗体を、間質部位、特定の創傷治癒領域、炎症、がん、または腫瘍へと方向付けるかまたは標的化することができる。

40

【0051】

50

その多様な文法的形態における「モノクローナル抗体」という語句は、特定の抗原と免疫反応することが可能な抗体の結合部位のうちの1つの分子種だけを有する抗体を指す。したがって、モノクローナル抗体は典型的にそれが免疫反応する任意の抗原に対して単一の結合アフィニティーを提示する。モノクローナル抗体はまた、抗体の複数の結合部位であって、各々が異なる抗原に対して免疫特異性である結合部位を有する抗体分子、例えば、二重特異性（キメラ）モノクローナル抗体も含有しうる。

【0052】

「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原の一部または全部に特異的に結合するかまたはこれと相補的な領域を含む抗体の一部について記載する。抗原が高分子である場合、抗体は、その部分をエピトープと称する、抗原の特定の一部だけに結合しうる。抗原結合ドメインは、1または複数の抗体可変ドメインによりもたらされる場合がある。抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）および抗体重鎖可変領域（VH）を含むことが好ましい。

10

【0053】

本発明において用いられる抗体、抗体分子、またはこれらの断片を、他の分子または薬剤にコンジュゲートするかまたは結合させた、本発明のイムノコンジュゲートまたは抗体融合タンパク質にはさらに、化学的切除剤、毒素、免疫調節剤、サイトカイン、細胞傷害薬、化学療法剤、抗菌剤または抗菌ペプチド、細胞壁および/もしくは細胞膜破壊剤、または細胞壁および/もしくは細胞膜破壊薬にコンジュゲートされたこのような抗体、分子、または断片が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0054】

「特異的」という用語は、特異的結合対の1つのメンバーが、その特異的結合パートナー（複数可）以外の分子にそれほどの結合を示さない状況を指すのに用いることができる。この用語はまた、例えば、抗原結合ドメインが、多くの抗原により保有される特定のエピトープに対して特異的な場合であって、抗原結合ドメインを保有する特異的結合メンバーが、エピトープを保有する多様な抗原に結合することが可能な場合にも適用可能である。

【0055】

「～を含む」という用語は一般に、「～を包含する」の意味で用いられ、すなわち、1または複数の特徴または構成要素の存在を許容する。

30

【0056】

「～から本質的になる」という用語は、大型の生成物に共有結合しない、規定数の残基による生成物、特に、ペプチド配列を指す。しかし、上記で言及された本発明のペプチドの場合、当業者は、例えば、C末端のアミド化などの保護基を付加する末端の化学的修飾など、ペプチドのN末端またはC末端に対するわずかな修飾を想定しうることを察知するであろう。

【0057】

「単離された」という用語は、本発明の特異的結合メンバー、またはこのような結合メンバーをコードする核酸が、本発明に従い存在する状態を指す。メンバーおよび核酸は、それらがそれらの天然の環境、または、このような調製が *in vitro* または *in vivo* において実施される組換えDNA法を介する場合は、それらが調製される環境（例えば、細胞培養物）において共に見出される他のポリペプチドまたは核酸など、それらが天然で会合する物質を含まないかまたは実質的に含まない。メンバーおよび核酸は、希釈剤または補助剤と共に処方することができ、なお実際の目的では、単離することもできる（例えば、イムノアッセイにおいて用いられるマイクロ滴定プレートにコーティングするのに用いる場合、メンバーは通常、ゼラチンもしくは他のキャリアと混合するか、または診断もしくは治療において用いる場合、薬学的に許容されるキャリアもしくは希釈剤と混合する）。

40

【0058】

本明細書で用いられる「pg」はピコグラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し

50

、「ug」または「 μ g」はマイクログラムを意味し、「mg」はミリグラムを意味し、「ul」または「 μ l」はマイクロリットルを意味し、「ml」はミリリットルを意味し、「l」はリットルを意味する。

【0059】

本明細書では、「抗体」、「ニューロン結合抗体」、「IgM12抗体」、「IgM42抗体」、「抗体12」、「抗体42」、「sHIgM12」、「sHIgM42」、「rHIgM12」、「rHIgM42」という用語、および具体的に列挙されていない任意のバリエーションを用いる場合があり、本出願および特許請求の範囲の全体で用いられる通り、単一または複数のタンパク質を含めたタンパク質性の物質を指し、本明細書に記載され、図5および6に示されるアミノ酸配列データを有し、それらの活性プロフィールが本明細書および特許請求の範囲に示されるタンパク質にまで拡張される。特に、IgM12抗体、抗体12、rHIgM12とは、特に、ポリペプチドもしくは抗体または断片、特に、図5に示される配列を含む組換え抗体または断片を指す。IgM12抗体、抗体12、rHIgM12とは、特に、ポリペプチドもしくは抗体または断片、特に、配列番号31~33に示される重鎖可変領域のCDR配列および配列番号34~36に示される軽鎖可変領域のCDR配列を含む組換え抗体または断片を指す。IgM12抗体、抗体12、rHIgM12は、配列番号1の重鎖可変領域配列および配列番号11の軽鎖可変領域配列を有する抗体を包含する。特に、IgM42抗体、抗体42、rHIgM42とは、特に、ポリペプチドもしくは抗体または断片、特に、図6に示される配列を含む組換え抗体または断片を指す。IgM42抗体、抗体42、rHIgM42とは、特に、ポリペプチドもしくは抗体または断片、特に、配列番号37~39に示される重鎖可変領域のCDR配列および配列番号40~42に示される軽鎖可変領域のCDR配列を含む組換え抗体または断片を指す。IgM42抗体、抗体42、rHIgM42は、配列番号17の重鎖可変領域配列および配列番号27の軽鎖可変領域配列を有する抗体を包含する。したがって、実質的に同等な活性または変化した活性を提示するタンパク質も同様に想定される。これらの改変は、例えば、部位指向変異誘発を介して得られる改変など、意図的なものの場合もあり、宿主における変異を介して得られる、複合体またはその命名されたサブユニットをもたらす改変など、偶発的なもの場合もある。「抗体」、「ニューロン結合抗体」、「IgM12抗体」、「IgM42抗体」、「抗体12」、「抗体42」、「sHIgM12」、「sHIgM42」、「rHIgM12」、「rHIgM42」という用語はまた、とりわけ本明細書で列挙されるタンパク質のほか、実質的に相同な類似体および対立遺伝子変異の全てもそれらの範囲内に包含することを意図する。

【0060】

本明細書に記載されるアミノ酸残基は、「L」異性体形態とすることが好ましい。しかし、ポリペプチドにより免疫グロブリン結合に所望される機能的特性が保持される限りにおいて、「D」異性体形態の残基を、任意のL-アミノ酸残基で置換することができる。NH₂とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。COOHとは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。標準的なポリペプチドの命名法(J. Biol. Chem., 243巻: 3552~59頁(1969年))に準拠して、アミノ酸残基の略記法を以下に示す。

【0061】

10

20

30

40

【化 1】

対応表：

対応表

1 文字記号	3 文字記号	アミノ酸	
Y	Tyr	チロシン	
G	Gly	グリシン	10
F	Phe	フェニルアラニン	
M	Met	メチオニン	
A	Ala	アラニン	
S	Ser	セリン	
I	Ile	イソロイシン	20
L	Leu	ロイシン	
T	Thr	トレオニン	
V	Val	バリン	
P	Pro	プロリン	
K	Lys	リシン	
H	His	ヒスチジン	30
Q	Gln	グルタミン	
E	Glu	グルタミン酸	
W	Trp	トリプトファン	
R	Arg	アルギニン	
D	Asp	アスパラギン酸	40
N	Asn	アスパラギン	
C	Cys	システイン	

【 0 0 6 2 】

本明細書では、全てのアミノ酸残基の配列は、その左から右の配向が、従来のアミノ末端からカルボキシ末端の方向にある書式により表されることに注意されたい。さらに、アミノ酸残基配列の始点または終点におけるダッシュ記号が、1または複数のアミノ酸残基によるさらなる配列へのペプチド結合を示すことにも注意されたい。上記の表は、本明細

書で代わる代わるに現れうる、3文字表記と1文字表記とを相互に関連付けるために提示する。

【0063】

「レプリコン」とは、*in vivo*におけるDNA複製の自律的な単位として機能する、すなわち、それ自体の制御下で複製が可能な任意の遺伝子エレメント（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である。

【0064】

「ベクター」とは、結合させたセグメントの複製をもたらすように別のDNAセグメントを結合せうる、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどのレプリコンである。

【0065】

「DNA分子」とは、その一本鎖形態であれ、二本鎖螺旋であれ、デオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）の多量体形態を指す。この用語は、この分子の一次構造および二次構造だけを指すものであり、この分子を任意の特定の三次形態に限定するものではない。したがって、この用語は、とりわけ、直鎖状のDNA分子（例えば、制限断片）、ウイルス、プラスミド、および染色体において見出される二本鎖DNAを包含する。特定の二本鎖DNA分子の構造について論じる場合、本明細書では、配列を、DNAの非転写鎖（すなわち、mRNAと相同的な配列を有する鎖）に沿った5'から3'の方向にある配列だけを与える通常の慣例に従って記載することができる。

10

【0066】

「複製起点」とは、DNA合成に関与するDNA配列を指す。

20

【0067】

DNAによる「コード配列」とは、適切な制御配列の制御下に置かれると、*in vivo*においてポリペプチドへと転写および翻訳される二本鎖のDNA配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端における開始コドンおよび3'（カルボキシル）末端における翻訳終止コドンを介して決定される。コード配列には、原核生物配列、真核生物のmRNAに由来するcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）のDNAに由来するゲノムDNA配列、およびまた合成DNA配列が含まれうるがこれらに限定されない。ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は通常、コード配列の3'側に位置する。

【0068】

転写制御配列および翻訳制御配列とは、宿主細胞においてコード配列の発現をもたらす、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなど、DNAの制御配列である。

30

【0069】

「プロモーター配列」とは、細胞内のRNAポリメラーゼに結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始することが可能なDNAの制御領域である。本発明を規定する目的で述べると、プロモーター配列には、その3'末端に転写開始部位が結合し、バックグラウンドを上回って検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小限の数の塩基またはエレメントを包含するように、上流（5'方向）へと伸長する。プロモーター配列内には、転写開始部位（ヌクレアーゼS1によるマッピングを介して規定されて好都合である）のほか、RNAポリメラーゼの結合の一因となるタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）も見出される。真核生物プロモーターは、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含有することが多いが、常に含有するわけではない。原核生物プロモーターは、-10および-35のコンセンサス配列に加えて、シャイン-ダールガルノ配列を含有する。

40

【0070】

「発現制御配列」とは、別のDNA配列の転写および翻訳を制御および調節するDNA配列である。RNAポリメラーゼによりコード配列がmRNAへと転写され、次いで、これが、コード配列によりコードされるタンパク質へと翻訳されるとき、コード配列は、細胞内の転写制御配列および翻訳制御配列の「制御下」にある。

50

【0071】

「シグナル配列」は、コード配列の上流に包含されうる。この配列は、ポリペプチドに対してN末端側にあり、宿主細胞にコミュニケーションしてポリペプチドを細胞表面へと方向付けるか、またはポリペプチドを培地へと分泌させる、シグナルペプチドをコードするものであり、このシグナルペプチドは、タンパク質が細胞から放出される前に宿主細胞により切り離される。シグナル配列は、原核生物および真核生物に天然の多様なタンパク質と関連することが見出されうる。

【0072】

本発明のプロープに言及しつつ本明細書で用いられる「オリゴヌクレオチド」という用語は、2つ以上のリボヌクレオチド、好ましくは3つを超えるリボヌクレオチドを含む分子として定義される。その正確なサイズは、多くの因子に依存し、これらの因子は、オリゴヌクレオチドの最終的な機能および使用に依存する。

10

【0073】

本明細書で用いられる「プライマー」という用語は、精製された制限消化物中などに天然で存在する場合であれ、合成により生成させた場合であれ、核酸鎖と相補的なプライマーの伸長産物の合成を誘導する条件下に置かれると、すなわち、ヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼなどの誘導剤の存在下で適切な温度およびpH下に置かれると合成開始地点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もあり、誘導剤の存在下において所望の伸長産物の合成をプライミングするのに十分な程度の長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、および用いられる方法を含めた多くの因子に依存する。例えば、診断適用では、標的配列の複雑性に依りて、オリゴヌクレオチドプライマーは、より少数のヌクレオチドも含有しうるが、典型的には15~25ヌクレオチド以上を含有する。

20

【0074】

本発明のプライマーは、特定の標的DNA配列の異なる鎖と「実質的に」相補的となるように選択される。これは、プライマーが、それらのそれぞれの鎖とハイブリダイズするのに十分な程度に相補的でなくてはならないことを意味する。したがって、プライマー配列が、鋳型の正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片をプライマーの5'末端に結合させ、プライマー配列の残りは鋳型鎖と相補的とすることができる。代替的に、プライマー配列が、これとハイブリダイズし、これにより、伸長産物を合成するための鋳型を形成する鎖の配列と十分な相補性を有する場合は、非相補的な塩基または非相補的な長い配列を、プライマー内に散在させることもできる。

30

【0075】

本明細書で用いられる「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」という用語は、それらの各々が特異的ヌクレオチド配列において、またはその近傍において二本鎖DNAを切断する細菌酵素を指す。

【0076】

このようなDNAが細胞内に導入されている場合、この細胞は、外因性DNAまたは相同的DNAにより「形質転換」されている。形質転換DNAは、細胞のゲノムを構成する染色体のDNAへと組み込まれる（共有結合する）場合もあり、組み込まれない場合もある。例えば、原核細胞、酵母細胞、および哺乳動物細胞では、形質転換DNAを、プラスミドなどのエピソードエレメントに維持することができる。真核細胞について述べると、安定的な形質転換細胞とは、形質転換DNAが、染色体の複製を介して娘細胞により遺伝するように染色体に組み込まれた細胞である。この安定性は、真核細胞が、形質転換DNAを含有する娘細胞の集団を含む細胞系またはクローンを確立する能力により裏付けられる。「クローン」とは、有糸分裂を介して単一の細胞または共通の原細胞から派生する細胞集団である。「細胞系」とは、*in vitro*において何世代にもわたり安定的に成長することが可能な初代細胞のクローンである。

40

【0077】

ヌクレオチドのうちの少なくとも約75%（好ましくは少なくとも約80%、および最

50

も好ましくは少なくとも約90または95%)が、規定された長さのDNA配列にわたりマッチする場合、これらの2つのDNA配列を「実質的に相同」とする。実質的に相同的な配列は、配列データベースにおいて入手可能な標準的なソフトウェアを用いて配列を比較することにより同定することもでき、その特定の系について規定された、例えば、厳密な条件下におけるサザンハイブリダイゼーション実験により同定することもできる。適切なハイブリダイゼーション条件の規定は、当技術分野の範囲内にある。例えば、Maniatisら、前出；「DNA Cloning」、IおよびII巻、前出；「Nucleic Acid Hybridization」、前出を参照されたい。

【0078】

また、本発明の特異的結合メンバー（抗体）をコードするDNA配列であって、例えば、図2もしくは10に提示されるのと同じアミノ酸配列を有する抗体、または本明細書もしくは図10に示されるがこれらと縮重するCDRドメイン領域の配列を含む抗体をコードするDNA配列も本発明の範囲内にあることを察知されたい。「～と縮重する」とは、異なる3文字コドンを用いて、特定のアミノ酸を指定することを意味する。当技術分野では、以下のコドンを互換的に用いて各特定のアミノ酸をコードさせることが周知である：

【0079】

【化 2】

フェニルアラニン(Phe または F)	UUU または UUC	
ロイシン(Leu または L)	UUA または UUG または CUU または CUC または CUA または CUG	
イソロイシン(Ile または I)	AUU または AUC または AUA	
メチオニン(Met または M)	AUG	10
バリン(Val または V)	GUU または GUC または GUA または GUG	
セリン(Ser または S)	UCU または UCC または UCA または UCG または AGU または AGC	
プロリン(Pro または P)	CCU または CCC または CCA または CCG	
トレオニン(Thr または T)	ACU または ACC または ACA または ACG	
アラニン(Ala または A)	GCU または GCG または GCA または GCG	20
チロシン(Tyr または Y)	UAU または UAC	
ヒスチジン(His または H)	CAU または CAC	
グルタミン(Gln または Q)	CAA または CAG	
アスパラギン(Asn または N)	AAU または AAC	
リシン(Lys または K)	AAA または AAG	30
アスパラギン酸(Asp または D)	GAU または GAC	
グルタミン酸(Glu または E)	GAA または GAG	
システイン(Cys または C)	UGU または UGC	
アルギニン(Arg または R)	CGU または CGC または CGA または CGG または AGA または AGG	
グリシン(Gly または G)	GGU または GGC または GGA または GGG	40
トリプトファン(Trp または W)	UGG	
終止コドン	UAA(オーカー)または UAG(アンバー)または UGA(オパ ール)	

【 0 0 8 0 】

上記で指定されたコドンは、RNA 配列のためのコドンであることを理解されたい。対応する DNA のためのコドンでは、U を T で置換している。

【 0 0 8 1 】

アミノ酸、抗体断片、図 5 もしくは 6 に示される C D R 領域の配列をコードする配列、 50

または図5もしくは6に示される核酸配列では、特定のコドンで、異なるアミノ酸をコードするコドンへと変化させるように、変異を発生させることができる。このような変異は一般に、可能な最小のヌクレオチド変化をもたらすことにより発生させる。この種の置換変異は、結果として得られるタンパク質におけるアミノ酸を、非保存的な形で（例えば、コドンを、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の群分けに属するアミノ酸から、別の群分けに属するアミノ酸へと変化させることにより）変化させるようにもたらすこともでき、保存的な形で（例えば、コドンを、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の群分けに属するアミノ酸から、同じ群分けに属するアミノ酸へと変化させることにより）変化させるようにもたらすこともできる。このような保存的变化は一般に、結果として得られるタンパク質の構造および機能においてもたらす変化が小さい。非保存的变化は、結果として得られるタンパク質の構造、活性、または機能を変化させる可能性が高い。本発明は、結果として得られるタンパク質の活性または結合特徴をそれほど変化させない保存的变化を含有する配列を包含すると考えるべきである。

10

【0082】

以下は、アミノ酸の多様な群分けの一例である。

非極性R基を伴うアミノ酸

アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン

帯電していない極性R基を伴うアミノ酸

グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン

20

帯電した極性R基（pH 6.0で負に帯電している）を伴うアミノ酸

アスパラギン酸、グルタミン酸

塩基性アミノ酸（pH 6.0で正に帯電している）

リシン、アルギニン、ヒスチジン（pH 6.0で正に帯電している）。

【0083】

別の群分けは、フェニル基を伴うアミノ酸でありうる。

フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン。

【0084】

別の群分けは、分子量（すなわち、R基のサイズ）による場合もある。

【0085】

30

【化3】

グリシン	75	アラニン	89	
セリン	105	プロリン	115	
バリン	117	トレオニン	119	
システイン	121	ロイシン	131	
イソロイシン	131	アスパラギン	132	10
アスパラギン酸	133	グルタミン	146	
リシン	146	グルタミン酸	147	
メチオニン	149	ヒスチジン(pHを6.0とする)	155	
フェニルアラニン	165	アルギニン	174	
チロシン	181	トリプトファン	204	20

【0086】

特に、好ましい置換は、

- ・ 正の電荷が維持されうるような、LysによるArgの置換およびこの逆の置換；
 - ・ 負の電荷が維持されうるような、GluによるAspの置換およびこの逆の置換；
 - ・ 遊離-OHが維持されうるような、SerによるThrの置換；および
 - ・ 遊離NH₂が維持されうるような、GlnによるAsnの置換
- である。

【0087】

例示的で好ましい保存的アミノ酸置換は、グルタミン(Q)によるグルタミン酸(E)の置換およびこの逆の置換、ロイシン(L)によるバリン(V)の置換およびこの逆の置換、セリン(S)によるトレオニン(T)の置換およびこの逆の置換、イソロイシン(I)によるバリン(V)の置換およびこの逆の置換、リシン(K)によるグルタミン(Q)の置換およびこの逆の置換、イソロイシン(I)によるメチオニン(M)の置換およびこの逆の置換、セリン(S)によるアスパラギン(N)の置換およびこの逆の置換、ロイシン(L)によるメチオニン(M)の置換およびこの逆の置換、リシン(L)によるグルタミン酸(E)の置換およびこの逆の置換、アラニン(A)によるセリン(S)の置換およびこの逆の置換、チロシン(Y)によるフェニルアラニン(F)の置換およびこの逆の置換、グルタミン酸(E)によるアスパラギン酸(D)の置換およびこの逆の置換、ロイシン(L)によるイソロイシン(I)の置換およびこの逆の置換、リシン(K)によるアルギニン(R)の置換およびこの逆の置換のうちのいずれかを包含する。

【0088】

また、特に好ましい特性を伴うアミノ酸で置換するように、アミノ酸置換を導入することもできる。例えば、Cysは、別のCysを伴うジスルフィド架橋のための潜在的な部位に導入することができる。Hisは、特に「触媒」部位(すなわち、Hisは、酸または塩基として作用することが可能であり、生化学的触媒反応において最も一般的なアミノ酸である)として導入することができる。Proは、タンパク質構造におけるターンを誘導する、特に平面的なその構造のために導入することができる。

【0089】

アミノ酸残基のうちの少なくとも約70%(好ましくは少なくとも約80%、および最

も好ましくは少なくとも約90または95%)が同一であるか、または保存的置換を表す場合、2つのアミノ酸配列を「実質的に相同」とする。1または複数のアミノ酸が、類似のアミノ酸置換または保存的アミノ酸置換で置換されており、その1つの/複数の抗体が、本明細書で開示されている、IgM12またはIgM42のうちの1または複数の結合プロファイルおよび活性プロファイルを示す場合、2つの抗体のCDR領域を実質的に相同とする。

【0090】

DNA構築物の「非相同」領域とは、天然ではこの大型の分子と会合して見出されることはない、大型のDNA分子内の同定可能なDNAセグメントである。したがって、非相同領域が哺乳動物の遺伝子をコードする場合、この遺伝子は通常、その供給源である生物のゲノム内の哺乳動物ゲノムDNAには隣接しないDNAに隣接する。非相同的なコード配列の別の例は、天然ではコード配列自体が見出されない構築物(例えば、ゲノムのコード配列がイントロンを含有するcDNA、または天然遺伝子とは異なるコドンを有する合成配列)である。対立遺伝子変異または天然の変異イベントは、本明細書で定義されるDNAの非相同領域をもたらさない。

10

【0091】

発現制御配列によりDNA配列の転写および翻訳が制御および調節される場合、このDNA配列は、発現制御配列に「作動可能に連結」されている。「作動可能に連結される」という用語は、発現させるDNA配列の上流に適切な開始シグナル(例えば、ATG)を有し、発現制御配列の制御下におけるDNA配列の発現およびDNA配列によりコードされる所望の産物の生成を可能とする適正なリーディングフレームを維持することを包含する。組換えDNA分子へと挿入することが所望される遺伝子が、適切な開始シグナルを含有しない場合は、このような開始シグナルを遺伝子の上流に挿入することができる。

20

【0092】

「標準的ハイブリダイゼーション条件」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のいずれについても、5倍濃度のSSCおよび65℃と実質的に同等な塩条件および温度条件を指す。しかし、当業者は、このような「標準的ハイブリダイゼーション条件」が、緩衝液中のナトリウムおよびマグネシウムの濃度、ヌクレオチド配列の長さ、および濃度、ミスマッチの百分率、ホルムアミドの百分率などを含めた特定の条件に依存することを察知するであろう。「標準的ハイブリダイゼーション条件」の決定においてはまた、ハイブリダイズする2つの配列が、RNA-RNAであるか、DNA-DNAであるか、RNA-DNAであるかも重要である。このような標準的ハイブリダイゼーション条件は、周知の処方であって、ハイブリダイゼーションが、所望の場合、高度な厳密性の洗浄により予測または決定される T_m を、典型的には10~20℃下回る処方に従い、当業者により容易に決定される。

30

【0093】

「薬剤」という用語は、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、化合物、および低分子を含めた任意の分子を意味する。特に、薬剤という用語は、被験化合物または薬物候補化合物などの化合物を包含する。

【0094】

「アゴニスト」という用語は、その最も広い意味において、リガンドが結合する受容体を刺激するリガンドを指す。

40

【0095】

「アッセイ」という用語は、化合物の特定の特性を測定するのに用いられる任意の工程を意味する。「スクリーニングアッセイ」とは、化合物を特徴付けるか、または化合物をそれらの活性に基づき化合物のコレクションから選択するのに用いられる工程を意味する。

【0096】

「~を防止すること」または「防止」という用語は、疾患の発症に先立って、病原体に曝露されている場合もあり、疾患に素因を示す場合もある被験体における、疾患または障

50

害に罹患するかまたはこれを発症する危険性の低減（すなわち、疾患の臨床症状のうちの少なくとも1つを発症させないこと）を指す。

【0097】

「予防」という用語は、「防止」という用語と関連し、これに包含され、その目的を、疾患を処置するかまたは治癒させることとするのではなくて、これを防止することとする措置または手順を指す。予防的措置の非限定的な例には、ワクチンの投与；例えば、病臥に起因する血栓の危険性にある入院患者への低分子量ヘパリンの投与；および、マラリアが風土病であるか、またはマラリアに罹患する危険性が高い地域を訪れるのに先立つ、クロロキンなどの抗マラリア剤の投与が含まれる。

【0098】

「治療有効量」とは、医師または他の治療者により探索されている、被験体の生物学的応答または医学的応答を誘発する薬物、化合物、薬剤、抗体、または医薬剤の量を意味する。特に、神経疾患または神経状態に関して述べると、「有効量」という用語は、疾患の臨床的に関与性のパラメータにおいて生物学的に有意義な変化をもたらす抗体またはその断片など、化合物または薬剤の有効量を包含することが意図される。これは、画像化すると観察可能となるかまたは評価可能となる神経傷害または神経死滅の量の変化、運動、発話、もしくは認知などの機能的パラメータの変化、または危険性もしくは感受性の条件下におけるこのような変化の非存在もしくは低減を包含しうる。本明細書では、「治療有効量」という語句を用いて、測定可能もしくは評価可能な現象、または病態の特徴、または機能の評価における臨床的に有意な変化を、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、より好ましくは少なくとも50パーセント、より好ましくは少なくとも70パーセント、より好ましくは少なくとも80パーセント、最も好ましくは少なくとも90パーセント改善または防止し、好ましくはこれを低減するのに十分な量を意味する。

【0099】

一実施形態では、任意の疾患、状態、傷害、または感染「を処置すること」またはこれらの「処置」という用語が、その疾患、状態、傷害、または感染の改善（すなわち、細胞もしくは組織の死滅、または細胞もしくは組織に対する損傷を停止させるか、あるいはこれらの臨床症状のうちの少なくとも1つの徴候、程度、または重症度を軽減すること）を指す。別の実施形態では、「～を処置すること」または「処置」が、被験体により識別不能な場合もある少なくとも1つの物理的パラメータの改善を指す。さらに別の実施形態では、「～を処置すること」または「処置」が、疾患、状態、傷害、または感染を、物理的に（例えば、識別可能な症状の安定化により）、生理学的に（例えば、物理的パラメータの安定化により）、またはこれらの両方により調節することを指す。さらなる実施形態では、「～を処置すること」または「処置」が、疾患の進行を緩徐化するか、または細胞または組織に対する傷害、損傷、死滅の量を低減することに関する。

【0100】

「薬学的に許容される」という語句は、ヒトに投与した場合に、生理学的に忍容可能であり、典型的にはアレルギー反応または同様の有害反応、例えば急性胃蠕動、めまいなどをもたらさない分子の実体および組成物を指す。

【0101】

本明細書で用いられる「pg」はピコグラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「ug」または「μg」はマイクログラムを意味し、「mg」はミリグラムを意味し、「ul」または「μl」はマイクロリットルを意味し、「ml」はミリリットルを意味し、「l」はリットルを意味する。

【0102】

B. 詳細な開示

神経保護剤は、結果としてCNS損傷をもたらす合併症を防止および処置することを目的とする。神経保護能を伴う化合物または薬剤は、脳卒中および神経系の傷害などの急性障害のほか、神経変性障害などの慢性疾患においても適用される。これらの状態では、神経組織に対する損傷の根底にある機序のうちの多くが類似しており、神経保護化合物また

10

20

30

40

50

は神経保護剤であれば、複数の障害において用いられるであろう。疾患には、脳血管障害、外傷性脳損傷、脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、多発性硬化症、てんかん、運動ニューロン疾患（複数可）、および虚血性神経障害が含まれる。他の適用には、麻酔時および手術時における神経保護が含まれる。フリーラジカルスカベンジャー、抗興奮毒性剤、アポトーシス（プログラム細胞死）阻害剤、抗炎症剤、神経栄養因子、金属イオンキレート化剤、イオンチャネル調節剤、および遺伝子治療の類型に由来する医薬品を含め、多くの医薬品が神経保護効果について探索されている。NMDAアンタゴニストおよび神経伝達物質の放出を低減する薬剤を含め、神経保護的医薬品の複数の候補医薬品が、臨床試験に到達しているが、有意性を示すことに失敗している（Clark WMら（2000年）、Stroke、31巻（6号）：1234～9頁；Sarco RIら（2001年）、JAMA、285巻（13号）：1719～28頁；Albers, GWら（2001年）、JAMA、286巻（21号）：2673～82頁）。神経保護剤についての1つの難題は、薬剤の効果が、正常細胞に対してそれほどの活性を伴わずに、これにより、望ましくない副作用、なお潜在的には有害な副作用を伴わずに、傷害されまたは損傷した/障害されたニューロンを指向するような特異性およびターゲティングである。ここで、本発明は、血液脳関門を越え、傷害、障害、または損傷の領域を標的とし、正常ニューロンに対する望ましくない作用を最小限として保護をもたらすことが可能な、特異的で忍容可能な薬剤（複数可）を提供する。

10

【0103】

20

本発明は一般に、特異的結合メンバー、特に、ニューロンへの結合を裏付け、神経変性状態、神経細胞死、および神経傷害を含め、ニューロンまたは神経細胞が障害された疾患および状態の診断、モニタリング、改善、および処置において用いられる神経保護剤として適用される抗体を提供する。本発明の抗体は、それらを特に神経保護および/または神経再生において有用とし、神経疾患および神経状態のための診断剤および治療剤において適用可能とする、特定で固有の目覚ましい特質を有する。本明細書では、新規の本発明の抗体、特に、組換え抗体が、血液脳関門を効果的に、かつ、改変されずに越え、ニューロンを細胞死から保護し、CNSにおける神経病変および傷害部位を標的とすることが裏付けられる。抗体は、神経機能を改善し、慢性軸索傷害および脱髄の動物モデルにおいて軸索を維持する。動物モデルにおいて評価される通り、抗体は、動物における毒性が最小限であり、自己免疫状態を増悪させない。

30

【0104】

本発明は一般に、神経変性状態、神経細胞死、および神経細胞傷害を含めた、ニューロンまたは神経細胞が障害された疾患および状態を改善および処置するための、単独の、または他の向神経活性剤もしくは代替的な向神経活性剤と組み合わせた治療剤としての適用を伴う特異的結合メンバー、特に、ニューロンへの結合を示す抗体を提供する。本出願は、神経疾患または神経欠損の動物モデルにおける、IgM12を含めた本発明の抗体の能力および治療的に関与性の活性についての証拠を提示する。特に、本明細書で提示される研究は、運動ニューロン疾患、特に、ALSの認知された動物モデルであるTMEVモデルにおける能力および活性を裏付け、脊髄傷害モデルにおける研究を提示する。このような疾患のうちのいずれかの改善もしくは処置、または障害もしくは障害の危険性の症例における神経傷害の防止もしくは神経の保護において用いられる組成物が提供される。

40

【0105】

IgM12およびIgM42による先行研究は、CNSのニューロンに結合する血清由来抗体が、抗体でコーティングした基質における神経突起伸長を支持し、*in vitro*研究においてCNSミエリンによる神経突起伸長の障害を凌駕することを示した（Warrington Aら（2004年）、J Neuropath Exp Neurol、63巻（5号）：461～473頁）。TMEV動物に注射されたsHIgM12についての研究は、夜間における自発活動の増大を示したが、動物におけるウイルス力価は評価しておらず、可能な抗ウイルス効果を決定することはできていない（Rodrigu

50

es Mら(2009年)、Neurology、72巻:1269~1276頁)。本明細書で記載される研究は、完全ヒト組換え抗体12の配列および抗体42の配列のほか、組換え抗体rHIgM42の配列も提示する。動物および疾患の動物モデルにおけるこれらの血清由来抗体および組換え抗体の目覚ましい神経保護効果および治療関与性効果のほか、それらの神経傷害部位への特異的結合/ターゲティングを裏付ける研究が今や提示される。

【0106】

抗体、組成物、および治療法

自己反応性ヒトmAbは、ヒト天然自己抗体(NatAb)に分類される(Cohen I. R. (2007年)、J Autoimmun、29巻:246~249頁)。NatAbは、本発明者らのヒト免疫グロブリンレパートリーの一部であり(Cohen、I. R. およびM. Schwartz (1999年)、Journal of neuroimmunology、100巻:111~114頁)、通常は体細胞変異なしに、ヒト固有の遺伝子から天然で作製され、細胞過程を刺激するように機能する場合もあり、細胞残屑を除去するように機能する場合もある(Lutz, HU (2007年)、J Autoimmun、29巻:287~294頁)。NatAbが、自己抗原に反応するのに対し、従来の抗体は、外因性抗原に反応する。NatAbは、比較的低アフィニティであり、通常は多重反応性であり、しばしばIgMである。これらのヒトIgMの作用機構は、同様であり、膜のマイクロドメインを介して作用すると考えられる。NatAbは、定義により多重反応性であり、したがって、*in vivo*における特異的機能について関与性の抗原を同定することは、難題でありうる。理論に束縛されずに述べると、現在のところ、これらのIgMは、細胞表面における膜のマイクロドメインの架橋形成分子に結合することが理解されている。通常これに関与しない分子は、まとめてシグナル伝達複合体をなす(Rodriguez, M., A. E. Warrington、およびL. R. Pease (2009年)、Neurology、72巻:1269~1276頁)。

【0107】

したがって、抗体媒介性疾患を伴わずにmAbを高濃度で保有する個体の血清に由来する自己反応性ヒトモノクローナル抗体(mAb)についてスクリーニングすることにより、治療用分子を同定した。このようなmAbを、神経系細胞の表面への結合について、抗原について考慮せずに調べる。次いで、mAbを、疾患モデルを調節する能力について調べる。この生物学的有効性を伴うmAbを同定する方法は、製薬業界で一般に用いられる方法と異なる(Rodriguez, M., A. E. Warrington、およびL. R. Pease (2009年)、Neurology、72巻:1269~1276頁)。特定のヒトIgMが再ミエリン化を促進しうることが裏付けられている(Warrington AEら(2000年)、Proc Natl Acad Sci U S A、97巻:6820~6825頁)。例えば、1つのこのようなIgMは、再ミエリン化を促進する、組換えヒトモノクローナルrHIgM22である(Mitsunaga YBら(2002年)、Faseb J、16巻:1325~1327頁)。抗体rHIgM22は、希突起膠細胞およびミエリンに結合し、MSのウイルス誘導性および毒素誘導性モデルにおけるCNSの再ミエリン化を促進する(Warrington AEら(2000年)、Proc Natl Acad Sci U S A、97巻:6820~6825頁; Bieber AJら(2002年)、Glia、37巻:241~249頁)。脊髄の再ミエリン化は、rHIgM22の単回低量投与の後に誘導される(Warrington AEら(2007年)、J Neurosci Res、85巻:967~976頁)。

【0108】

寿命の短い(マウスにおける半減期が15時間と推定される)分子による1回の腹腔内(i.p.)処置が、生得の自発的修復はほとんど見られないMSモデルにおいて、5週間以内に最大限の組織修復を促進することは注目に値する。末梢への注射後、rHIgM

10

20

30

40

50

22は、血液脳関門(BBB)を越え、脱髄を伴うマウスの脳病変および脊髄病変内に蓄積される。in vivoの病変では、フェリチンビーズで標識したrHIgM22が、MRIを介して検出されている(Pirkko Iら(2004年)、Faseb J、18巻:1577~1579頁)。

【0109】

また、再ミエリン化能を伴うさらなるヒト血清IgM抗体であるsHIgM46、およびその組換え対応物であるrHIgM46についても記載されている。血清由来抗体であるsHIgM22およびsHIgM46、ならびにそれらの組換え形、および再ミエリン化のための方法については、例えば、WO0185797において記載されている。rHIgM22抗体およびこれによる方法は、例えば、米国特許第7,473,423号および同第7,807,166号で対象とされている。

10

【0110】

本発明は、モノクローナル抗体、および、特に、中枢神経系におけるニューロンの促進、刺激、保護、および/または再生において活性を示す組換え抗体を含めたヒト自己抗体を提供する。本発明の態様では、それらの断片を含めた本抗体が、中枢神経系における傷害を介する神経細胞死を防止または低減するときの神経保護、ニューロンおよび軸索の保存および再生において活性を示す。抗体は、疾患もしくは状態の処置もしくは改善、または疾患もしくは状態、特に、神経が損傷され、傷害され、もしくは他の形で障害された疾患もしくは状態と関連する神経細胞欠損および神経細胞死またはアポトーシスの防止または低減において適用可能である。本発明の抗体が使用または適用される状態または疾患には、脳傷害または脳外傷、脊髄損傷(SCI)、神経損傷、頭部傷害、脳への血液供給が低減されるかまたは障害された状態、脳の感染性疾患、神経変性疾患を含めた、ニューロンの構造、機能、または生存の喪失が関与するかまたは関連する状況が含まれる。例示的なこのような疾患または状態には、脊髄損傷(SCI)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症(MS)、アルツハイマー病、脳卒中、パーキンソン病、ハンチントン病、出産前低酸素症/周産期虚血および/または脳性まひ、脳症、脊髄症、ならびに運動ニューロン疾患が含まれる。

20

【0111】

本発明の神経調節剤または抗体は、以下の特徴のうちの1または複数を含む：それらが、ニューロンを保護し、かつ/もしくはこれを安定化させること；それらが、CNSもしくは神経細胞の損傷、障害、もしくは傷害における部位を標的とすること；および/またはそれらが、細胞死、例えば、過酸化水素誘導性細胞死を遮断すること。本発明は、本発明のニューロン結合モノクローナル抗体が、中枢神経系における診断目的および治療目的のために、神経突起伸長を促進し、ニューロンを損傷から保護することが可能であることを提示する。特に、組換え抗体であって、皮質ニューロン、海馬ニューロン、小脳顆粒細胞、および網膜神経節細胞を含めたニューロンを認識し、これらに結合することが可能な抗体が提供される。

30

【0112】

本発明は、例示的な抗体(複数可)またはその断片(複数可)である抗体12および抗体42、特に、血清由来または組換えのIgM12またはIgM42を提供する。さらなる特定の態様では、本発明の抗体が、図5および/または図6に示されるアミノ酸配列を含めた抗体12または42のアミノ酸配列を含む。本発明の組換え抗体であるIgM12は、図5に示される、可変重鎖配列(配列番号1)および可変軽鎖配列(配列番号11)を含む。本発明の組換え抗体であるIgM42は、図6に示される、可変重鎖配列(配列番号17)および可変軽鎖配列(配列番号27)を含む。本発明の態様では、図5および6に示される可変領域のCDR配列を含む、組換えまたは合成のニューロン結合抗体が提供される。抗体12は、図5に示される、重鎖CDR配列CDR1 GGSVSLYY(配列番号31)、CDR2 GYIYSSGST(配列番号32)、およびCDR3 ARSASIRGWF(配列番号33)、ならびに軽鎖CDR配列CDR1 QSISSY(配列番号34)、CDR2 AAS(配列番号35)、およびCDR3 QQS YH

40

50

T P W (配列番号 36) を含む。抗体 42 は、図 6 に示される、重鎖 C D R 配列 C D R 1 G F T F S T Y A (配列番号 37)、C D R 2 I N V G G V T T (配列番号 38)、および C D R 3 V R R S G P D R N S S P A D F (配列番号 39)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q G I G (配列番号 40)、C D R 2 T T S (配列番号 41)、および C D R 3 Q K Y N S A P R T (配列番号 42) を含む。

【0113】

ニューロン、特に、ヒトニューロンを認識することが可能な、F a b 断片を含めた組換え抗体もしくはそれらの断片のパネル、またはファージディスプレイライブラリーを、多様な特性、すなわち、アフィニティー、アイソタイプ、エピトープ、安定性などについてスクリーニングすることができる。例示的な抗体である I g M 1 2 および I g M 4 2 の活性を模倣し、ニューロンに結合し、ニューロンを例えば、過酸化物質媒介性細胞死などの細胞死または細胞傷害から保護する能力を有する抗体が特に対象である。このような抗体は、特異的結合アッセイおよび活性アッセイにおいて、容易に同定および/またはスクリーニングすることができる。本抗体である、I g M 1 2 および/または I g M 4 2 の抗原結合領域または重鎖 C D R 領域および/もしくは軽鎖 C D R 領域を含む組換え抗体を生成させ、活性についてスクリーニングすることができる。

10

【0114】

一般に、図 5 および 6 の C D R 領域として実質的に示されるアミノ酸配列を含む C D R 領域は、C D R 領域のニューロンの表面への結合、またはニューロンの表面における結合、および、特に、哺乳動物のニューロン、特に、ヒト、サル、ヒヒ、ラット、および/またはマウスのニューロンへの結合を可能とする構造において保有される。「~として実質的に示される」とは、本発明の変領域配列、および/または、特に、C D R 配列が、図 5 および 6 の指定した領域と同一であるか、またはこれらと相溶性が高いことを意味する。「相溶性が高い」とは、変領域配列および/または C D R 配列において少数カ所の置換、好ましくは 1 ~ 8 カ所、好ましくは 1 ~ 5 カ所、好ましくは 1 ~ 4 カ所、または 1 ~ 3 カ所、または 1 もしくは 2 カ所の置換だけを施しうることを想定する。「~として実質的に示される」という用語は、特に、本抗体の特異性および/または活性に実質的なまたは重大な影響を及ぼさない保存的アミノ酸置換を包含する。

20

【0115】

C D R 以外の可変領域配列では、C D R 配列を保持するような置換を施すことができる。したがって、C D R 配列は維持し、可変領域配列の残りは置換しうるように、可変領域配列の変化、または代替的な、非相同的であるかもしくはベニア化された可変領域配列を導入することもでき、これらを用いることもできる。代替的に、置換は、特に、C D R において施すこともできる。本発明の抗体の C D R 配列は、図 5 および 6 を含め、本明細書において示され、記載されている。抗体 12 は、図 5 に示される、重鎖 C D R 配列 C D R 1 G G S V S L Y Y (配列番号 31)、C D R 2 G Y I Y S S G S T (配列番号 32)、および C D R 3 A R S A S I R G W F D (配列番号 33)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q S I S S Y (配列番号 34)、C D R 2 A A S (配列番号 35)、および C D R 3 Q Q S Y H T P W (配列番号 36) を含む。抗体 42 は、図 6 に示される、重鎖 C D R 配列 C D R 1 G F T F S T Y A (配列番号 37)、C D R 2 I N V G G V T T (配列番号 38)、および C D R 3 V R R S G P D R N S S P A D F (配列番号 39)、ならびに軽鎖 C D R 配列 C D R 1 Q G I G (配列番号 40)、C D R 2 T T S (配列番号 41)、および C D R 3 Q K Y N S A P R T (配列番号 42) を含む。上に記載し想定した置換を有する本発明の抗体は、抗体 I g M 1 2 および抗体 I g M 4 2 を含め、本明細書および特許請求の範囲で示される特徴を有する例示的な抗体と同等の活性および特異性を維持するように選択される。

30

40

【0116】

本発明の C D R を保有する構造は一般に、抗体の重鎖配列もしくは軽鎖配列またはその実質的な部分の構造であって、C D R 領域が、再構成された免疫グロブリン遺伝子によりコードされる天然抗体の V H 可変ドメインおよび V L 可変ドメインの C D R 領域に対応す

50

る位置に配置される構造である。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabata, E. A.ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、4版、US Department of Health and Human Services、1987年、および、現在はインターネット(immuno.bme.nwu.edu)で入手できるその改定版を参照することにより決定することができる。可変ドメインは、任意の生殖細胞系列または再構成されたヒト可変ドメインに由来する場合もあり、公知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成可変ドメインの場合もある。前出の段落で定義した、本発明のCDRに由来する配列は、組換えDNA法を用いて、CDR領域を欠く可変ドメインレポーターへと導入することができる。

10

【0117】

例えば、Marksら(Bio/Technology、1992年、10巻:779~783頁)は、抗体可変ドメインのレポーターを生成させる方法であって、可変ドメイン領域の5'端を指向するかまたはこれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトVH遺伝子の第3のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと共に用いて、1つ/複数のCDRを欠くVH可変ドメインのレポーターをもたらす方法について記載している。Marksらは、どのようにすればこのレポーターを、特定の抗体のCDRと組み合わせるかについてもさらに記載している。次いで、適切な特異的結合メンバーを選択しうるように、レポーターを、WO92/01047のファージディスプレイシステムなど、適切な宿主系において提示することができる。レポーターは、約 10^4 を超える個別のメンバー、例えば、 $10^6 \sim 10^8$ または 10^{10} のメンバーからなる。また、Stemmer(Nature、1994年、370巻:389~391頁)により、類似のシャフリング法またはコンビナトリアル法も開示されているが、Stemmerは、 λ -ラクターゼ遺伝子との関連でこれらの技法について記載し、これらの手法を、抗体を生成させるのに用いることに気付いている。

20

【0118】

さらなる代替法は、例えば、可変ドメイン全体の中で変異を発生させる、抗体のVH遺伝子またはVL遺伝子に対するランダム変異誘発を用いて、本発明のCDRに由来する配列を保有する新規のVH領域またはVL領域を生成させる。このような技法については、エラープローンPCRを用いたGramら(1992年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻:3576~3580頁)により記載されている。用いる別の方法は、変異誘発をVH遺伝子またはVL遺伝子のCDR領域へと方向付ける方法である。このような技法は、Barbasら(1994年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91巻:3809~3813頁)およびSchierら(1996年、J. Mol. Biol.、263巻:551~567頁)により開示されている。当技術分野では、上記に記載した技法の全てがそれ自体として公知である。当業者は、このような技法を、当技術分野において日常的な方法を用いて本発明の特異的結合メンバーをもたらすのに用いることが可能であろう。

30

【0119】

免疫グロブリンの可変ドメインのうちの実質的な部分は、それらに介在するフレームワーク領域と併せて、少なくとも3つのCDR領域を含む。この部分はまた、第1のフレームワーク領域および第4のフレームワーク領域の両方のうちの少なくとも約50%も包含し、この50%は、第1のフレームワーク領域のうちのC末端側の50%および第4のフレームワーク領域のうちのN末端側の50%とすることが好ましい。可変ドメインの実質的部分のN末端またはC末端におけるさらなる残基は、天然の可変ドメイン領域と通常は関連しない残基でありうる。例えば、組換えDNA法により作製される本発明の特異的結合メンバーの構築は、クローニングまたは他の操作ステップを容易とするために導入されるリンカーによりコードされるN末端残基またはC末端残基の導入を結果としてもたらさる。他の操作ステップには、本発明の可変ドメインを、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン(例えば、ダイアボディーを生成させる場合)、または本明細書で示されるタン

40

50

パク質標識および/もしくは当業者に公知のタンパク質標識を含めたさらなるタンパク質配列へと接合するリンカーの導入が含まれる。

【0120】

本発明の好ましい態様では、図5および/または6に実質的に示される配列に基づく結合ドメインの対を含む組換え抗体が好ましいが、これらの配列のうちのいずれかに基づく単一の結合ドメインも、本発明のさらなる態様を形成する。図5および/または6に実質的に示される配列に基づく結合ドメインの場合は、免疫グロブリンのVHドメインは、標的抗原に特異的な形で結合することが可能なことが公知であるので、このような結合ドメインを、CNSにおけるニューロン、特に、神経損傷または傷害部位を標的とする薬剤として用いることができる。

10

【0121】

本発明の特異的結合メンバーは、抗体の定常領域またはそれらの一部をさらに含む。例えば、図5および6のVH配列およびVL配列に基づく組換え抗体は、それらのC末端において、図5または6に示されるそれぞれの定常領域ドメインと異なるか、またはこれらに由来するパリアントである定常領域ドメインを含め、ヒトC鎖またはヒトC鎖、好ましくは、C鎖を含めた抗体の軽鎖定常領域ドメインに結合させることができる。同様に、図5または6の配列に基づく組換え抗体は、それらのC末端において、任意の抗体アイソタイプ、例えば、IgG、IgA、IgE、IgD、およびIgM、ならびにアイソタイプのサブクラスのうちいずれか、特に、IgG1、IgG2b、およびIgG4に由来する免疫グロブリン重鎖の全部または一部に結合させ、次いで、これらを調べて同等および/または適切な活性および能力を確認または決定することもできる。IgMが好ましい。

20

【0122】

抗体またはそれらの任意の断片は、任意の細胞毒素、細菌毒素、または他の毒素、例えば、緑膿菌外毒素、リシン、もしくはジフテリア毒素とコンジュゲートすることもでき、これらと組換えにより融合させることもできる。用いられる毒素の一部は、毒素の全体的場合もあり、毒素の任意の特定のドメインの場合もある。このような抗体-毒素分子は、異なる種類のがんの標的化および治療に用いられて成功している(例えば、Pastan、Biochem Biophys Acta、1997年10月24日;1333巻(2号):C1~6頁;Kreitmanら、N Engl J Med、2001年7月26日;345巻(4号):241~7頁;Schneidlら、Leukemia、2000年1月;14巻(1号):129~35頁;Ghetieら、Mol Biotechnol、2001年7月;18巻(3号):251~68頁を参照されたい)。二重特異性および三重特異性の多量体は、異なるscFv分子を会合させることにより形成することができ、T細胞を腫瘍へと動員するための架橋形成試薬(免疫療法)、ウイルスの再標的化(遺伝子治療)、および赤血球凝集試薬(免疫診断剤)としてデザインされている(例えば、Todorovskaら、J Immunol Methods、2001年2月1日;248巻(1~2号):47~66頁;Tomlinsonら、Methods Enzymol、2000年;326巻:461~79頁;McCallら、J Immunol、2001年5月15日;166巻(10号):6112~7頁を参照されたい)。

30

40

【0123】

本発明の抗体は、検出可能な標識または機能的な標識で標識することができる。検出可能な標識には、抗体画像化の技術分野において公知の従来化学反応を用いて本発明の抗体に結合させうる放射性同位体である、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{121}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{117}Lu 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{67}Cu 、 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{99}Tc 、および ^{186}Re などの放射性標識が含まれるがこれらに限定されない。標識にはまた、蛍光標識(例えば、フルオレセイン、ロダミン、Texas Red)および当技術分野においてMRI-CTによる画像化のために従来用いられている標識も

50

含まれる。これらにはまた、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -グルコロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼなどの酵素標識も含まれる。標識にはさらに、検出可能な特異的同族部分、例えば、標識したアビジンへの結合を介して検出されうるビオチンなどの化学的部分も含まれる。機能的標識には、障害部位、損傷または傷害部位を標的とし、神経組織の破壊に対して保護をもたらすようにデザインされた物質が含まれる。このような機能的標識には、5-フルオロウラシルまたはリシンなどの細胞傷害薬、および細菌性カルボキシペプチダーゼまたはニトロレダクターゼなど、プロドラッグを機能部位において活性薬物へと転換することが可能な酵素が含まれる。本発明のイムノコンジュゲートまたは抗体融合タンパク質であって、他の分子または薬剤にコンジュゲートするかまたは結合させた抗体およびそれらの断片に、化学的切除剤、毒素、免疫調節剤、サイトカイン、細胞傷害薬、化学療法剤または化学療法薬にコンジュゲートした結合メンバーがさらに含まれるがこれらに限定されないイムノコンジュゲートまたは抗体融合タンパク質が想定される。放射性標識を用いる場合、公知の現在利用可能なカウンティング手順を用いて、特異的結合メンバーを同定および定量化することができる。標識を酵素とする場合には、現在用いられている、当技術分野において公知の比色法、分光法、蛍光分光法、電流測定法、またはガス定量法のうちのいずれかを介して検出を達成することができる。

【0124】

当業者は、結果として神経細胞の傷害または損傷を含めたCNS損傷をもたらす合併症、または神経変性状態の*in vivo*における動物モデルを用いて、本発明の抗体、もしくはそれらの断片、それらのパリアント、またはこれらの組合せ、または他のCNS反応性抗体との組合せを、さらにまたは加えてスクリーニング、評価、および/または検証することもできる。このような動物モデルには、神経細胞の損傷、障害、変化、死滅、傷害、または変性と関連する状態または疾患のモデルが含まれるがこれらに限定されない。モデルには、脳卒中、脳傷害、虚血、MS、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、認知症、脳炎、髄膜炎、ALS、または運動ニューロン疾患のモデル、またはこれらの側面を模倣するモデルが含まれる。ヒヒ、サル、またはマカクザルなど、霊長動物における中脳動脈の閉塞を用いる脳卒中モデルは、当技術分野において公知であり、適切でありうる(Young Aら(1997年)、Stroke、28巻:1471~1476頁; del Zoppo G Jら(1986年)、Stroke、17巻:1254~1265頁; MarshallおよびRidley(1996年)、Neurodegeneration、5巻:275~286頁)。TMEVなどのMSモデルも公知であり、本明細書でも記載されて用いられる。ALSおよび運動ニューロン疾患についてのSODマウスモデルも公知であり、本明細書でも記載されて用いられる(Gurney M Eら(1994年)、Science、264巻:1772~1775頁)。

【0125】

本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、哺乳動物における神経保護の方法であって、前記哺乳動物に有効量の本発明の抗体、それらの断片、および組換え抗体を投与するステップを含む方法など、ヒトまたは動物の身体に対する処置法、防止法、または診断法において用いることができる。本発明によるCDRドメイン領域の配列を含む組換え抗体またはそれらの断片は、このような方法において用いることができる。本発明の薬剤、特に、組換え抗体またはそれらの断片は、神経傷害、神経損傷または神経障害、および結果としてCNS損傷をもたらすことが可能であり、可能性があるかまたは実際にもたらす合併症を防止、処置、または改善するための方法における神経保護剤として用いることができる。本発明の方法は、脳傷害または脳外傷、脊髄損傷(SCI)、神経傷害、頭部傷害、脳への血液供給が低減されるかまたは障害された状態、脳の感染性疾患、神経変性疾患を含めた、ニューロンの構造、機能、または生存の喪失が関与するかまたは関連する場合に適用可能である。本発明の方法に従い処置、防止、または改善するための例示的なこのような疾患または状態には、脊髄損傷(SCI)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症(MS)、アルツハイマー病、脳卒中、パーキンソン病、ハンチントン病、出産前低酸素症/周産期虚血、および/または脳性まひ、脳症

、脊髄症、ならびに運動ニューロン疾患が含まれる。

【0126】

本発明は、神経が損なわれているか、傷つけられているか、もしくは損傷している哺乳動物における疾患もしくは状態、または神経もしくはニューロンが障害、傷害もしくは損傷に感受性であるかもしくはこの危険性がある状況を処置または改善する方法であって、IgM12およびIgM42から選択される組換え抗体もしくは完全ヒト抗体またはその断片を投与するステップを含む方法を提供する。本発明の方法は、抗体IgM12および抗体IgM42の組合せを含めた、複数の抗体または断片の投与を含みうる。さらなるこのような方法では、抗体IgM12および/または抗体IgM42のうちの1または複数を含め、特に、抗体rHIgM22および/またはrHIgM46のうちの1または複数を含め、別のCNS作用抗体と組み合わせる(combined)ことができる。抗体の組合せは、まとめて投与することもでき、逐次的に投与することもでき、多様な回数および多様な量または濃度で投与することができる。したがって、抗体12および/または抗体42は、抗体22および/または抗体46と組み合わせ、併用投与を介して投与することもでき、数時間、数日間、または数週間を含めた短時間または長期間隔てて逐次的に投与することもできる。神経変性を伴う疾患または状態、および、特に、脱髄を含めた疾患または状態を処置または改善するために、抗体12および/または抗体42は、特に、抗体22および/または抗体46(sHIgM22、rHIgM22、sHIgM46、またはrHIgM46)と組み合わせ、併用投与を介して投与することもでき、逐次的に投与することもできる。このような一方法では、特に多発性硬化症(MS)を含めた脱髄性疾患または脱髄性状態を処置または改善するために、抗体12および/または抗体42を、抗体22および/または抗体46と組み合わせ、併用投与を介して、または逐次的に投与する。抗体IgM22の可変重鎖および軽鎖配列は、それぞれ、配列番号43および配列番号44に示される。抗体IgM46の可変重鎖および軽鎖配列は、それぞれ、配列番号45および配列番号46に示される。抗体IgM12および/または抗体IgM42のうちの1または複数は、(a)CDR1配列であるSSGMH、CDR2配列であるV(I)ISYDGSRKYYADSVKG、およびCDR3配列であるGVTGSP TLDYを含む重鎖可変領域のCDR、ならびにCDR1配列であるSGSSSNIGNNFVS、CDR2配列であるDITKRPS、およびCDR3配列であるG(E)TWDSSLSAVVを含む軽鎖可変領域のCDR;または(b)CDR1配列であるSGFTFSYW、CDR2配列であるIKKDGEK、およびCDR3配列であるARPNCGGDCYLPWYFDを含む重鎖可変領域のCDR、ならびにCDR1配列であるQSVLYSSNNKNY、CDR2配列であるYWAS、およびCDR3配列であるQQYYNTPQAを含む軽鎖可変領域のCDRを含む1または複数の再ミエリン化抗体と組み合わせることができる。

【0127】

本発明の抗体は、処置を必要とする患者に、腹腔内注射、血流もしくはCSF中への注射、または傷害部位または障害部位への直接の注射を含めた、任意の適切な経路を介して投与することができる。例示的な本発明の抗体の特定の利点は、それらがBBBを越え、したがって、腹腔内投与であっても、CNSを標的としうることである。正確な用量は、抗体が診断用であるのか処置用であるのか、傷害のサイズまたは程度および位置、抗体の正確な性質(全抗体であるのか、断片であるのか、ダイアボディーであるのかなど)、および抗体に結合させた任意の検出可能な標識または機能的標識の性質を含めた多くの因子に依存する。放射性核種を治療に用いる場合、適切な単回の最大用量は、約45mCi/m²、~約250mCi/m²の最大量とすることができる。好ましい用量は、15~40mCiの範囲とし、さらに好ましい用量範囲は、20~30mCiまたは10~30mCiとする。このような治療は、骨髄置換または幹細胞置換を要請する場合がある。臨床的に容認されるネイキッド抗体は一般に、mg単位の量で投与し、成体用量を、投与1回当たり20~2000mgのタンパク質、投与1回当たり20~1500mgのタンパク質、または投与1回当たり20~1000mgのタンパク質、または投与1回当たり20

10

20

30

40

50

~ 500 mg のタンパク質、または投与1回当たり20 ~ 100 mg のタンパク質とする。臨床的に容認される注射用モノクローナル抗体は、mg 単位の量で投与し、投与1回当たり3 ~ 5 mg / kg、5 ~ 10 mg / kg、投与1回当たり300 ~ 400 mg、投与1回当たり300 ~ 500 mg とする (Newsome BW および Ernstoff MS (2008年)、Br J Clin Pharmacol、66巻(1号): 6 ~ 19頁; herceptin.net、tysabri.net、avastin.net、remicade.com)。再ミエリン化抗体IgM22は、 μ g の範囲の比較的著明な低用量で有効であり、抗体の単回投与によっても、BBBを越え、CNSにおいて活性となることが可能であると示されていることが注意される (WO2004/110355; Warrington AEら(2007年)、J Neurosci Res、85巻(5号): 967 ~ 976頁)。組換えIgM12抗体は、動物モデルにおいて μ g の範囲での単回腹腔内投与されると、治療的に関与性の活性を示すことが本明細書で示されている。したがって、本発明の抗体の投与は、単回投与で適用可能かつ有効な場合もあり、複数回投与および/または定期的投与で適用可能かつ有効な場合もあり、投与1回当たり μ g または投与1回当たり μ g / kg の範囲で適用可能かつ有効な場合もあり、投与1回当たりmg 単位の低量(投与1回当たり100 μ g ~ 1 mg、1 mg 未満、1 mg ~ 5 mg、1 mg ~ 10 mg、5 mg ~ 15 mg、10 mg ~ 20 mg)で適用可能かつ有効な場合もある。成体患者に対する単回処置のための用量を、小児および乳児のために比例調整することができ、また、他の抗体フォーマットのために、例えば、分子量に比例して調整することもできる。処置は、医師の裁量下、毎日、毎週2回、毎週、または毎月の間隔で反復することができる。例示的な抗体の1つの利点は、それらがBBBを越えて、損傷または傷害部位を標的とし、したがって、適切な効果を達成するために、低用量および潜在的に少ない投与回数を使用を容易とすることである。

10

20

【0128】

医薬組成物および治療用組成物

本発明の抗体または断片は通常、本発明の抗体(複数可)または断片に加えて少なくとも1つの成分を含みうる、医薬組成物の形態で投与する。したがって、本発明による医薬組成物および本発明に従って用いられる医薬組成物は、有効成分に加えて、当業者には周知である、薬学的に許容される賦形剤、キャリア、緩衝液、安定化剤、または他の物質も含みうる。このような物質は、非毒性であるべきであり、有効成分の有効性に干渉すべきではない。キャリアまたは他の物質の正確な性質は、経口経路の場合もあり、注射、例えば、静脈内注射を介する場合もあり、腫瘍部位におけるデポ剤を介する場合もある、投与経路に依存する。

30

【0129】

経口投与用の医薬組成物は、錠剤形態の場合もあり、カプセル形態の場合もあり、粉末形態の場合もあり、液体形態の場合もある。錠剤は、ゼラチンまたは補助剤など、固体のキャリアを含みうる。液体の医薬組成物は一般に、水、石油、動物油もしくは植物油、鉱物油、または合成油など、液体のキャリアを含む。生理食塩液、デキストロース、あるいは他の糖溶液、または、エチレングリコール、プロピレングリコール、もしくはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれうる。静脈内注射または罹患部位における注射では、有効成分が、発熱物質を含まず、pH、等張性、および安定性が適切な、非経口的に許容される水溶液の形態でありうる。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液などの等張性ビヒクルを用いて、適切な溶液を調製することが十分に可能である。防腐剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤、および/または他の添加剤も、要請に応じて包含されうる。

40

【0130】

組成物は、単独で投与することもでき、他の処置、治療剤、または薬剤と組み合わせて、処置される状態に応じて同時的または逐次的に投与することもできる。本明細書に記載される1または複数の組換え抗体またはその断片の組合せを含む組成物が想定される。加えて、本発明は、本明細書に記載される抗体またはその断片、および向神経活性剤もしくは

50

は神経治療剤、抗炎症剤、神経伝達物質放出調節剤、神経受容体のリガンドもしくはアゴニストもしくはアンタゴニスト、カルシウムチャンネル剤、免疫調節剤、または他の CNS 反応性抗体など、他の薬剤または治療剤を含む組成物も想定し、包含する。本明細書で記載される 1 または複数の組換え抗体またはその断片の組合せを含む組成物が想定される。他の処置または治療剤には、適切な用量の非ステロイド系抗炎症薬（例えば、アスピリン、パラセタモール、イブプロフェン、またはケトプロフェン）などの鎮痛薬、またはモルヒネなどのアヘン剤、または制吐剤の投与が含まれる。加えて、組成物は、免疫反応およびがん細胞または腫瘍の軽減または消失を刺激する、インターロイキン、腫瘍壊死因子（TNF）、または他の増殖因子、コロニー刺激因子、サイトカイン、またはデキサメタゾンなどのホルモンなどの免疫調節剤と共に投与することもできる。組成物はまた、特に

10

20

30

40

50

【0131】

本発明はさらに、本発明の治療法を実施するのに有用な治療用組成物も想定する。対象の治療用組成物は、混合剤中に、薬学的に許容される賦形剤（キャリア）、および有効成分としての、本明細書で記載される抗体、そのポリペプチド類似体またはその断片のうちの 1 または複数を含む。好ましい実施形態では、組成物が、本結合メンバー / 抗体の標的細胞との特異的結合を調節することが可能な抗原を含む。当技術分野では、抗体、ポリペプチド、または活性断片を有効成分として含有する治療用組成物または医薬組成物の調製について十分に理解されている。典型的には、このような組成物を溶液または懸濁液としての注射剤として調製する。しかしまた、液体中で溶液に適するか、または液体中で懸濁液に適する固体形態を、注射の前に調製することもできる。調製物はまた、乳化させることもできる。治療的有効成分は、薬学的に許容され、この有効成分と適合性である賦形剤と混合させることが多い。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。加えて、所望の場合、組成物は、有効成分の有効性を増強する保湿剤または乳化剤、pH 緩衝剤など、微量の補助物質も含有しうる。抗体または活性断片は、薬学的に許容される中和された塩形態としての治療用組成物へと処方することができる。薬学的に許容される塩には、酸添加塩（ポリペプチドまたは抗体分子の遊離アミノ基により形成される）が含まれ、これらは、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸中で形成される。また、遊離カルボキシル基から形成される塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2 - エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来しうる。

【0132】

治療的抗体または活性断片を含有する組成物は従来、例えば、単位用量の注射を介して腹腔内投与または静脈内投与されている。本発明の治療用組成物に言及して用いられる場合の「単位用量」という用語は、各単位が、要請される希釈剤、すなわち、キャリアまたはビヒクルとの関連で、所望の治療的効果をもたらすように計算した所定量の活性物質を含有する、ヒト用の単位用量として適切な物理的に個別の単位を指す。

【0133】

組成物は、処方と適合的な形で、かつ、治療有効量で投与する。投与される量は、処置される対象、対象の系が有効成分を用いる能力、および所望のニューロン結合能の程度または神経傷害の程度に依存する。投与するように要請される有効成分の正確な量は医師の判断に依存し、各個体に特有である。初回投与および追加投与に適するレジームもまた可変的であり、初回投与の後に、その後の注射または他の投与を介して 1 もしくは複数時間、1 もしくは複数日間、1 もしくは複数週間、または 1 もしくは複数力月間の間隔で反復される投与を包含しうる。代替的に、血液、CNS、または所望の治療部位において適切かつ十分な濃度を維持するのに十分な持続的注入または持続的投与も想定される。

【0134】

投与時期は、規格による教示、患者または対象の臨床パラメータ、状態または疾患の状況または重症度、または神経傷害、神経病変または障害の程度もしくは性質に基づき、当業者または医師が変化させ、決定することができる。したがって、神経機能の改善、または、例えば、死滅もしくは障害からのニューロン保護の増強は、神経損傷または神経障害の程度を最小化するように、疾患の早期に投与することにより増強することもでき、疾患が発症または臨床的に顕在化したときに増強することもできる。ある態様では、神経機能障害または神経損傷による疾患の進行を最小化または緩和するように、投与時期を、神経機能の評価、状態の決定、および/または他の臨床評価と協調させる。

【0135】

診断アッセイ

本発明はまた、神経細胞の損傷、傷害または障害を検出または決定する方法を含めた多様な診断的適用にも関する。本発明の抗体および断片を用いて、*in vitro*または*in vivo*におけるニューロンを評価し、定量化し、標的化し、かつ/または画像化することができる。それらの断片を含めた本抗体、ならびに特異的結合メンバー、抗体および/またはそれらのサブユニットの生成または活性を調節する薬物は、特定の診断適用を保有することが可能であり、例えば、ニューロンの障害、変性、傷害、損傷、または死滅を伴う状態または疾患を検出し、かつ/または測定する目的に用いることができる。放射性標識した抗体およびそれらの断片を含め、標識した抗体およびそれらの断片は、*in vitro*の診断法および*in vivo*の放射性画像化法、ならびに放射性免疫治療において有用である。*in vivo*における画像化の例では、本発明の抗体または断片を、例として挙げると、抗体分子にキレート化基を介して多数の常磁性イオンをロードした磁気共鳴造影剤が含まれるがこれらに限定されない、放射性同位体（複数可）以外の造影剤にコンジュゲートすることができる。キレート化基の例には、EDTA、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、およびポリオキシムが含まれる。常磁性イオンの例には、ガドリニウム、鉄、マンガン、レニウム、ユーロピウム、ランタニウム、ホルミウム、およびフェルビウムが含まれる。本発明のさらなる態様では、放射性標識した抗体およびそれらの断片、特に、ラジオリソコンジュゲートが、特に、細胞療法のための放射性標識した抗体として、放射性免疫治療において有用である。なおさらなる態様では、放射性標識した特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらの断片が、放射免疫ガイド下手術法において有用であり、この場合、これらにより、障害されもしくは損傷したニューロンもしくは神経傷害部位の存在および/または位置を、手術中、または手術後に同定および指示して、このような細胞を標的とするかまたは除去することもでき、これらの特定の部位に細胞を移植または投与することもできる。

【0136】

放射性免疫治療（RAIT）は、臨床に導入され、多様な抗体イムノコンジュゲートを用いて有効性を裏付けている。¹³¹Iで標識したヒト化抗がん胎児性抗原（抗CEA）抗体hMN-14が結腸直腸がんにおいて評価されており（Behr TMら（2002年）、*Cancer*、94巻（増刊4号）：1373～81頁）、⁹⁰Y標識を伴う同じ抗体が甲状腺髄様がんにおいて評価されている（Stein Rら（2002年）、*Cancer*、94巻（1号）：51～61頁）。また、非ホジキンリンパ腫および膵臓がんのためのモノクローナル抗体を用いる放射性免疫治療も評価および報告されている（Goldenberg DM（2001年）、*Crit Rev Oncol Hematol*、39巻（1～2号）：195～201頁；Gold DVら（2001年）、*Crit Rev Oncol Hematol*、39巻（1～2号）：147～54頁）。また、特定の抗体による放射性免疫療法も、米国特許第6,306,393号および同第6,331,175号において記載されている。また、抗CEA抗体および腫瘍関連抗原を指向する抗体を用いることを含めた放射免疫ガイド下手術（RIGS）も臨床治療に導入され、有効性および有用性を裏付けている（Kim JCら（2002年）、*Int J Cancer*、97巻（4号）：542～7頁；Schneebaum Sら（2001年）、*World J Surg*、25巻（12号）：1495～8頁；Avital

10

20

30

40

50

Sら(2000年)、Cancer、89巻(8号):1692~8頁;McIntosh DGら(1997年)、Cancer Biother Radiopharm、12巻(4号):287~94頁)。

【0137】

放射性標識した抗体およびそれらの断片は、*in vitro*の診断法および*in vivo*の放射性画像化法において有用である。抗体およびそれらの断片、特に、ラジウムノコンジュゲートは、放射性免疫治療において、特に、神経傷害の修復、神経変性の回復、がん、またはCNS腫瘍の治療のための放射性標識した抗体として、または代替的に、特定の症例において損傷した神経組織もしくはニューロンを切除するための放射性標識した抗体として有用である。*in vivo*の態様では、抗体またはそのニューロン結合断片を標識し、神経傷害を位置特定するかまたは損傷または傷害された残りの神経組織を評価するための、定位固定法または侵襲性が最小限の技法を含めた手術もしくは外科法の前、手術もしくは外科法の間、または手術もしくは外科法後に動物に投与する。このような態様では、放射性標識した特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらの断片が、放射免疫ガイド下手術法において有用であり、この場合、これらにより、障害され、損傷され、傷害され、または死滅する神経細胞もしくはニューロンまたは神経組織の存在および/または位置を、手術前、手術中、または手術後に同定および指示して、このような細胞を標的とするか、同定するか、または除去することもできる。

10

【0138】

本発明の抗体およびそれらの断片の診断的適用は、当業者に周知で標準的であり、本記載に基づく、*in vitro*および*in vivo*における適用を包含する。*in vitro*においてニューロンまたは神経組織を評価(*assessment*および*evaluation*)するための診断アッセイおよびキットを用いて、神経細胞が障害され、損傷または傷害された神経状態または神経疾患を有するかまたはこれらを有することが疑われることが公知の患者試料を含めた患者試料を診断、評価、およびモニタリングすることもでき、患者または対象に由来する試料における場合を含め、細胞死もしくは細胞損傷の程度またはCNS腫瘍もしくはがんの程度を決定することもできる。神経学的疾患状態の評価(*assessment*および*evaluation*)はまた、患者の薬物についての臨床試験に対する適性、または、これらの組合せを含めた、特定の神経治療剤もしくは化学療法剤もしくは本発明の抗体の投与に対する、異なる薬剤もしくは抗体の投与に対する適性と対比した適性を決定するのにも有用である。

20

30

【0139】

本発明は、例として挙げると、ニューロンの損傷、障害、もしくは傷害の程度もしくは存在についての定量的解析のための試験キット、または試料中のニューロンを定量化するための試験キットの形態で調製しうるアッセイ系を包含する。系または試験キットは、本明細書で論じられる放射法および/または酵素法のうちの1つを介して調製される標識された成分と、標識の、抗体、および、場合によって、それらのうちの少なくとも1つを遊離成分(複数可)もしくは固定化成分(複数可)とする1または複数のさらなる免疫化学試薬、またはそれらの結合パートナー(複数可)への連結とを含みうる。

40

【0140】

本発明のさらなる実施形態では、上記に基づき、試料中のニューロンの状態を決定するために医療従事者が用いるのに適する市販の試験キットを調製することもできる。上記で論じた試験法に従い、このようなキットのうちの1つのクラスは、少なくとも標識した抗体またはその結合パートナー、例として挙げると、標識した抗体に特異的な抗体、および選択される方法、例えば、「競合」法、「サンドウィッチ」法、および「DASP」法などに当然ながら依存する指示書を含む。キットはまた、緩衝剤、安定化剤などの周縁的試薬も含有しうる。

【0141】

したがって、ニューロンの存在を裏付けるか、またはその状態を決定するための試験キットであって、

50

(a) 本抗体もしくは断片またはこれに対する特異的結合パートナーの、検出可能な標識への直接的または間接的な結合により得られる、所定量の、少なくとも1つの標識した免疫化学反応性の成分と、

(b) 他の試薬と、

(c) 前記キットの使用についての指示書と

を含むキットを調製することができる。

【0142】

神経細胞の傷害、損傷または障害の存在を裏付けるための試験キットであって、

(a) 本抗体またはこれに対する特異的結合パートナーの、検出可能な標識への直接的または間接的な結合により得られる、所定量の、少なくとも1つの標識した免疫化学反応性の成分と、

(b) 他の試薬と、

(c) 前記キットの使用についての指示書と

を含むキットを調製することができる。

【0143】

核酸

本発明はさらに、本発明の抗体、特に、組換え抗体、特に、完全ヒト抗体をコードする単離核酸を提供する。核酸は、DNAおよびRNAを包含する。好ましい態様では、本発明が、図5もしくは6に示されるポリペプチドを含め、上記で規定した本発明のポリペプチドをコードする核酸、またはそのCDR領域をコードすることが可能な核酸を提供する。

【0144】

本発明はまた、少なくとも1つの上記のポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写カセット、または発現カセットの形態である構築物も提供する。本発明はまた、1または複数の上記の構築物を含む組換え宿主細胞も提供する。提供される任意の抗体または断片をコードする核酸は、特異的結合メンバーを生成させる方法であって、それをコードする核酸からの発現を含む方法と同様に本発明の態様をなす。発現は、その核酸を含有する組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することにより達成することができて簡便である。発現を介する生成の後、特異的結合メンバーは、任意の適切な技法を用いて単離および/または精製し、次いで、必要に応じて用いることができる。

【0145】

本発明による抗体およびコード核酸分子およびベクターは、例えば、それらの天然の環境から、実質的に純粋または均一の形態で単離および/または精製して提供することもでき、核酸の場合は、要請される機能を伴うポリペプチドをコードする配列以外に由来する核酸または遺伝子を含まないかまたは実質的に含まない形で提供することもできる。本発明による核酸は、DNAを含む場合もありRNAを含む場合もあり、完全に合成の場合もあり、部分的に合成の場合もある。

【0146】

異なる多様な宿主細胞においてポリペプチドをクローニングし、発現させるための系は周知である。適切な宿主細胞には、細菌、哺乳動物細胞、酵母、およびバキュロウイルス系が含まれる。相同的なポリペプチドを発現させるために当技術分野において利用可能な哺乳動物の細胞系には、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、がん細胞、卵巣がん細胞、および他の多くの細胞が含まれる。一般的な、好ましい細菌宿主は、E. coliである。当技術分野では、E. coliなどの原核細胞における抗体および抗体断片の発現が確立されている。プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列を含めた適切な制御配列、マーカー遺伝子、および他の配列を必要に応じて含有する適切なベクターを、選択または構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミドベクターの場合もあり、ウイルスベクター、例えば、ファージベクターまたはファージミドベクターの場合もある。さらなる詳細については、例えば、「Molecular Cloning: a Laboratory

10

20

30

40

50

tory Manual」、2版、Sambrookら、1989年、Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。例えば、核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの導入、および遺伝子の発現、ならびにタンパク質の解析において核酸を操作するための多くの公知の技法およびプロトコールについては、「Short Protocols in Molecular Biology」、2版、Ausubelら編、John Wiley & Sons、1992年において詳細に記載されている。SambrookらおよびAusubelらによる開示は、参照により本明細書に組み込まれている。

【0147】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書で開示される核酸を含有する宿主細胞を提供する。なおさらなる態様は、このような核酸を宿主細胞へと導入するステップを含む方法を提供する。導入するステップには、任意の利用可能な技法を用いることができる。真核細胞の場合、適切な技法には、リン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAE-デキストラン法、電気穿孔、リボソームを介するトランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス、例えば、牛痘ウイルス、もしくは、昆虫細胞では、バキュロウイルスを用いる形質導入が含まれる。細菌細胞の場合、適切な技法には、塩化カルシウムによる形質転換、電気穿孔、およびバクテリオファージを用いるトランスフェクションが含まれる。導入の後、例えば、遺伝子を発現させるための条件下で宿主細胞を培養することにより、核酸から発現させ、または発現を可能にする。本発明はまた、上記の特異的結合メンバーまたはポリペプチドを発現させるための発現系において、上記で言及した構築物を用いることを含む方法も提供する。

10

20

【0148】

本発明の別の特徴は、本明細書で開示されているDNA配列の発現である。当技術分野において周知の通り、DNA配列は、それらを適切な発現ベクター内の発現制御配列へと作動的に連結し、この発現ベクターを用いて適切な単細胞宿主を形質転換することにより発現させることができる。本発明のDNA配列を発現させるのに、多種多様な宿主/発現ベクターの組合せを用いることができる。有用な発現ベクターは、例えば、染色体のDNA配列、染色体以外のDNA配列、および合成DNA配列のセグメントからなることが可能である。適切なベクターには、SV40の派生体および公知の細菌プラスミド、例えば、E. coliのプラスミドであるcolE1、pCR1、pBR322、pMB9、およびこれらの派生体、RP4などのプラスミド；ファージDNA、例えば、ファージの多くの派生体、例えば、NM989、および他のファージDNA、例えば、M13および線状の一本鎖ファージDNA；2uプラスミドまたはその派生体などの酵母プラスミド；昆虫細胞または哺乳動物細胞において有用なベクターなど、真核細胞において有用なベクター；ファージDNAまたは他の発現制御配列を用いるように改変されたプラスミドなど、プラスミドとファージDNAとの組合せに由来するベクターなどが含まれる。これらのベクターにおいて、多種多様な発現制御配列（それに作動可能に連結されたDNA配列の発現を制御する配列）のうちのいずれかを用いて、本発明のDNA配列を発現させることができる。このような有用な発現制御配列には、例えば、SV40初期プロモーターまたはSV40後期プロモーター、CMV、牛痘ウイルス、ポリオーマウイルスまたはアデノウイルス、lac系、trp系、TAC系、TRC系、LTR系、ファージの主要なオペレーター領域およびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター（例えば、Pho5）、酵母接合因子のプロモーター、および原核細胞もしくは真核細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが公知である他の配列、ならびにこれらの多様な組合せが含まれる。

30

40

【0149】

また、多種多様な単細胞の宿主細胞も、本発明のDNA配列を発現させるのに有用である。これらの宿主は、E. coli、Pseudomonas属、Bacillus属、Streptomyces属の株、酵母などの真菌、ならびにCHO細胞、YB/20細

50

胞、NSO細胞、SP2/0細胞、RI.1細胞、B-W細胞、およびL-M細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、COS 1細胞、COS 7細胞、BSC1細胞、BSC40細胞、およびBMT10細胞）、昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）、およびヒト細胞、および組織培養物中の植物細胞などの動物細胞など、周知の真核生物宿主、および原核生物宿主を包含しうる。

【0150】

全てのベクター、発現制御配列、および宿主が、本発明のDNA配列を発現させるのに同等に良好に機能するわけではないことが理解されるであろう。また、全ての宿主が、同じ発現系により同等に良好に機能するわけでもない。しかし、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなしに所望の発現を達成するのに必要以上の実験を行わずに、適正なベクター、発現制御配列、および宿主を選択することが可能であろう。発現制御配列の選択では、通常多様な因子を考慮する。これらには、例えば、系の相対強度、その制御可能性、および発現させる特定のDNA配列または遺伝子との、特に、潜在的な二次構造に関するその適合性が含まれる。適切な単細胞宿主は、例えば、それらの選択したベクターとの適合性、それらの分泌特徴、それらがタンパク質を適正にフォールドする能力、およびそれらの発酵要件のほか、発現させるDNA配列によりコードされる産物の宿主に対する毒性、および発現産物を精製する容易さを考慮することにより、選択される。これらの因子および他の因子を考慮すると、当業者は、本発明のDNA配列を、発酵により、または大スケールの動物培養物により発現させる、多様なベクター/発現制御配列/宿主の組合せを構築することが可能である。

10

20

【0151】

抗体またはその断片をコードするDNA配列は、クローニングではなく合成により調製することができる。DNA配列は、特異的結合メンバーのアミノ酸配列に適切なコドンによりデザインすることができる。一般に、配列を発現のために用いる場合は、意図される宿主に好ましいコドンを選択する。完全な配列は、標準的な方法を介して調製され、完全なコード配列へと組み立てられる、重複するオリゴヌクレオチドから組み立てる。例えば、Edge、Nature、292巻：756頁（1981年）；Nambairら、Science、223巻：1299頁（1984年）；Jayら、J. Biol. Chem.、259巻：6311頁（1984年）を参照されたい。合成DNA配列により、特異的結合メンバーの類似体または「変異タンパク質」を発現させる遺伝子の簡便な構築が可能となる。代替的に、天然の特異的結合メンバー遺伝子またはcDNAに対する部位指向変異誘発を介して変異タンパク質をコードするDNAを作製することもできるが、変異タンパク質は、従来のポリペプチド合成を用いて直接作製することができる。

30

【0152】

本発明は、本発明の例として提示される以下の非限定的な実施例を参照することにより、よりよく理解することができる。以下の例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために提示されるものであり、本発明の広範な範囲を限定するものとしてみなされるべきではない。

【実施例】

【0153】

本発明は、本発明の例として提示される以下の非限定的な実施例を参照することにより、よりよく理解することができる。以下の例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために提示されるものであり、本発明の広範な範囲を限定するものとしてみなされるべきではない。

40

【0154】

（実施例1）

自己神経系細胞に結合する天然自己抗体（NatAb）の同定

ニューロンに結合する天然血清のヒトIgMを、モノクローナルIgGまたはモノクローナルIgMの高スパイク（血中に10mg/mlを超える）を伴う候補血清について、45年間にわたり収集された140,000を超える試料を含有するMayo Clin

50

i c 血清バンクをスクリーニングし、次いで、血清を抗体の生存大脳皮質および生存小脳のスライスへの結合について調べることににより同定した(31)。次いで、このようなIgMを陽性試料から精製し、1)単離された初代ニューロンの表面への結合、2)神経突起伸長を支持するための基質として、3)ストレス分子に対するニューロンをアポトーシスから保護する能力についてさらに調べた。このスクリーニングプロトコールは、希突起膠細胞に結合し、MSモデル(22、およびW00185797において記載されている)における再ミエリン化を促進するヒトIgMを同定するのに使用されるプロトコールに基づく。適切な組織または細胞の表面の認識は、治療用IgMの特徴を規定するのに重要であると考えられる。

【0155】

2つの新規で異なる血清由来ヒトニューロン結合IgM(sHIgM12およびsHIgM42)を同定した。これらの血清由来抗体の特定の特徴を表1に列挙する。血清に由来するsHIgM12およびsHIgM42はまず、神経突起伸長ならびに強力な基質であるラミニンを支持し、CNSミエリンによる神経突起成長の障害を凌駕することが*in vitro*において示されている(23)。

【0156】

さらなる研究は、マウスにおける夜間1時間当たりの平均自発活動を介して評価される通り、血清由来のsHIgM12が、TMEV感染マウスにおける自発的機能を改善することを示している(21)。既に同定されているIgM NatAb(sHIgM22およびsHIgM46)と異なり、sHIgM12もsHIgM42も脊髄の再ミエリン化を促進しない。

【0157】

【表1】

表1: 治療用ヒトIgM

ヒトIgM	再ミエリン化の促進	神経突起伸長の支持	希突起膠細胞への結合	ニューロンへの結合
sHIgM12	なし	あり	なし	あり
sHIgM42	なし	あり	なし	あり
sHIgM22	あり	なし	あり	なし
sHIgM46	あり	なし	あり	なし
sHIgM39	なし	なし	なし	なし

【0158】

自己抗体は、病原性であると考えられることが多い。これに対し、本明細書で裏付けられる通り、ニューロンに対する自己抗体(sHIgM12およびsHIgM42ならびにこれらに基づく組換え抗体)は、ニューロンを死滅させない。そうではなくて、これらのIgMは、ニューロンを死滅から保護し、神経突起伸長を促進し、*in vivo*におけるNAAを増大させ、*in vivo*のTMEVモデルにおいて軸索を保護し、TMEV罹患マウスの夜間における自発的機能を改善する。

【0159】

ニューロン結合抗体であるIgM12およびIgM42は、CNS病変におけるニューロンを標的とし、ニューロンの喪失を可逆化し、かつ/またはニューロン損傷またはニューロン疾患の影響を改善するのに適用可能である。ニューロン結合ヒトIgMは、多様な疾患および神経変性、ニューロン損傷、またはニューロン死滅を伴う状態に対する固有の

10

20

30

40

50

適用を伴う治療剤の新たなクラスを代表する。限定せずに述べると、このような疾患には、MS、脊髄損傷、ALS、アルツハイマー病、外傷性脳損傷、脳血管事象、または脳卒中が含まれる。これらのヒトIgMは、動物に全身投与した場合の抗原性が最小限となっている。

【0160】

複数種類の生存ニューロンの表面に結合するヒトIgMの同定および特徴付け：

高濃度のIgGまたはIgM (> 10 mg/ml)を伴う血清試料を、抗体の、生存CNS組織のスライスにおけるニューロン層(皮質および小脳)への結合についてスクリーニングした。152例の被験血清のうち、17例のヒト血清が、組織スライスにおいて陽性であった(23)。

10

【0161】

抗体sHIgM12および抗体sHIgM42は、ニューロンマーカーであるニューロフィラメントまたはIIIチューブリンで共標識される多種多様なニューロンの表面に結合する。これらには、ヒト側頭葉の生検に由来する小脳顆粒細胞(23)、皮質ニューロン、海馬ニューロン、ニューロン(図1)、および網膜神経節細胞(データは示さない)が含まれる。rHIgM12は、海馬ニューロンの神経細胞体、神経突起、および成長円錐を染色させる(データは示さない)。この交差反応性は、ヒトIgMが、MS、筋萎縮性側索硬化症、または脳卒中など、多くの神経学的状態/疾患において影響を受けるCNS細胞において作用しうることを示唆する。

20

【0162】

本データは、sHIgM12またはsHIgM42のニューロン表面への結合が炭水化物依存性であることを示す。培養物中のニューロンに対するシアリダーゼ処置によりいずれのヒトIgMの細胞表面への結合も消失する一方、Fumonisin B1によりスフィンゴ脂質の合成を遮断するか、またはPIPLCによりGPI結合タンパク質を除去しても、IgMの結合は消失しなかった(23)。ガングリオシドは、これらのヒトIgMの抗原の候補物質である。共標識実験では、rHIgM12が、ニューロン膜におけるGM1と共に共局在化する(実施例11および図21Cを参照されたい)。

【0163】

sHIgM12およびsHIgM42は、神経突起成長の誘発など、特定の機能的特徴を共有するが、差異を裏付けており、各々が固有の抗体である。これは、結合研究および免疫蛍光研究において明らかであり、sHIgM12およびsHIgM42により、小脳顆粒細胞の表面が異なるパターンで標識される。培養物中のラット小脳顆粒細胞についての免疫蛍光研究では、ニューロン膜がこれらの2つの抗体により標識されるパターンが異なる(図2)。神経突起膜の小領域には、sHIgM12が結合する結果として、点状のパターンがもたらされる。神経突起膜の大領域には、sHIgM42が結合する結果として、分節化の高いパターンがもたらされる。

30

【0164】

(実施例2)

ヒトIgMは皮質ニューロンを過酸化物誘導性死滅から保護する

再ミエリン化促進ヒトIgMは、培養物中の希突起膠細胞を、活性アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ3の過酸化物誘導性活性化から保護することが示されている(33)。本明細書で示される通り、sHIgM12またはsHIgM42も、類似のプロトコールにより評価した。sHIgM12またはsHIgM42のそれぞれ、および過酸化物を、マウス初代皮質ニューロンの培養物へと併せて添加し、24時間後にカスパーゼ3の活性化度をアッセイした(図3)。

40

【0165】

培養されたニューロンをrHIgM12で処置した結果として、カスパーゼ3活性化のうちの80%に対する保護がもたらされた。また、ニューロンのsHIgM42による処置も、カスパーゼ3活性化のうちの約40%に対して保護的であった。これらの結果は、結果としてカスパーゼ3活性化からの保護が10%未満となる対照のヒトIgMと比較し

50

て有意に異なった ($P < 0.01$)。

【0166】

したがって、ニューロン結合 s H I g M 1 2 またはニューロン結合 s H I g M 4 2 は、皮質ニューロンを、過酸化物により誘導される細胞死から保護した。したがって、神経細胞損傷 (または死滅) 誘導剤または神経細胞損傷 (または死滅) 剤を供給した場合、I g M 1 2 および I g M 4 2 は、損傷 (または死滅) が生じることを個別かつ有意に防止した。

【0167】

(実施例3)

s H I g M 1 2 に由来する組換え抗体

s H I g M 1 2 の2つの組換え形態を構築した。各形態では、重鎖および軽鎖についての組換え I g M 2 2 抗体 (r H I g M 2 2) について既に用いた発現ベクターと同じ発現ベクターを用いた (22、28、W O 0 1 8 5 7 9 7)。ベクターは、S V 4 0 プロモーターの制御下で発現させた選択用 d H f R 遺伝子を包含する。マウス J 鎖を伴う部分ヒト組換え I g M 1 2 抗体の形態を、まず以下の通りに構築し、その後、ヒト/マウスハイブリドーマ系である F 3 B 6 細胞により抗体を生成させた。

【0168】

組換え I g M 1 2 抗体 (P A D 1 2) 用ベクターの構築は、ヌクレオチドデータベースに由来するリーダー配列を伴う重鎖可変領域の c D N A と、ヌクレオチドデータベースに由来するリーダー配列を結合させた完全軽鎖 c D N A とを、下記のプライマーを用いる既に記載された形 (6) と同様の形で挿入することにより実施した。ベクターを図4に示す。組換えヒト I g M 1 2 抗体に用いた重鎖および軽鎖の配列を、可変領域および定常領域に言及して図5に示す。

【0169】

r H I g M 1 2 V H を作製し、これを、データベース (M 2 9 8 1 2) に由来する、イントロンを伴うリーダー配列 (小文字) へと重複伸長を介してスプライシングするのに用いたプライマー (H o r t o n R M ら (1989年)、Gene、77巻: 61~68頁) は、以下の通りである。

【0170】

【化4】

(1) BspEI部位を伴う5'側プライマー : TCC GGA CGG TCC GGG A

(2) TCC GGA CGG TCC G ggacctct gtgcaagaac atgaaacatc tgtggtctt ccttctctg gtggcagctc ccagatgta
gtatctcagg gatccagaca

(3) cagg gatccagaca tggggatag ggaggtgct ctgatcccag ggctcactgt ggtctctct gttcacaggg gtcctgtccc aggtgcagct
gcaggatcg ggcccaggac

(4) PAC I部位を伴う3'側プライマー : CCTTAATTAAGACCTGG AGAGGCCATTCTTACCTGAG
GAGACGGTGACCAGGGTTC

【0171】

r H I g M 1 2 V k を作製し、これを、データベースに由来する、リーダー配列 (小文字、受託番号: X 5 9 3 1 2) へと重複伸長を介してスプライシングする (s o e) のに用いたプライマーは、以下の通りである。

【0172】

10

20

30

40

【化5】

(1) lym 12 VκからCκへのsoeを行うための5'側Cκプライマー : CGA ACT GTGGCT GCA C

(2) Xho Iを伴う3'側Cκプライマー : CCGCTCGAGTATCTAACACTCTCCCCTGTT

(3) Nhe Iを伴う5'側Lym 12 Vκ :

AGCATTACTAGCTAGCTC AAGACTCAGCCTGGAC atggaca tgagggtccc

cgctcagctc ctggggctcc tgctactctggctccgag gtgccaga tgt GAC ATC CAG ATG ACC CA

【0173】

合成の抗体遺伝子を伴うベクターを、電気穿孔を介してF3B6ハイブリドーマ細胞へと導入し、既に記載されている通り(6)に、メトトレキサート(MTX)による増幅を実施した。

10

【0174】

略述すると、8百万個のF3B6マウス/ヒトヘテロハイブリドーマ細胞(American Type Culture Collection: ATCC)を、Bgl I Iで直鎖化した10μgのPAD12ベクターと共に、800μlの無血清培地中で10分間にわたりインキュベートした後で、Biorad Gene Pulser(商標)(Biorad, Hercules, CA, USA)により0.2Vで電気穿孔した。氷上で10分間のインキュベーション後、細胞を、10%のウシ胎仔血清(FC)(Gibco, Carlsbad, CA, USA)を含有するRPMI-1640中で24mlまで希釈し、24ウェルプレートに播種して37℃でインキュベートし、48時間後、ベクターを含有する細胞を、1μMのメトトレキサート(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)を用いて選択した。2週間にわたるインキュベーション後、コロニーを新たなプレートへと採取し、コンフルエントまで増殖させた。この時点で、上清を採取し、酵素免疫測定アッセイ(ELISA)を介して、ヒトIgMの存在についてアッセイした。陽性コロニーを、さらに2カ月間にわたり、メトトレキサートの用量を1μM~200μMの範囲で増大させて選択した。このようにして、細胞を生成し、これにより、10μg/mlを超えるIgMを産生した。

20

【0175】

上記の通りに構築した最初の組換え抗体は、完全ヒト抗体ではない。完全ヒト形態を生成させるため、CHO細胞(Gibco BRL; 型番: 11619)を、E1AプロモーターおよびpCI(Promega)においてヒトJ鎖を発現させる構築物の制御下で組換え重鎖および組換え軽鎖をコードするベクターで共トランスフェクトした。細胞は、10%のコスミド(cosmic)クローンを伴うPowerCholとIMDMとの50/50混合物中で、メトトレキサートの用量を増大させて選択し、ELISAを介する測定で抗体を最も多く生成させた2つのクローンをサブクロニングした。サブクロンを増殖させ、バイアルを凍結させた。いずれの組換えIgM12形態も、ニューロンへの結合および血清から単離されたIgMのin vivoにおける有効性の特徴を維持するが、マウスにおける半減期は短い(これは、グリコシル化の差異に起因する可能性がある)。

30

40

【0176】

同様に同等の手順を用いて、同等のベクターにより組換えHIgM42抗体を構築した。ヒトIgM42抗体の重鎖配列および軽鎖配列を、可変領域および定常領域について言及して図6に示す。

【0177】

(実施例4)

rHIgM12の単回末梢投与は多発性硬化症(MS)のTMEVモデルにおける神経機能を改善した

rHIgM12により、培養物中の初代ニューロンが保護され、MSのTMEVモデルにおける身体障害が軸索喪失と相関する(2)という事実を照らして、TMEV感染マウ

50

スの r H I g M 1 2 による処置を用いて、神経欠損の進行を緩徐化する能力を評価した。

【 0 1 7 8 】

軸索の喪失が始まる時点である、T M E V 感染の 9 0 日後におけるマウス 5 匹の群を、r H I g M 1 2 1 0 0 μ g または対照のヒト I g M 1 0 0 μ g の単回投与で処置した。5 匹の感染マウスは、各群について無作為に選択し、処置前の機能記録を用いて、ベースラインの活性が群間で異なることを確認した。マウスは、複数週間における連続 3 日間にわたり、活動ボックスを用いて群として追跡した (3 4 、 3 5) 。夜間挙動の変化は、T M E V 媒介性疾患における神経欠損の高感度の尺度である。活動ボックスとは、筐体全体に格子を創出する赤外線ビームを対向させる透明のアクリル製ボックスであって、水平方向および垂直方向全ての運動を記録するボックスである。アッセイの感度は、後肢による立脚および歩行を測定する能力を反映する。T M E V 感染マウスでは、後肢がこわばり、後肢による立脚が低減される。しかし、ケージ内の自発歩行が重度に影響を受けることはない。後肢がこわばったマウスは、後肢で立脚するより歩く方が容易であり疾患が進行したマウスでもなお、夜間には極めて活動的でありうる。

10

【 0 1 7 9 】

各処置群は無作為に組み立て、処置前に活動ボックス内に 7 2 時間にわたり収容し、次いで、処置後各週につき 7 2 時間にわたり収容した。解析時間である 7 2 時間における午後 6 時 ~ 午前 6 時の 1 2 時間にわたり、水平方向および垂直方向の活動について、1 時間当たりの平均ビーム遮断回数を計算した。マウスが入眠するので、典型的には遮断が 6 0 0 回 / 時間未満となる、昼間における水平方向および垂直方向の活動に処置群間の差異は見られなかった。しかし、r H I g M 1 2 による処置群では、夜間における水平方向の自発活動のそれらの処置前のベースラインと比較した増大が記録された (3 ~ 7 週間にわたり : P < 0 . 0 1) (図 7) 。細胞に結合しない対照のヒト I g M は、活動を改善しなかった。

20

【 0 1 8 0 】

同様の研究において、血清由来の s H I g M 1 2 について見られる効果、および、今やまた、組換え抗体 r I g M 1 2 について見られる効果とも異なり、ヒト抗体 s H I g M 4 2 は、同じ条件下で、T M E V 感染マウスの夜間活動を変化させなかった。同じアッセイフォーマットにおける s H I g M 4 2 のための代替的な投与パラメータは、夜間活動に対して異なり、かつ、より肯定的な結果をもたらす。

30

【 0 1 8 1 】

機能の改善についての 1 つの可能な説明は、有効な I g M が、ウイルス負荷に干渉し、その結果として、疾患の軽減がもたらされるということである。しかし、これは、説明であるとは考えられない。慢性 T M E V 疾患を伴うマウスを、r H I g M 1 2 、 s H I g M 4 2 、または対照の I g M の単回投与で処置し、5 週間後に脳および脊髄を採取し、次いで、T M E V R N A ゲノムの転写物レベルを、ウイルスタンパク質 2 に対するプローブによる P C R を介して測定した。ウイルス転写物は、群間で異ならなかった (P < 0 . 0 1) (データは示さない) 。

【 0 1 8 2 】

(実施例 5)

脊髄疾患を伴うマウスの脳幹における N A A レベル : 脊髄全体における軸索保存の非侵襲的サロゲートマーカー

40

N A A とは、ニューロン機能と関連する代謝物質である (3 6 、 3 7) 。 N A A は、脳において 2 番目に豊富なアミノ酸であり、ほぼもっぱらニューロンに限定される。脳幹における N A A レベルの保存は、本発明者らのグループにより T M E V マウスモデルを用いて検証された脊髄軸索全体の健康の尺度である (8) 。脊髄下部の軸索が損傷すると、脳幹の細胞が死滅し、N A A が低減される。M R S を介して測定される N A A レベルは、主にニューロン密度を反映する。N A A は、他の神経細胞でも発現するが、N A A の主な発現は、ニューロンにおいてである。精製された C N S 細胞の M R S プロファイルを研究すると、N A A シグナルの振幅がニューロンにおいて優勢であるのに対し、希突起膠細胞ま

50

たは星状細胞の N A A シグナルの振幅は、ニューロンにおけるシグナルの、それぞれ、5 % および 10 % であることが示される (38)。

【 0183 】

s H I g M 1 2 および I g M 4 2 が軸索機能を保存することによりマウスの活動を改善する能力をさらに評価するため、本発明者らは、非侵襲的画像化アッセイおよび従来の形態解析を用いて脊髄軸索を評価した。逆行追跡を用いて、T M E V 媒介性疾患の脱髄後における脊髄軸索の機能不全を裏付けた (5)。胸部軸索 ~ 脳幹核における逆行標識の劇的な低減が測定された。脳幹とは、細胞体の多くが存在する場所であって、脊髄の全長に沿って長い軸索路を展出させる場所である。その後、既に報告されたプロトコル (8) を用いて、T M E V 感染マウスにおいて、磁気共鳴分光法 (M R S) を介して、脳幹における N - アセチルアスパラギン酸 (N A A) レベルを評価した (図 8)。

10

【 0184 】

本発明者らは、T M E V 誘導性疾患を伴うマウスにおいてある時間にわたる脳幹 N A A の低減を観察した (図 9)。N A A レベルは、感染後最初の 45 日間にわたり低下し、感染の 270 日後まで低レベルを保った。T M E V に感染した S J L マウスでは、脊髄脱髄の程度が感染の 90 日後までプラトー状態を保つ (39)。このモデルにおいて軸索喪失が組織学を介してされるのは、この時点においてである (2)。したがって、N A A は、軸索における機能不全の高感度の尺度である。

【 0185 】

最後の M R S 収集の後、軸索を、T 6 レベルにおける脊髄断面内の外見が正常な白質の 6 つの領域から体系的にサンプリングした。このレベルは、これにより脊髄全体においてランダムに分布する複数の脱髄病変に由来する軸索喪失が全体的に表される (39) ために選択した。本発明者らは、T M E V 感染の 270 日後の S J L マウスにおける軸索は、非感染対照と比較して 30 . 5 % 少ない ($p < 0 . 001$) ことを見出した。脳幹 N A A レベルと脊髄の T 6 レベルにおける軸索カウントとの間には、正の相関 ($r = 0 . 823$) が存在することが見出された (8)。

20

【 0186 】

ニューロン結合ヒト I g M の単回投与は脳幹における N A A レベルおよび脊髄における軸索を保存する：

ヒトニューロン結合 I g M が T M E V 感染マウスにおける N A A レベルまたは軸索カウントを変化させる能力を評価した。これにより、T M E V 感染マウスを、脊髄軸索の脱落の開始時 (感染の 90 日後) に、ニューロン結合 I g M である s H I g M 1 2 または s H I g M 4 2 100 μ g ずつの単回投与で処置したところ、10 週間後に測定したときの胸部脊髄の正常白質における有髄軸索密度が増大することが見出された。

30

【 0187 】

感染の 90 日後におけるマウス 10 ~ 15 匹の群を、s H I g M 1 2、s H I g M 4 2、対照のヒト I g M、または生理食塩液 100 μ g ずつの単回投与で処置した (図 10)。処置前ならびに処置の 5 および 10 週間後、各マウスを小型のボア磁石に入れ、脳幹における M R S を収集した。10 週間後、マウスを屠殺し、脊髄を回収し、プラスチック包埋し、T 6 レベルで切断した断面をパラフェニレンジアミン (p a r a p h e n y l a m i n d i a m i n e) で染色して、髄鞘を可視化し、400, 000 μ m の外見が正常な白質を包含する切片 1 つ当たり 6 枚の画像を収集し、軸索を自動式でカウントした。2 つのニューロン結合 I g M (s H I g M 1 2、s H I g M 4 2) のうちのいずれで処置した群においても、N A A レベルは、5 週間後および 10 週間後のいずれにおいても処置前のレベルと比較して増大した。対照の I g M で処置したマウスは低下傾向を示し、生理食塩液で処置したマウスは変化を示さなかった。

40

【 0188 】

s H I g M 1 2 および s H I g M 4 2 で処置した群の N A A レベルは、それぞれ、9 . 13 および 9 . 3 m M まで増大したが、これらの各々は、非感染マウスの 12 . 0 m M のレベルを大きく下回った。T 6 レベルにおける軸索を処置群間で比較した (表 2) と

50

、sHlgM12またはsHlgM42で処置したマウスは、生理食塩液で処置した群より多くの軸索を含有した(15, 198本の軸索と比較して、17, 303本および17, 771本の軸索: $P = 0.008$ および $P < 0.001$)が、非感染マウスにおいてカウントされた軸索数(21, 284本の軸索)より少なかった。

【0189】

TMEVモデルにより証拠立てられる通り、これらの結果は、sHlgM12抗体およびrHlgM12抗体の各々により、軸索の保存を介して機能が改善されることを示した。TMEVモデルでは、sHlgM42抗体により軸索が保存されたが、初期試験の夜間活動の評価では、裏付け可能な変化が観察されなかった。用量範囲探索研究の後、sHlgM42はまた、夜間活動試験における活動の増大も達成することが見出された。

10

【0190】

脳幹MRSを用いて、脊髄疾患のマウスモデルにおける軸索状態を評価することにより、本発明がさらに検証され、したがって、脳幹におけるNAAは、臨床試験でこれらのヒト抗体を用いるための優れた評価項目として用いられる。

【0191】

sHlgM42およびsHlgM12で処置してNAAレベルが改善されたマウスはまた、胸部中央の脊髄において含有する軸索も増大した。TMEV感染SJLマウス10~15匹の群を、感染の90日後に、rHlgM22、sHlgM42、sHlgM12、対照のsHlgM39、および生理食塩液100 μ gずつの単回投与で処置した。処置の10週間後、脊髄を摘出し、胸部中央の切片をPPDで染色してミエリンを可視化した。各マウスから、400, 000 μ m²の白質を包含する6つの領域をサンプリングし、有髄軸索数をカウントした(1)。T6断面1つ当たりの有髄軸索絶対数の平均 \pm SEMを表2に列挙する。

20

【0192】

【表2】

表2

ニューロン結合IgMによる処置は脊髄における軸索カウントを保存する

処置	T6レベルの軸索数の平均	比較
sHlgM42	17,771 \pm 436	$p < 0.001$
sHlgM12	17,303 \pm 505	$p = 0.008$
対照 IgM	15,508 \pm 627	
生理食塩液	15,198 \pm 484	$p = 0.701$
非感染マウス	21,284 \pm 829	

30

40

【0193】

(実施例6)

ニューロン結合IgMは再ミエリン化を促進することなしに軸索を保存する

希突起膠細胞に結合し、再ミエリン化を促進する複数のヒトIgM(例えば、sHlgM22およびsHlgM46)が同定されている(22, 40, 41)。下記で示される通り、ニューロン結合IgMは、ニューロン数を増大させ、ニューロン機能を改善するが、明白な再ミエリン化は伴わない。理論に束縛されずに述べると、作用機構は、軸索の直接的な活性化(保護、神経突起伸長)に起因し、かつ/または生得的免疫系または獲得的

50

免疫系を活性化させてニューロンを保護する因子を分泌させることを介すると理解される。上記で提示した結果は、抗体が軸索/ニューロンに対して直接的な効果を及ぼすことを明確に裏付ける。s H I g M 1 2 および s H I g M 4 2 を介する軸索保存および/または再成長が測定された同じ脊髄内では、脱髄、再ミエリン化、および炎症の全体が、処置群間で異ならなかった(図11)。

【0194】

これらの属性は、脊髄の全長に沿って試料を代表する10の脊髄断面の四半部を等級づけすることにより定量化した(6)。r H I g M 2 2 処置群(陽性対照)が、予測される再ミエリン化の増大を示したのに対し、s H I g M 1 2 および s H I g M 4 2 で処置したマウスは、脊髄の再ミエリン化をほとんど含有しなかった。したがって、T M E V モデルにおける神経欠損が、著明な再ミエリン化を要請することなしに改善され(例えば、I g M 1 2)、さらに、検討された時間枠内では、軸索の保存および/または再成長のために再ミエリン化が必要ではない。

10

【0195】

(実施例7)

r H I g M 1 2 (ヒトJ鎖を伴う)およびs H I g M 4 2 の血清半減期

ヒトI g M、r H I g M 1 2 (ヒトJ鎖を伴う)、およびs H I g M 4 2 の半減期を決定するために、200 μ l の生理食塩液中に100 μ g のヒトJ鎖を含有するr H I g M 1 2、または100 μ g のs H I g M 4 2 を、正常C D - 1 マウスの尾静脈へと注射した(図12)。規定された間隔(15分間、1、4、8、24、48時間)で、マウス3匹ずつの群から、心穿刺を介して血液を回収した。血清を回収し、サンドウィッチE L I S A を用いて、ヒトI g M ミュー鎖の存在についてアッセイした。

20

【0196】

r H I g M 1 2 では、15分後における初回の回収と8時間後における回収との間における半減期が、3.8時間であった。s H I g M 4 2 では、15分後における初回の回収と24時間後における回収との間における半減期が、20.5時間であった。これらの値は、マウスにおける半減期を15時間とし(29)、ウサギにおける半減期を90時間とする、再ミエリン化を促進するr H I g M 2 2 の半減期を一括する。半減期は、式： $k_{elim} = (\ln(c_{peak}) - \ln(c_{low})) / t_{interval}$ および $t_{1/2} = 0.693 / k_{elim}$ を用いて計算した。

30

【0197】

(実施例8)

放射性標識したヒトモノクローナルI g M は血液脳関門を越える

分子量が百万に近いI g M は、循環から血液脳関門(B B B)を越え、これにより、C N S に入るには大型に過ぎる可能性があることがしばしば受け入れられている(42、43)。しかし、一部のI g M はB B B を越えるという特定の証拠は存在する。

【0198】

正常S J L マウスおよびT M E V 感染S J L マウスの組織における³⁵S 標識したr H I g M 1 2 の分布を測定した(図13)。50 μ g のr H I g M 1 2 (1 × 10⁷ c p m) を腹腔内投与した。4または24時間後にマウスを生理食塩液で灌流し、組織を迅速に採取し、細断し、シンチレーション液中に溶解させた。非感染マウスの脳および脊髄は、いずれの時点においても放射性標識を含有した。T M E V 感染マウスのC N S は、4時間後の時点で非感染マウスの2倍の放射性標識を含有した。これは、24時間後までに4倍に増大した。

40

【0199】

また、r H I g M 1 2 (ヒトJ鎖を伴うr H I g M 1 2、およびヒトJ鎖を伴わないr H I g M 1 2 の両方)およびs H I g M 4 2 は、正常マウスおよびアルツハイマー病のモデルであるS A M P 8 マウスにおいてB B B を越えることも見出された。したがって、¹²⁵I 標識したヒトI g M を静脈内注射し、2時間後に脳を回収した。これらの抗体の各々は、正常マウスおよび疾患マウスの脳に蓄積される。これらの抗体はまた、I g M を

50

、脳内注射を介して送達した場合であれ、静脈内注射を介して送達した場合であれ、アルツハイマー病のマウスモデルにおける認知障害も可逆化する。

【0200】

(実施例9)

腹腔内送達されたヒトニューロン結合IgMは脱髄した脊髄病変に入り、ニューロフィラメント陽性の軸索に局在化する

同位体で標識した、再ミエリン化を促進するマウスIgMである、SCH94.03についてのHunterによる研究(44)は、オートラジオグラフィーを用いて、放射性標識が、*in vivo*においてTMEV感染マウスの脊髄、とりわけ、微細構造的に希突起膠細胞と同定された細胞に局在化することを裏付けた。³⁵ rHIgM12による同様のオートラジオグラフィー研究も実施されている。本発明者らは、従来免疫細胞化学を用いて、脊髄病変内のニューロン結合ヒトIgMを検出した(図14)。

10

【0201】

したがって、1.0mgのrHIgM12(ヒトJ鎖を伴う)、sHIgM42、または市販される対照のヒトIgM(Jackson Immuno Research)慢性脱髄を伴うTMEV感染マウスに腹腔内投与した。4時間後、マウスをパラホルムアルデヒドで灌流し、凍結させた脊髄を縦方向に切片化し、ヒトIgMミュー鎖の存在について免疫染色した。rHIgM12またはsHIgM42を施されたマウスでは、ヒトミュー鎖が、脱髄病変の軸索線維を示唆する並列経路に局在化した。対照のヒトIgMは、病変内にも、非病変脊髄にも見出されなかった。したがって、ニューロン結合ヒトIgMであるrHIgM12またはsHIgM42がTMEV感染マウスにおいてBBBを越えることが明らかとなった。

20

【0202】

次いで、隣接する脊髄切片を、抗ニューロフィラメント(NF)抗体(SMI-32およびSMI-34、Sternberger)の後、蛍光二次抗体である抗ヒトミュー鎖-FITC抗体および抗マウス-TRITC抗体で免疫標識した。共焦点顕微鏡法は、rHIgM12およびsHIgM42が、線維による経路の形で、および断続的に切断される軸索の神経線維束として、病変内のNF+軸索に共局在化することを裏付けた(図15)。

30

【0203】

(実施例10)

疾患の発症時に施された場合、rHIgM12またはsHIgM42はMOGペプチド誘導性EAEを増悪させない

自己反応性のCNS結合IgMを自己免疫が活性な動物に投与することにより、疾患を増悪させようという憂慮に対処するため、EAEを伴うマウスにおけるrHIgM12およびsHIgM42の効果を調べた。MOGペプチド(200 μ g)誘導性EAEを伴うC57BL/6マウス10匹の群に、rHIgM12、sHIgM42、対照のヒトIgM、または生理食塩液100 μ gずつの単回静脈内投与を施した。個々のマウスは、それらの臨床スコアが1に到達した(尾の引きずり)時点で処置した。次いで、マウスを、処置群に対して盲検として、1日おきに体重を記録し、臨床スコアを評価する試験実施者が、マウスが免疫化の28日後に到達するかまたは臨死状態となるまで追跡した。

40

【0204】

体重または平均の臨床スコアにおいて、処置群間の差異は見られなかった(図16:P=0.14)。加えて、各マウスの脊髄の全体を包含する10の脊髄断面を、脊髄の各四半部における髄膜炎および脱髄の存在について、盲検により評価した(6)。髄膜炎(P=0.825)または脱髄(P=0.766)を伴う四半部の百分率に、処置群間で差異は見られなかった(図17)。したがって、TMEVモデルにおいて軸索を保護するのに有効なニューロン結合ヒトIgMの単回投与は、EAEによる臨床的欠損を増悪させたり、欠損の進行を加速化させたり、脊髄病態を悪化させたりしないことが見出された。

【0205】

50

【数 1】

参考文献

1. Howe, C. L., J. D. Adelson, and M. Rodriguez. 2007. Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis* 25:354-359.
2. McGavern, D. B., P. D. Murray, C. Rivera-Quinones, J. D. Schmelzer, P. A. Low, and M. Rodriguez. 2000. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 123 Pt 3:519-531.
3. Jones, M. V., T. T. Nguyen, C. A. Deboy, J. W. Griffin, K. A. Whartenby, D. A. Kerr, and P. A. Calabresi. 2008. Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*.
4. Rodriguez, M., E. Oleszak, and J. Leibowitz. 1987. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol* 7:325-365. 10
5. Ure, D. R., and M. Rodriguez. 2002. Preservation of neurologic function during inflammatory demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 111:399-411.
6. Mitsunaga, Y., B. Ciric, V. Van Keulen, A. E. Warrington, M. Paz Soldan, A. J. Bieber, M. Rodriguez, and L. R. Pease. 2002. Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *Faseb J* 16:1325-1327.
7. Van Keulen, V. P., B. Ciric, S. Radhakrishnan, K. L. Heckman, Y. Mitsunaga, K. Iijima, H. Kita, M. Rodriguez, and L. R. Pease. 2006. Immunomodulation using the recombinant monoclonal human B7-DC cross-linking antibody rHIgM12. *Clin Exp Immunol* 143:314-321.
8. Denic, A., A. Bieber, A. Warrington, P. K. Mishra, S. Macura, and M. Rodriguez. 2009. Brainstem (1)H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Marker of demyelination and repair in spinal cord. *Annals of neurology* 66:559-564. 20
9. Duncan, I. D. 1996. Glial cell transplantation and remyelination of the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:87-100.
10. Fernandez, M., A. Giuliani, S. Pirondi, G. D'Intino, L. Giardino, L. Aloe, R. Levi-Montalcini, and L. Calza. 2004. Thyroid hormone administration enhances remyelination in chronic demyelinating inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16363-16368.
11. Craig, C. G., V. Tropepe, C. M. Morshead, B. A. Reynolds, S. Weiss, and D. van der Kooy. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
12. Rodriguez, M. 2007. Effectors of Demyelination and Remyelination in the CNS: Implications for Multiple Sclerosis. *Brain Pathol* 17:219-229.
13. Pitt, D., P. Werner, and C. S. Raine. 2000. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6:67-70.
14. Okuda, Y., S. Sakoda, H. Fujimura, and T. Yanagihara. 1997. Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 73:107-116. 30
15. Waxman, S. G. 2002. Sodium channels as molecular targets in multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev* 39:233-242.
16. Irvine, K. A., and W. F. Blakemore. 2008. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131:1464-1477.
17. Linker, R. A., M. Maurer, S. Gaupp, R. Martini, B. Holtmann, R. Giess, P. Rieckmann, H. Lassmann, K. V. Toyka, M. Sendtner, and R. Gold. 2002. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8:620-624.
18. Chang, A., W. W. Tourtellotte, R. Rudick, and B. D. Trapp. 2002. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:165-173.
19. McTigue, D. M., R. Tripathi, and P. Wei. 2006. NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:406-420. 40
20. Franklin, R. J., G. L. Hinks, R. H. Woodruff, and M. T. O'Leary. 2001. What roles do growth factors play in CNS remyelination? *Prog Brain Res* 132:185-193.
21. Rodriguez, M., A. E. Warrington, and L. R. Pease. 2009. Invited Article: Human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease. *Neurology* 72:1269-1276.

【 数 2 】

22. Warrington, A. E., K. Asakura, A. J. Bieber, B. Ciric, V. Van Keulen, S. V. Kaveri, R. A. Kyle, L. R. Pease, and M. Rodriguez. 2000. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6820-6825.
23. Warrington, A. E., A. J. Bieber, V. Van Keulen, B. Ciric, L. R. Pease, and M. Rodriguez. 2004. Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:461-473.
24. Radhakrishnan, S., L. T. Nguyen, B. Ciric, D. Flies, V. P. Van Keulen, K. Tamada, L. Chen, M. Rodriguez, and L. R. Pease. 2004. Immunotherapeutic potential of B7-DC (PD-L2) cross-linking antibody in conferring antitumor immunity. *Cancer Res* 64:4965-4972.
25. Cohen, I. R. 2007. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun* 29:246-249. 10
26. Cohen, I. R., and M. Schwartz. 1999. Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology* 100:111-114.
27. Lutz, H. U. 2007. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun* 29:287-294.
28. Bieber, A. J., A. Warrington, K. Asakura, B. Ciric, S. V. Kaveri, L. R. Pease, and M. Rodriguez. 2002. Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice. *Glia* 37:241-249.
29. Warrington, A. E., A. J. Bieber, B. Ciric, L. R. Pease, V. Van Keulen, and M. Rodriguez. 2007. A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J Neurosci Res* 85:967-976.
30. Pirko, I., B. Ciric, J. Gamez, A. J. Bieber, A. E. Warrington, A. J. Johnson, D. P. Hanson, L. R. Pease, S. I. Macura, and M. Rodriguez. 2004. A human antibody that promotes remyelination enters the CNS and decreases lesion load as detected by T2-weighted spinal cord MRI in a virus-induced murine model of MS. *FASEB J* 18:1577-1579. 20
31. Warrington, A. E., and S. E. Pfeiffer. 1992. Proliferation and differentiation of O4+ oligodendrocytes in postnatal rat cerebellum: analysis in unfixed tissue slices using anti-glycolipid antibodies. *J Neurosci Res* 33:338-353.
32. Ciric, B., V. Van Keulen, M. Paz Soldan, M. Rodriguez, and L. R. Pease. 2004. Antibody-mediated remyelination operates through mechanism independent of immunomodulation. *Journal of neuroimmunology* 146:153-161.
33. Howe, C. L., A. J. Bieber, A. E. Warrington, L. R. Pease, and M. Rodriguez. 2004. Antiapoptotic signaling by a remyelination-promoting human antimyelin antibody. *Neurobiol Dis* 15:120-131.
34. Rivera-Quinones, C., D. McGavern, J. D. Schmelzer, S. F. Hunter, P. A. Low, and M. Rodriguez. 1998. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 4:187-193. 30
35. McGavern, D. B., L. Zoecklein, K. M. Drescher, and M. Rodriguez. 1999. Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp Neurol* 158:171-181.
36. De Stefano, N., P. M. Matthews, L. Fu, S. Narayanan, J. Stanley, G. S. Francis, J. P. Antel, and D. L. Arnold. 1998. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121 (Pt 8):1469-1477.
37. Tourbah, A., C. Linnington, C. Bachelin, V. Avellana-Adalid, H. Wekerle, and A. Baron-Van Evercooren. 1997. Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats. *J Neurosci Res* 50:853-861.
38. Manganas, L. N., X. Zhang, Y. Li, R. D. Hazel, S. D. Smith, M. E. Wagshul, F. Henn, H. Benveniste, P. M. Djuric, G. Enikolopov, and M. Maletic-Savatic. 2007. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318:980-985. 40
39. McGavern, D. B., P. D. Murray, and M. Rodriguez. 1999. Quantitation of spinal cord demyelination, remyelination, atrophy, and axonal loss in a model of progressive neurologic injury. *J Neurosci Res* 58:492-504.
40. Asakura, K., D. J. Miller, L. R. Pease, and M. Rodriguez. 1998. Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J Neurosci* 18:7700-7708.
41. Asakura, K., D. J. Miller, K. Murray, R. Bansal, S. E. Pfeiffer, and M. Rodriguez. 1996. Monoclonal autoantibody SCH94.03, which promotes central nervous system remyelination, recognizes an antigen on the surface of oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 43:273-281.

【 数 3 】

42. Kozlowski, G. P., I. Sterzl, and G. Nilaver. 1992. Localization patterns for immunoglobulins and albumins in the brain suggest diverse mechanisms for their transport across the blood-brain barrier (BBB). *Prog Brain Res* 91:149-154.
43. Banks, W. A. 2008. Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 9 Suppl 3:S2.
44. Hunter, S. F., D. J. Miller, and M. Rodriguez. 1997. Monoclonal remyelination-promoting natural autoantibody SCH 94.03: pharmacokinetics and in vivo targets within demyelinated spinal cord in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 150:103-113.
45. Banks, W. A., S. A. Farr, J. E. Morley, K. M. Wolf, V. Geylis, and M. Steinitz. 2007. Anti-amyloid beta protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment. *Exp Neurol* 206:248-256. 10
46. Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandever, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, and P. Seubert. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.
47. Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk, and T. Yednock. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6:916-919.
48. Mikami, Y., M. Toda, M. Watanabe, M. Nakamura, Y. Toyama, and Y. Kawakami. 2002. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note. *J Neurosurg* 97:142-147. 20
49. Mikami, Y., H. Okano, M. Sakaguchi, M. Nakamura, T. Shimazaki, H. J. Okano, Y. Kawakami, Y. Toyama, and M. Toda. 2004. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J Neurosci Res* 76:453-465.
50. Gilgun-Sherki, Y., H. Panet, V. Holdengreber, R. Mosberg-Galili, and D. Offen. 2003. Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Res* 47:201-207.
51. Genain, C. P., B. Cannella, S. L. Hauser, and C. S. Raine. 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5:170-175.
52. Genain, C. P., M. H. Nguyen, N. L. Letvin, R. Pearl, R. L. Davis, M. Adelman, M. B. Lees, C. Lington, and S. L. Hauser. 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96:2966-2974. 30
53. Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima, and B. G. Weinshenker. 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364:2106-2112.
54. Rodriguez, M., W. E. Karnes, J. D. Bartleson, and A. A. Pineda. 1993. Plasmapheresis in acute episodes of fulminant CNS inflammatory demyelination. *Neurology* 43:1100-1104.
55. Herrero-Herranz, E., L. A. Pardo, R. Gold, and R. A. Linker. 2008. Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 30:162-173.
56. Yednock, T. A., C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, and N. Karin. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356:63-66.
57. Kanwar, J. R., J. E. Harrison, D. Wang, E. Leung, W. Mueller, N. Wagner, and G. W. Krissansen. 2000. Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology* 103:146-152. 40
58. Warrington, A. E., and M. Rodriguez. 2008. Remyelination-promoting human IgMs: developing a therapeutic reagent for demyelinating disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 318:213-239.
59. Jaffe, J. D., H. Keshishian, B. Chang, T. A. Addona, M. A. Gillette, and S. A. Carr. 2008. Accurate inclusion mass screening: a bridge from unbiased discovery to targeted assay development for biomarker verification. *Mol Cell Proteomics* 7:1952-1962.

【数4】

60. Keshishian, H., T. Addona, M. Burgess, E. Kuhn, and S. A. Carr. 2007. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* 6:2212-2229.

【0209】

(実施例11)

ヒトIgM抗体であるrHIgM12は軸索の形成を促進し、微小管を標的とする脂質ラフトと相互作用する

抗体sHIgM12は、初代培養小脳顆粒ニューロンにおける神経突起成長を促進した。本例では、初代海馬ニューロンを用いて、完全ヒト抗体(ヒトJ鎖を有するrHIgM12)が、軸索の形成を促進することを見出した。rHIgM12は、ニューロン膜に結合し、コレステロールおよびガングリオシドであるGM1のクラスター形成を誘導する。 10

【0210】

さらに、膜結合rHIgM12は、2つのプールで分布し、1つのプールは脂質ラフトドメインと会合し、他のプールは、細胞骨格に富む洗浄剤に不溶性のペレットと会合する。洗浄剤による抽出の後、rHIgM12は、微小管には共局在化するが、線維状アクチンには共局在化せずに凝集する。共免疫沈降研究は、rHIgM12と3-チューブリンとが複合して存在することを裏付けた。これらの結果は、rHIgM12が、微小管細胞骨格にシグナル伝達する膜ドメインをクラスター形成させることにより軸索の形成を規定することを示す。 20

【0211】

ニューロンは、神経突起成長の制御を介して軸索を発生させる(BarnesおよびPollaux、2009年)。線維状アクチン(F-アクチン)および微小管を包含するニューロンの細胞骨格は、神経突起成長および成長円錐の経路探索において極めて重要な役割を果たす。

【0212】

血清由来抗体は、大スケールの研究に適切でない場合があり、特に、大量に生成させることができず、抗体をもたらす患者から使用のたびごとに単離しなければならない場合は、同等の活性および能力を示す組換え形態の生成が有利である。本研究は、組換えの完全ヒトIgM12抗体(rHIgM12)が、軸索形成を促進し、したがって、培養された海馬ニューロンにおけるニューロンの極性を駆動することを裏付けた。rHIgM12は、コレステロールおよびガングリオシドであるGM1を含有するニューロン膜ドメインをクラスター形成させる。 30

【0213】

スクロース密度勾配の画分化は、ニューロン膜結合rHIgM12が、カベオリン-1を含有する、洗浄剤耐性の軽い画分と会合する1つのプールと、細胞骨格に富むペレットを伴う他のプールとの2つのプールへと分別されることを示した。洗浄剤による生存ニューロンの抽出は、rHIgM12が、微小管と会合することを裏付けた。rHIgM12はまた、3-チューブリンとも共免疫沈降した。まとめると、rHIgM12は、微小管と会合する膜ドメインに結合することが理解される。表面における基質として存在する場合、rHIgM12は、ニューロン膜における微小管のアンカリングを促進し、これにより、神経突起成長および軸索形成が促される。 40

【0214】

組換えヒトIgM12(rHIgM12): rHIgM12は、CHO細胞(Gibco BRL、型番:11619)において発現させた。ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症患者12例の血清において発現した主要な抗体の重鎖および軽鎖のコード配列を発現させるプラスミドを、ヒトJ鎖トランス遺伝子と共に、CHO-S細胞へとトランスフェクトした。結果として得られるCHO細胞を、メトトレキサートの用量を増大させて選択し、ELISAを介して測定される抗体を生成させる安定的なクローンを、サブク 50

ローニングし、増殖させた。培養物上清に由来する r H I g M 1 2 抗体を、クロマトグラフィを介して、H P L C 解析を介して測定される通りに 9 7 % まで精製した。

【 0 2 1 5 】

細胞の培養および神経突起成長アッセイ：F V B マウスから初代海馬ニューロンを調製した。胎生期 1 5 日目の海馬ニューロンをトリプシン - E D T A 中で解離させ、ガラス製のカバースリップに結合させたニトロセルロース膜の薄層にコーティングしたポリ - D - リシン (P D L) 基質、ラミニンを伴う P D L 基質、または r H I g M 1 2 基質上に播種し、2 % (v / v) の B 2 7 を含有する N e u r o b a s a l 培地中で増殖させた。ニューロンを播種した 1 2 時間後、神経突起成長をアッセイした。ニューロンを 4 % のパラホルムアルデヒドで固定し、抗 3 - チューブリン抗体で染色した。線維状アクチン (F - アクチン) は T e x a s - R e d フアロイジンで標識し、核は D A P I で標識した。N e u r o n J ソフトウェアを用いて神経突起長を測定し、E x c e l (M i c r o s o f t) で処理し、P r i s m (G r a p h P a d) で統計学的に解析した。ステージ 3 のニューロンとは、T a u 1 染色を介して軸索として決定される最も長い神経突起 (D o t t i ら、1 9 8 8 年) が、2 番目に長い神経突起の長さの少なくとも 2 倍である、複数の神経突起を伴うニューロンとして定義した。T a u 1 は、軸索の遠位部分において非対称的に濃縮された。これに対し、ステージ 2 のニューロンは、複数の対称的な神経突起を有した。

10

【 0 2 1 6 】

初代培養ニューロンの免疫染色、免疫沈降、およびスクロースの密度勾配による画分化：i n v i t r o において 1 ~ 3 日間 (D I V) にわたり培養した海馬ニューロンを、4 % のパラホルムアルデヒドで固定して、0 . 2 % の T r i t o n X - 1 0 0 で透過処理した後に免疫染色した。O l y m p u s 製の正立顕微鏡を用いて画像を収集し、P h o t o s h o p (A d o b e) を用いて処理した。r H I g M 1 2 の分布は、不連続的なスクロース勾配中の超遠心分離を介して決定した。略述すると、r H I g M 1 2 を、D I V 7 の生存皮質ニューロンに 4 で 3 0 分間にわたり結合させ、次いで、氷冷溶解緩衝液 (5 0 m M の T r i s . H C l 、p H 7 . 4 、1 5 0 m M の N a C l 、1 m M の E D T A 、1 % の T r i t o n X - 1 0 0 、およびプロテアーゼ阻害剤によるカクテル) 中で 3 0 分間にわたり溶解させた。ニューロン溶解物を、等容量の 1 0 0 % (w / v) スクロースと混合した。混合物を遠心分離管に移し、3 5 % のスクロース 8 m l と 5 % のスクロース 3 . 5 m l とを随時重ね合わせた。4 、6 画分 (各画分 2 m l ずつ) 、 $2 \times 1 0 ^ 5$ g で 2 0 時間にわたり遠心分離した後、勾配の最上画分から回収した。各画分およびペレットを、S D S - 試料緩衝液中で溶解させ、ウェスタンブロット法にかけた。

20

30

【 0 2 1 7 】

r H I g M 1 2 を細胞骨格タンパク質と共免疫沈降させるため、D I V 7 の生存皮質ニューロンを、4 で 3 0 分間にわたり r H I g M 1 2 により処置し、0 . 5 % の N P - 4 0 を含有する緩衝液中で溶解させた。r H I g M 1 2 は、プロテイン L - アガロースビーズにより捕捉し、3 - チューブリンは、プロテイン G - 樹脂 (T h e r m o) により捕捉した。二重標識するために、生存ニューロンを固定した後、氷上で r H I g M 1 2 により染色し、0 . 2 % の T r i t o n X - 1 0 0 で透過処理した。生存ニューロンの抽出および固定は、6 0 m M の P i p e s 、2 5 m M の H e p e s 、5 m M の E G T A 、1 m M の M g C l ₂ 、4 % のパラホルムアルデヒド、および 0 . 1 % の T r i t o n X - 1 0 0 を含有する緩衝液中で実施した。

40

【 0 2 1 8 】

この例における抗体および他の試薬：抗 3 - チューブリン抗体 (P r o m e g a) ; 抗アクチン、E D T A 、ポリ - D - リシン、メチル - シクロデキストリン、およびフィリピン (S i g m a) ; 抗 T a u 1 抗体、抗カベオリン - 1 抗体、および抗トランスフェリン受容体抗体 (M i l l i p o r e) ; T e x a s R e d - フアロイジン、コレラ毒素 B 、N e u r o b a s a l 培地、および B 2 7 (I n v i t r o g e n) ; プロテアーゼ阻害剤錠 (R o c h e) 。

50

【0219】

組換えヒトIgMであるrHIgM12は軸索形成を促進した：

IgMのニューロンの分化および根底的な分子機構に対する効果をさらに理解するために、組換えrHIgM12を用いて、培養された海馬ニューロンによる神経突起成長アッセイを実施した。海馬ニューロンは、3つの分化段階を経て軸索を形成する(Dottira, 1988年)。複数の過程が細胞体から始まる。急速に成長しつつある神経突起は、その後、そのうちの一方が軸索へと分化し、他方が樹状突起へと分化し、これは、それぞれ、Tau1およびMAP2の示差的分布を介して同定することができる(Lewisら, 1989年；(KanaiおよびHirokawa, 1995年)。本発明者らは、基質として存在する場合のrHIgM12が、ニューロンの分化を実質的に促進することを見出した。播種後12時間以内に、rHIgM12上で成長しつつある海馬ニューロンが複数の神経突起を発生させ、それらのうちの1つは、近傍の神経突起と比較してはるかに長かった。これに対し、ポリ-D-リシン(PDL)上に播種されたニューロンは、複数の対称的な神経突起を示した(図18A、B)。

10

【0220】

神経突起長を測定した後、本発明者らは、rHIgM12上に播種されたニューロン(n=86)の全神経突起長が、PDL上に播種されたニューロン(n=74)と比較して有意に長い(195.8μm対150.7μm：p=0.0056)ことを見出した(図18C)。最も長い神経突起長は2倍を超えた(117.1μm対51.8μm：p<0.0001)(図18D)が、2番目に長い神経突起長には有意な差異が見出されなかった(38.7μm対33.3μm：p=0.0782)(図18E)。rHIgM12上で成長しつつあるニューロンが保有する初代神経突起は少数であり(2.9対4.1：p<0.0001)(図18F)、それらの大半の表現型は、ステージ3のニューロンであった(rHIgM12上の72%対PDL上の18%)(図18G)。これらの結果は、基質として存在する場合のrHIgM12が、ニューロンの分化を促進することを示した。

20

【0221】

ニューロン分化に特徴的な特徴は、極性化された軸索成長および樹状突起からの分離である。本発明者らは、rHIgM12が1つの有意に長い神経突起を伴う神経突起伸長を促進することを観察した。ステージ3のニューロンに由来するこれらの最も長い神経突起が、軸索へと発生することをさらに検証するため、異なる基質上に播種された海馬ニューロンを、抗Tau1抗体および抗MAP2抗体で染色した(図19)。Tau1染色は、PDL上で成長したニューロンにおいては弱かった(図19A、D)が、PDL-ラミニン(図19B、E)またはrHIgM12(図19C、F)上に播種されたニューロンにおいてははるかに強かった。ラミニンは、ニューロン分化および軸索形成についての古典的な基質であり(Chenら、2009年)、陽性対照として用いた。

30

【0222】

PDL上で成長したニューロンによるTau1強度(図19D)を比較すると、PDL-ラミニン(図19E)またはrHIgM12(図19F)上に播種されたニューロンにおけるTau1の分布は、最も長い神経突起の遠位部分において非対称的に濃縮され、はるかに大きかった。これに対し、MAP2は、全ての神経突起の近位部を染色した(図19A2~C2)。この結果は、rHIgM12上およびラミニン上の両方で成長したステージ3のニューロンに由来する最も長い神経突起が軸索であることを示した。これらの研究は、rHIgM12が複数のニューロン型に由来する神経突起成長を支持し、rHIgM12が軸索形成を駆動することを裏付ける。

40

【0223】

rHIgM12はニューロン膜のマイクロドメインのクラスター形成を誘導した

基質としてのrHIgM12上で成長しつつある海馬ニューロンは、分化の増強を示した(図18および19)。しかし、本発明者らは、rHIgM12を培養液に適用しても、rHIgM12が神経突起成長を誘導することを観察しなかった(データは示さない)

50

。この観察は、rHIGM12は、その機能を果たすために、細胞外マトリックス分子として提示するように要請されることを示唆する。rHIGM12-ニューロン膜間相互作用をさらに理解するために、生存ニューロンを、まず、rHIGM12で処置し、次いで、固定し、それぞれ、コレステロールまたはガングリオシドであるGM1に結合する、フィリピンまたはコレラ毒素B(CTB)で二重染色した(ShogomoriおよびFuterman、2001年)。rHIGM12、CTB、およびフィリピンは、非処置の対照ニューロンの細胞表面を均等に標識した(図20A)。これに対し、37のrHIGM12による処置は、30分後にニューロン膜の再組織化を誘導した(図20B、C)。第1に、rHIGM12は、非処置のニューロン(図20A)、またはニューロン膜に結合しない対照のIGM抗体で処置したニューロン(データは示さない)では観察されない、膜における「パッチ」様構造(図20B1、C1)へと凝集した。第2に、クラスター形成したコレステロール(図20B2)およびGM1(図20C2)のいずれもが、細胞体、神経突起軸、および成長円錐のニューロン膜において形成された。第3に、凝集したrHIGM12は、とりわけ、成長円錐の中央ドメイン(図20B~C、高拡大率)ではクラスター形成したが、成長円錐の末梢ではクラスター形成しなかった、コレステロール(図20B3)またはGM1(図20C3)と共局在化した。これらの結果は、液浴で適用したrHIGM12が、神経突起/軸索伸長は支持しないが、ニューロン膜の再構成を誘導することを示した。基質として提示された場合のrHIGM12は、膜分子を、rHIGM12-ニューロン膜間接触部位へと動員する結果として、方向付けのシグナル伝達を生成させうる可能性がある。

10

20

【0224】

脂質ラフトに結合するrHIGM12

低温状態における非イオン性洗浄剤による抽出に基づく生化学的研究を用いてコレステロールおよび糖スフィンゴ脂質を含有する脂質ラフトの存在が裏付けられている(ChichiliおよびRodgers、2009年)。しかし、ナノスケールのサイズは光学顕微鏡の解像度を超えるため、脂質ラフト内の形態的情報は限定されたものである(LingwoodおよびSimons、2010年)。rHIGM12が膜のクラスター形成を誘導し、コレステロール含有膜ドメインおよびGM1含有膜ドメインと共局在化する(図20)ことの観察により、rHIGM12が脂質ラフトドメインと会合する可能性が立ち上がった。

30

【0225】

ニューロン膜は融点(T_m)が高いコレステロールおよび糖スフィンゴ脂質に富む(Samsonovら、2001年)ので、 T_m を下回る膜温度の低下は、37ではより動的な脂質ラフトおよびその関連分子の可視化を促進しうる。この仮説を検証するために、生存ニューロンを4まで冷却した後、rHIGM12で染色した。rHIGM12が均等に結合した、ニューロンを37で固定する場合(図21A)と異なり、4では、rHIGM12により、はるかに大型の点状構造が標識される。加えて、ニューロンの成長円錐も収縮した(図21B)。

【0226】

本発明者らは、脂質ラフトがコレステロール依存性の膜ドメインであり、コレステロールの枯渇によりそれらの構造が破壊されるという事実を利用した(ChichiliおよびRodgers、2009年)。培養された海馬ニューロンを、まず、メチル- β -シクロデキストリン(M β CD)で処置してコレステロールを枯渇させ、次いで、4まで冷却するのに続いて、固定した後、rHIGM12およびCTBで染色した(Koら、2005年)。コレステロールを枯渇させ、CTB標識したGM1と共局在化させた後、rHIGM12は、ニューロン膜における点状構造に結合した(図21C)。GM1は脂質ラフトマイクロドメイン内に常在し、rHIGM12により、GM1のクラスター形成が誘導される(図20)ため、本発明者らは、rHIGM12が、ニューロン膜のコレステロールからは独立するGM1含有マイクロドメインに結合することを結論付けた。これらの実験により、脂質ラフトが、膜内に均等に挿入される、異なる形態的構造として存在す

40

50

る(図20Aおよび図21A)か、または凝集して大型のドメインを形成する(図20BおよびC、図21BおよびC)ことが確認された。これらの結果は、rHlgM12が、他の分子との生物物理的相互作用に応じて、ラフトドメインと非ラフトドメインとの間を往復する分子(複数可)に結合することを示す。

【0227】

本発明者らはさらに、rHlgM12が脂質ラフトに結合するという仮説も調べた。脂質ラフトは、低温において、非イオン性洗浄剤耐性膜(DRM)内に局在化する(Samsonovら、2001年)ため、4で調製した皮質ニューロン溶解物におけるrHlgM12の局在化を解析した。ニューロン溶解物を、抗ヒトIgM二次抗体でプロットしたところ、膜結合rHlgM12が、ペレットおよび上清のいずれにおいても見出されるのに対し、ニューロンに結合しない対照のIgM抗体は、洗浄溶出物だけに見出される(図22A)ことが明らかとなった。これらの観察は、rHlgM12が、一方は上清中の「洗浄剤可溶性」画分に局在化し、他方は「洗浄剤不溶性」ペレットと会合する、2つのプールへと分別されることを示した。

10

【0228】

第2の実験では、皮質ニューロンを、まず、rHlgM12で標識し、次いで、4のスクロース密度勾配を介して画分化した。異なる画分のプロットは、rHlgM12が、脂質ラフトのマーカであるカベオリン-1もまた含有する軽い画分に局在化するが、トランスフェリン受容体に富む非ラフト画分には局在化しないことを示した(図22B)。しかし、この厳密な画分化工程(1%のTriton X-100および2x105gにおける超遠心分離)においてもなお、一部のrHlgM12は、主に洗浄剤不溶性細胞骨格を含有するペレット中に検出された(図22B)。主に洗浄剤不溶性細胞骨格を含有するチューブリン(Soriceら、2009年)およびアクチン(LevitaniおよびGooch、2007年)のいずれもが存在するが、ラフト中では3-チューブリンだけが検出され、アクチンの大半は、非ラフト画分へと移行した(図22B)。これらのデータは、一方は脂質ラフト中に存在し、他方はペレット中に存在する、膜結合rHlgM12の2つのプールの存在を示した。

20

【0229】

rHlgM12は微小管と会合する

本発明者らのデータは、凝集したrHlgM12が、微小管が優越する細胞体、神経突起軸、および成長円錐の中央ドメインなどの領域(図20)に局在化することを示した(ForscherおよびSmith、1988年)。膜結合rHlgM12が、これらのいずれもが3-チューブリンを含有する脂質ラフト画分およびペレット画分へと分別されたという事実(図22B)と併せて述べると、これらの知見は、rHlgM12が、細胞骨格の構成要素(複数可)と会合しうることを示唆する。この仮説を検証するために、海馬ニューロンを、rHlgM12で処置して、膜の再構成を誘導し、次いで、37で0.1%のTriton X-100を含有する4%のパラホルムアルデヒドにより同時に固定および抽出した。抽出後、rHlgM12で標識した洗浄剤不溶性膜の点が、神経突起軸に束ねられた微小管束に沿って並んだ(図23A2)。成長円錐では、rHlgM12が、脱束生微小管により占められる中央ドメインに主に局在化した。F-アクチンに富む成長円錐末梢には局在化しなかった(図23A3およびA4)。これらの結果は、rHlgM12が微小管と会合しうることを示した。

30

40

【0230】

本発明者らは、rHlgM12が、GM1と共同在化することを見出した(図21C)。GM1は、小脳顆粒ニューロンの膜におけるチューブリンによりアンカリングされ、架橋形成後に抗チューブリン抗体によりプルダウンされることが示された(Palestiniら、2000年)。したがって、rHlgM12が、チューブリンを含有する膜のマイクロドメインと会合することが可能である。この仮説をさらに検証するため、4でrHlgM12により処置した生存皮質ニューロンに由来する細胞溶解物により、改変プルダウン実験を実施した。本発明者らは、rHlgM12および3-チューブリンの両方

50

が、互いに共免疫沈降する(図23B)ことから、rHlgM12と3-チューブリンとが、複合体として存在すると示唆されることを見出した。IgM分子は五量体構造を有し、分子量を約900kDaとする。rHlgM12が、ニューロン溶解物中でチューブリンまたは微小管と直接会合する可能性を除外するため、rHlgM12に結合するが、3-チューブリンを発現するN2A神経芽細胞腫細胞によりプルダウンアッセイを実施した(図25A)。rHlgM12は、3-チューブリンと会合することも、ペレット中に存在することもなかった。rHlgM12は、N2A神経芽細胞腫細胞溶解物の上清だけで検出された(図25B)。まとめると、これらの結果により、脂質ラフトが、rHlgM12と、その抗原と、微小管との会合を媒介することが確認された。

【0231】

本明細書のデータは、基質として存在する場合の完全ヒト組換えIgMであるrHlgM12が、初代培養海馬ニューロンにおける軸索成長を促進することにより、ニューロンの極性を駆動することを裏付けた(図18および19)。rHlgM12は、ニューロン表面に凝集し、コレステロールおよびガングリオシドであるGM1のクラスター形成を誘導した(図20)。rHlgM12は、GM1と共局在化する(図21)。スクロース勾配によるニューロン溶解物の画分化は、膜結合rHlgM12が、一方は脂質ラフトと会合し、他方はペレットと会合する2つのプールへと分別されることを示した(図22)。生存ニューロンを非イオン性洗浄剤で抽出することにより、本発明者らはさらに、膜結合rHlgM12が、微小管と共局在化し、3-チューブリンと共免疫沈降することを示した(図23)。

【0232】

前出は、rHlgM12が、脂質ラフトマイクロドメインに結合し、これらと相互作用することを示し、さらに、rHlgM12会合ラフトドメインが、微小管へのシグナル伝達を担うことも示す。結果として、rHlgM12は、軸索成長を駆動する微小管の安定化を媒介する。

【0233】

この例は、rHlgM12が、初代海馬ニューロンの軸索成長を選択的に促進することを裏付けた(図18および19)。

【0234】

近年、本発明者らは、ヒト血清IgMであるsHlgM12が、広範な軸索変性および軸索喪失を発症する多発性硬化症の動物モデルの神経機能を改善したことを示した(Rodriguezら、2009年)。これらの研究は、HlgM12が、軸索成長を促進することによりその機能を果たすという概念を裏付ける。

【0235】

ニューロンは、神経突起伸長を制御する制御された内因性のプログラムを介して軸索を特化させる。発生しつつあるニューロンは、複数の神経突起を誘発する。神経突起のうちの一方は軸索へと分化し、他方は樹状突起へと分化する。近傍の神経突起は、互いに競合し合う。また、伸長速度も最も速い神経突起である、最も長い神経突起が、まず対称的な神経突起伸長を遮断して軸索へと発生するのに対し、他の神経突起は伸長がはるかに遅く、後に樹状突起へと発生する(Dottira、1988年; GoslinおよびBanker、1989年)。F-アクチンと微小管とは、神経突起伸長および軸索形成に関与する2つの主要な細胞骨格である。軸索の特化についての本発明者らの理解も、伸展しつつある。主に成長円錐の末梢に局在化するF-アクチンが主要な役割を果たすと考えられていた。神経突起軸において優越し、成長円錐の中央ドメインに局限される微小管は、F-アクチンに対して二次的であると考えられていた。近年、微小管はまた、軸索成長において極めて重要な役割も果たすことを見出された。微小管は、成長円錐のアクチンメッシュワークを動的に探索することが可能である。微小管の安定化は、軸索形成を誘導するのに十分である(WittteおよびBradke、2008年)。

【0236】

本発明者らのrHlgM12と3-チューブリンとが共免疫沈降したという結果、r

10

20

30

40

50

H I g M 1 2 が微小管と共同在化したという結果、および r H I g M 1 2 が洗浄剤による抽出後にペレット中に存在したという結果は、微小管を、中心的な役割を果たすものとして裏付けるだけではない。加えて、このデータは、当技術分野において、微小管がニューロン膜と直接相互作用することの最初の証拠ももたらした。これらの知見は、r H I g M 1 2 が、細胞外シグナルを微小管へと伝達する膜貫通カスケードと相互作用するかまたはこれに結合するという概念を裏付ける。微小管が、例えば、成長円錐において、増進および退縮する動的特性により、それらがニューロン膜の運動を駆動することが可能となる (D e n t および K a l i l、2001年)。安定化した微小管は、ニューロン膜にアンカリングする。動的微小管および安定化した微小管の存在、ならびに / またはこれらの2つの状態の間の移行により、神経突起成長が軸索を特化させる過程が組織化される。したがって、I g M 1 2 は、微小管の安定性をもたらすことにより、軸索の伸長を増強する。

10

【0237】

脂質およびタンパク質は、持続的に細胞膜へと組み込まれ、次いで、マイクロドメイン、いわゆる脂質ラフトへと分割される。膜ラフトは一般に、ステロールおよびスフィンゴ脂質で濃縮された、ナノスケール (10 ~ 200 nm の) であり、異質で、動的な膜コンパートメントとして定義される (L i n g w o o d および S i m o n s)。

【0238】

本発明者らは、r H I g M 1 2 が、脂質ラフトに結合することを提起する。第一に、本発明者らは、r H I g M 1 2 が、ニューロン膜に凝集し、コレステロールまたはガングリオシドである G M 1 のクラスター形成を誘導することを観察した (図 20)。これらの結果は、r H I g M 1 2 が、コレステロールおよび G M 1 を含有する脂質ラフトドメインに結合することを示す。低分子であるラフトは、脂質および / またはタンパク質と相互作用しうる。個別の微量のラフトは、シグナルを統合し、シグナル伝達経路の強度および振幅を制御する、高分子のプラットフォームを安定化させ、これらに融合することが可能である。五量体構造を保有する I g M 抗体は、隣接する抗原 (受容体) に架橋形成し、かつ / または抗原を架橋形成または相互作用を増強するのに十分な程度に近接させることにより、シグナルを増幅しうる。したがって、架橋された抗原および会合したシグナル伝達分子は、クラスター形成しうる。第二に、本発明者らは、海馬ニューロンを 4 まで冷却したところ、r H I g M 1 2 が、ニューロン膜上のはるかに大型の斑点に結合することを示した (図 21)。コレステロールおよびスフィンゴ脂質は、融点が高い (T_m)。T_m を下回る温度においてニューロンを処置すると膜の動態が減殺され、これにより、凝集した脂質ラフトの可視化が促進される。r H I g M 1 2 が、コレステロールを枯渇させた後においてもなお G M 1 と共同在化するという知見 (図 21) と併せると、これらの結果は、r H I g M 1 2 が、G M 1 と共同在化するニューロン膜の分子に結合し、これらと相互作用することを示唆する。培養されたラット小脳顆粒ニューロンをシアリダーゼ処置すると s H I g M 1 2 の結合が消失するという本発明者らによる以前の知見は、s H I g M 1 2 が結合したエピトープが炭水化物であることを示唆するが、正確な識別は明らかでない (W a r r i n g t o n ら、2004年)。第三に、ニューロン溶解物をスクロースにより画分化した後、膜結合 r H I g M 1 2 は、脂質ラフトマーカであるカベオリン - 1 もまた含有する軽い画分へと局在化した。まとめると、本発明者らの結果は、r H I g M 1 2 が脂質ラフトに結合するという仮説を裏付ける。

20

30

40

【0239】

ニューロン膜の外葉から細胞内の細胞骨格へのシグナルカスケードは、軸索の特化によって中心的である。r H I g M 1 2 の凝集物は、微小管が優越し、線維状アクチンは優越しない (図 23)、神経突起軸および成長円錐の中央ドメインへと分配された (図 20)。r H I g M 1 2 の凝集物の一部は、洗浄剤不溶性であり、洗浄剤による抽出の後、束生微小管の束に局在化した (図 23A)。これらの観察は、脂質ラフトと会合するプールとは異なりうる、r H I g M 1 2 結合分子の別のプールの存在を示す。スクロース画分化研究により、洗浄剤不溶性ペレット中に局在化する r H I g M 1 2 会合分子のプールが存在し (図 22B)、これは、図 23A で検出された微小管と共に局在化するプールでありう

50

ることがさらに確認された。

【0240】

これらの結果は、rHlgM12のうちの一部が、細胞骨格成分（複数可）、おそらくは微小管と会合することを裏付けた。上清中の「洗浄剤可溶性」分子と会合する（図22Aおよび図23B）rHlgM12が、 α 3-チューブリンとも共免疫沈降した（図23B）という知見は、rHlgM12結合分子（複数可）と、 α 3-チューブリンとが、脂質ラフト中に複合体として存在しうることを示す。しかし、rHlgM12が結合しないN2A神経芽細胞腫細胞において、rHlgM12は、 α 3-チューブリンをプルダウンしなかった（図25）ため、rHlgM12が、 α 3-チューブリンと直接相互作用することは可能ではない。したがって、細胞骨格および脂質ラフトの両方に会合するrHlgM12は、チューブリンの近傍に局在化する分子に結合する。この概念は、rHlgM12が、GM1と共局在化するという観察（図21C）、およびGM1が架橋形成反応後において抗チューブリン抗体によりプルダウンされたという観察によりさらに強化された（Palestiniら、2000年）。

10

【0241】

脂質ラフトドメイン内のrHlgM12結合分子は、神経突起成長過程および軸索伸長過程の間常に細胞骨格へと組み込まれうる。この仮説は、rHlgM12が、成長円錐領域では中央ドメインに凝集し（図3および6A）、 α 37で洗浄剤不溶性であった（図23A）という知見により裏付けられる。まとめると、HlgM12は、HlgM12から微小管へのシグナル伝達を媒介する脂質ラフトに結合し、この動態に影響を及ぼすことが開示される。

20

【0242】

F-アクチンがrHlgM12誘導性シグナル伝達に関与するかどうかは明らかでない。アクチンおよびアクチン結合タンパク質の両方が、脂質ラフトと会合することを示す筋の証拠は多い（LevitánおよびGooch、2007年）。アクチン線維と微小管とは、ニューロンもまた包含する協調的な細胞運動において活発に相互作用する（Rodríguezら、2003年）。したがって、アクチンはまた、rHlgM12誘導性シグナル伝達において役割を果たすことも可能である。 α 3-チューブリンと共に、少量のアクチンが、rHlgM12によりプルダウンされた（図26B）。したがって、rHlgM12は、アクチンおよび α 3-チューブリンの両方を含有する脂質ラフトに結合する。

30

【0243】

しかし、ニューロンを α 4で処理したところ、rHlgM12で標識された点が成長円錐の最外縁部にとどまったのに対し、F-アクチンのネットワークは成長円錐の末梢から収縮した（図26A）。スクロース勾配による画分化の後、アクチンは主にラフト以外の画分に局在化し、洗浄剤不溶性ペレット中には少量のアクチンだけが検出された（図22B）。これらの観察は、F-アクチンが極めて動的であり、低温状態において、かつ/または洗浄剤抽出を介して、その大半が脱重合化することを示す。したがって、アクチンが、rHlgM12を介するシグナル伝達に関与しうる。

【0244】

本発明者らは、ヒトIgMであるrHlgM12が、脂質ラフトに結合し、これらを認識すること、および微小管が下流の標的のうちの一つであることを結論付ける。rHlgM12は、基質として提示される場合に限り、軸索の伸長を促進する。基質としてのrHlgM12を固定化し、そのニューロン膜との相互作用に制約した。モルフォゲン誘導性シグナル伝達においてしばしば観察される通り、固定化されたrHlgM12は、ニューロン膜にわたりシグナル勾配を創出した可能性がある（Schmittら、2006年）。これに対し、液浴によるrHlgM12の適用は、脂質ラフトのランダムなクラスター形成（図20）を促進しうるに過ぎず、対称的な神経突起成長を遮断し、軸索の伸長を増強するのに十分ではありえない。略述すると、本発明者らの結果は、図24で提起したモデルを裏付ける。ニューロン膜は、両方ラフトラフトマイクロドメインおよび非ラフトマ

40

50

イクロドメインを含有する。ラフトドメインの2つのプールが存在し、それらのうちの1つは微小管と会合する(図24A)。2) r H I g M 1 2 は、ラフトドメインに結合し、クラスター形成させ、これにより、微小管の安定化および膜へのアンカリングが促進される(図24B)。3) 成長円錐では、r H I g M 1 2 により誘導されたラフトのクラスター形成が、成長円錐の末梢の中央ドメインへの移行、軸索形成を特化させる対称的な神経突起成長の遮断を増強しうる(図24C)。

【 0 2 4 5 】

【 数 5 】

参考文献

- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8:128-140. 10
- Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:347-381.
- Chen ZL, Haegeli V, Yu H, Strickland S (2009) Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* 327:158-168.
- Chichili GR, Rodgers W (2009) Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66:2319-2328.
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.
- de Anda FC, Pollarolo G, Da Silva JS, Camoletto PG, Feiguin F, Dotti CG (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436:704-708.
- Dent EW, Kalil K (2001) Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21:9757-9769. 20

【 0 2 4 6 】

【数 6】

- Dent EW, Callaway JL, Szebenyi G, Baas PW, Kalil K (1999) Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* 19:8894-8908.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Forscher P, Smith SJ (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol* 107:1505-1516.
- Goslin K, Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1507-1516.
- Herdegen T, Skene P, Bahr M (1997) The c-Jun transcription factor--bipotent mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 20:227-231.
- Higginbotham HR, Gleeson JG (2007) The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci* 30:276-283. 10
- Kanai Y, Hirokawa N (1995) Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* 14:421-432.
- Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M (2005) Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J Biol Chem* 280:42759-42765.
- Levitani I, Gooch KJ (2007) Lipid rafts in membrane-cytoskeleton interactions and control of cellular biomechanics: actions of oxLDL. *Antioxid Redox Signal* 9:1519-1534.
- Lewis SA, Ivanov IE, Lee GH, Cowan NJ (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* 342:498-505.
- Lingwood D, Simons K Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46-50.
- Niethammer P, Dellling M, Sytnyk V, Dityatev A, Fukami K, Schachner M (2002) Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol* 157:521-532. 20
- Palestini P, Pitto M, Tedeschi G, Ferraretto A, Parenti M, Brunner J, Masserini M (2000) Tubulin anchoring to glycolipid-enriched, detergent-resistant domains of the neuronal plasma membrane. *J Biol Chem* 275:9978-9985.
- Rodriguez M, Warrington AE, Pease LR (2009) Invited Article: Human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease. *Neurology* 72:1269-1276.
- Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 5:599-609.
- Samsonov AV, Mihalyov I, Cohen FS (2001) Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J* 81:1486-1500.
- Schmid RS, Maness PF (2008) L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 18:245-250. 30
- Schmitt AM, Shi J, Wolf AM, Lu CC, King LA, Zou Y (2006) Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 439:31-37.
- Segal RA (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* 26:299-330.
- Shogomori H, Futerman AH (2001) Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. *J Biol Chem* 276:9182-9188.
- Sorice M, Matarrese P, Tinari A, Giammarioli AM, Garofalo T, Manganelli V, Ciarlo L, Gambardella L, Maccari G, Botta M, Misasi R, Malorni W (2009) Raft component GD3 associates with tubulin following CD95/Fas ligation. *Faseb J* 23:3298-3308.
- Warrington AE, Bieber AJ, Van Keulen V, Ciric B, Pease LR, Rodriguez M (2004) Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:461-473. 40
- Witte H, Bradke F (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol* 18:479-487.
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180:619-632.

【 0 2 4 7 】

(実施例 1 2)

脊髄損傷に有益なヒトモノクローナル抗体についてのナノ細孔光学バイオセンサーアッセイ

脊髄損傷 (S C I) 後における軸索の保護および修復は、運動ニューロンの喪失および永続的な身体障害を防止するのに有効な戦略としての大きな可能性を保持する。ニューロ

ンの保護は、傷害後における軸索の損傷を防止し、軸索の修復を促進するために標的化される栄養因子を用いて達成されている。これらの分子は主に、特異的な低分子である神経栄養因子の標的化に焦点を当てる *in vitro* 系に基づく選択戦略を用いて同定された。

【0248】

天然の自己反応性モノクローナル抗体は、損傷および疾患の複数のモデルを用いて、CNS細胞における有益な生物学的機能を裏付けている。抗体を介するニューロン生存の促進、軸索の再生、および機能回復が、マウスモノクローナルIgMであるIN-1を用いて、*in vivo*において裏付けられている(Bregman、1995年; CaroniおよびSchwab、1988年)。同様の結果が、CNS損傷に先立つ脊髄ホモジネート(SCH)の免疫化を用いて得られた(Ellezam、2003年; Huang、1999年)。

10

【0249】

IgM12および再ミエリン化抗体IgM22を含めたニューロン結合ヒト抗体による本発明者らのデータに基づき、ニューロン生存および機能を促進することにより軸索を損傷から保護し、SCIなどのCNSの損傷および/または疾患を処置するのに有益なヒトモノクローナル抗体の相互作用が、病理学的/生理学的状態下における表面の細胞質膜タンパク質-脂質二重層間相互作用に依存することが開示される。

【0250】

神経傷害または損傷(例えば、SCIにおける)後においてニューロンの生存を促進するか、またはニューロンを傷害または死滅から保護する結果として、各症例において神経機能の保存をもたらすヒト抗体を、病理学的/生理学的表面の細胞質膜タンパク質-脂質二重層を維持する技法を用いて評価し、特徴付け、かつ/または同定した。

20

【0251】

本研究において、本発明者らは、タンパク質-脂質二重層表面プラズモン共鳴(SPR)センサーを用いて、表面におけるヒトモノクローナル抗体の結合相互作用の反応速度を決定する。ヒトモノクローナル抗体は、脊髄損傷後における齧歯動物に由来する*ex vivo*の組織切片の脊髄病変における結合を用いて特徴付けるかまたは同定する。次に、齧歯動物の脊髄挫滅損傷モデルを用いて、ヒト抗体が、*in vivo*においてニューロンの生存、神経突起伸長、または再ミエリン化を促進する結果として、病態を軽減し、神経機能を改善する能力をさらに評価する。

30

【0252】

新規のSPR脂質二重層センサーは、表面のタンパク質-脂質間における、有益なヒトIgM抗体の結合反応速度および結合アフィニティーの特徴付けを可能とする迅速な無標識法を提供する。この表面プラズモン共鳴(SPR)センサー法は、生理学的な平面的脂質二重層と組み合わせた金属膜における周期的なナノ細孔アレイに基づき開発された。SPR法は、迅速な無標識によるIgM抗体の関与性の抗原との結合反応速度および結合アフィニティーの特徴付けを可能とした。

【0253】

小さな差異を定量化するのに重要な結合反応速度は、開発時におけるリード分子を選択する根拠がもたらし、*in vivo*における治療用分子の用量および効力のいずれに対しても影響を及ぼす。SPRは、業界環境および研究環境で標準的な方法として受容されており、これにより、典型的には、可溶性結合パートナー対の間の分子的相互作用が特徴付けられる。しかし、この技法は、膜結合抗原の必要に適合し始めたばかりである。SPRセンシングにおいて用いられる金基質は、脂質膜を支持して形成するには適さない。さらに、金表面と直接接触する膜タンパク質は、それらの機能性を喪失することが多い。しかし、周期的なナノ細孔アレイで穿通された金薄膜を用いる新規のナノ細孔センシング構築法の開発は、これらの難題を克服している(例えば、図27を参照されたい)。各ナノ細孔は、ガラス製の基質上に配置され、微小なウェルを形成して、支持される脂質膜を閉じ込める一方、周囲の金膜は、SPR効果をもたらして、分子の膜への結合を動的にモ

40

50

ニタリングする(図27B)。力学的安定性を維持し、両面を緩衝液に取り囲ませながら、ナノ細孔上に薄い脂質二重層を懸濁させるので、金膜に押し延ばされたナノ細孔アレイにより、固有の形状がもたらされる(図27B)。

【0254】

これにより、膜タンパク質を、金によるナノ細孔アレイのSPRセンシング能と継ぎ目なく統合することができ、これにより、それらの天然状態をより緊密に模倣する環境におけるそれらの機能性が維持される。さらに、自立的な脂質二重層に組み込まれた膜タンパク質は、両面からの接近が容易となりうることで、この手法を、細胞表面における抗原-抗体間結合が、結果として細胞シグナル伝達をもたらす機構を研究するのにより魅力的なものとしている(図27B)。このSPR脂質二重層センサーは、表面のタンパク質-脂

10

【0255】

このセンサープラットフォームは、脊髄損傷の動物モデルにおける試験のために、表面のタンパク質-脂質間における、治療用ヒトIgM抗体の結合反応速度および結合アフィニティーを特徴付ける。本発明者らは、小脳組織およびCNS内の細胞の固定されない「生存」表面への結合を介して同定される特定のIgM抗体を広範に特徴付けた。これらのIgM抗体(IgM22およびIgM46により例示される)は、*in vitro*においてカルシウム流を刺激し、*in vivo*において再ミエリン化を促進した。同じ基準に基づき、Mayo Clinicにおけるタンパク異常血症の血清バンク試料をスクリー

20

【0256】

CNS損傷およびCNS疾患についての複数のマウスモデルに由来する、固定されていない「生存」皮質切片を用いたところ、ニューロン結合抗体は、特定のCNS細胞に対する特異的免疫反応性、損傷の構造、および疾患の病態を呈示した。

【0257】

天然のヒトモノクローナル抗体は、損傷および疾患についての複数のモデルに由来するCNS細胞において有益な生物学的機能を強化することが示されている。ヒトモノクローナル抗体は、小脳ニューロン、皮質ニューロン、網膜神経節ニューロン、および脊髄ニューロンを含めた培養物中の多種多様なニューロンの表面に結合する(例として挙げると、ヒト抗体IgM12およびIgM42)。これらの抗体は、CNSニューロンからの神経突起伸長を誘導し(図28)、CNSミエリンの神経突起成長に対する障害を凌駕する(Warringtonら、2004年)。

30

【0258】

*in vitro*における研究は、ヒトモノクローナル抗体の、ニューロン表面の細胞膜への結合を裏付けている。特徴的な結合が0で均一となるのに対し、表面の再構成形態である点状構造は15で均一となる(図29)。細胞表面における結合は、シグナルカスケードを誘発するシグナル伝達分子と会合してクラスター形成する膜のマイクロドメインに特徴的である(Howeら、2004年)。

40

【0259】

ヒトモノクローナル抗体は、脊髄組織に入り、静脈内投与の4時間後に損傷部位に蓄積される(図30)。ピプラトームによる脊髄切片に対して実施する免疫細胞化学により、ニューロン結合抗体を投与した後の病変内にはヒトIgMが検出されるが、対照のヒトIgMを投与した後の病変内にはヒトIgMが検出されない。慢性脊髄疾患を伴うマウス(TMEV感染マウス)に、腹腔内を介してsHIgM42 0.5mgを施し、4時間後に脊髄を摘出し、脊髄断面におけるヒトIgMの存在を検出した(図30)。sHIgM42を施されたマウスに由来する脊髄の損傷領域は、蛍光タグ付けした抗ヒトIgMに結合する並列線維を示す(図30A)。対照のヒトIgMを施されたマウスに由来する脊髄

50

の損傷領域は、ヒトIgMを含有しない(図30B)。

【0260】

ヒトモノクローナル抗体は、Mayo Clinicのタンパク異常血症血清バンクに由来する試料をスクリーニングするための生物学的機能アッセイを用いて同定した。40年間にわたり収集された115,000例の血清試料は、単クローン性免疫グロブリン血症を伴う患者に由来する高濃度のモノクローナル抗体を含有する。本発明者らは、動物モデルにおいて再ミエリン化促進活性を有する組換えヒトIgM22(Mitsunaga、2002年;Warrington、2000年)を合成し、調べた。

【0261】

一実施形態では、本実施例により、ヒトSCIまたはCNSのニューロンを露出させる脱髄性状態などの神経変性状態、神経傷害および/または損傷における治療適用、予後診断適用、診断適用、および/または予防適用に有用なGMP品質のモノクローナル抗体を生成させる。

10

【0262】

これらの研究はさらに、外傷性SCI後においてニューロンの生存を促進する結果として、神経機能の保存をもたらすヒトIgM抗体も特徴付けて評価する。SCI後における行動学的試験および軸索数の形態的測定を評価し、神経機能の内因性保存と神経機能の抗体を介する保存との差異を決定する。SCI後において抗体対照と比較した軸索保護抗体および軸索伸長抗体による処置を用いて、神経機能保存の差異を、特異的抗体を介する活性について特徴付ける。

20

【0263】

細胞膜タンパク質-脂質二重層を含有する膜小胞を、生理学的条件下で細胞から単離する。SPRセンサーのナノ細孔を、正常CNSおよび脊髄損傷組織から単離されたニューロン、神経膠、シナプトソーム、およびミエリン膜の微小胞調製物を用いてコーティングする。ヒトモノクローナル抗体血清試料および組換え抗体試料をスクリーニングして、特定の膜の種類の種類結合反応速度を決定する。

【0264】

SPRセンサーを用いて確認される通り、生理学的条件下で、凍結されず固定されていない「生存」細胞および「生存」組織表面の細胞膜に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を、SCI後における、凍結されず固定されない病理学的「生存」組織を用いて、特異的結合について調べる。脊髄病変への結合を裏付けるヒトモノクローナル抗体を、齧歯動物のSCI後の処置における適用可能性および活性についてさらに特徴付ける。

30

【0265】

プロトコルデザイン：改変動脈瘤クリップ(FEJOTAマウスクリップ：閉止力を3gまたは8gとする)を用いて、10週齢の雌(18~22g)C57BL/6Jマウス(Jackson Laboratories)のT9レベルにおいて圧迫損傷を生成させる。このSCIモデルは、初期影響だけでなく、小球性(microcystic)キャピテーション、軸索変性、および頑強なアストログリオシス、ヒト外傷性SCIの全ての顕徴を促進する持続的な圧迫期も包含する(JoshiおよびFehlings 2002年)。ラット用のBasso, Beattie, Bresnahan(BBB)運動評価スケール、および運動のBassoマウススケール(BMS)を用いて、行動学的試験を決定して、SCI後における神経欠損を評価する。図31に技法を示す。

40

【0266】

次いで、凍結させず、固定させていないex vivoの生存組織切片を、齧歯動物における脊髄圧迫損傷後における病理学的病変から調製する。生理学的条件下で維持した切片に対する免疫蛍光(IF)染色を用いて、ヒトIgM抗体結合の免疫反応性をスクリーニングする。

【0267】

脊髄圧迫損傷後迅速に、マウスを、腹腔内投与されるrHIgM12およびsHIgM42またはrHIgM42を含めたヒト抗体で処置する。ヒト抗体が軸索保存または組織

50

修復を促進する能力を測定する。BBBスケールおよびBMSスケールを用いる行動学的試験を、SCI後の5週間において定期的な間隔で実施する。SCIの30分後に、ヒト抗体0.5mgの単回投与を、腹腔内を介してマウスに施す。マウスの群(15匹のマウス)に、ニューロン保護、神経突起成長を促進するヒト抗体、細胞に結合しない対照のヒト抗体、または対照を施す。個別のマウスを毎週1回一晩にわたり自動式赤外線活動ボックスに収容し(Mikamiら、2002年)、後肢を引きずる身体障害の尺度である後肢による自発的立脚と水平方向の活動とを記録した(Accuscan Inc、Ohio)。また、従来のBBBスコアも毎週収集した。機能的評価は、盲検により実施する。

【0268】

処置の4週間後、Fluoro-GoldおよびFast Blueを、マウス4匹の胸部下方の脊髄へと注射する。1週間後、マウスを灌流し、脳および脊髄を摘出する。脳幹の網様核、前庭神経核、および赤核において逆行標識された細胞体を、蛍光顕微鏡を介して群を通してカウントする(UreおよびRodriguez、2002年)。脳幹(ピラトーム切片)内で標識された細胞体の数は、脊髄全体における機能的軸索のレベルを反映する。脊髄に沿って1mmごとに採取した組織断面において、アミロイドタンパク質の蓄積についての免疫細胞化学を実施する。切片中のアミロイド凝集物の数は、胸部下方において機能障害を来した軸索輸送、および胸部下方における軸索の機能不全を反映する。

【0269】

損傷の5週間後、残りのマウスをホルムアルデヒド/グルタルアルデヒド(glutaraldehyde)で灌流し、脊髄を摘出した。脊髄病変部位を含む1mmのブロックを1つおきにAralditeプラスチック中に包埋し、切片化(1ミクロン)し、パラフェニレンで染色して、ミエリンにより取り囲まれて保存された軸索を可視化した。Microsuiteソフトウェア(Olympus)を用いて、病変領域の断面、保存された軸索数、および病変への免疫細胞浸潤を測定する。軸索の頻度を測定し、群間で比較した(McGavernら、2000年; Rodriguezら、1987年)。全ての解析は、実験群について知らされずに、コード化および盲検化された試料について行う。保存された軸索は、病変1mm²当たりの保存された軸索数として表す。実験群間および対照群間におけるデータの対比較では、マン-ホイットニーランクサム検定を用いる。

【0270】

【数7】

参考文献

- Rodriguez M, Warrington AE, Pease LR. Human Natural Autoantibodies in the Treatment of Neurologic Disease. *Neurology* 2009; 72: 1269-1276.
- Im H, Lesuffleur A, Lindquist NC, Oh SH. Plasmonic nanoholes in a multichannel microarray format for parallel kinetic assays and differential sensing. *Analytical Chemistry*. 2009;81:2854-2859
- Maynard JA, Lindquist NC, Sutherland JN, Lesuffleur A, Warrington AE, Rodriguez M, and Oh S-H. Next generation SPR technology of membrane-bound proteins for ligand screening and biomarker discovery. *J Biotech* 2009; 4(11):1542-1558
- Nagpal P, Lindquist NC, Oh SH, Norris DJ. Ultrasoft patterned metals for plasmonics and metamaterials. *Science*. 2009;325:594-597.
- Bieber AJ, Warrington A, Asakura K, Ciric B, Kaveri SV, Pease LR, Rodriguez M. 2002. Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lyssolecithin-induced demyelination in mice. *Glia* 37(3):241-249.
- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378(6556):498-501.
- Caroni P, Schwab ME. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1(1):85-96.
- Corse AM, Bilak MM, Bilak SR, Lehar M, Rothstein JD, Kuncel RW. 1999. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 6(5):335-346.

【0271】

【 数 8 】

- Ellezam B, Bertrand J, Dergham P, McKerracher L. 2003. Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve. *Neurobiol Dis* 12(1):1-10.
- Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, Beckman JS. 1998. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci* 18(3):923-931.
- Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. 2006. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem* 97(5):1314-1326.
- Hemendinger RA, Armstrong EJ, 3rd, Persinski R, Todd J, Mougeot JL, Volvovitz F, Rosenfeld J. 2008. Huperzine A provides neuroprotection against several cell death inducers using in vitro model systems of motor neuron cell death. *Neurotox Res* 13(1):49-61. 10
- Howe CL, Bieber AJ, Warrington AE, Pease LR, Rodriguez M. 2004. Antiapoptotic signaling by a remyelination-promoting human antimyelin antibody. *Neurobiol Dis* 15(1):120-131.
- Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24(3):639-647.
- Joshi M, Fehlings MG. 2002. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma* 19(2):175-190.
- McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quinones C, Schmelzer JD, Low PA, Rodriguez M. 2000. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 123 Pt 3:519-531.
- McTigue DM, Tripathi R, Wei P. 2006. NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(4):406-420. 20
- Mikami Y, Toda M, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Kawakami Y. 2002. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note. *J Neurosurg* 97(1 Suppl):142-147.
- Mitsunaga Y, Ciric B, Van Keulen V, Warrington AE, Paz Soldan M, Bieber AJ, Rodriguez M, Pease LR. 2002. Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *Faseb J* 16(10):1325-1327.
- Pannu R, Christie DK, Barbosa E, Singh I, Singh AK. 2007. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem* 101(1):182-200.
- Pirko I, Ciric B, Gamez J, Bieber AJ, Warrington AE, Johnson AJ, Hanson DP, Pease LR, Macura SI, Rodriguez M. 2004. A human antibody that promotes remyelination enters the CNS and decreases lesion load as detected by T2-weighted spinal cord MRI in a virus-induced murine model of MS. *Faseb J* 18(13):1577-1579. 30
- Rodriguez M, Lennon VA, Benveniste EN, Merrill JE. 1987. Remyelination by oligodendrocytes stimulated by antiserum to spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 46(1):84-95.
- Warrington AE, Asakura K, Bieber AJ, Ciric B, Van Keulen V, Kaveri SV, Kyle RA, Pease LR, Rodriguez M. 2000. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6820-6825.
- Warrington AE, Bieber AJ, Ciric B, Pease LR, Van Keulen V, Rodriguez M. 2007. A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J Neurosci Res* 85(5):967-976.
- Warrington AE, Bieber AJ, Van Keulen V, Ciric B, Pease LR, Rodriguez M. 2004. Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(5):461-473. 40

【 0 2 7 2 】

(実施例 1 3)

多発性硬化症モデル：用量反応評価

I g M抗体を、それらがマウスの多発性硬化症モデルにおいて機能的改善を促進し、再ミエリン化過程、神経突起成長過程、またはこれらの両方の過程を増強する能力について評価する。モデルは、Warringtonら、2007年と同様の方法を用いてヒトMSにおいて見出される病変と同様の特徴を伴う、CNSの遷延性、慢性で進行性の脱髄性病変を誘導する、ピコルナウイルスのサイラーマウス脳脊髄炎ウイルス(TMEV)の使用を伴う。

【 0 2 7 3 】

雌マウスおよび雄マウス(約8週齢：S J L / J株)に、サイラーマウス脳脊髄炎ウイ

50

ルス (2×10^5 プラーク形成単位の Daniel 株: $10 \mu\text{L}$ の脳室内注射) を注射する。処置のための無作為化の前に、マウスを6カ月間にわたり回復させる。次いで、マウスを、被毛状態、歩行、および立ち直り反射について観察し、処置群へと無作為に割り付ける(処置表に示す)。次いで、マウスを、ピヒクル(通常の生理食塩液)または組換えヒトIgM抗体 ($0.025 \sim 2.5 \text{ mg/kg}$) の単回静脈内注射で処置する。神経機能を、処置の2週間後、1カ月後、および2カ月後にモニタリングする。

【0274】

機能的評価項目は、被毛状態、歩行、およびロータロッド能力に基づく評価を包含した。被毛外観については、評価を以下の通り: 疾患なし(0)、最小の被毛変化(1)、つやのない被毛(2)、失禁および被毛浸潤(3)とする。活動の変化は、自動式活動ボックスにより定量化する。さらに、歩行は、歩行速度 $> 90 \text{ cm/秒}$ を用いるデジタル式の歩行捕捉法(DigiGait)を用いて解析する。定量的な歩行解析評価項目は、立幅および持続時間、歩幅および頻度、足の角度のほか、揺れ、制動および推進の持続時間を包含する。歩行のベースラインからの変化を定量化する。ロータロッド能力(回転軸上の速度および持続時間との関係で運動を測定する回転軸上を動物が歩く能力を介して、感覚および平衡調整の尺度を評価する)は、動物が一連の試行にわたり回転装置上にとどまる時間の合計として定量化する。

10

【0275】

実験が終了したら、動物を、 CO_2 への過剰曝露を介して安楽死させる。1) 髄鞘形成の程度(プラスチック包埋してパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒドで固定してオスミウム処置した組織の、電子顕微鏡による解析)および2) 神経突起成長(立体評価法を介する神経突起密度の評価)を評価するために、脳および脊髄を摘出する。

20

【0276】

第1の実施形態では、組換えヒト抗体を、表3Aおよび表3Bに示す3つの用量レベルにおいて単独で投与する。

【0277】

【表 3 A】

表 3A: 処置群および評価項目の概要:個別の組換え IgM 抗体

処置	想定される組織学的結果	用量レベル (mg/kg:静脈内)	神経学的評価	組織学的評価
ビヒクル (生理食塩液)	該当なし	0	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM12	神経突起成長	0.025 0.25 2.50	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM42	神経突起成長	0.025 0.25 2.50	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM22	再ミエリン化	0.025 0.25 2.50	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM46	再ミエリン化	0.025 0.25 2.50	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長

10

20

【 0 2 7 8 】

30

【表 3 B】

表 3B: 処置群についての結果の概要

処置	想定される機能	抗体の用量レベル (mg/kg:静脈内)	組織学的結果の種類(複数可)	相対的な組織学的転帰 ^(*)	相対的な神経学的転帰: 被毛状態、歩行解析、およびロータロッドスコアの組合せ ^(*)
ビヒクル (生理食塩液)	該当なし	0	なし	0	0
IgM12	神経突起成長	0.025 0.25 2.50	神経突起成長	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)
IgM42	神経突起成長	0.025 0.25 2.50	神経突起成長	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)
IgM22	再ミエリン化	0.025 0.25 2.50	再ミエリン化	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)
IgM46	再ミエリン化	0.025 0.25 2.50	再ミエリン化	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)	X(0.025) X+(0.25) X++(2.50)

10

20

30

【 0 2 7 9 】

(*) X は改善を示し、X + は一層の改善を示し、X + + はなお一層の改善を示す。改善スコアの値は、所与の抗体の用量と関係する。したがって、X + を、その同じ抗体について X より大きな改善とする。1つの抗体についての改善 X は、他の抗体についての X 値と必ずしも同じではなく、1つの抗体の X + 値は、他の抗体の X + 値と必ずしも同じではなく、1つの抗体の X + + 値は、他の抗体の X + + 値と必ずしも同じではない。

【 0 2 8 0 】

この実施例では、組換え抗体である I g M 1 2、I g M 4 2、I g M 2 2、および I g M 4 6 の各々が、被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目の各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意で (p < 0 . 0 5) 用量依存的な改善をもたらすことが見出される。ビヒクルで処置される動物は、T M E V 損傷の 6 カ月間以内に、被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目における安定的な欠損をもたらす。各抗体について、0 . 0 2 5 ~ 2 . 5 m g / k g の用量範囲にわたり、低用量時の感覚運動の評価項目における改善 X の増大、用量を 0 . 2 5 m g / k g とするときの感覚運動の評価項目におけるより大きな改善 X + の増大、および用量を 2 . 5 m g / k g とするときの感覚運動の評価項目におけるなおより大きな改善 X + + + を伴う、感覚運動の評価項目における有意で用量依存的な変化 [評価中、X を改善とする] が見出される。この傾向は、動物を 1 2 匹とする群サイズについて、検出力 0 . 8 のレベルおよび 0 . 0 5 のアルファレ

40

50

ベルで観察される。したがって、抗体 I g M 1 2、I g M 4 2、I g M 2 2、および I g M 4 6 の各々は、被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらす。性別に基づく改善の差は見出されない。

【0281】

この実施例では、I g M 1 2 および I g M 4 2 が、立体法を介してビヒクルによる処置の対照と比較して評価した、T M E V 感染マウスに由来する脳切片および脊髄切片における神経突起成長の統計学的に有意で用量依存的な増大をもたらすことが見出される。各抗体について、 $0.025 \sim 2.5 \text{ mg/kg}$ の用量範囲にわたり、低用量時の神経突起成長における改善 X の増大、用量を 0.25 mg/kg とするときの神経突起成長におけるより大きな改善 X + の増大、および用量を 2.5 mg/kg とするときの神経突起成長におけるなおより大きな増大 X + + + を伴う、神経突起成長の有意で用量依存的な変化 [評価中、X を改善とする] が見出される。この傾向は、動物を 12 匹とする群サイズについて、検出力 0.8 のレベルおよび 0.05 のアルファレベルで観察される。

10

【0282】

I g M 2 2 および I g M 4 6 は、立体法を介してビヒクルによる処置の対照と比較して評価した、T M E V 感染マウスに由来する脳切片および脊髄切片における再ミエリン化の統計学的に有意で用量依存的な増大をもたらすことが見出される。各抗体について、 $0.025 \sim 2.5 \text{ mg/kg}$ の用量範囲にわたり、低用量時の再ミエリン化における改善 X の増大、用量を 0.25 mg/kg とするときの再ミエリン化におけるより大きな改善 X + の増大、および用量を 2.5 mg/kg とするときの再ミエリン化におけるなおより大きな増大 X + + + を伴う、再ミエリン化の有意で用量依存的な変化 [評価中、X を改善とする] が見出される。この傾向は、動物を 12 匹とする群サイズについて、検出力 0.8 のレベルおよび 0.05 のアルファレベルで観察される。

20

【0283】

(実施例 14)

多発性硬化症モデル：抗体の組合せ

この実験では、用量比を固定した組換え I g M 抗体の多様な組合せを、前出の例で記載した M S の T M E V モデルにおける神経学的転帰の改善について検討する。T M E V への曝露の 6 カ月後、マウスにおける組換え I g M の組合せによる処置を開始する。この一連の研究では、マウスに単独のビヒクルまたは I g M の多様な組合せを静脈内単回投与（混合剤）により施す。上記の通りに、感覚運動の評価項目をモニタリングする。髄鞘形成および神経突起成長を評価して、抗体の組合せによりもたらされる変化を検討する。評価される組合せを表 4 A および表 4 B に示す。

30

【0284】

【表 4 A】

表 4A:処置群の概要:組換え IgM 抗体組合せ

処置	想定される機能	用量レベル (mg/kg:静脈内)	神経学的評価	組織学的評価	
ビヒクル (生理食塩液)	該当なし	0	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	10
IgM12 + IgM42	神経突起成長+ 神経突起成長	0.25 0.25	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	
IgM22 + IgM46	再ミエリン化+再 ミエリン化	0.25 0.25	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	20
IgM22 + IgM12	再ミエリン化+ 神経突起成長	0.25 0.25	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	20
IgM46 + IgM 12	再ミエリン化+ 神経突起成長	0.25 0.25	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	
IgM22 + IgM42	再ミエリン化+ 神経突起成長	0.25 0.25	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	30
IgM46 + IgM42	再ミエリン化+ 神経突起成長	0.25 0.25	被毛状態 歩行解析 ロータロッド	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	

【 0 2 8 5 】

【表 4 B - 1】

表 4B:結果の概要:組換え IgM 抗体組合せ

処置	想定される組織学的結果	用量レベル (mg/kg: 静脈内)	組織学的結果の種類(複数可)	相対的な組織学的転帰および結果の種類(複数可) ^(*)	相対的な感覚運動の神経学的転帰 ^(*) :被毛状態、歩行解析、およびロータロッド
ピヒクル (生理食塩液)	該当なし	0	なし	なし	なし
IgM12 + IgM42	神経突起成長+神経突起成長	0.25 0.25	神経突起成長	(IgM12 による X+の神経突起成長) および (IgM42 による X+の神経突起成長)より大きな神経突起成長	(IgM12 による X+の感覚運動の改善) および (IgM42 による X+の感覚運動の改善)より大きな感覚運動の改善
IgM22 + IgM46	再ミエリン化+再ミエリン化	0.25 0.25	髄鞘形成	(IgM22 による X+の再ミエリン化) および (IgM46 による X+の再ミエリン化)より大きな再ミエリン化	(IgM22 による X+の感覚運動の改善) および (IgM46 による X+の感覚運動の改善)より大きな感覚運動の改善
IgM12 + IgM22	神経突起成長+再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長および再ミエリン化	(IgM12 による X+の神経突起成長) および (IgM22 による X+の再ミエリン化)より大きな再ミエリン化および神経突起成長	(IgM12 による X+の感覚運動の改善) および (IgM22 による X+の感覚運動の改善)より大きな感覚運動の改善
IgM12 + IgM 46	神経突起成長+再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長および再ミエリン化	(IgM12 による X+の神経突起成長)および(IgM46 による X+の再ミエリン化)より大きな再ミエリン化および神経突起成長	(IgM12 による X+の感覚運動の改善) および (IgM46 による X+の感覚運動の改善)より大きな感覚運動の改善
IgM42 + IgM22	神経突起成長+再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長および再ミエリン化	(IgM42 による X+の神経突起成長)および(IgM22 による X+の再ミエリン化)より大きな再ミエリン化	(IgM42 による X+の感覚運動の改善) および (IgM22 による X+の感

10

20

30

40

【表 4 B - 2】

				化および 神経突起成長	覚運動の改善)より大き な感覚運動の改善
IgM42 + IgM46	神経突起成 長+再ミエリン 化	0.25 0.25	神経突起成 長および再ミ エリン化	(IgM42 による X+の神経 突起成長)および(IgM46 による X+の再ミエリン 化)より大きな再ミエリン 化および 神経突起成長	(IgM42 による X+の感 覚運動の改善) および (IgM46 による X+の感 覚運動の改善)より大き な感覚運動の改善

10

【0287】

(*) Xは改善を示し、X+は一層の改善を示し、X++はなお一層の改善を示す。改善スコアの値は、所与の抗体の用量と関係する。したがって、X+を、その同じ抗体についてXより大きな改善とする。1つの抗体についての改善Xは、他の抗体についてのX値と必ずしも同じではなく、1つの抗体のX+値は、他の抗体のX+値と必ずしも同じではなく、1つの抗体のX+++値は、他の抗体のX+++値と必ずしも同じではない。

20

【0288】

この実施例では、組換え抗体の組合せであるIgM12+IgM42、IgM22+IgM46、IgM12+IgM22、IgM12+IgM46、IgM42+IgM22、およびIgM42+IgM46が、被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意(各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$)で用量依存的な改善をもたらす。性別に基づく改善の差は見出されない。

【0289】

さらに、これらの組合せの各々による感覚運動の評価項目の改善度は、抗体の各々単独により予測される相加的改善と比較して統計学的に有意で用量依存的な形で相乗的(相乗作用が呈示される)である。ここでもまた、性別に基づく改善の差は見出されない。

30

【0290】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意(各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$)で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、IgM12+IgM42の組合せは、神経突起成長を、ビヒクルによる対照と比較して有意に($p < 0.05$)増強した。神経突起成長度は、単独で投与される各抗体の相加的効果と比較して相乗的である。したがって、これらの抗体は、異なる作用機構を介して成長を誘発し、これは、これらの抗体の神経組織へのそれぞれに異なる結合パターンと符合することが理解される。

40

【0291】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意(各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$)で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、IgM22+IgM46の組合せは、髄鞘形成を、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な($p < 0.05$)増大をもたらした。さらに、再ミエリン化度は、単独で投与されるIgM22またはIgM46について予測される相加的効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を

50

誘発する。

【0292】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 1 2 + I g M 2 2の組合せは、損傷している脊髄における髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 1 2またはI g M 2 2それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

10

【0293】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 1 2 + I g M 4 6の組合せは、髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 1 2またはI g M 4 6それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

20

【0294】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 2 2 + I g M 4 2の組合せは、髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 2 2またはI g M 4 2それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

30

【0295】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 4 6 + I g M 4 2の組合せは、髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 4 6またはI g M 4 2それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

40

【0296】

（実施例15）

脊髄損傷モデル

I g M抗体を、それらがラットの脊髄損傷モデルにおいて機能的改善を促進し、再ミエ

50

リン化過程、神経突起成長過程、またはこれらの両方の過程を増強する能力について評価する。モデルは、脊髄を、幅を2.5mmとするカバースリップ用ピンセットを改変したブレードの間で側方から、あらかじめ設定したブレード間隔である0.9mmまで、15秒間にわたり圧迫することを伴う。結果として得られる病変は、ヒトSCIにおいて見出される特徴と同様の特徴を示す(Grunerら、1995年)。

【0297】

雄ラットおよび雌ラット(約200~225g、Long Evans)に手術を施して、上記の脊髄損傷をもたらす。手術の10分後、組換えIgM抗体またはビヒクルによる処置を、静脈内を介して施す。BBB運動評価スケールを用いて、後肢における運動機能および歩行を12週間にわたり評価する(例えば、Basso DM、Beattie MS、Bresnahan JC、Anderson DK、Faden AI、Gruner JA、Holford TR、Hsu CY、Noble LJ、Nockels R、Perot PL、Salzman SK、Young W.(1996年)、「MASCIS evaluation of open field locomotor scores: Effects of experience and teamwork on reliability」、Journal of Neurotrauma、13巻:343~359頁;Basso DM、Beattie MS、Bresnahan JC.(1995年)、「A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats」、Journal of Neurotrauma、12巻:1~21頁を参照されたい)。ラットを、1、3、5、7、および10日後に調べ、次いで、SCI後9~12週間にわたり毎週、ベースラインからのBBB変化を定量化する。

10

20

【0298】

実験が終了したら、動物を、CO₂への過剰曝露を介して安楽死させる。1) 髄鞘形成の程度(プラスチック包埋してパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒドで固定してオスミウム処置した組織の、電子顕微鏡による解析)および2) 神経突起成長(立体評価法を介する神経突起密度の評価)を評価するために、脳および脊髄を摘出する。

【0299】

(実施例16)

脊髄損傷モデルにおける個別の抗体の使用

この実験では、組換えヒト抗体を、表5Aおよび表5Bに示す通り、3つの用量レベルにおいて単独で投与する。

30

【0300】

【表 5 A】

表 5A:処置群および評価項目の概要:個別の組換え IgM 抗体

処置	想定される組織学的結果	用量レベル (mg/kg:静脈内)	神経学的評価	組織学的評価
ビヒクル(生理食塩液)	該当なし	0	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM12	神経突起成長	0.025 0.25 2.50	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM42	神経突起成長	0.025 0.25 2.50	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM22	再ミエリン化	0.025 0.25 2.50	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長
IgM46	再ミエリン化	0.025 0.25 2.50	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長

10

20

【 0 3 0 1 】

【表 5 B】

表 5B:処置群についての結果の概要

処置	想定される機能	抗体の用量レベル (mg/kg:静脈内)	組織学的結果の種類	相対的な組織学的転帰 ^(*)	相対的な神経学的転帰: BBB スコア ^(*)
ビヒクル (生理食塩液)	該当なし	0	なし	0	0
IgM12	神経突起成長	0.025	神経突起成長	X(0.025)	X(0.025)
		0.25		X+(0.25)	X+(0.25)
		2.50		X++(2.50)	X++(2.50)
IgM42	神経突起成長	0.025	神経突起成長	X(0.025)	X(0.025)
		0.25		X+(0.25)	X+(0.25)
		2.50		X++(2.50)	X++(2.50)
IgM22	再ミエリン化	0.025	再ミエリン化	X(0.025)	X(0.025)
		0.25		X+(0.25)	X+(0.25)
		2.50		X++(2.50)	X++(2.50)
IgM46	再ミエリン化	0.025	再ミエリン化	X(0.025)	X(0.025)
		0.25		X+(0.25)	X+(0.25)
		2.50		X++(2.50)	X++(2.50)

10

20

30

【0302】

(*) Xは改善を示し、X+は一層の改善を示し、X++はなお一層の改善を示す。改善スコアの値は、所与の抗体の用量と関係する。したがって、X+を、その同じ抗体についてXより大きな改善とする。1つの抗体についての改善Xは、他の抗体についてのX値と必ずしも同じではなく、1つの抗体のX+値は、他の抗体のX+値と必ずしも同じではなく、1つの抗体のX++値は、他の抗体のX++値と必ずしも同じではない。

【0303】

この実施例では、改良型BBBパラメータにより、組換え抗体であるIgM12、IgM42、IgM22、およびIgM46の各々が、後肢における運動機能の、統計学的に有意で(各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して: $p < 0.05$)用量依存的な改善をもたらすことが見出される。ビヒクルで処置される動物は、中等度レベルの脊髄損傷の6週間以内に、安定的なBBBスコアをもたらす。各抗体について、0.025~2.5mg/kgの用量範囲にわたり、低用量時のBBBレベルにおける改善Xの増大、用量を0.25mg/kgとするときのBBBにおけるより大きな改善X+の増大、および用量を2.5mg/kgとするときのBBBにおけるなおより大きな改善X++を伴う、BBBスコアにおける有意で用量依存的な変化[評価中、Xを改善とする]が見出される。この傾向は、動物を12匹とする群サイズについて、検出力0.8のレベルおよび0.05のアルファレベルで観察される。したがって、改良型BBBにより、抗体Ig

40

50

M 1 2、I g M 4 2、I g M 2 2、および I g M 4 6 の各々は、後肢における運動機能の、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらす。性別に基づく改善の差は見出されない。

【 0 3 0 4 】

I g M 1 2 および I g M 4 2 が、立体法を介してビヒクルによる処置の対照と比較して評価した、T M E V 感染マウスに由来する脳切片および脊髄切片における神経突起成長の統計学的に有意で用量依存的な増大をもたらすことが見出される。各抗体について、0.025 ~ 2.5 mg / kg の用量範囲にわたり、低用量時の神経突起成長における改善 X の増大、用量を 0.25 mg / kg とするときの神経突起成長におけるより大きな改善 X + の増大、および用量を 2.5 mg / kg とするときの神経突起成長におけるなおより大きな増大 X + + + を伴う、神経突起成長の有意で用量依存的な変化 [評価中、X を改善とする] が見出される。この傾向は、動物を 12 匹とする群サイズについて、検出力 0.8 のレベルおよび 0.05 のアルファレベルで観察される。

10

【 0 3 0 5 】

I g M 2 2 および I g M 4 6 は、立体法を介してビヒクルによる処置の対照と比較して評価した、T M E V 感染マウスに由来する脳切片および脊髄切片における再ミエリン化の統計学的に有意で用量依存的な増大をもたらすことが見出される。各抗体について、0.025 ~ 2.5 mg / kg の用量範囲にわたり、低用量時の再ミエリン化における改善 X の増大、用量を 0.25 mg / kg とするときの再ミエリン化におけるより大きな改善 X + の増大、および用量を 2.5 mg / kg とするときの再ミエリン化におけるなおより大きな増大 X + + + を伴う、再ミエリン化の有意で用量依存的な変化 [評価中、X を改善とする] が見出される。この傾向は、動物を 12 匹とする群サイズについて、検出力 0.8 のレベルおよび 0.05 のアルファレベルで観察される。

20

【 0 3 0 6 】

（実施例 17）

脊髄損傷：抗体の組合せ

この実施例では、用量比を固定した組換え I g M 抗体の多様な組合せを、本明細書の実施例 14 で記載した脊髄損傷モデルにおける神経学的転帰の改善について検討する。したがって、I g M 抗体の組合せ（混合剤として）またはビヒクル対照による静脈内処置を、損傷の 10 分後に施す。運動評価項目を、上記の通りにモニタリングする。さらに、髄鞘形成および神経突起成長を評価して、抗体の組合せによりもたらされる変化を検討する。評価した組合せを、表 6 A および表 6 B に示す。

30

【 0 3 0 7 】

【表 6 A】

表 6A:処置群の概要:組換え IgM 抗体組合せ

処置	想定される 組織学的 結果	用量レベ ル (mg/kg:静 脈内)	神経学的 評価	組織学的評価	
ビヒクル (生理食塩 液)	該当なし	0	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	10
IgM12 + IgM42	神経突起成長+ 神経突起成長	0.25 0.25	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	
IgM22 + IgM46	再ミエリン化+ 再ミエリン化	0.25 0.25	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	
IgM12 + IgM22	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	20
IgM12 + IgM 46	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	
IgM42 + IgM22	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	
IgM42 + IgM46	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	BBB スコア	電子顕微鏡法による髄鞘形成 立体法による神経突起成長	30

【 0 3 0 8 】

【表 6 B - 1】

表 6B:処置群の概要:結果

処置	想定される 組織学的 結果	用量レベル (mg/kg:静脈 内)	組織学的結 果の種類(複 数可)	相対的な組織学的 転帰:結果の種類 (複数可) ^(*)	相対的な神経学的 転帰: BBB スコア ^(*)
ピヒクル (生理食塩 液)	該当なし	0	なし	なし	なし
IgM12 + IgM42	神経突起成長+ 神経突起成長	0.25 0.25	神経突起成長	(IgM12 による X+の 神経突起成長)およ び(IgM42 による X+ の神経突起成長)よ り大きな神経突起 成長	(IgM12 による X+の BBB)および(IgM42 による X+の BBB) より大きな BBB の 改善
IgM22 + IgM46	再ミエリン化+ 再ミエリン化	0.25 0.25	髄鞘形成	(IgM22 による X+の 再ミエリン化)およ び(IgM46 による X+の 再ミエリン化)より大 きな再ミエリン化	(IgM22 による X+の BBB)および(IgM46 による X+の BBB) より大きな BBB の 改善
IgM12 + IgM22	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長 および再ミエリ ン化	(IgM12 による X+の 神経突起成長)およ び(IgM22 による X+ の再ミエリン化)より 大きな再ミエリン化 および 神経突起成長	(IgM12 による X+の BBB)および(IgM22 による X+の BBB) より大きな BBB の 改善
IgM12 + IgM 46	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長 および再ミエリ ン化	(IgM12 による X+の 神経突起成長)およ び(IgM46 による X+ の再ミエリン化)より 大きな再ミエリン化 および 神経突起成長	(IgM12 による X+の BBB)および(IgM46 による X+の BBB) より大きな BBB の 改善
IgM42 + IgM22	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長 および再ミエリ ン化	(IgM42 による X+の 神経突起成長)およ び(IgM22 による X+ の再ミエリン化)より 大きな再ミエリン化 および	(IgM42 による X+の BBB)および(IgM22 による X+の BBB) より大きな BBB の 改善

10

20

30

40

【表 6 B - 2】

				神経突起成長	
IgM42 + IgM46	神経突起成長+ 再ミエリン化	0.25 0.25	神経突起成長 および再ミエリ ン化	(IgM42 による X+の 神経突起成長)およ び(IgM46 による X+ の再ミエリン化)より 大きな再ミエリン化 および 神経突起成長	(IgM42 による X+の BBB)および(IgM46 による X+の BBB) より大きな BBB の 改善

10

【0310】

(*) X は改善を示し、X + は一層の改善を示し、X + + はなお一層の改善を示す。改善スコアの値は、所与の抗体の用量と関係する。したがって、X + を、その同じ抗体について X より大きな改善とする。1つの抗体についての改善 X は、他の抗体についての X 値と必ずしも同じではなく、1つの抗体の X + 値は、他の抗体の X + 値と必ずしも同じではなく、1つの抗体の X + + 値は、他の抗体の X + + 値と必ずしも同じではない。

【0311】

この実験では、組換え抗体の組合せである I g M 1 2 + I g M 4 2、I g M 2 2 + I g M 4 6、I g M 1 2 + I g M 2 2、I g M 1 2 + I g M 4 6、I g M 4 2 + I g M 2 2、および I g M 4 2 + I g M 4 6 の各々が、B B B パラメータを介して見出される後肢機能（運動評価項目）の統計学的に有意で用量依存的な改善をもたらすことが見出される。性別に基づく改善の差は見出されない。

20

【0312】

さらに、これらの組合せの各々は、運動機能を、同じ用量における抗体の各々単独による改善と比較して相加的を超える（すなわち、相乗的）な形で改善することが見出される。ここでもまた、性別に基づく改善の差は見出されない。

【0313】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 1 2 + I g M 4 2 の組合せは、神経突起成長を、ビヒクルによる対照と比較して有意に（ $p < 0.05$ ）増強した。神経突起成長度は、単独で投与される各抗体の相加的効果と比較して相乗的である。したがって、これらの抗体は、異なる作用機構を介して成長を誘発し、これは、これらの抗体の神経組織へのそれぞれに異なる結合パターンと符合することが理解される。

30

【0314】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 2 2 + I g M 4 6 の組合せは、髄鞘形成の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらした。さらに、再ミエリン化度は、単独で投与される I g M 2 2 または I g M 4 6 について予測される相加的効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

40

【0315】

50

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 1 2 + I g M 2 2の組合せは、損傷している脊髄における髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 1 2またはI g M 2 2それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

10

【0316】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 1 2 + I g M 4 6の組合せは、髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 1 2またはI g M 4 6それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

20

【0317】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 2 2 + I g M 4 2の組合せは、髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 2 2またはI g M 4 2それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

30

【0318】

被毛状態、歩行パラメータ、およびロータロッドスコアを含めた多様な感覚運動の評価項目において、ビヒクルによる処置と比較して統計学的に有意（各評価項目について、ビヒクルによる処置と比較して： $p < 0.05$ ）で用量依存的な改善をもたらすことに加えて、I g M 4 6 + I g M 4 2の組合せは、髄鞘形成ならびにニューロン成長の、ビヒクルによる処置の対照と比較して有意な（ $p < 0.05$ ）増大をもたらす。さらに、ニューロン成長および再ミエリン化の程度は、この例で用いられる用量において単独で投与されるI g M 4 6またはI g M 4 2それぞれの効果と比較して相乗的である。理論に束縛されずに述べると、これは傍分泌活性の結果であると理解される。したがって、成長しつつあるニューロンおよび成長しつつある希突起膠細胞の各々が存在する場合、これらの細胞は、それぞれ、評価される他の細胞型に正の影響を及ぼす傍分泌生成を誘発する。

40

【0319】

（実施例18）

ヒトニューロン結合I g Mである組換えr H I g M 1 2抗体は脊髄軸索を保護する

本発明者らは、天然ヒト血清抗体であるs H I g M 1 2が、*in vitro*においてニューロンに結合し、神経突起成長を促進することを裏付けた。本発明者らは、同一の特性を伴う組換え形態であるr H I g M 1 2を生成させた。サイラーマウス脳脊髄炎ウイルス

50

ス (T M E V) による感受性マウス株の脳内感染は、多発性硬化症の進行性の形態と同様の進行性の軸索喪失および神経機能不全を伴う慢性脱髄性疾患を引き起こす。このモデルを、希突起膠細胞に結合する I g M クラスの抗体で処置すると、C N S の再ミエリン化が改善される (W a r r i n g t o n ら (2 0 0 7 年) 、 J N e u r o s c i R e s 、 8 5 巻 : 9 6 7 ~ 9 7 6 頁) 。 これに対し、ニューロンに結合する血清由来のヒトモノクローナル抗体 (s H I g M 1 2) は、ラミニンと同程度に頑健な神経突起成長を促進し、C N S ミエリンの神経突起成長に対する阻害効果を低減する (W a r r i n g t o n ら (2 0 0 4 年) 、 J N e u r o p a t h o l E x p N e u r o l 、 6 3 巻 (5 号) : 4 6 1 ~ 4 7 3 頁) 。 より近年には、上記と同一の生物学的特性を伴うヒト s H I g M 1 2 の組換え形態 (r H I g M 1 2) を生成させた。r H I g M 1 2 の脊髄軸索の完全性に対する効果を研究するために、本発明者らは、解剖学的に連続であり、機能的に保存された軸索に依拠する技法である逆行標識法を実施した。

10

【 0 3 2 0 】

方法

逆行標識法：マウスに麻酔をかけた後、下部胸椎 (T 1 0 ~ 1 1) において背部椎弓切除を実施した。脊髄を右側において片側切断し、片側切断部位に 4 % F l u o r o g o l d の滅菌溶液を充填した。手術の 1 週間後、マウスを屠殺し、脳を摘出した。脳幹の連続切片 (4 0 m m 厚) を作製し、切片を 4 枚ごとに解析した。16 枚の脳幹スライスから、大型で明るい蛍光ニューロンを、200 倍の拡大率下でカウントした。

20

【 0 3 2 1 】

結果

T M E V モデルは、神経保護を促進し、軸索喪失を防止する戦略を開発するためのプラットフォームをもたらす。疾患の早期は炎症および脱髄を包含し、後期は軸索喪失および機能欠損を提示する。前出例で詳述し、共焦点顕微鏡画像 (図 1 5) を介して確認される通り、1 m g の単回腹腔内注射の後、r H I g M 1 2 は脊髄に入り、ニューロフィラメント + (N F) の軸索に局在化する。r H I g M 1 2 はまた、クロスカット形として N F + 神経線維束にも共局在化する (図 1 5 D) 。動物研究では、r H I g M 1 2 が、逆行標識した脳幹ニューロン数を増大させる。感染の 9 0 日後 (d p i) に、r H I g M 1 2 または生理食塩液を S J L マウスに投与した。処置の 9 週間後に、逆行標識法のための脊髄手術を実施した。手術の 1 週間後、マウスを屠殺し、脳幹の連続切片により、蛍光標識したニューロンを定量化した。r H I g M 1 2 は、生理食塩液対照と比較して逆行標識した脳幹ニューロン数を増大させる (データは示さない) 。したがって、r H I g M 1 2 で処置したマウスの逆行標識した脳幹ニューロンは、生理食塩液で処置した対照と比較して増大した。

30

【 0 3 2 2 】

(実施例 1 9)

ニューロン結合ヒトモノクローナル抗体の単回投与はマウス脱髄モデルにおける自発活動を改善する

本発明者らの実験室は、天然ヒト血清抗体である s H I g M 1 2 が、i n v i t r o においてニューロンに結合し、神経突起成長を促進することを裏付けた。本発明者らは、同一の特性を伴う組換え形態である r H I g M 1 2 を生成させた。サイラーマウス脳脊髄炎ウイルス (T M E V) による感受性マウス株の脳内感染は、結果として、多発性硬化症の進行性の形態と同様の進行性の軸索喪失および神経機能不全を伴う慢性脱髄性疾患をもたらす。r H I g M 1 2 の T M E V 感染マウスの運動機能に対する効果を研究するため、本発明者らは、夜間における自発活動を、何週間にもわたってモニタリングした。通常は活動的な夜間のモニタリング時間において最大限の活動変化が生じることが予測されるため、夜間挙動は、齧歯動物の神経機能についての高感度の尺度である。ベースラインの自発活動についてまとめるため、マウスを、処置前に 8 日間にわたり活動ボックスに入れた。処置後、各群における活動を 8 週間にわたり持続的に記録した。本発明者らは、以下の 2 つの理由で 8 週間にわたる長期のモニタリング期間を選択した：(1) 本発明者らは既

40

50

に、I g M誘導性再ミエリン化が、処置後5週間までに示されると裏付けたこと、および(2)この株におけるT M E V誘導性脱髄性疾患の進行は極めて遅いこと。長期の観察期間および大規模なデータセットに起因して、フィルタリングされていない元の記録を研究しながら、処置群間の差異を察知することは困難でありうる。高度に変動的な元のデータにおける変化を明確に詳述するために、本発明者らは、3つの異なる方法：(1)ビニング法、(2)ガウスローパスフィルター(G F)の適用、および(3)多項式近似を適用した。3つの方法の各々を用いて、本発明者らは、r H I g M 1 2による早期の処置が、水平方向の運動機能および垂直方向の運動機能のいずれにおいても、対照のI g Mおよび生理食塩液と比較して改善を誘導するのに対し、後期の処置が改善するのは水平方向の活動だけであることを示した。r H I g M 1 2は、正常な非感染マウスの活動を変化させな

10

【0323】

序説

齧歯動物の疾患モデルにおける、長期にわたる神経機能のモニタリングおよび解析は、依然として難題である。通常は活動的な夜間のモニタリング時間において最大限の活動変化が生じることが予測されるため、夜間挙動は、齧歯動物の神経機能についての高感度の尺度である[1]。しかし、進行が緩徐な疾患の動物モデルでは、機能状態のモニタリングが数週間にわたることが多い。本発明者らは既に、希突起膠細胞結合抗体(r H I g M 2 2)が、処置後5週間までに、再ミエリン化を増強することを報告した[2]。疾患および修復の発生のいずれもが緩徐な過程であることを考え合せ、かつ、活動における任意の変動を確かに考慮に入れるために、本発明者らは、短期のモニタリングにおいて用いられるサンプリング密度と同じサンプリング密度で、長期にわたる活動をモニタリングする。これにより、大規模で高度に変動的なデータセットが創出された(図32A、C)。処置後の変化を明確に詳述し、長期の活動における一般的な傾向を復元するために、本発明者らは、Mathematica(Wolfram Research, Inc.)を用いることにより、データビニング、ガウスフィルタリング、および多項式近似の使用を比較した。

20

【0324】

サイラーマウス脳脊髄炎ウイルス(T M E V)による感受性マウス株の脳内感染は、結果として、多発性硬化症の進行性の形態と同様の進行性の軸索喪失および神経機能不全を伴う慢性脱髄性疾患をもたらす[3]。このモデルを、希突起膠細胞に結合するI g Mクラスの抗体で処置すると、C N Sの再ミエリン化が改善される[4]。これに対し、ニューロンに結合する血清由来のヒトモノクローナル抗体(s H I g M 1 2)は、ラミニンと同程度に頑健な神経突起成長を促進し、C N Sミエリンの神経突起成長に対する阻害効果を低減する[5]。より近年には、上記と同一の生物学的特性を伴うヒトs H I g M 1 2の組換え形態(r H I g M 1 2)を生成させた。本発明者らは、r H I g M 1 2の半減期は3.6時間であるが、なおも血液脳関門を越え、神経組織に結合することを既に示した(未刊行の観察)。r H I g M 1 2のT M E V感染マウスの活動に対する効果を研究するため、本発明者らは、AccuScan活動ボックス(AccuScan Instruments, Inc., Columbus, OH)を用いて夜間における自発活動を数週間にわたってモニタリングした。本発明者らは、以下の2つの理由で8週間にわたる比較的長期のモニタリング期間を選択した：(1)I g M誘導性再ミエリン化が、処置後5週間までに示されること、および(2)この株におけるT M E V誘導性脱髄性疾患の進行は、M Sの純粹に自己免疫的なE A Eモデルと比較して極めて遅いこと[6]。既に刊行された研究と比較して長期の観察期間(表7)に起因して、生データの目視により変化を同定することは、困難であるとわかった。

30

40

【0325】

【表 7】

表 7

本研究と比較した、公表された研究における自発活動のモニタリングの長さ

刊行物	記録された運動活動セッションの長さ
Mikami ら、2002 年、2004 年[14、15]	10 分間(馴化を 10 分間とする)
Melnick および Dow-Edwards、2001 年[16]	60 分間(馴化なし)
Chen ら、2005 年[17]	30 分間(馴化なし)
Torres-Reveron および Dow-Edwards、2006 年[18]	60 分間(馴化を 20 分間とする)
Zhu ら、2007 年[19]	60 分間(馴化なし)
Li ら、2009 年[20]	3 時間(馴化を 1 時間とする)
(Rivera-Quinones ら、1998 年;McGavern ら、1999 年[1、21])	3 日間(馴化なし)
本研究	64 日間(馴化を 8 日間とする)

10

20

【 0 3 2 6 】

材料および方法

マウス：S J L / J マウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) を、Mayo Clinic の動物ケア施設に収容し、飼育した。動物用のプロトコルは、Mayo Clinic の Institutional Animal Care and Use Committee により承認された。

30

【 0 3 2 7 】

脱髄のサイラーウイルスモデル：脱髄性疾患は、6 ~ 8 週齢の雌マウスにおいて、TMEV の脳内注射を介して誘導した。27 ゲージの注射針により、Daniel 株の TMEV 2.0×10^5 プラーク形成単位を含有する $10 \mu\text{l}$ を送達した。この結果、発症率を $> 98\%$ とするが致死性はまれな感染がもたらされた。全ての動物は、2 週間以内に消失する軽度の脳炎を発症した。動物は、次の 6 ~ 8 カ月間において、慢性脊髄脱髄性疾患により増悪した。軸索損傷および軸索喪失は感染の 3 カ月後に始まり、神経機能不全と相関する [3]。

40

【 0 3 2 8 】

抗体による処置：S J L マウス (非感染、感染の 45 日後および 90 日後) を、0.5 ml の PBS 中に溶解させた抗体 (rHlgM12 またはアイソタイプの IgM 対照) 200 μg の単回腹腔内投与で処置した。第 3 群は、0.5 ml の PBS だけで処置した。

【 0 3 2 9 】

自発活動のモニタリング：自発運動の活動は、Digiscan open field (OF) 装置 (Omnitech Electronics ; Columbus, OH) および Versamax ソフトウェア、v. 4.12 - 1 AFE (Accuscan Instruments, Inc.、Columbus, OH) により記録した。この装置は、2 セットの光電管を保持する金属製フレームにより支持される 6 つのアクリル製ケ

50

ージ(40×40×30.5cm)からなる。このデバイスは、投射された赤外線ビームの遮断回数を集計することにより、水平方向の運動および垂直方向の運動の個別の数を測定する。全てのケージにおいて、マウスを、以下の同一の環境状態に曝露した：(a)食物および水を自由に摂取可能とすること、(b)通常の12時間の明/暗周期、(c)周囲温度を70°Fとすること。各実験において、活動過剰の動物、および、まれな場合には、体重過剰の動物は除外し、残りのマウスを無作為化した。S J Lマウス5匹ずつの複数の群を各ケージの中央に入れ、連続8日間にわたり、ベースラインの自発活動についてまとめた。この期間の後、ベースラインの活動が最も類似する3つの群のマウスを、r H I g M 1 2、対照のI g M抗体、または生理食塩液で処置し、次いで、8週間にわたりモニタリングした。1時間のブロック当たりのビーム遮断回数としてデータを収集した。水平方向および垂直方向の全活動は、V e r s a d a tプログラム、v . 3 . 0 2 - 1 A F E (A c c u s c a n I n s t r u m e n t s)を用いて記録した。本発明者らは、これがI n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e (I A C U C)により許容される最大限の動物数であるため、活動ボックス1つ当たりに5匹を超える動物を入れることができなかった。

10

20

30

40

50

【0330】

データ解析：フィルタリングされていない元の記録を研究しながら、処置群間の差異を察知することは困難でありうる(図32A~C)。高度に変動的な元のデータにおける緩徐な傾向を復元するために、本発明者らは、3つの異なる方法：(1)ビンニング法、(2)ガウスローパスフィルター(GF)の適用、および(3)多項式近似を適用した。

【0331】

データビンニングとは、最も単純な方法であり、あらかじめ選択したビン内のデータ点を群を、それらの平均値で置換する。本発明者らの場合、本発明者らは、マウスの活動が夜間にピークとなることを踏まえ、夜間におけるビンを選択した。したがって、本発明者らは、図33A、33B、35C、35D、37C、および37Dに示す通り、全ての夜間におけるリーディング(12時間/日)を、それらの平均値で置換した。群の比較は、処置1回当たり12時間にわたる有効な試料サイズを伴う平均の差異についての単純なt検定を介して実施することができる。これらの比較は単純であるが、各時点における試料サイズが小型である結果として標準誤差が大きくなり、統計学的な比較の使用は限定されたものとなる。全体的に、データビンニングは、ノイズの多いデータを可視化するのに有効な方法であるが、統計学的検定のための使用は限定されたものとなる。

【0332】

ガウスフィルタリング(GF)(また、ローパスフィルタリング、データの平滑化、または感度の増強としても公知である)は、フーリエ変換分光法および画像処理において一般に用いられるノイズ低減手順である[7]。ガウスブロードニング(GB、日単位)の適切な選択により実施されるGFにより、高頻度の変動が、所望のレベルで除去された。フィルターの選択は任意であり、予測される活動変化の割合を指針とすることができる。GFは、影響がガウス関数に従い減衰するように、両側の値から採取した点からの情報を用い、これらの点の影響を考慮する平滑化法である。コンピュータ利用について述べると、GFは、以下の2つの同等な方式で実装することができる：1)データをフーリエ変換(FT)した後、ガウス関数で乗じ、この積のFTの逆数を取る方式、および2)ガウス核によるデータの直接的なコンボリューション。高レベルのソフトウェアパッケージ(M a t l a b (M a t h w o r k s) または M a t h e m a t i c a (W o l f r a m)) では、ガウスフィルター関数が、使用者によるプログラミングを最小限とするかまたはプログラミングを伴わずに利用可能である。GBを適切に選択すれば、上記で詳述したGF法により、高度に複雑かつ異質なデータの単純な可視化が可能となる。GFの1つの限界は、GFにより傾向の容易な可視化が可能となる一方で、GBを選択することにより、統計学的な比較が複雑化することである。

【0333】

比較のために、かつ、単純な統計学的比較を可能とする方法を裏付けるために、本発明

者らは、多項式でデータを近似する。これらのモデルは、任意の次数 (x^n) までの多項式の項を許容し、各処置群について個別の形態パラメータ (相互作用項) を推定した。本発明者らによる6次多項式の選択は、複数の選択肢を探索した後の恣意的なものであったが、ある時間にわたる非線形効果をモデル化するのに十分な柔軟性を可能とした。次数を変化させる多項式を用いて異なる処置群を最適な形で近似したため、本発明者らは、高次における柔軟性を可能とすることを選択した。Akaike Information Criteria (AIC) を用いて、多項式系による複数の処置群にわたる「最良の近似」を決定した [8]。AICとは、さらなる項を足し合わせることにより R^2 の増分を相殺するが、過剰複雑性 (すなわち、自由度の使用) にはペナルティーを科すモデル比較の方法である。AICによれば、一般に、3次の近似が、データの傾向を捕捉するのに十分とされ、場合によっては、2次近似、なおまたは線形近似が「最良」とされた。しかし、本発明者らの主な目標は、観察される時点における処置群を比較することであった。データ点が多数であり、本発明者らは、多項式近似を用いて、本発明者らの観察データ以外の処置値を予測する (または外挿する) わけではないため、結果に対する「過剰近似」の影響は最小限である。

10

20

30

40

50

【0334】

多項式近似の1つの利点は、処置群の統計学的な比較が単純であり、指定した時点において、予測されるモデル値およびそれぞれの標準誤差を用いて処置を比較しうることである。直接的な対応のある処置の比較は、時間枠の全体にわたり、定期的な間隔で実施して、処置群が有意に異なったときを決定することができる。最後に、多項式近似は、さらなる中程度頻度および低頻度のノイズを除去し、これにより、時間枠の全体にわたり、視覚的注意の焦点が一般的な傾向に当てられる。

【0335】

しかし、実験の各々においては、一部の群のマウスのベースラインにおける水平方向および垂直方向の活動 (8日間) が、何らかの形で異なっていた。したがって、本発明者らはまず、Z値を用いて、各群について個別にベースラインの活動を標準化し、次いで、これらの値に対して、ガウスフィルタリングを実施するか、または多項式を近似するした。

【0336】

統計学的な解析: Mathematica (Wolfram) で書かれたマクロプログラムを用いることにより、データのビニングおよびガウスローパスフィルターによるデータの平滑化を実施した。マクロプログラムおよび指示書は、mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/rodriguez_lab/software.cfmにおいて入手可能である。z統計 (SAS Institute, Inc.) に基づいて予測されるモデル値およびそれぞれの標準誤差を用いて、多項式回帰モデルおよび処置群の統計学的比較を実施した。直接的な対応のある処置の比較は、時間枠の全体にわたる各日において実施し、統計学的な有意性は、閾値を典型的な $\alpha = 0.05$ として決定した。多重比較のための調整は行わなかった。

【0337】

結果

感染の90日後において施すと、rH1gM12はS/JLマウスにおける水平方向の活動を改善する

感染の90日後 (dpi) におけるS/JLマウス5匹ずつの3つの群を活動ボックスに入れ、連続8日間にわたりベースラインの活動を測定した。2つの群のマウスを、rH1gM12またはアイソタイプの対照IgM 200 μ g ずつの単回投与で処置した。第3群は、生理食塩液で処置した。処置後、自発活動を、8週間にわたり持続的に記録した。データは、1時間のブロックで収集したため、本発明者らは、各群について約900ずつのデータ点を得た。この元の生データ (図32A~C) は高度に変動的であるので、処置群間の差異を察知することは困難でありうる。3つの方法 (ビニング法、ガウスフィルタリング、および多項式近似) 全てにより、rH1gM12で処置したマウスが、水平方向の活動における改善を示すのに対し、対照のIgMおよび生理食塩液で処置したマウスは

、8週間にわたり活動の変化を示さないことが明らかとなった(図33A、C、およびE)。多項式近似の後、本発明者らは、3つの処置についての直接的な対応のある比較を用いて、rHIGM12処置マウスにおける水平方向の運動機能の改善が、処置の7日後(対照のIGMと比較して)および11日目において(生理食塩液と比較して)統計学的に有意となることを決定した(図34)。rHIGM12処置動物の水平方向の夜間活動において観察される改善は、約30日間にわたり持続し、次いで、ベースラインレベルに戻った。生理食塩液処置群の対照IGM処置群と対比した対応のある比較は、38~52日目にわたり統計学的な有意性を示した。しかし、rHIGM12処置群と対照との間で観察される主要な差異と比較した場合、本発明者らは、対照群間におけるこれらの差異は、生物学的に有意ではないと考える。他方、垂直方向の活動は、主要な差異を示さず、3つの群全てにおいて同様であった(図33B、D、およびF)。

10

【0338】

感染の45日後に施すと、rHIGM12はSJLマウスにおける水平方向および垂直方向の活動を改善する

以前の研究では、垂直方向の活動(後肢による立脚拳動)を主要なリードアウトとして用いた[1]。慢性TMEV感染マウスでは、軸索の脱落に起因して、後肢が徐々に脆弱となり、こわばるので、後肢による立脚が低減された。この研究の第1の実験では、rHIGM12を、脱髄が最大となり、進行性の軸索喪失が始まる時点で投与した(感染の90日後)ところ、水平方向の活動だけが改善された。後肢による立脚拳動は影響を受けず、3つの処置群全てにおいて同等であった。したがって、本発明者らは、早期の時点における処置がより有益でありうるか否か問うた。第2の実験では、マウス5匹の群を、感染の45日後に、rHIGM12、アイソタイプの対照IGM、または生理食塩液200μgずつの単回投与で処置した。同一の実験デザインを用い、ベースラインの活動を8日間にわたり収集し、処置後の活動を8週間にわたり収集した。処置の約2週間後に始まるこの実験では、rHIGM12で処置したマウスが、水平方向および垂直方向のいずれの活動においても明らかな改善を示した。これは、3つの方法の全て:データの平均化、ガウスフィルターまたは多項式近似の適用を用いた後で明らかとなった(図35C~H)。対照のIGMおよび生理食塩液で処置したマウスは、研究の終了まで同様の活動レベルを示した。rHIGM12で処置したマウスでは、実験が終了するまで、水平方向の活動の改善が明らかであった。他方、垂直方向の活動の改善は、約4週間にわたって続き、次いで、ベースライン値へと低下した。3つの処置についての直接的な対応のある比較は、rHIGM12で処置したマウスにおける水平方向の運動機能の改善が、処置の13日後において(対照のIGMと比較して)、および処置の9日後において(生理食塩液と比較して)有意に異なることを示した(図36AおよびC)。同様に、rHIGM12で処置したマウスにおける垂直方向の運動機能の改善も、処置の14日後において(対照のIGMと比較して)、および処置の6日後において(生理食塩液と比較して)有意に異なった(図36BおよびD)。対照のIGM処置群を生理食塩液処置群と対比する比較は、水平方向の活動または垂直方向の活動のいずれについても大きな生物学的差異を明らかにしなかった(図36EおよびF)。

20

30

【0339】

rHIGM12は正常の非感染マウスにおける自発活動を変化させない

以前の2つの実験におけるrHIGM12による処置は、神経障害を来した感染マウスにおいて明らかに有益な効果を示した。この抗体が刺激性の特性を有し、したがって、運動機能の増大を誘発する可能性を除外するために、本発明者らは、非感染マウスによる同様の実験を実施した。週齢を一致させた非感染マウスの3つの群を、rHIGM12、対照のIGM、または生理食塩液で処置した。感染マウスにおける活性の増強と比較して、rHIGM12、ならびに、他の2つの処置は、正常マウスの運動機能の増大を誘導しなかった(図37)。3つの群全てが、自発活動の低下傾向を示した。この結果は、いずれの抗体も、正常マウスにおける活動の増大に影響を及ぼさないことを示す。

40

【0340】

50

考察

多発性硬化症のほか、他の脱髄性疾患および神経変性疾患のための神経保護療法を開発することが火急に必要なとされている。炎症性CNS疾患における軸索損傷の軽減を間接的にもたらしうる抗炎症薬も存在するが、ニューロン/軸索のレベルで直接作用する薬物は存在しない。神経保護の主要な目標は、ニューロンの機能不全を限定し、ニューロンおよび軸索の機能的完全性を維持しようと試みることである。多年にわたり、MSの病理学的顕徴である脱髄は、永続的な神経欠損の原因であると考えられた。今日では、脱髄が永続的な軸索喪失に必要ではあるが十分ではないことが明らかである[9]。脱髄だけが、露出された軸索に、T細胞の細胞傷害作用または死滅した希突起膠細胞に由来する局所性の神経栄養性の支持の喪失により引き起こされる続発的損傷に対する素因を与える[10]

10

【0341】

ニューロン結合抗体であるsHlgM12が、頑健な神経突起伸長を促進したという以前の観察[5]は、*in vitro*における明らかに有益な応答を表す。この抗体の組換え形が、*in vitro*において同様の特性を示したため、本発明者らは、それがTMEV誘導性脱髄性疾患を伴うマウスの運動活動に影響を及ぼすか否か問うた。運動機能の解析は、夜間における自発活動をモニタリングすることにより実施した。第一に、本発明者らは、脱髄が最大となり、軸索喪失が始まる時点(感染の90日後)において、マウスを処置した。処置の8週間後、rHlgM12が、水平方向の運動活動だけを改善したのに対し、垂直方向の活動は影響を受けなかった。しかし、疾患の早期に(感染の45日後に)マウスを処置したところ、rHlgM12は、水平方向および垂直方向のいずれの活動も改善した。慢性TMEV誘導性疾患では、後肢による立脚挙動(垂直方向の活動)への影響が最も重度であり、この活動の一因となる軸索の変性および喪失は、不可逆性であると考えられる。この結果、これらの軸索の損傷が不可逆的ではない疾患の早期が、処置に理想的な時点であると考えられる。Jonesらは、EAEモデルを用い、軸索の脱落と運動機能とを研究することにより、神経保護薬による処置は、疾患の早期、運動欠損が始まるさらに前に開始すべきであるという同一の枠組みを提起した[11]。第二に、機能的改善が生じるのは処置後2週間以内であり、約25~30日間後には減衰し始めるため、運動機能を維持するには、処置を反復することが必要でありうる。本発明者らの研究では残念ながら、結果としてアナフィラキシーをもたらず、マウスにおける抗ヒト抗体免疫反応のために、ヒトIgMの複数回投与を検証することが可能ではなかった。A2B5とは、神経突起成長もまた促進する[5]マウスモノクローナル抗体であり、機能的転帰およびその作用の持続時間に対する複数回投与対単回投与を検証することが可能な候補抗体を表す。最後に、いずれの処置も、非感染の正常動物の運動機能には効果を及ぼさなかった。処置に関わらず、正常マウスの全ての群は、自発活動の漸進的な低下を示したが、これは、環境への馴化により説明することができる。正常動物におけるこの活動の低下は、rHlgM12により誘導される、疾患マウスの活動の増大をさらにより印象的なものとする。

20

30

【0342】

本発明者らは、神経欠損の発症を防止することが一般に極めて困難であった、炎症性脱髄性疾患の慢性進行性モデルにおける運動機能の改善を裏付けた。したがって、ニューロン結合モノクローナル抗体rHlgM12は、ヒトMSを処置するだけでなく、また、他の脱髄性障害または神経変性障害を処置するためにも極めて有望な治療剤を表す。加えて、臨床的に無症状のMSによる侵襲例も見られるため[12、13]、本発明者らは、神経保護的化合物を免疫調節剤で補完すべきであることも提起した[11]。本発明者らは、免疫調節剤薬とrHlgM12とによる組合せ処置が、軸索損傷後におけるCNSの保存および修復の著明な増強を結果としてもたらしうることを提起する。

40

【0343】

まとめると、この研究による結果は、以下の3つの重要な結論を提示する：1) 処置を施す病期が極めて重要である(早期の処置ほど有益性が増大する)こと；2) 運動機能の

50

改善をさらに維持するには、処置の反復が必要でありうること；および3) r H I g M 1 2 が毒性ではなく、正常な非感染動物における運動機能には影響を及ぼさないこと。これらの知見は、ニューロンを標的とする組換え抗体が、慢性軸索脱髄モデルにおける神経機能を改善するという仮説と符合する。

【 0 3 4 4 】

【 数 9 】

参考文献

1. McGavern, D.B., et al., *Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination*. *Exp Neurol*, 1999. **158**(1): p. 171-81. 10
2. Warrington, A.E., et al., *Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(12): p. 6820-5.
3. McGavern, D.B., et al., *Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis*. *Brain*, 2000. **123 Pt 3**: p. 519-31.
4. Warrington, A.E., et al., *A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose*. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(5): p. 967-76.
5. Warrington, A.E., et al., *Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. **63**(5): p. 461-73. 20
6. Denic, A., et al., *The relevance of animal models in multiple sclerosis research*. *Pathophysiology*, 2010. **18**(1): p. 21-9.
7. Hoch, J.C. and A.S. Stern, *NMR Data Processing*. 1 ed 1996, New York: Wiley- Liss. 230.
8. Akaike, H., *A new look at the statistical model identification*. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 1974. **19**(6): p. 716-723.
9. Howe, C.L., J.D. Adelson, and M. Rodriguez, *Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination*. *Neurobiol Dis*, 2007. **25**(2): p. 354-9.
10. Rodriguez, M., *A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis*. *Brain*, 2003. **126**(Pt 4): p. 751-2. 30
11. Jones, M.V., et al., *Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol*, 2008. **199**(1-2): p. 83-93.
12. Jacobs, L., P.R. Kinkel, and W.R. Kinkel, *Silent brain lesions in patients with isolated idiopathic optic neuritis. A clinical and nuclear magnetic resonance imaging study*. *Arch Neurol*, 1986. **43**(5): p. 452-5.
13. Pohl, D., et al., *Pediatric multiple sclerosis: detection of clinically silent lesions by multimodal evoked potentials*. *J Pediatr*, 2006. **149**(1): p. 125-7.
14. Mikami, Y., et al., *A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note*. *J Neurosurg*, 2002. **97**(1 Suppl): p. 142-7. 40
15. Mikami, Y., et al., *Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery*. *J Neurosci Res*, 2004. **76**(4): p. 453-65.

【 0 3 4 5 】

【数 1 0】

16. Melnick, S.M. and D.L. Dow-Edwards, *Differential behavioral responses to chronic amphetamine in adult male and female rats exposed to postnatal cocaine treatment*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001. **69**(1-2): p. 219-24.
17. Shen, H., et al., *Inosine reduces ischemic brain injury in rats*. *Stroke*, 2005. **36**(3): p. 654-9.
18. Torres-Reveron, A. and D.L. Dow-Edwards, *Prenatal cocaine dampened behavioral responses to methylphenidate in male and female adolescent rats*. *Neurotoxicol Teratol*, 2006. **28**(2): p. 165-72.
19. Zhu, N., J. Weedon, and D.L. Dow-Edwards, *Oral methylphenidate improves spatial learning and memory in pre- and periadolescent rats*. *Behav Neurosci*, 2007. **121**(6): p. 1272-9.
20. Li, X., et al., *Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor-knockout mice*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009. **204**(1): p. 1-11.
21. Rivera-Quinones, C., et al., *Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis*. *Nat Med*, 1998. **4**(2): p. 187-93.

10

【0 3 4 6】

(実施例 2 0)

運動ニューロン疾患である ALS を処置するためのニューロン保護的ヒトモノクローナル抗体

20

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) とは、主に前角細胞および皮質脊髄路ニューロンを損なう深刻な神経疾患である。ALS とは、脳および脊髄における運動細胞の進行性の変性を特徴とする運動ニューロン疾患である。運動細胞 (ニューロン) は、個体が動き回り、話し、呼吸し、嚥下することを可能とする筋肉を制御する。神経がそれらを活性化しなければ、筋肉は徐々に脆弱化し、失われる。広範な研究にもかかわらず、この障害の病因は、大部分未知であり、有効な処置は見られない。ALS のまれな遺伝子形態を伴う少数の患者において関与する遺伝子により、この障害に対する潜在的な鍵がもたらされる [1]。同定された 1 つの遺伝子変異は、Cu / Zn SOD (銅 / 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ) 変異であり、これは、ALS の遺伝子形態を伴う患者のうちのわずかな比率において存在する [2]。SOD 変異を保有する患者は、関連の遺伝子変異を伴わずにこの疾患を自発的に発症する患者と比較して、神経学的転帰が酷似することが明らかである [3]。この酵素は、スーパーオキシドを触媒して、酸素および過酸化水素をもたらす。SOD 1 とは、ALS と関連する酵素形態である。軸索輸送を急速に損なう SOD 1 の機能獲得が認められると考えられている [4]。家族性 ALS における SOD 変異の頻度は 1 2 ~ 2 3 % で変化し、この遺伝子は通常、常染色体優性遺伝子として遺伝する。

30

【0 3 4 7】

この遺伝子を同定することにより、新たな薬物をデザインし、調べるための、ALS の疾患特徴を伴う動物モデルの開発が可能となった。ALS の遺伝形態と非遺伝形態とは類似の疾患であるため、根底的な原因は、関連している可能性がある。したがって、遺伝性 ALS のマウスモデルにおいて有効な薬物はまた、ALS のより一般的なランダム形態を伴う患者においても作用する。ヒト SOD 1 遺伝子および ALS の病理学的特徴を伴うトランスジェニックマウスモデルの利用可能性により、この疾患のための薬物の開発が推進されてきた [5]。これらのトランスジェニックマウスは、進行性の運動ニューロン喪失および神経欠損を発症する。ALS の遺伝形態と非遺伝形態とは臨床的に類似するため、運動ニューロン機能における根底的な欠損が関連している可能性がある。SOD 1 関連 ALS において有効な試薬はまた、有病率の高い ALS の散発形態の一助ともなる。現在のところ、ALS 用に市販されている薬物は、グルタミン酸遮断薬である Rilutek (登録商標) (Riluzole 錠) の 1 つに過ぎない。しかし、研究により、この薬物は、患者の生活の質を改善せず、寿命を平均 2 カ月間延長しうるに過ぎないことが示されて

40

50

いる。より有効な薬物が火急に必要とされていることが明らかである。

【0348】

本発明者らの実験室では、中枢神経系（CNS）の脱髄性障害および変性障害を処置するための新規の療法を開発し[6]、CNSにおける修復を誘導することが示されている、希突起膠細胞[7]またはニューロン[8]に結合する一連のヒトモノクローナル抗体（mAb）を同定した。これらの抗体は、クローニングされ、配列決定され[9]、将来の臨床試験のためにGMPグレードの施設で大量に作製されている[10]。組換えヒト抗体IgM12（rHIgM12）は、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症を伴う患者から単離された抗体に由来する[11]。この抗体は、CNSのニューロンおよび軸索を特異的に標識する[8]。IgM抗体であるにもかかわらず、上記の実施例で示した通り、IgM12は、血液脳関門を越え、CNS内の軸索およびニューロンに特異的に結合する。In vitroにおいて、rHIgM12は、小脳顆粒ニューロン、皮質ニューロン、海馬ニューロン、および網膜神経節細胞ニューロンを含めた広範なニューロンに結合する[12]。in vitroにおける実験は、rHIgM12が、ニューロンを細胞死から保護することを裏付ける。ALS（ALSの遺伝形態および自発形態の両方）の早期に患者に投与されたモノクローナル抗体であるrHIgM12は、前角細胞を保護し、軸索損傷を防止し、これにより、身体障害の開始を遅らせ、生存を改善するように作用しうる。

10

【0349】

結果

本発明者らは、G86R hSOD1変異（FVBTg SOD1 G86R M1J wg、Jackson Labs）[13]を伴うマウスを、ヒト抗体rHIgM12で処置する実験を実施した。G86Rマウスは、出生時は正常に見える。しかし、約90～100日齢から、G86Rマウスは、顕著な体重減少を経て、著明な筋肉の萎縮を発症し、急激な体重減少から数週間以内に呼吸器不全で死滅する。LUDOLPH?無作為化「盲検」試験では、これらのマウスが55日齢のときに、GMPグレードで精製されたrHIgM12を、単回腹腔内投与（200μg）として施した。これに対し、プラセボ群には、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）を施した。少数のマウスは未処置のまま放置して、人為的な操作を伴わない疾患の自然経過を決定した。PBS処置マウスおよび非処置マウスについてのデータは同様であったため、これらの群を統計学的な解析のために併合した。マウスは、本発明者らの実験室の1人の試験実施者による処置のために無作為化し、それらが臨死となるまで、別の「盲検処理された」試験実施者に神経欠損について観察させた。処置する試験実施者と、病理学的解析を実施する他の試験実施者とは、コードが解読されるまで無作為化プロトコールについて知らされなかった。

20

30

【0350】

動物は毎週ベースで秤量して、ヒトmAbによる処置が、生存を延長するだけでなく、また、体重減少の開始も遅らせるか否か決定した。結果は驚くべきものであり、rHIgM12を施された動物における生存の、PBSを施された動物と比較して統計学的に有意な延長を示した。試験実施者は、平均で25～30日間にわたる生存の増大（これは、カプラン-マイヤー曲線（図38）を介して統計学的な有意性（ $P = 0.008$ ）を示した）を記録した。加えて、rHIgM12で処置したマウスは、動物の疾患進行の評価において一般に評価されるパラメータである体重の減少[18]がそれほど顕著ではなかった（図39）。本発明者らの知る限り、これは、ニューロンを指向する完全組換えヒトモノクローナル抗体が、ALS表現型を伴う動物の生存を延長するのに有効であることについての最初の実証である。

40

【0351】

動物が臨死期に到達したら、それらを屠殺し、Trump固定剤で灌流した。脊髄を摘出し、1mmのブロックへと切断し、1μm厚の切片用のAralditeプラスチック内に包埋した。これらの切片を組織学的に検討した。SOD変異に由来するALSを発症した動物は、軸索が分解されるときに比較的容易に同定されるミエリン渦が脊髄白質にお

50

いて発生するように、白質路において著明な軸索変性を示した。r H I g M 1 2 を施された動物の胸部切片における脊髄渦（変性軸索）の数を、P B S を施された動物の場合と対比して定量化したところ、モノクローナル抗体療法で処置した動物におけるミエリン渦の数は、統計学的に有意に少なかった（図 4 0）。

【 0 3 5 2 】

また、脊髄切片を、C N S におけるニューロンを特異的に標識し、前角細胞のほか、後角細胞におけるニューロンも極めて良好に明確化するマーカーである N e u N に対する抗体でも染色した。多くの前角細胞を、r H I g M 1 2 を施された動物の脊髄胸部において、P B S と比較して定量化した（図 4 1、左）。r H I g M 1 2 を施された動物において保存された前角細胞の数の増大には、P B S と対比して高度に統計学的な差異が見られた。また、後角細胞におけるニューロンについての同様の解析も、r H I g M 1 2 で処置したマウスのニューロンの有意な増大を明らかにした（図 4 1、右）。

10

【 0 3 5 3 】

ヒト抗体である r H I g M 1 2 は、マウス、ヒト（図 4 2）、ウサギ、および霊長動物を含めた多くの種から得られた多くの種類の C N S のニューロンの表面に結合する。これにより、r H I g M 1 2 によるニューロンのシグナル伝達が、マウスからヒトを含めた哺乳動物において保存されていることの証拠が提示される。S O D マウスによる本発明者らの研究は、前角細胞および後角細胞を死滅から保護することにより、脊髄軸索の変性が減少し、動物の生存が増大しうることを示唆する。上記の前出の実施例において記載した培養物中の皮質ニューロンによる実験は、ニューロンを r H I g M 1 2 で処置することにより、ニューロンを細胞死から保護しうることを裏付ける（図 3 を参照されたい）。新生仔マウスから増殖させた皮質ニューロンを、ごく高濃度の過酸化水素に曝露して、ニューロンのうちの 9 0 % が死滅する濃度を決定した。過酸化水素に曝露したニューロンを、r H I g M 1 2 またはニューロンに結合しない別のヒト I g M で同時に処置した。r H I g M 1 2 による処置は結果として、ニューロンのうちの 8 0 % の保存をもたらした。これに対し、対照の I g M による処置は結果として、過酸化水素への曝露後におけるニューロンのうちの 9 0 % の死滅をもたらした。本発明者らは、r H I g M 1 2 が、ニューロンを細胞死から保護することにより、A L S を伴う動物における寿命を延長すると仮定した。

20

【 0 3 5 4 】

ヒト抗体はまた、組織培養プレート上における基質としても調べ、小脳ニューロンまたは皮質ニューロンからの正常な細胞伸長過程を促進する能力について比較した。ニューロンの表面に結合する抗体である r H I g M 1 2 および s H I g M 4 2 と、ニューロンに結合しない抗体である r H I g M 2 2 および s H I g M 3 9 とを、この過程を強力に支持する細胞外マトリックス分子であるラミニンと比較した。ヒト抗体である r H I g M 1 2 または s H I g M 4 2 の基質上で成長しつつあるニューロンは結果として、ラミニンにより観察される場合と同様の、ニューロン成長の劇的な拡大をもたらした [8]。この研究はまた、r H I g M 1 2 の存在下では、ニューロンの挙動が正常であることも示した。

30

【 0 3 5 5 】

分子量が百万に近い I g M は、循環から血液脳関門（B B B）を越えて C N S に入るには大型に過ぎるとというのが一般に受容された定説であった [1 5] [1 6]。しかし、一部の抗体は、B B B を確かに越えるという証拠が蓄積されつつある。本発明者らは上記で、末梢への注射後に、r H I g M 1 2 を脊髄内で検出することについて記載した。r H I g M 1 2 または対照のヒト I g M 1 . 0 m g を、脱髄性脊髄病変を伴うマウスへと腹腔内投与した。4 時間後、マウスを屠殺し、脊髄切片を、ヒト I g M ミュー鎖および抗ニューロフィラメント抗体の存在について免疫染色した。r H I g M 1 2 を施されたマウスでは、共焦点顕微鏡法により、脱髄病変内のヒトミュー鎖が、並列経路内に末端で切断された束として、軸索のマーカーである抗ニューロフィラメント抗体と共局在化することが裏付けられた（図 1 5 を参照されたい）。対照の I g M を施されたマウスの脊髄病変内では、ヒト I g M が見出されなかった。

40

【 0 3 5 6 】

50

提示される研究は動物モデルにおける研究であるが、これらの研究結果のうちの多くの興味深い側面により、この新規の手法がヒト患者において有効であることがさらに示される。本明細書で記載されて用いられる I g M 1 2 抗体が、完全ヒト、モノクローナル抗体であることは重要である。結果として、マウスでこの抗体を用いるのは単回投与だけである。その後も投与すれば、動物に抗体に対する免疫反応を発生させる結果として、r H I g M 1 2 の中和またはアナフィラキシーに起因する動物の死がもたらされる。しかし、これらは「真の」ヒト抗体であるので、r H I g M 1 2 で処置したヒト患者は、それらに対する免疫反応を発生させる可能性が低い。r H I g M 1 2 はまた、有害作用または抗体遮断反応の発生を伴わずに、潜在的に持続的な間欠的ペースで患者に施すこともできる。r H I g M 1 2 は、天然ヒト自己抗体であるため、有害な副作用が生じる可能性が低く、したがって、本発明者らは、この薬剤の毒性が最小限となることを予測する。r H I g M 1 2 がヒトにおいて安全であることの証拠が多く存在する。A L S モデルにおいてこれらの肯定的な結果がもたらされる前に、本明細書の上記の通り、神経疾患の複数のモデルにおいて、抗体の血清形態である s H I g M 1 2 を調べたが、毒性は生じなかった。これらの研究において、本発明者らは、1) 1 m g の投与後、ウイルスを介する脱髄を伴うマウスにおける C N S 病態の増大が見られないこと、2) 2 0 0 μ g の投与後、活性 E A E を伴うマウスにおける臨床スコアの重症度に増大が見られないこと、および 3) 3 0 0 μ g の投与後、正常 C D - 1 マウスでは、血液化学反応および組織病態に異常がないことを見出した。そうであってもなお、A L S の認知された動物モデルにおけるマウスへの単回投与が、目覚ましい結果をもたらしたことが注意される。

10

20

【 0 3 5 7 】

r H I g M 1 2 は既に、G M P グレードの施設で、F D A のガイドラインに従い増殖させており、安定的な、トランスフェクト細胞系を、F D A のガイドラインに準拠して生成し、外膜感染を伴わずに保管している。これらの細胞系を、> 5 0 の感染性生物によるパネルに対して調べたところ、全ての細胞系が陰性の結果を示した。加えて、これらの細胞系により、組織培養物 (1 5 0 μ g / m l) 中に大量の抗体が作製される。r H I g M 1 2 を、F D A のガイドラインに従い、外膜のウイルス、D N A 、R N A 、または他の外因性物質を伴わずに、純度 > 9 7 % まで精製する方法が確立されたことから、前臨床段階における r H I g M 1 2 の、早期 A L S を伴う患者における将来の第 I 相臨床試験のための強力な基礎がもたらされている。

30

【 0 3 5 8 】

進行中の研究

上記で、組換えヒトモノクローナル抗体 (r H I g M 1 2) が、前角細胞および軸索の喪失を防止することにより、ヒト A L S のトランスジェニックモデルにおける生存を延長しうることを示したので、A L S 患者における第 I 相臨床試験へと向かって、薬物動態および毒性を介する前臨床データを作成する研究が進行中である。

【 0 3 5 9 】

プラセボ抗体と対比した盲検研究

A L S の表現型を伴う S O D マウスの 2 つの株 (S O D 1 G 8 6 R および S O D 1 G 9 3 A) において、組換えヒト抗体 r H I g M 1 2 を、アイソタイプ対照のヒト抗体である s H I g M 3 9 と対比して調べる、決定的な「盲検」プラセボ対照研究を実施する。組換えヒト抗体である r H I g M 1 2 2 0 0 μ g の単回投与の、疾患を軽減する有効性を、G 8 6 R S O D 1 および G 9 3 A S O D 1 両方 [1 4] (B 6 C g - T g S O D 1 G 9 3 A 1 G u r 、 J a c k s o n L a b s) の変異体トランスジェニックマウスモデルにおいて、アイソタイプ対照のヒト抗体である s H I g M 3 9 2 0 0 μ g の投与と比較して調べる。E N M C による発症前処置の推奨に従い、抗体による処置を 5 5 日齢で行った [1 8] と同様、r H I g M 1 2 を P B S と比較するパイロット研究を反映する結果がもたらされた (図 3 8 ~ 4 1) 。主要評価項目は、生存および体重減少の防止である。各実験群は、上記データに基づく差異を検出するのに十分な 2 4 匹のマウスからなる。加えて、屠殺後の全てのマウスにおける C N S も検討し、N e u N についての標

40

50

識を用いて胸部中央の脊髄における前角細胞の数を決定した。異常なミエリン渦により示される、変性した軸索の数をカウントした。G93A SOD1変異体モデル(B6.Cg-Tg)であるSOD1 G93A 1Gur/J(型番004435; Jackson Laboratory)は、これが、ALSについての、最初の、遺伝子ベースで、最も広く用いられ、最もよく特徴付けられたモデルであり、rHlgM12についての結果を、処置の枠組みについての広範なデータベースと比較することを可能とするために包含した。G86Rマウスは、疾患の発症が遅く(7カ月後)、進行が速いのに対し、G93Aマウスは、発症が速く(3~4カ月後)、進行が遅い。この研究は、SOD1マウスへの外来タンパク質の導入について調整し、また、作用機構の概念についても取り組むものである。rHlgM12のニューロン結合特徴は、極めて重要であり、ニューロンに結合しないIgMは、疾患を改善しないはずである。本研究における主要評価項目は、生存の増大(10%以上: $P < 0.05$)および体重減少の軽減(10%以上: $P < 0.05$)である。SOD1マウスのうちの少なくとも1つの株で改善が見られれば、成功と考える。全てのマウスを、いずれかの側に仰臥させて15~30秒間以内に自ら直立できなくなる時点で屠殺する。副次評価項目では、ミエリン渦の異常、および脊髄胸部(T6レベル)におけるNeuN陽性前角細胞の密度により示される、変性した軸索の数を測定する。1) rHlgM12で処置したマウスの体重減少が対照と比較して20%多い場合、2) rHlgM12で処置したマウスが発作を発症する場合、3) rHlgM12で処置したマウスの死亡率が対照より20%高い場合は、有害事象を考慮した。

【0360】

用量滴定研究

上記の研究における肯定的な結果に続き、SOD1マウスを死滅から保護するのに要請される最小限の用量を決定するために、用量滴定研究(55日齢のマウス1匹当たり0、5、50、100、および250 μg の単回投与を施す)を企図する。マウス脳幹についてのMR分光法を用いて、N-アセチルアスパラギン酸(NAA)を測定する。本発明者らは、他の神経疾患モデルにおいて、脳幹内のNAAが、脊髄全体における軸索健康の優れたサロゲート指標であることを示した[17]。MR分光法のデータは、rHlgM12を用いる潜在的なヒト試験における抗体有効性についてのサロゲートマーカーとしてのNAAを検証する一助となる。55日齢のSOD1マウス20~24匹の群に、腹腔内を介して0、5、50、100、および250 μg の単回投与を施す。主要評価項目および副次評価項目ならびに有害事象については上記と同じとするが、N-アセチルアスパラギン酸(NAA)を測定する、脳幹におけるMR分光法が加わる。MR分光法は、100日齢時および屠殺直前の抗体による処置日において、各マウスについてまとめる。100日後または最終走査時の任意のrHlgM12処置群の脳幹におけるNAA濃度の、生理食塩液で処置したマウスと比較した10%($P < 0.05$)の増大を改善と考える。

【0361】

薬物動態研究およびBBB

研究は、正常マウス血液免疫グロブリンのバックグラウンドにおけるヒトIgMを特異的に検出する、確立されたELISA検出システムを用いて、200 μg の静脈内単回投与の50~70日[18]後のSOD1 G86RマウスおよびSOD1 G93Aマウスにおいて実施する。ヒトIgMは、投与後の多様な時点(0、15分間、30分間、1時間、4時間、8時間、12時間、18時間、24時間、2日間、3日間、5日間、および7日間)の血液中で測定する。マウスの血液量は、少量(全血液量 $< 1.5\text{ml}$)であるため、各回収時点では、3つの個別のマウスを用いる。

【0362】

rHlgM12は、末梢への注射後、血液脳関門を越え、ニューロンと相互作用して、それらを死滅から保護しながら、神経系に直接作用することが提起される。ヒト抗体が血液脳関門を越えず、免疫反応の側面を刺激し、次いで、軸索保護をもたらす可能性もあるが、その可能性は高くない。この問題に十分に取り組むために、*in vivo*における35S標識したrHlgM12の追跡を用いる。35S標識したrHlgM12の2つの

用量レベルである、250 μg と、上記で確立された最小有効用量とを、50～70日齢のSOD1マウスにおいて追跡する。35S標識したrHlgM12の静脈内投与後、血液脳関門を越え、注射の4、8、24、48、および72時間後の脳/脊髄実質において見出される35Sの百分率を決定した。加えて、既に公表されているオートラジオグラフィ法[19]を用いて、脳/脊髄における35Sの局在化部位も決定した。

【0363】

血清半減期研究

rHlgM12が有効性を裏付けた、SOD1株(複数可)における200 μg の投与を用いて、rHlgM12についての血中反応速度試験を実施する。研究は、静脈内注射後7日間にわたる13の回収点において、1時点当たり3匹ずつのSOD1マウス群により実施する。50～70日齢のSOD1マウスを処置して、処置時点における抗体反応速度を理解する。rHlgM12の血清半減期、曝露の飽和、および中和抗体であるIgMの存在について決定する。放射性同位体(35S)標識したrHlgM12を追跡する研究では、上記の最小限の有効用量の決定が要請される。50～70日齢のSOD1マウスに、rHlgM12 250 μg およびrHlgM12の最小限の有効用量(少なくとも 1×10^7 cpmを含有する)[19]の単回静脈内投与を施して、rHlgM12が、治療的処置の時点でCNSに入るかどうかに取り組む。注射の4、8、24、48、および72時間後において、脳、脊髄、肝臓、心臓、肺、胃、腸、筋肉、脾臓、肝臓、膵臓を含めた主要な組織を迅速に摘出する。組織部分150mgを摘出し、秤量し、Solvable(Perkin Elmer)中で溶解させ、シンチレーション液(Ultima Gold、Perkin Elmer)中でcpmを決定した。同位体で標識したrHlgM12を、オートラジオグラフィを用いて脊髄切片中で局在化させる[19]。この実験では、主要評価項目を、rHlgM12を注射した4、8、24、48、および72時間後に対照のゼロ時点と比較した、マウスの脳または脊髄における35S同位体の蓄積とする。任意の時点の脳または脊髄の全体1mg当たりの35Sのカウントの50%($P < 0.05$)の増大を有意と考え、rHlgM12がCNSに入りうることの証拠であると考えた。オートラジオグラフィ研究では、マウスに標識したrHlgM12を投与し、rHlgM12がCNS内で増大する時点において脊髄を摘出した。脊髄切片中のニューロン全体 1mm^2 当たりの銀目の50%の増大を、*in vivo*における抗体ターゲティングの有意な証拠と考えた。

【0364】

初期毒性研究

rHlgM12により実験を実施して抗体が正常CD-1マウスおよび正常ウサギにおいて毒性であるか否が決定する：両方の性別の正常CD-1マウス10匹の群に、上記で決定したrHlgM12の最小限の有効用量の1倍(1x)、10倍(10x)、および20倍(20x)、または生理食塩液を、1回または7日間にわたり毎日静脈内投与する。2週間後、「完全」剖検を介して血液および組織を回収して解析する。主要な器官全ての組織切片を、毒性評価において熟練した獣医科の病理学者が「盲検により」検討する。血液を、肝臓酵素、心臓酵素、電解質および血液学グループに対する効果についての血液研究を含めた、通常の毒性スクリーンパネルのための化学および血液学で特徴付ける。同一の曝露研究を齧歯動物以外の種において実施し、各性別のウサギ2匹ずつを各用量で調べる。加えて、rHlgM12を用いる組織の交差反応性研究を、抗体が他の任意の組織または器官に結合するか否が決定するのに用いる。マウス、ウサギ、霊長動物、およびヒト(Zymed)に由来するパラフィン包埋した組織切片のパネルを、rHlgM12または対照のヒトIgMで免疫標識する。*in vivo*における状況をより緊密に模倣するので、各組織内の結合の強度および構造を画像化し、rHlgM12および対照のIgMによる組織チョッパーで切断した生存組織スライスの標識化と比較する[7]。加えて、FDAへの治験薬申請の予備的毒性試験部門と一致して、rHlgM12および対照抗体の結合も、凍結ヒト組織および凍結霊長動物組織において調べる。組織交差反応性研究は、マウスおよびウサギにおける曝露研究の間、特に、器官をモニタリングするための鍵

をもたらす。

【 0 3 6 5 】

組織への結合

有効性を決定した後、これらの研究では、標的組織および標的以外の組織への結合に取り組む。ヒトおよびカニクイザル (Charles River) の市販される組織アレイ (Zymed) および切片を、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の rH Ig M 1 2 および対照のヒト Ig M である sH Ig M 3 9 で免疫標識する。デジタル画像を用いて標識の強度を比較する。rH Ig M 1 2 の、パラフィン包埋して固定した組織アレイおよび凍結させたヒトおよび霊長動物の脳および脊髄への結合を、生存マウスの小脳スライスにおいて観察される抗体結合と比較する。本発明者らは、標準的な効力アッセイである生存小脳スライスへの抗体結合を用いたが、これは、rH Ig M 1 2 の血清形態が同定された最初のスクリーンである。

10

【 0 3 6 6 】

【 数 1 1 】

引用参考文献

1. Gurney, M.E., et al., *Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease*. J Inherit Metab Dis, 1998. **21**(5): p. 587-97.
2. Morrison, B.M. and J.H. Morrison, *Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration*. Brain Res Rev, 1999. **29**(1): p. 121-35.
3. Siddique, T., D. Nijhawan, and A. Hentati, *Familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Neural Transm Suppl, 1997. **49**: p. 219-33.

20

【 0 3 6 7 】

【数 1 2】

4. Cluskey, S. and D.B. Ramsden, *Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis*. Mol Pathol, 2001. **54**(6): p. 386-92.
5. Turner, B.J. and K. Talbot, *Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS*. Prog Neurobiol, 2008. **85**(1): p. 94-134.
6. Bieber, A.J., et al., *Humoral autoimmunity as a mediator of CNS repair*. Trends Neurosci, 2001. **24**(11 Suppl): p. S39-44.
7. Warrington, A.E., et al., *Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6820-5. 10
8. Warrington, A.E., et al., *Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(5): p. 461-73.
9. Ciric, B., et al., *Clonal evolution in Waldenstrom macroglobulinemia highlights functional role of B-cell receptor*. Blood, 2001. **97**(1): p. 321-3.
10. Mitsunaga, Y., et al., *Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease*. Faseb J, 2002. **16**(10): p. 1325-7.
11. Rodriguez, M., A.E. Warrington, and L.R. Pease, *Invited article: human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease*. Neurology, 2009. **72**(14): p. 1269-76. 20
12. Wright, B.R., et al., *Cellular mechanisms of central nervous system repair by natural autoreactive monoclonal antibodies*. Arch Neurol, 2009. **66**(12): p. 1456-9.
13. Bruijn, L.I., et al., *ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions*. Neuron, 1997. **18**(2): p. 327-38.
14. Gurney, M.E., et al., *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. Science, 1994. **264**(5166): p. 1772-5.
15. Banks, W.A., *Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease*. BMC Neurosci, 2008. **9 Suppl 3**: p. S2. 30
16. Kozlowski, G.P., I. Sterzl, and G. Nilaver, *Localization patterns for immunoglobulins and albumins in the brain suggest diverse mechanisms for their transport across the blood-brain barrier (BBB)*. Prog Brain Res, 1992. **91**: p. 149-54.
17. Denic, A., et al., *Brainstem 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: marker of demyelination and repair in spinal cord*. Ann Neurol, 2009. **66**(4): p. 559-64.
18. Ludolph, A.C., et al., *Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop*. Amyotroph Lateral Scler, 2007. **8**(4): p. 217-23.
19. Hunter, S.F., D.J. Miller, and M. Rodriguez, *Monoclonal remyelination-promoting natural autoantibody SCH 94.03: pharmacokinetics and in vivo targets within demyelinated spinal cord in a mouse model of multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 1997. **150**(2): p. 103-13. 40

【0 3 6 8】

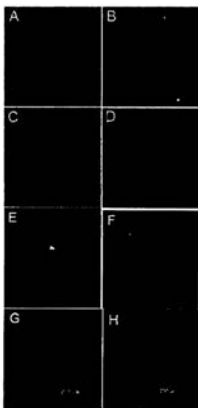
本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱しない限りにおいて、他の形態で実施することもでき、他の方式で実行することもできる。したがって、本開示は、例示的なものであり限定的なものではない全ての態様、付属の特許請求の範囲により示される本発明の範囲にあるものと考えられ、同等性の意味および範囲内に収まる全ての変化がその中に包含されることを意図する。

【 0 3 6 9 】

本明細書全体では多様な参考文献が引用されるが、それらの各々が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

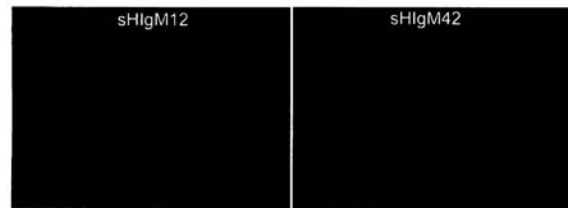
【 図 1 】

FIGURE 1



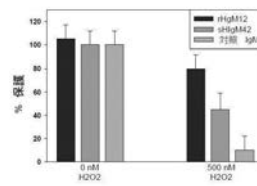
【 図 2 】

FIGURE 2



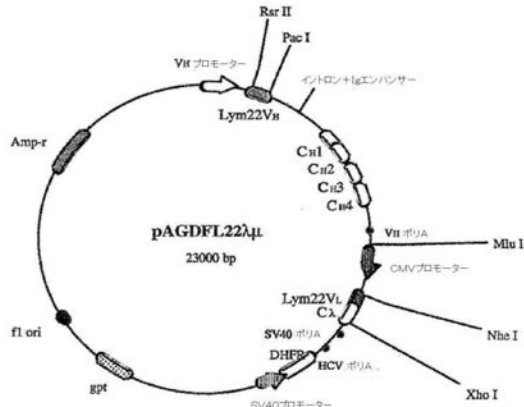
【 図 3 】

FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4 (ベクター図)



【 図 5 - 1 】

FIGURE 5

IGM 12 配列

注
 黄色 = EIAプロモーター
 青色 = 重鎖
 グリーン = 可変重鎖
 プラム = 可変重鎖内のCDR領域
 赤色 = 軽鎖
 茶色 = 可変軽鎖内のCDR領域
 緑色 = 制限酵素
 BGGGG = BSHI
 FCCGA = BspEI
 GCTAG = NheI
 CTCAG = XhoI
 ATCGAT = ClaI

```

TTTCCACACCTGGTCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGG
ACTTTCCACACCCCTAACTGACACACATTCACAGCTGCCTCCGCGCTTTCCGCTGATGACGGTGAACCCCT
CTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCGGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCTGACGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACTAGCGGATAGCGGAG
TGTACTGGTCTAACTAGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTTGAAATA
CCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATCCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCTCCGCTCACTGACTCGCTGC
GCTCGCTGCTGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATC
AGGGGATAACGACGAAAGACATGTGACAAAAGCGCAGCAAAAGGCGAGAACCGTAAAAAGCCCGG
TTGCTGGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGATCAAAAATGACGGCTCAAGTCAGAGGT
GGGAAAACCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGGCGCTCTCTGT
TCCGACCTCGCCCTTACCGGATCCTGTCGCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC
TCAGCGTAGGATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGCTCAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCGG
TTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGTAATCTGCTTGGTCCAAACCGGTAAGACACAGCTTAC
GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGGATGTAGGCGGTCTGACAGATTCTTG
AAGTGGTGGCTAACTACCGCTACACTAGAAGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
CCTTCCGAAAAGAGTGGTAGCTTGTATCCGCAAAAACCCCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTG
TTGCAAGCAGCAGATTACCGCGAAGAAAAGGATCTCAAGAAATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCT
GAGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGATTTTGGTATGAGATTATCAAAAAGATCTTCACT
AGTCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCAAGATATATAGTAATTTGGTCTGACAG
TTACCAATGCTTAATCAGTAGGACCTATCTCAGCGATCTGCTATTTGCTTCAATCAATGTTCCGTA
CTCCCGCTGTGATAACTACATACCGGAGGGCTTCCACTGCGCCCGCTGCTGACAGTATACCCG
GAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAACCCAGCCAGCCGAGGCGGAGCCAGAG
TGTCTGCAACTTTTCCGCTCCATCCAGTCTTAAATTTGTTGGCGGAGAGCTAGATAGTAGTTGCG
CCAGTTAATAGTTGGCACAAGTTGTGCCATTGCTGAGGCGATCGTGTGTCAGCTGCTGTTGGTA
TGCCTTATCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGCGAGTACATGATCCCGCTGTTGCAAAAAGC
GGTTAGCTCTTGGTCTCCGATCGTTGTCAAGAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATG

```

【 図 5 - 2 】

```

GCAGCACTGCATAAATCTCTACTGTCAATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTACTGGTGGTACTCAA
CCAAGTCACTGAGAATAGTGTATCGCGGACCGAGTTGCTCTTCCCGGGCTCAACCGGGTAATAC
CGCGCACATAGCAGACTTTAAAAGTCTCATCATTTGGAAAACGCTTTCGGGGCGAAAATCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAAGCATCTTTA
CTTTCACCGCTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAGGGCGAC
ACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTCAATATTTAAGCATTATCAGGCTATTTGCTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAA
AAGTGCCACTGAGCTGAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGGGTATCAGAG
GCCCTTTGCTTCAAGAATTCCTTTGCTAATTTAAATGAGGACTTAACCTGGAATAATTTTGTAGT
GGGAAGCTTACTGTTAAAACGAGGTTATGGGGTAACTGCTATGTTAAAACGATCAGGAGACACA
AAAACTCATGAAAATGGTGTGAAAACCCATCAAGGTCAAAATTTTCAATTTTTGCTGTGGTGGG
GAACCTTGGAGCTGCGGGTGTGTAGCAACTACAGGACAAAATATCCTGCTCAAACTGTAACCCOA
AAAATGCTACAGTTCAGCTGACGATGACAGATGACACTGACCAAGGCTGTTTGGATAAGGATAATGCTTA
TCCAGTGGATGCTGGTCTTCTGATCAAATGAAAATGAAAACATAGATATTTTGAAGCTACACAGT
GGGAAAATGTGCTCTGTTTTGCACATTAACACAGCAACCCAGTGTCTTGTAGGACAGGGTG
TTGGCCCTTGTGAAAAGCTGACAGCTTGTATGTTTTCTGCTGTGACATTTGTTGGGCTGTTTTCAACAAC
TCTTGGAAACAAGCAGTGGAGGGACTTCCAGATATTTAAAATACCCTTAGAAAAGCGCTGTGAAA
AACCCCTACCAATTTCTTTTGTGTAAGTACCTAATTAACAGGAGGACAGAGGCTGGATGGGCGAC
CTATGTTGAATGCTCTCAAGTAGAGGAGGTTAGGGTTATGAGGACAGAGGAGTCTCTGGGG
TCCCTAGGTGGGACTGCTCCCTTTGGACTTTTCAATATCTCTTTTAAATATCTTTTGGTCAAGAT
ACAGAAGTGATAGAAGAATTTGACAGTAATCCATCATTTCTTAGACATGGGAAAAGTTATGAAGAAT
GATAGAAGATTTTTTTGTAAGTCTGACACATTAACAGTGCATTTCTGTTCTTAGGCTTTTGGTTAA
GGTGTGCTTTTAAAGAACACATGAATTCATTTAAAATTCATGTTTTTCCATATTTACACCTTAAAG
CTTAATCTAGTAGATAATAATAATAGAGATTTCTTTTGTCCAGTTATCTAGCATTTGTTAGAGT
AAGTTTTATATAATACATTTTAAATTTAGAGTGTGTACTGTTCAGATGAAGAAATGATCAAGC
AAATGTGACTATTAATCATTTTGTAGACTATATACAGGATTTACTGTGATATGACAGATACCAAT
AAGTGTGACACCAATTTGATACCCATTTAATCTTCTGATGCTTTGATGCTCTCAAGTTTGTAGC
CTTACATGAACAAGCTTCAAGTGAATGAATGATCAGAGTCAAGGAGCAAAAGCCTGTGAGA
TAAGAGTGGGAAAGCACTTATAGCATTAAGGTGCAAGCACATTCAGTGGTATGGGGGGCGGGAA
TACTGGCAAAGCCAGGAAGTCTGACAGCTTGGATACAAGAGTCTAGAGGATGCTGTGCTATGAGT
GAGAGCAATGTGACTTAATAGCTCAGAAAAGCAGCCAAATGGGAATAGTCTAATGATGAGGGGAGGA
GAAAGCAACTAGAGAGAGAGGAGGAGATTAACAGGAAGAAATTAAGCTGTTGGGAGAGGAGGGGCT
CCTACCAGACATGACAGGATGGCAAGTTCAATGTGACAGATGCTTCTTTTGTGAAAAGAGCAGA
GACTAGTGTGATGAGAGAAAGCAAGTCTGTTGATATCAGAACACAAAACATATAGCATGCAAAAT
ATCTTACTGGTACTTAGGAGGTCACAAAAGTGGCTGGACATGCAATTTGGAATAGAGAGGAGTACT
ATATGTTGATGAGAAGTTCAGCACTGGAAGCAATTAAGTATACACAGACCCCAAGTGTATATTCAT
TTTTAAATCAAGAAATTAAGTCAAGTATAATCCATATCTTATTTAAGGTTCTATGATTAATTTAAG
CTGCGGGGCTATACCTTATTTGGATGAAACCAATATGATAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGC
GCAGGCTGGAACGGGGGGGCTGAGTACTGATGTTGGCGGAAATTTAAGCTGTTGGGAGAGGAGGGCT
CATGTAAGCAGCAGATGTGGCAAAAGTGAAGTTTTGGTGTGCGCGGTTACACAGGAGTGAACAAT
TCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGATGAAAATTTGGCGGTAACCCAGTAAGATTTGGCCATTTCCGCGG
AAAACGTAATAAGAGGAGTAAATCTGAATATTTTGTACTACATAGCGGTAATATTTGCTCAGGG
CCGCGGGGACTTTGACGGTTTACGTGGAGCTCCGCGAGGTTTCTCAGGTTGTTTTCCGCGTTCCGG
GTCAAAGTTGGCGTTTTAATATATAGTACGATGCTGTCAGCGCGCGCAGCCGAGTGTATTTAT
ATCGGGCGGCTCGGACCTCTCTGCAAGAC

```

【 図 5 - 3 】

```

atgaaacatctgtggtttctctctctctctgttggcagctcccaga リーダー
M K R L W F F L L V A A P R

I スプライス
GAGTATCTCAGGGATCCAGACATGGGGATATGGGAGGTGCCCTGTATCCCAAGGGCTCACTGTGGGTCTC
CTCTGTTGAC

TGG GTC CTG TCC
W V L S

caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactgctgaagccttgggagaccctgtccctc
Q V Q L Q E S G P G L L K P S E T L S L
acaatgcactgtctctgtggttccctcagcttcttcaactcagctgagtgatccggcagctc
T C T V S G G S V S L Y Y W S W I R Q S
ccagggaaggaacccaggatggatggatatactctccagtggaagaccagctatacaac
P G K E P E W I G Y I Y S S G S T D Y N
Ccttccctcaggtgcagtaaccaatatacactgcagcagcagcaaacacccogtttccctc
P S L R S R V T I S L D T S N H R P S L
aacctgaggtctgtaccocccagcagatcacccggtctatgtgtgagcaagtcgctca
N L R S V T A A D T A V Y W C R S A S
ataggggctgttccagccctggggccaggaaacccctgtcaccctctctctca
I R G W F D P W G Q G T L V T V S S

GGTAGAATGGCTCCAGGCTTAATAAAGCTTGAAGTCTGAGGAGCAATCTGTCCAGGGCTAAT
EGGACTTGTGAGAATFAGGGCTGACAGTGTAGGTTGACGATTTCCAGGTCAGTACTGCTGGTTC
CTGAGGTTAGGCTGGAATATAGTTACCTTGAAGACTTAAGAGGGTCCAGGGGGCTCTGACAGGCA
GGGACAGAAATGGGAACAATGATGGAATGGTGAATCTTGTGTGACACCGAAATGGCATAATGCT
GAGTGTCCCAAGGGGTGATCTAGCTCAGACTCTGGGGTTTTTGTGGGATAGAGAAAATCCCAATTTG
FGATTAATGATGATGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAAGCTCTCCCTCAGGTAAGATGGGCTC
TCCAGGCTTTAATTTAACCTTGTATGAGGATTTCTGAGCATTTGACAGATAATCTTGAATTTGTC
ECTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAGTGGGAAATAAATGCTGAGGATCTCAGAGGCTTTAGGACAGAT
ATCTCCACATCTTGAAAAATAAGAAATCTGTGTAGGTTGGTGGAGTCCCTGGATGATGGGATAGG
GACTTTGAGGCTCATTGAGGAGATGCTAAAACAATCTCAATGCTGAGGATGATGGGGCTGTAGT
TGGAGATTTTCAGTTTTAGATAAAGATTAAGTCCGGGATATACCTCAGGACCACTCTGTGACAGC
ATTTATACAGTATCCGATGATAGGACAAAGAGTGGGAGTGGGCACTTCTTTAGATTTGTAGGAAATG
TCCCACTAGATTTTAAACTTCAATTTGTTGAGGAGGAGTGTCTTATGATGATGAGTCAAGGAGAT
AAGGACTTAGCTCCGCTCAAAAAGGATGTTGCTGTCTAGAGAGGCTGTTGGAGGCTGCAAAAATCC
AGCTTTCAAGGAACACAGAAATGTTGATGGAATATAGAAATGTTGCTTTACTCTTAAGTGTGTT
CTTAGAAAATAATGTAATCTGTGACTTTAAAATGTGAGAGGGTTTTCAAGTACTATTTTTAAAT
TGGCAAAATTTTGTCAATCAATTTAGGCTTGTGTTGTTGATAGACTGACATTTCAAGTTAAAGT
GGATGAGGAGTGGAGGCTCTCATACCTTATCAGAGCTGACTTTTAAACAATAAATAAATTAAGTTAA
TATTTTAAATGAATGAGCAATGTTGAGTGGAGTCAAGATGCGGATCAGAACAGAAACCCAGCAGC
AGCTGGCAGGAGCAGGCTCATGTGGCAAGGCTATTTGGGAGGGGAAAATAAACCCTAGTAACTTTG
TAGCTGTGGTTTTGAAGAGTGGTTTTGAACACTCTGTCCAGCCCAACCAAGGAGTCCAGGCTGAG

```


【 図 5 - 8 】

GGATCTCTGACGGAAGAAAGAAAGTCAAGAGCAAAACAGAGTAACCTCCACAGTAGCTCCAAATCTT
TATAAGGGTCAATGTCCATGCCCAAGCCACCCAGGACAGCTTGGAGGCTTGAACAGTGGGACATGT
ACAAAGATGATTAGGACAGAGTGAAGAAATGTGATGGTGGTGGCCAGACCAATTTATGCTACAGC
CTCCTAATCAAAAGCCTTTAACTAATCTCTCCGCCAGCTCTCCAGCTCTAAACACACAGCTTT
GAAGTAGGCTCAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGGATCTGATGGGCTTCCAGGTGGTCTCCATSCAACCTCGAAGGTGAAGCAAGTGCACACGAGCCG
CAGATGAGAAGGCACAGACGGGGAGACCGCGTAAAGAGAGGTGGCCCGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CGGAGAAAGGGACGAGAGATCCCAAGCGGCCCGGAGGGGTCGTCGGCGGGATTCAAGCGCCAGCGGA
CGTAAACAAAGGACGCTCCCGCAAGGATCTAAAGCCAGCAAAAGTCCCATGGTCTTATAAAATGCTAG
CTTAGGAGGGGACAGAGAACTGAAAGCATCTTCTGTAGTCTTCTCTCTAGACTTCAAACCTA
TACTTGTAGCTTTTCTCTCTGACAGAGGAGCGCTGGTATTCTGGGAGAAAGTTATATTTCC
CCAAATCAATTTGGGAAACAGTGTCACTTTCAAATCTGATGATCTTGTACAAAGAGCTGGAG
GTGGCTGGTGTATGATGGCTCTGTGTAACAGAACTGCTCCGACTATCCAAACATGCTACTTTA
CTTGGCAATTCGGTGTCTCAATAAGTCTTAAAGCATCATCCAAACTTTTGGCAAGAAATGAGCTCTC
GTGGTGGTCTTTGAGTCTCTACTGAGAACTATATTAATCTGTCTTTAAAGGTCGATTTCTTCTCAGG
AATGGAAACAGGTTTCTCACCATAATCACCAGATTCTGTTTACCTTCCACTGAAGAGGTTGTGGTC
ATTCTTTGAAAGTACTTGAATCTGCTGAGCGGAGGCCAGGTCGGTCTCGTCTTCTTCCAAATCCCCA
TATTTTGGGACACGGCAGCATGCAATCAATGGTCAAGCAATGATGGCAATCTAGAAAGCTTTTGC
AAAGCCTAGGCTCCAAAGAAAGCTTCTCACTACTCTGGAATAGCTCAGAGCCGAGGGCCCTCGCC
TCTGATAAATAAAAGAAATTAATCAAGCATGGGCGGAGAAATGGCGGAACTGGCGGAGTAAAGGGCG
GGATGGCGGAGTAAAGGGCGGACTATGGTGTGACTAATGAGATGATGCTTGTGACTACTTCTGCC
TGCTGGGAGCTGGGAC

【 図 5 - 9 】

ヒトJ鎖のタンパク質配列 (AAH38982)
1 MKNHLFWGV LAVFIKAVHV KAQEDERIVL VDNKCKARI TSRIIRSED
51 PNEDIVERN IRIIVPLNRE NISDPTSPLR TRFVYHLSL CKKCDPTEVE
101 LDNQIVTATQ SNICEDSAT ETCYTYDRNK CYTAVVPLVY GGETKQVETA
151 LTPDACYPD

用いられるヒトJ鎖のコード配列(黄色)

CATATAAGAATTCGCCACC ATGAAGAACCATTGGCTT
TCTGGGGAGTCTGGCGGTTTTTAAAGGCTTCATGTTGAAAGCCCA
GAAGATGAAAGGATGTTCTTGTGACAACAAATGAAAGTGGCCGGAT
TACTTCCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAAGATCCTAATGAGGACATTTGG
AGAGAAACATCCGAATATTGTTCTCTGAAACACAGGGAGAATATCTCT
GATCCCACCTCACCATTGAGAACAGATTTGTACCATTGTCTGACCT
CTGTAATAAATGTGATCCTACAGAAAGTGGAGCTGGATAATCAGATAGTTA
CTGTACCAGAGCAATATCTGTGATGAAGACAGTGTACAGAGACTGCG
TACACTTATGACAGAAACAGTGTACACAGCTGTGGTCCCACCTGATA
TGGTGGTGAAGCAAAATGGTGAACAGCTTAAACCCAGATGCTGCTG
ATCTGACTAAGTCGAC

【 図 6 - 1 】

FIGURE 6

IGM 42 配列

注
黄色 = E1Aプロモーター
青色 = 重鎖
ブルー = 可変重鎖
フラム = 可変重鎖内のCDR領域
紫色 = 軽鎖
赤色 = 可変軽鎖内のCDR領域
緑色 = 制限酵素
GGGGGG = BSSHI
TCCGGA = BspEI
GCTAGC = XhoI
CTCAGG = XhoI
ATCGAG = ClaI

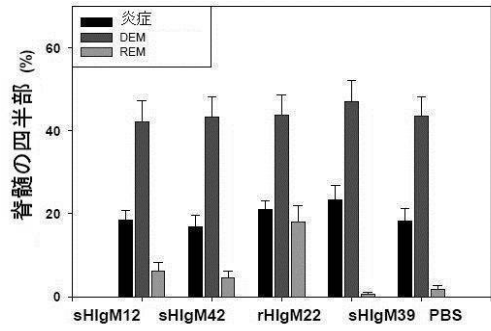
TTTCCACCTGGTGTGACTAATGAGATGATGCTTTGCACTACTCTGCTGCTGGGGAGCCTGGGG
ACTTCCACCCCTAAGTACACACATTCACAGCTGCTCCGCGGTTTCGGTGTAGCGGTGAAACCT
CTGACACATGCAGCTCCCGGAGAGCGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGACAGCAAGCCG
CAGGGCCGCTCAGCGGTTTGGCGGTTGGGGGCGAGCCATGACCCAGTCAAGTACAGTACAGCGGAG
TGTACTTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATGATCTAGAGTGCACCATATGCGGTTGAAATA
CCGCACAGATGCGTAAGGAGAAATACCGCATCAGCGCTCTCCGCTCTCTGCTCACTGACTGCTGCG
GCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGATCAGCTCACTCAAGGGCGGTAATACGTTATCCACAGATC
AGGGGATAACCGAGGAAAGAACTGTGAGCAAAAGCCAGCAAAAGCCAGGACCGTAAAGAGCCGCG
TTGCTGGCTTTTTCATAGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGAGCT
GGGAAACCCGACAGGACTAATAAGTACAGGCGTTTCCCTTGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCCTGT
TCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTGGGAAGCTGGCGCTTTCTCATAGC
TCACGCTGTAGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGCTGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCAAGCAAGCCCG
TTCAGCCGACCCCTGCGCTTATCCGCTAATACGAGTATGCGAGTGGTGTAGTGGTGGTGGTGGTGG
GCCACTGGCAGCAGCTCGTACAGATGATGCGAGGAGGATGATGAGCGGCTGCTACAGATTTTGG
AAGTGGTGGTCACTACGCTACACTAGANGACAGTATTTGGTATCTCCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
CCTTCGAAAAGAGTGGTACTTGTATCCGCAAAACACCCGCTGGTAGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TTGCAAGCAGGATTAACCGCGAGAAAAGGATCTCAAGAGATCTTGTGATCTTTCTAGCGGCTG
GACGCTCAGTGAAGCAAGAACTACAGTAAAGGATTTGGTCTAGAGATTACAAAAGGATCTTCACT
AGATCCCTTTAAATAAAATGAAGTTTAAATCAATTAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAG
TACCAATGCTAATCAGTGAAGCACTATCTCAGCGATCTGCTATTCTGTTATCCATAGTGGCTGA
CTCCCTCGTGTAGATTAATACGATACGAGGAGGCTTACCATTGCCCGAGTGTGCAATGATACCCG
GAGACCAGCTACCGCTCCAGATTATCACAAATAAACCCAGCCAGCGAGGGCCAGCGCAGAG
TGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTAATAATTTGGTGGGAAAGTGTAGAGTAAAGTGTG
CCAGTTAATAGTTGGCAAGCTTGTGCAATTTGCTGACGATCTGTTGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTG
TGCTCTTACCTGCTCCGTTCCCAAGATCAAGCGGATACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGC
GTTAGTCTCTGCTCCGATGCTGTGAGAAGTAAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGTTATG

【 図 6 - 2 】

GCAGCCTGCAATTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGTCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAA
CCAAGTATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGGCTCAACACGGGATAATAC
CGCGCCACATAGCAAGACTTAAAGAGTCTCATCTGGAAGACCTCTTCCGGGGGAAACTCTCAAGG
ATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTCAGCATCTTTA
CTTCCACAGCCTTCTGGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGG
ATGAGCGGATACATTTGAAATGTTTAAAGAAATAAACAATAGGGGTTCCGGCCACATTTCCCGGAA
AAGTGCCACTGACCTTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAAAGGCGTATCACGAG
GCCCTTTCGTTCAAGAAATCCCTTTCCTAATTTAAATGAGGACTTAACTGTGGAAATATTTGATGT
GGGAGCTGTTACTGTTAAACTGAGGTTATGGGGTAACTGCTATGTTAACTGCATCAGGAGCACA
AAAACTCATGAAATGGTGTGTAAGCCACTCAAGGGTCAAAATTTTCAATTTTTTGGTGTGGTGGG
GAACCTTGGAGCTGCGAGGTTGTGTAGCAACTCAGGACCAAAATTTCTGCTCAAACTGTAACCCCA
AAAATGCTACAGTGCAGTGCAGATGACACTGACCAAGGCTGTTTGGGATAAGGATAATGCTTA
TCCAGTGGATGCTGCTGCTGATCCAAATAAATAAAGGAACTAGATATTTTGAAGCTCACAGGT
GGGAAAAATGTCCTCTGTTTGCACATTAACACAGCAACCCAGCTGCTTCTGATGAGCAGGGT
TTGGCCCTTGTGAAAGCTGACAGCTGTTGTTCTGCTGTTGACATTTGGGGGTTTACCAACAC
TCTTGAACACAGCAGTGGAAAGGACTTCCAGATATTTAAATTTACCTTAGAAAGCGGCTGTGAAA
AACCCCTACCAATTTCTTTTGTAGTACCTAATTAACAGGAGGACAGAGGCTGATGGGCGAGC
CTATGTTGAAATGCTTCAAGTGAAGAGGTTAGGGTTTATAGGAGCACAGAGGACTCTCGGGGA
TCCAGTGGAGGACTGCTCCCTTGGACTTCCCTCAATATCTCTGTTAATATCTTTGTCGAAGT
ACAGAGTGTAGAGAAGAAATTTGACAGTATCCATCATTTCTTAGACATGGGAAAGTATGAGAAGT
GATAAGGAAATTTTTTGAAGTGTACACATTCACAGTGCATCTCTGTTCTAGGCTTTTGGTAA
GGTGTGCTTTTAAAGAACACATGAAATTTCAATTTAAATTCATGTTTTCCATATTTACACCTTAAGGA
CTTAATCTAGTAGATAATAAATATAGAGATTTCTTTTGGCAGTTTATCTAGCATGTTAGAGTGT
AAGTTTTATATAATTAACAATTTAATTTAGAGTGTGTATAGTTCAGATGAAGAATGAGTCAAGC
AAATGTGACTATATATCAATTTGAGAACTATTAACAGGATTTACTGTGATATGACAGATACCAATC
AAGTGTGAGGACCAATGATACCCATTTATACCTTTGATGCTTTGAGTCTCTCAAGTTTGTAGG
CTTACATTAACAAGGCTTCAAGTGAATGATGAGTGCAGGAGCACAAGCCCTGTGAGA
TAAGAGTGGGAAAGCAACTTATAGCATTAAAGTGCACACATTCAGTGGTATGGGGGGGGGGGAA
TACTGGCAAGCCAGGAAAGTGTGACGACTGGATACAAAGTGTAGAGGAGTGGTCTTATGAGGT
GAGAGCAATGTACTTAATAGTCAAGAAAGCAAGCAATGGAGAAATGCTGATGATGAGGGAGGAG
GAGAGGCAACTGAGAGAGAGAGAGAGGAGATTAACAGGAAAGAAATTAAGCTGGGAGAGGAGGGGCTG
GACTACAGCAGGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCTAGATGTTGATGAGAGAAAGGCAAGTCTGGTGTATTCAGAACACAAACTATGATGCAAAAT
ATCTTACGTTGACTTAGGGAGTCAAAATGACTGGACATGCAATTTGGAATAGAGAGAGGAGTACT
ATAGTGGTGAAGAGTTCAGCACTGGAGGAACTAAGTATACACAGAGACCCCAAGTGTATTTCACT
TTTTAATCAAGAAATAATGCAAGTATAATCCATATCTATTTTATGAGTTCTATGATTAATTTAAG
CTCGGGGATACCTTATTTGGATTGAAGCCAAATGATGATGAGGGGGTGGAGTTTGTGAGCTGGC
GGGGGGGTTGAAACCGGGGGGGTGGCTAGTGTGGGGGAAAGTGTGATGCAAGTGGGGGAAACA
CATGTAGGCGGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TCCGCGGGTTTTAGCGGATGTTGTGATTAATTTGGGCTAACCGGTAAGATTTGGCCATTTTCCGCGG
AAAACGAAATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCGCGGGGCTTGGAGGCTTACGTTGGAGACTGCGCCAGGTTTCTCAGGTTGTTTTCCGCGTCCGG
CTCAAGTGGCGGTTTTAATTAATGACAGCATGCTGCGGCGGCGGAGCGGAGTATTTAT

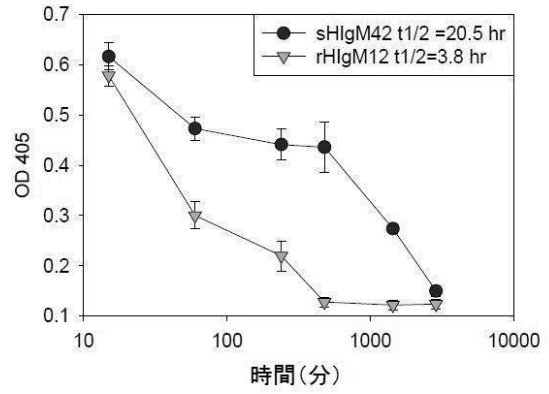
【 図 1 1 】

FIGURE 11



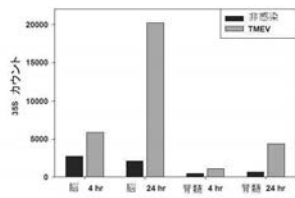
【 図 1 2 】

FIGURE 12



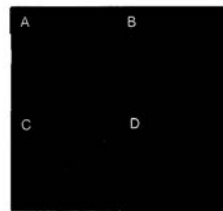
【 図 1 3 】

FIGURE 13



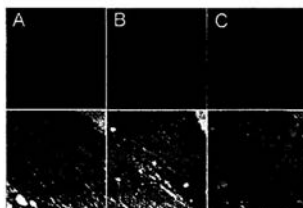
【 図 1 5 】

FIGURE 15



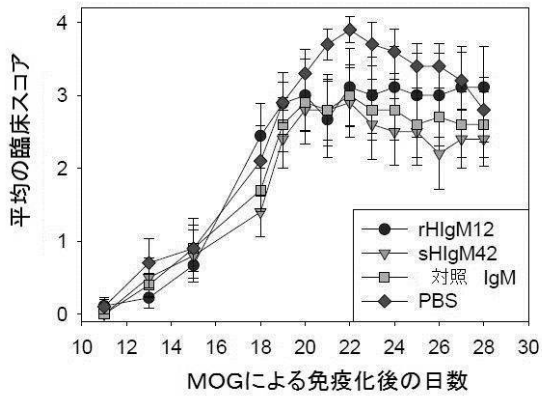
【 図 1 4 】

FIGURE 14



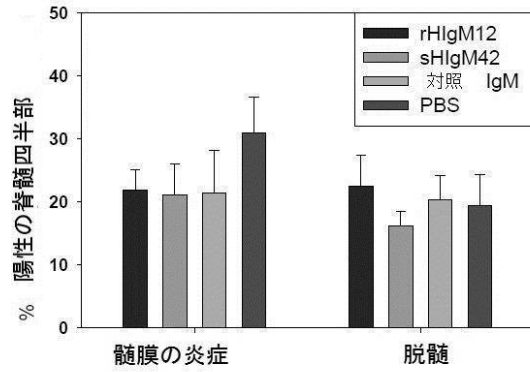
【 図 1 6 】

FIGURE 16



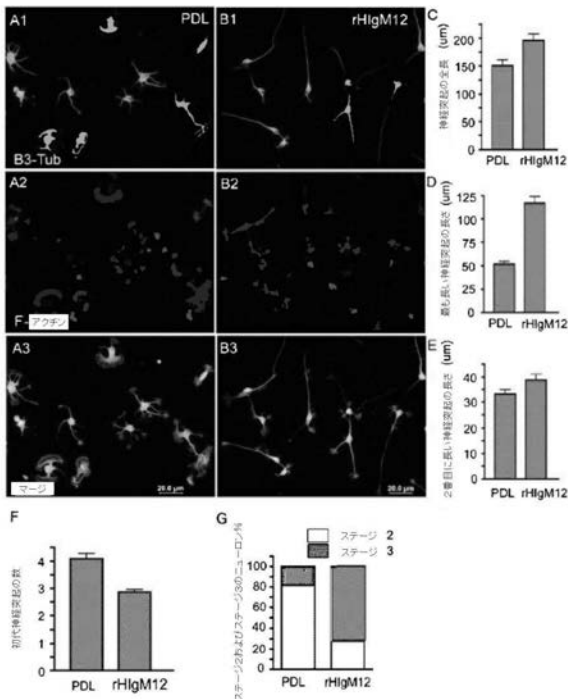
【 図 1 7 】

FIGURE 17



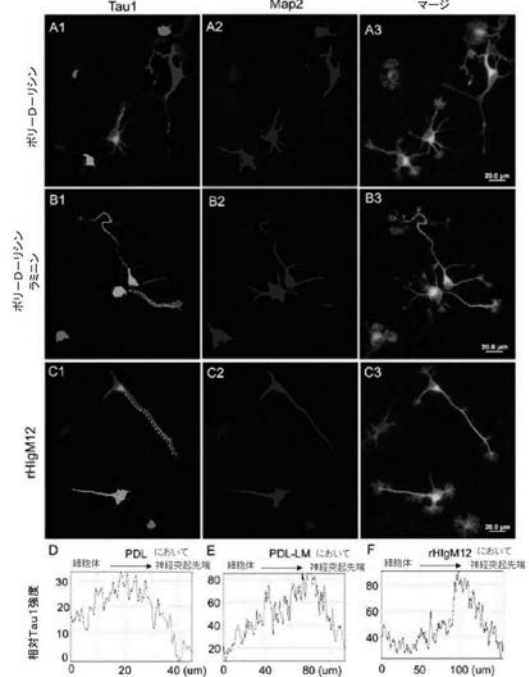
【 図 1 8 】

FIGURE 18



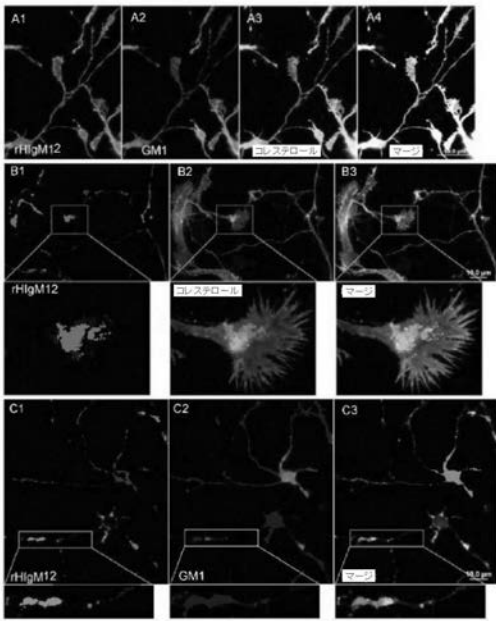
【 図 1 9 】

FIGURE 19



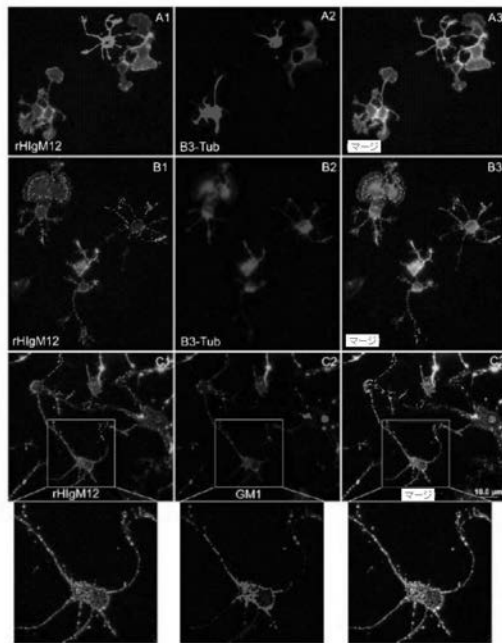
【 図 2 0 】

FIGURE 20



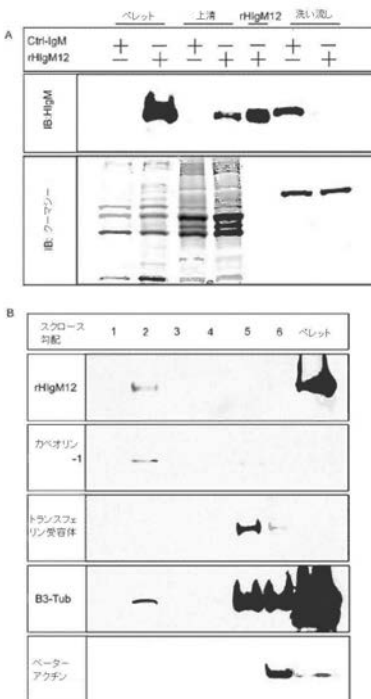
【 図 2 1 】

FIGURE 21



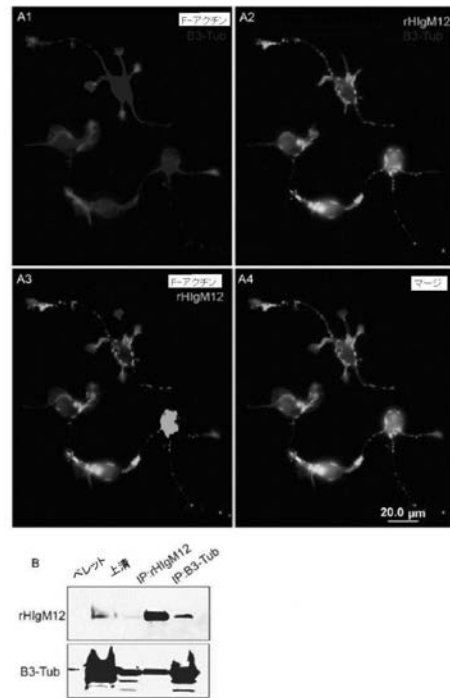
【 図 2 2 】

FIGURE 22



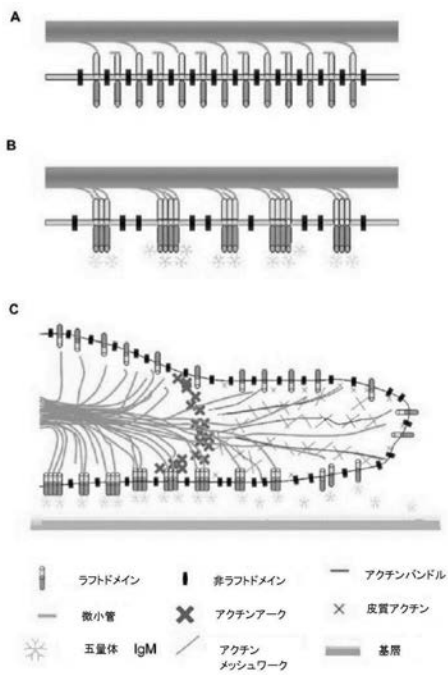
【 図 2 3 】

FIGURE 23



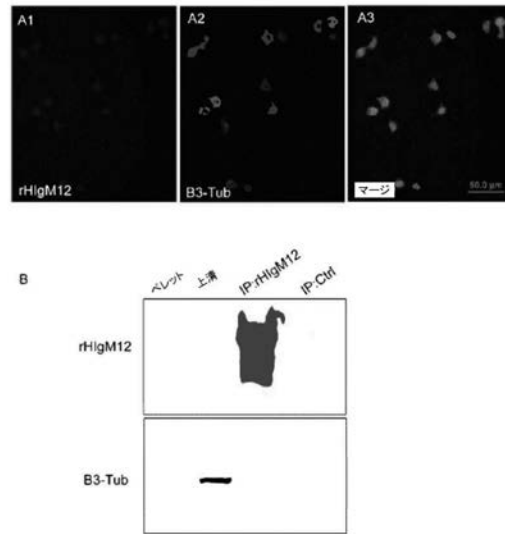
【 図 2 4 】

FIGURE 24



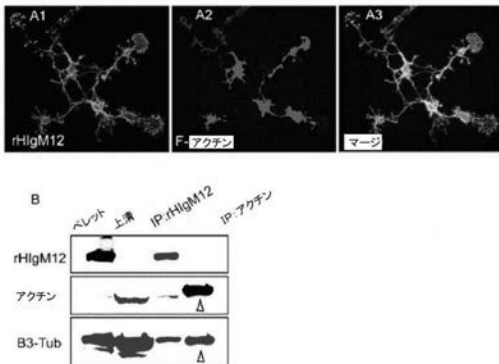
【 図 2 5 】

FIGURE 25



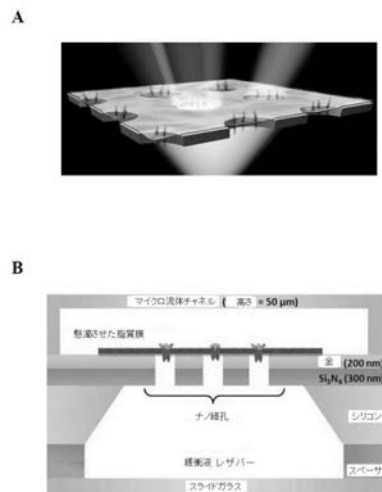
【 図 2 6 】

FIGURE 26



【 図 2 7 】

FIGURE 27



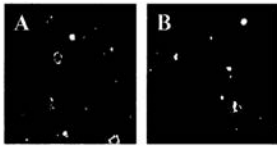
【 図 2 8 】

FIGURE 28



【 図 2 9 】

FIGURE 29



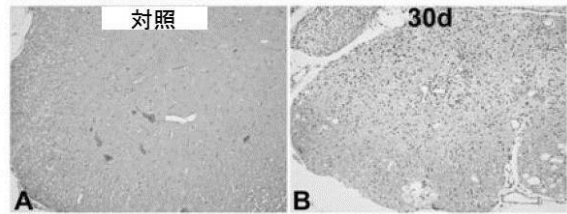
【 図 3 0 】

FIGURE 30



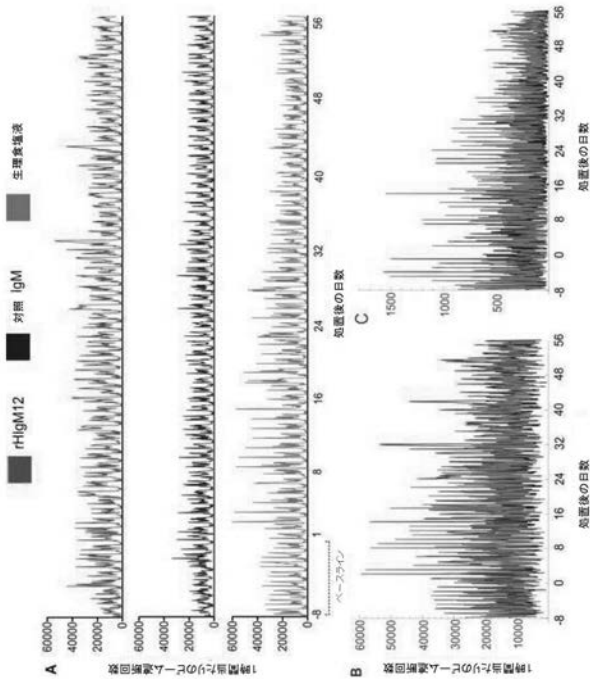
【 図 3 1 】

FIGURE 31



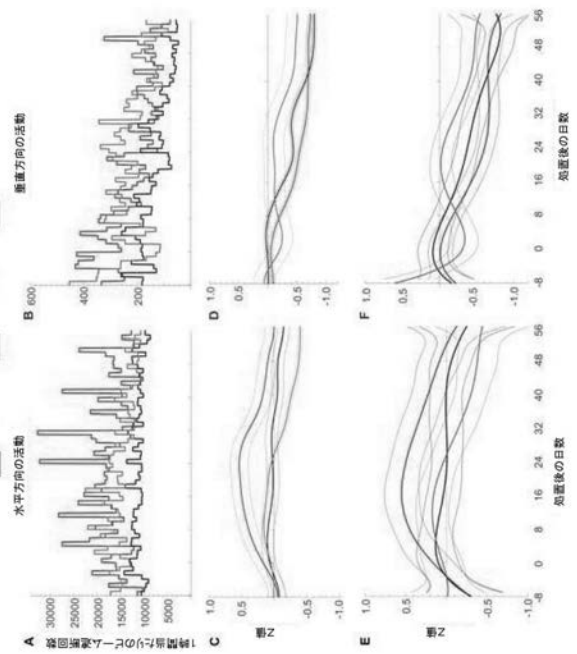
【 図 3 2 】

FIGURE 32

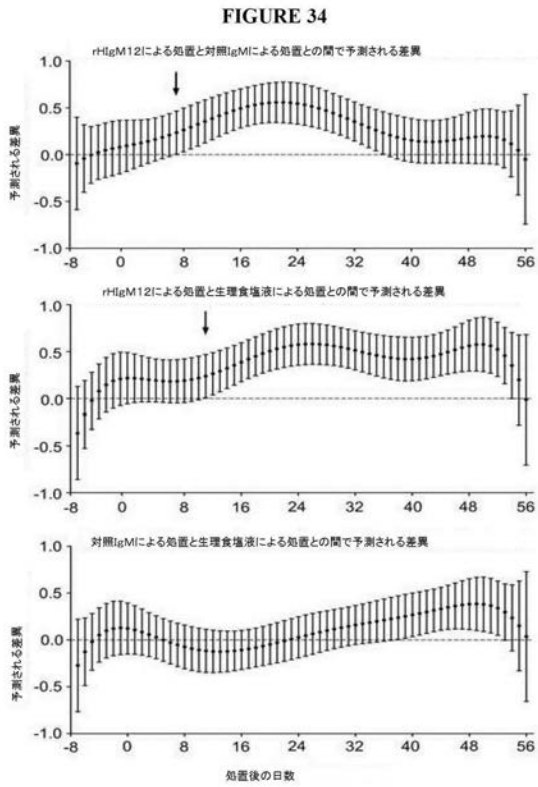


【 図 3 3 】

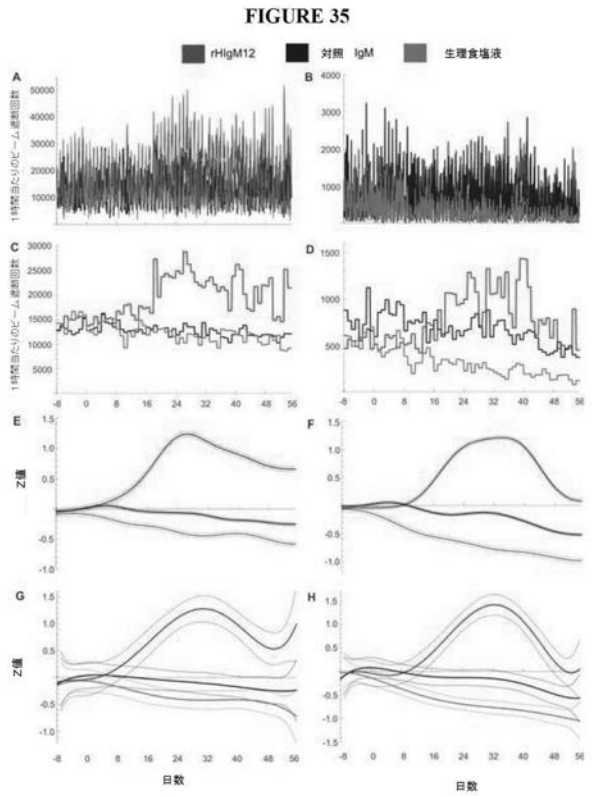
FIGURE 33



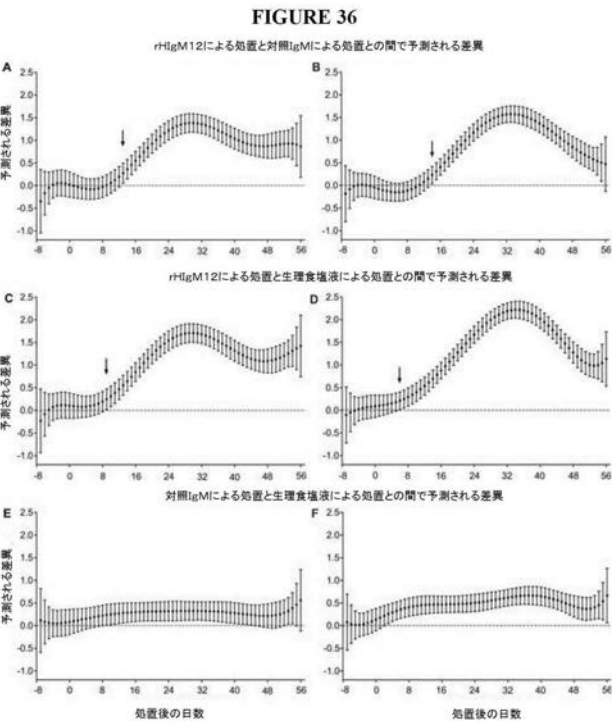
【 図 3 4 】



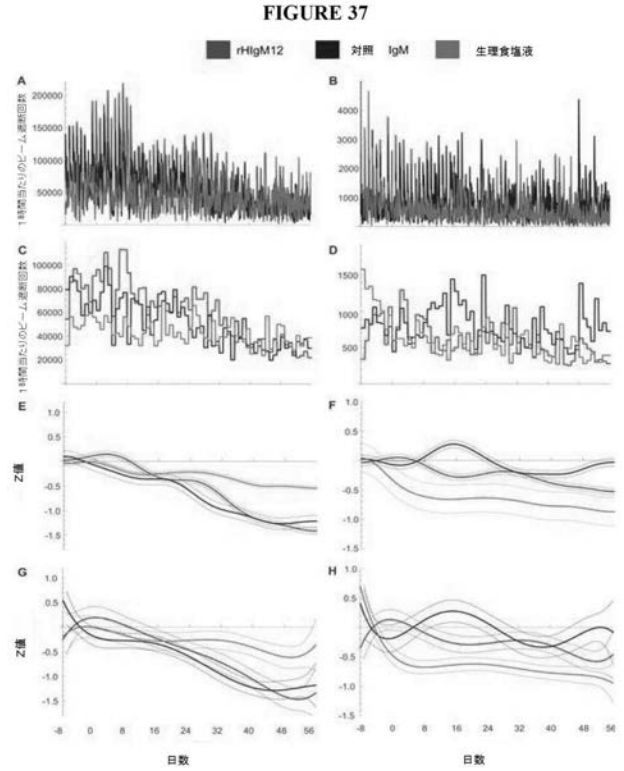
【 図 3 5 】



【 図 3 6 】

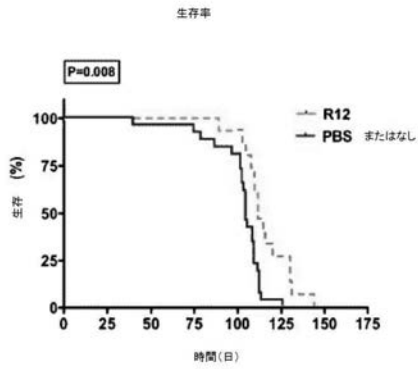


【 図 3 7 】



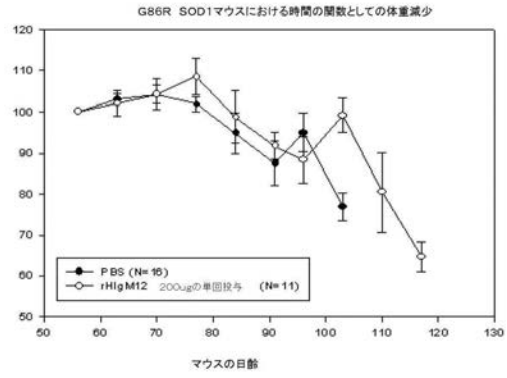
【 図 3 8 】

FIGURE 38



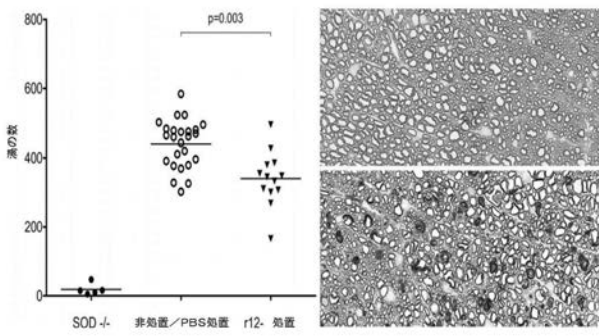
【 図 3 9 】

FIGURE 39



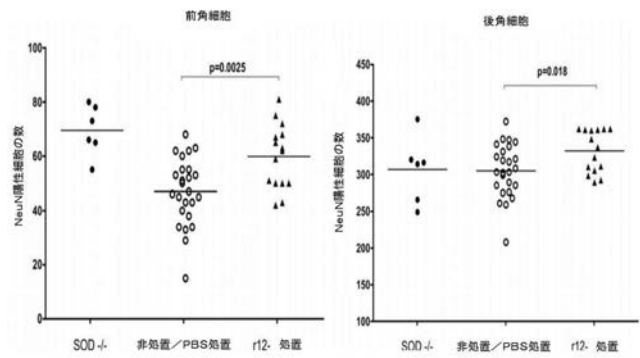
【 図 4 0 】

FIGURE 40



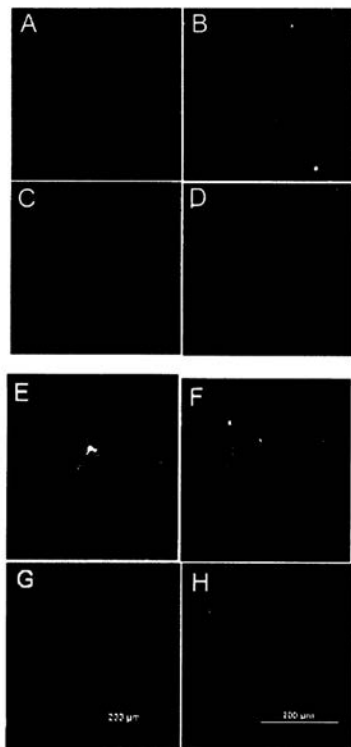
【 図 4 1 】

FIGURE 41



【 図 4 2 】

FIGURE 42



【 配 列 表 】

2016130259000001.app

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 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/531	A

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 モーゼス ロドリゲズ

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 9 0 2 , ロチェスター , ヒルサイド レーン エス . ダブリュー . 2 4 0 2

(72)発明者 アーサー イー . ワリントン

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 9 0 6 , ロチェスター , 1 5 ティーエイチ ストリート エヌ . イー . 2 0 0 4

(72)発明者 ラリー アール . ピーズ

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 9 0 6 , ロチェスター , コリーン レーン エヌイー 2 4 2 6

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QR48 QR51 QR56 QS33 QX02
QX07

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC03 CC06 CC24

4C084 AA19 NA14 ZA02 ZC75

4C085 AA13 AA14 BB37 EE01 EE03 GG02 GG06

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】

2016130259000001.pdf

专利名称(译)	人类抗体及其诊断和治疗用途，用于治疗神经疾病		
公开(公告)号	JP2016130259A	公开(公告)日	2016-07-21
申请号	JP2016077993	申请日	2016-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	梅奥基金会的医学教育和研究		
[标]发明人	モーゼスロドリゲズ アーサーイーワリントン ラリーアールピース		
发明人	モーゼス ロドリゲズ アーサー イー. ワリントン ラリー アール. ピーズ		
IPC分类号	C07K16/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12P21/08 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/507 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/74 C07K2317/94 A61K39/39541		
FI分类号	C07K16/00.ZNA C12N15/00.A C12Q1/02 C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P25/00 A61P43/00.121 G01N33/53.D G01N33/531.A C12N15/13		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC03 4B064/CC06 4B064/CC24 4C084/AA19 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZC75 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB37 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG06 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/455363 2010-10-19 US 61/546634 2011-10-13 US 61/537392 2011-09-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供人抗体及其诊断和治疗用途，用于治疗神经疾病。解决方案：本发明提供特异性结合成员，特别是人抗体，特别是重组抗体及其片段，其能够结合并识别CNS中的神经元并在CNS神经元中引发反应。该抗体可用于神经保护以及与神经损伤，神经损伤或神经变性和神经退行性疾病相关的病症的诊断和治疗。本发明的抗体，其可变区或CDR结构域序列及其片段还可以与化学治疗剂，免疫调节剂或神经活性剂和/或其他抗体或其片段组合用于治疗。抗体的例子是抗体IgM12和IgM42，其序列在本文中提供。所附图：无

ヒト IgM	再ミエリン化 の促進	神経突起伸 長の支持	希突起膠細胞 への結合	ニューロンへの結 合
sHlgM12	なし	あり	なし	あり
sHlgM42	なし	あり	なし	あり
sHlgM22	あり	なし	あり	なし
sHlgM46	あり	なし	あり	なし
sHlgM39	なし	なし	なし	なし