(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2019-50832
(P2019-50832A)
(43)公開日　平成31年4月4日(2019.4.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B064
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C084
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4H045
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 150 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-205 (P2019-205)
(22)出願日　平成31年1月4日 (2019.1.4)
(62)分割の表示　特願2017-89783 (P2017-89783)の分割
原出願日　平成25年4月17日 (2013.4.17)
(31)優先権主張番号　61/625,628
(32)優先日　平成24年4月17日 (2012.4.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(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
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脳卒中および虚血または虚血状態において使用するためのヒト抗体およびその特異的結合配列

(57)【要約】
【課題】脳卒中および虚血または虚血状態において使用するためのヒト抗体およびその特異的結合配列を提供すること。
【解決手段】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に有用であり、特に、脳卒中または脳虚血の処置または改善に有用である。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、もしくは神経作用剤、および／または他の抗体もしくはそれらの断片と組み合わせて用いることもできる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本願図面に記載の発明。
【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。本発明は特に、脳卒中または虚血、特に、脳虚血を緩和または処置する方法、ならびに脳卒中または虚血に用いられる、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、機能欠損が持続する。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。Ａｇｕａｙｏ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、ミエリン関連阻害因子（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調節する程度が、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）。
【０００８】
ＭＡＩとは、ＣＮＳミエリンの成分としての、希突起膠細胞が発現するタンパク質である。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）、ミエリン関連糖タンパク質（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。
【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媒介する。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）。
【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

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脳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。

【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。抗体が媒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）。

【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関連により、ＭＳが免疫媒介性疾患であるという推断が誘発されている。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（「バイスタンダー」的な）ミエリン破壊が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しうる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））。

【００１４】

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ら（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。

【００１５】

虚血とは、組織への血液供給の制限であり、細胞の代謝に（組織の生存を保持するために）必要とされる酸素およびグルコースの不足を引き起こす。虚血は一般に、血管に関する問題、結果としてもたらされる組織への損傷または組織の機能不全に関する問題により引き起こされる。虚血はまた、場合によって、うっ血（血管収縮、血栓症、または塞栓症など）から生じる、身体の所与の部分における局所的な貧血も指す。低酸素症とは、身体の全体または身体の領域（組織低酸素症、または、それほど一般的ではないが、局所低酸素症）から、十分な酸素の供給が失われた状態である。動脈内酸素濃度の変動は、例えば、激しい身体運動の間における正常な生理の一部でありうる。細胞レベルにおける酸素供給とその要求との間のミスマッチは、低酸素状態を結果としてもたらしうる。虚血性低酸素症は、血流が減少する場合に生じ、例えば、心不全および血管拡張性ショックにおいて生じうる。脳低酸素症は、脳に到達する酸素が十分でない場合に生じる。脳は、機能するために、酸素および栄養物の一定の供給を必要とする。

【００１６】

脳低酸素症では、場合によって、酸素供給だけが中断される。脳低酸素症は、煙の吸入、一酸化炭素中毒、窒息、呼吸筋の運動を妨げる疾患、高い高度、気管（ｗｉｎｄｐｉｐｅ（気管（ｔｒａｃｈｅａ））に対する圧力、および絞扼により引き起こされうる。心停止、心不整脈、全身麻酔の合併症、溺水（ｄｒｏｗｉｎｇ）、薬物過剰摂取、脳性まひ、脳卒中、極低血圧など、生誕の間または生後における新生児への傷害など、他の場合には、酸素および栄養物両方の供給が停止または中断される。

【００１７】

脳虚血とは、脳への血流が不十分なことであり、急性の場合もあり、慢性の場合もある。急性虚血性脳卒中とは、迅速に処置すれば逆転可能でありうる、神経学的緊急事態である。慢性脳虚血は、血管性認知症と呼ばれる認知症の形態を結果としてもたらしうる。脳に影響を及ぼす虚血の短いエピソードは、一過性脳虚血発作（ＴＩＡ）と呼ばれるが、軽度脳卒中と称することが多い。

【００１８】

脳血管発作（ＣＶＡ）としてもまた公知である脳卒中は、脳への血液供給の障害に起因する、脳機能（複数可）の急速な喪失である。これは、遮断（血栓、動脈塞栓症）または出血（血液の漏出）により引き起こされる、虚血（血流の欠如）に起因しうる。脳虚血（ｃｅｒｅｂｒａｌ ｉｓｃｈｅｍｉａ）としてもまた公知の脳虚血（ｂｒａｉｎ ｉｓｃｈｅｍｉａ）とは、脳への血流が代謝による要求を満たすのに不十分な状態であり、くも膜下出血および脳内出血と共に、脳卒中の１つの種類である。虚血は、脳の特殊な領域に限られる限局性虚血の場合もあり、脳組織の広範な領域を包摂する全虚血の場合もある。米国では、脳卒中は、長期にわたる身体障害の主要な原因である。毎年、８００，０００近くの人々が、脳卒中を被っている。虚血性傷害後において、臨床的欠損と関連する身体障害は、ニューロンの機能不全に主に起因する。機能的な回復の欠如は、再生および神経可塑性の制約に部分的に帰せられる（Ｗａｌｍｓｌｅｙ，Ａ．Ｒ．およびＭｉｒ，Ａ．Ｋ．（２００７年）、Ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｄｅｓｉｇｎ、１３巻：２４７０～２４８４頁）。脳卒中は、身体の一方の側における１もしくは複数の肢を動かすことができないことなど、運動機能の変化、発話を理解することができないかもしくは発話を行うことができないことなどの認知的影響、または視野の一方の側を見ることができないことなどの視覚的影響を含めた他の欠損を結果としてもたらしうる。現

在のところ、脳卒中に関連する神経欠損を防止または逆転するのに有効な処置は存在しない。

【００１９】

虚血性脳卒中は、場合により、病院で血栓溶解（「クロットバスター」としてもまた公知の）により処置され、一部の出血性脳卒中は脳神経外科から利益を得る。再発の防止は、アスピリンおよびジピリダモールなどの抗血小板薬の投与、高血圧のコントロールおよび低減、ならびにスタチンの使用を伴いうる。選ばれた患者は、頸動脈血管内膜切除術および抗凝固剤の使用から利益を得ることができる。脳虚血の介入的治療は、依然として組換え組織プラスミノーゲン活性化因子ｒｔＰＡの使用による酵素的血栓溶解（Ｂｒｏｔｔ，　Ｔ．Ｇ．ら（１９９２年）、Ｓｔｒｏｋｅ、２３巻：６３２～６４０頁；Ｈａｌｅｙ，　Ｅ．Ｃ．ら（１９９２年）、Ｓｔｒｏｋｅ、２３巻：６４１～６４５頁；Ｇｒｏｕｐ，　Ｔ．Ｎ．（１９９５年）、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｊ　Ｍｅｄ、３３３巻：１５８１～１５８７頁）、および直接的なカテーテル法を介する血餅の介入的摘出（Ｇｏｂｉｎ　ＹＰら（２００４年）、Ｓｔｒｏｋｅ、３５巻：２８４８～２８５４頁）に限定されている。しかし、ｒｔＰＡの治療域は3時間と短く、3時間の時間枠を超えて注入すると、出血性脳虚血の発生率を増加させる（Ｃｌａｒｋ，　ＷＭら（１９９９年）、ＪＡＭＡ、２８２巻：２０１９～２０２６頁；Ｈａｃｋｅ　Ｗら（２００８年）、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｊ　Ｍｅｄ、３５９巻：１３１７～１３２９頁）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００２０】

【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

【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ら、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ら、Ｎａｔｕｒｅ、（２０００年）４０３巻：４３４～４３９頁

【非特許文献８】ＧｒａｎｄＰｒｅ　Ｔら、Ｎａｔｕｒｅ、（２０００年）４０３巻：４３９～４４頁

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

【非特許文献１０】Ｋｏｔｔｉｓ　Ｖら、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】

【００２１】

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したヒトモノクローナル自己抗体が同定されている。ＣＮＳにおける活性を有するヒトモノクローナル抗体、特に、これらの活性、ならびに特に、脳卒中もしくは脳（ｂｒａｉｎ／脳（ｃｅｒｅｂｒａｌ））虚血の例、または脳もしくはＣＮＳへの酸素もしくは血流が、急性もしくは慢性で失われるかもしくは影響を受ける例において、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有する組換え抗体

を開発することが所望される。特に、ＣＮＳに接近し、脳虚血または脳卒中を処置、防止、または緩和する能力を有するヒトモノクローナル抗体の使用および適用が所望される。これは、本発明が対象とする目的の達成に向けたものである。

【００２２】

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】

【００２３】

本発明は、ＣＮＳにおける特定の有効性を有する神経調節剤であって、ＩｇＭ亜型の抗体、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または複数を有する：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。本発明の特定の態様では、薬剤、特に、ニューロン結合モノクローナル抗体は、脳卒中および虚血、特に、脳虚血を処置および緩和するのに有効であり、適用され、用いられ、神経細胞または脳の虚血または低酸素が関与するかまたは生じている状態において有効であり、適用され、用いられる。

【００２４】

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有するニューロン結合モノクローナル抗体を提供する。本研究は、ニューロン結合モノクローナル抗体、特に、抗体ＩｇＭ１２　ｒＨＩｇＭ１２を、脳卒中後の動物（この場合、虚血性脳卒中を誘導するための動物モデル）へと投与すると、動物の機能の明確な改善が結果としてもたらされ、組織の完全性が保護されることを裏付ける。

【００２５】

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であり、脳卒中、虚血性状態、または、神経細胞もしくは小膠細胞における虚血もしくは低酸素の場合、およびこれらが生じたときは、ニューロンおよび神経細胞を標的とし、媒介する抗体が提供される。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使用される。

【００２６】

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　ｂｒｉａｎ　ｉｎｊｕｒｙ）（ＴＢＩ）、筋萎縮性側索硬化症（Ａｍｙｏｌｏｔｒｏｐｉｃ　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、出産前酸素欠乏症／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。

【００２７】
特定の態様では、本発明の抗体またはそれらの組成物は、脳卒中および脳虚血において用いられ、適用される。特定の態様では、本発明の抗体または組成物は、代謝的要求を満たすのに血流および／もしくは脳への酸素が不十分である状態、あるいは脳に対する外傷性傷害であって、ニューロンおよび関連細胞の死滅もしくは傷害、またはこれらの死滅もしくは傷害の危険性を結果としてもたらす外傷性傷害が存在する状態において用いられる。特定の態様では、本発明は、抗体１２または抗体４２、特に、血清由来であるかまたは組換えのＩｇＭ１２もしくはＩｇＭ４２である抗体またはその断片を提供する。
【００２８】
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　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　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　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。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。
【００２９】
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　ＱＱＳＹＨＴＰＷ（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）を含む抗体または断片を提供する。
【００３０】
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。
【００３１】
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。

【００３２】

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　ＱＱＳＹＨＴＰＷ（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　ＱＱＳＹＨＴＰＷ（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供する。

【００３３】

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アント、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　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　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　ＧＦＴＦＳＴＹ

Ａ（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）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。

【００３４】

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。

【００３５】

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、出産前酸素欠乏症／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。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、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に関する。

【００３６】

本発明の特定の態様では、本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、脳卒中または脳虚血の処置または改善のための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。本発明の特定の態様では、本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、脳卒中の処置または改善のための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。本発明の特定の態様では、本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、脳虚血の処置または改善のための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。本発明の実施形態では、本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、脳卒中などの状態における運動機能を改善するための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。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、脳卒中を患っているかまたはこれを患っていることが疑われる動物における運動機能を改善するための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。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、脳卒中を有したことがあるかまたは脳虚血を有する動物における運動機能を改善するための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、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　ＡＲ

ＳＡＳＩＲＧＷＦＤ（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、ＩｇＭ１２、ｒＩｇＭ１２、抗体１２は、脳卒中または脳虚血を処置、防止、または緩和するのに用いることができる。そのある態様では、本発明による可変領域配列を含む抗体、それらの断片、および組換え抗体は、脳卒中および／または脳虚血が決定されるか、疑われるか、またはこの危険性がある例であって、組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）などの酵素性血栓溶解剤または他の血栓溶解剤または抗血栓剤を投与し得るかまたは用いうる例を含む例において投与することができる。

【００３７】

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、傷害もしくは損傷を受け易い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ための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、外傷、もしく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、外傷、もしくは状態の経過もしくは持続時間にわたり反復使用する。

【００３８】

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、および組換え抗体は、脳卒中または脳虚血の場合の神経学的影響、欠損、損傷、またはニューロン細胞死を和らげるかまたは改善するための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。方法に従い、抗体（複数可）は、脳卒中スケールまたは機能スケールなどの、評価可能であるかまたはスケール化可能なパラメータを含め、１または複数の機能的パラメータまたは評価可能な神経学的パラメータまたは運動パラメータを改善する。抗体（複数可）の投与は、例えば、上肢および下肢の運動機能、四肢の失調、感覚機能、言語、構音、注意、凝視および視覚機能、腕部、手掌部、および脚部の力および運動のうちの１または複数を含めた、脳卒中と関連する症状またはパラメータのうちの１または複数を改善する（ｉｍｐｒｏｖｅ）または改善する（　ａｍｅｌｉｏｒａｔｅ）のに有効である。

【００３９】

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。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　ＱＱＳＹＨＴＰＷ（配列番号３６）、または（ｂ）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）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ＩｇＭ１２および／または抗体ＩｇＭ４２のうちの１または複数、特に、抗体ｒＨＩｇＭ２２および／または抗体ｒＨＩｇＭ４６のうちの１または複数を含めた他のＣＮＳ作用抗体と組み合わせることができる。ｒＨＩｇＭ２２抗体は、配列番号４３および４４に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列番号のＣＤＲを含む。ｒＨＩｇＭ４６抗体は、配列番号４５および４６に示されるアミノ酸配列またはこれらの配列番号のＣＤＲを含む。したがって、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ＧＶＴＧＳＰＴＬＤＹ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ＳＧＦＴＦＳＳＹＷ、ＣＤＲ２配列であるＩＫＫＤＧＳＥＫ、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。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１２および／または抗体４２を、抗体２２および／もしくは抗体４６ならびに／またはＩｇＭ２２またはＩｇＭ４６のＣＤＲ領域のＣＤＲ１配列、ＣＤＲ２配列、およびＣＤＲ３配列を有する抗体と組み合わせて、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について再ミエリン化および神経保護を達成する。

【００４０】

本発明の薬剤の神経保護能および／または神経再生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。

【００４１】

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、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ための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。したがって、抗体は、脳卒中または虚血を評価し、かつ／あるいは虚血もしくは脳卒中または予測されるかもしくは疑われる虚血もしくは脳卒中を追跡する中で傷害を評価するためのアッセイおよび方法において用いることができる。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（ｍａｓｓ）を、結合させる標識の性質で変えることができる公知の技法によって調べることができる。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で変えることができる公知の技法によって調べること

ができる。本発明の診断的有用性の態様では、本発明の抗体またはそれらの活性断片を、アッセイおよび方法において用いて、脳虚血または脳卒中を特徴付けることができる。特に、脳虚血または脳卒中が疑われるかまたはこの危険性がある例では、本発明の抗体を用いて、脳虚血および／または脳卒中を決定するかまたはこれらについて評価することができる。

【００４２】

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、ラジオイムノコンジュゲート、特に、放射性標識した抗体としてのラジオイムノコンジュゲートが、神経傷害の修復、神経再生、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。

【００４３】

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。

【００４４】

本発明は、例として挙げると、ニューロンの損傷、障害、もしくは傷害の存在の程度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、抗体に標識をカップリングさせる、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、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）とを含みうる。

【００４５】

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し得る。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みうる。

【００４６】

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。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とするかまたは方向付ける、例えば、脳虚血または脳卒中の部位に向けて、分子または薬剤を標的とすることができる。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

脳虚血もしくは脳卒中を処置もしくは改善するか、脳卒中後もしくは脳虚血後の動物における神経機能を改善するか、または脳卒中後もしくは脳虚血後のニューロンもしくは神経細胞を損傷もしくは細胞死から保護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抗体またはその断片であって、以下の配列：

（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　ＱＱＳＹＨＴＰＷ（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）

を含む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１１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１７に示される可変重鎖アミノ酸配列および配列番号２７に示される可変軽鎖アミノ酸配列、もしくは相同性の高いそれらの変異体を含み、該変異体がニューロン結合活性および神経保護活性または神経再生活性を保持する、項目１に記載の単離抗体。

（項目３）

組換え抗体ｒＨＩｇＭ４２であり、図６に示される、配列番号１７に示される可変重鎖アミノ酸配列および配列番号２７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４）

ヒトＪ鎖配列をさらに含む、項目１に記載の単離抗体。

（項目５）

前記Ｊ鎖が配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含む、項目４に記載の抗体。

（項目６）

組換え抗体ｒＨＩｇＭ１２であり、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１１に示される可変軽鎖アミノ酸配列を含む、項目４または５に記載の抗体。

（項目７）

配列番号１および１１のアミノ酸配列または相同性の高いそれらの変異体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またはその抗体断片であり、該変異体がニューロン結合活性および神経保護活性または神経再生活性を保持する、項目５に記載の単離抗体または断片。

（項目８）

脳または脳細胞または神経細胞への血流または酸素が不十分な、脳卒中、外傷性脳損傷

（ＴＢＩ）、脳虚血、または他の状態において使用される、項目１から７のいずれかに記載の単離抗体またはその断片。
（項目９）
脳卒中または脳虚血を処置または改善するのに使用するために、血栓溶解剤、抗血小板薬、血圧降下薬、またはスタチンと組み合わせて製剤化される、項目１に記載の単離抗体。
（項目１０）
検出可能な標識または機能的な標識で標識した、項目１から７のいずれかに記載の抗体。
（項目１１）
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１０に記載の抗体。
（項目１２）
項目１から７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。
（項目１３）
項目１から７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１２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回収するステップとを含む方法。
（項目１４）
項目１から７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媒体、キャリア、または希釈剤とを含む、脳卒中または脳虚血を処置または改善するための医薬組成物。
（項目１５）
項目１４に記載の医薬組成物の医薬剤形と、１または複数のさらなる神経作用剤もしくは治療薬、血栓溶解剤、血圧降下剤、抗血小板剤、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、カルシウムチャネル剤、免疫調節剤、または他のＣＮＳ反応性抗体を含む個別の医薬剤形とを含む、動物における脳卒中または脳虚血を処置または改善するためのキット。
（項目１６）
動物における脳卒中または脳虚血を処置または改善するための方法であって、脳卒中または脳虚血を患うことが疑われるかまたはそれを患うことが決定された動物に、有効量の、項目１４に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法。
（項目１７）
前記組成物を、単回投与として、脳卒中または脳虚血を患うことが疑われるかまたはそれを患うことが決定された前記動物に投与する、項目１６に記載の方法。
（項目１８）
脳卒中または脳虚血を患うかまたはそれを有することが疑われる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方法であって、
Ａ．脳卒中または脳虚血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７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がおこること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どうかを検出するか、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。
【００４７】
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】
【００４８】
【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を含む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、βＩＩＩチューブリン陽性でもあった（Ｆ：Ｐｒｏｍｅｇａ製の抗βＩＩＩ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、過酸化物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H_2O_2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、カスパーゼ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、処置した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。Ｃλ軽鎖の定常領域は、カッパ軽鎖の定常領域であるＣκ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。
【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。

【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。

【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。

【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。

【図５－７】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５－８】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５－９】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６－１】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６－２】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６－３】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６－４】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６－５】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６－６】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　１００μｇ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±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２．５mm^3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、１００μｇのｓＨＩｇＭ１２、ｓＨＩｇＭ４２、対照のヒトＩｇＭ、または生理食塩液（ＰＢＳ）の単回腹腔内投与を施した。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の平均値は、複数の平均値から得た。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、^{35}Ｓ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。^{35}Ｓ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潅流し、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％のパラホルムアルデヒドで潅流し、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を越えう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ことにより、（Ｃ）で組み合わされた、ｓＨＩｇＭ４２（Ａ）の、長鎖のＮＦ＋線維（Ｂ）との共局在が確認される。ｒＨＩｇＭ１２（Ｄ：緑色）はまた、断面で切断された軸索の線維束などのＮＦ＋構造（Ｄ：赤色）とも共局在した。
【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Ｃ５７ＢＬ６マウス１０匹の群に、１００μｇのｒＨＩｇＭ１２、ｓＨＩｇＭ４２、対照のヒトＩｇＭ、または生理食塩液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）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、ｒＨＩｇＭ１２およびｓＨＩｇＭ４２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、ｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２－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、β３－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。ｒＨＩｇＭ１２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基板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、ｒＨＩｇＭ１２が、軸索形成を駆動することを示す図である。ＰＤＬ基板（Ａ）、ＰＤＬ＋ラミニン基板（Ｂ）、またはｒＨＩｇＭ１２基板（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、ｒＨＩｇＭ１２基板上およびラミニン基板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、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２、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）。ｒＨＩｇＭ１２（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ｒＨＩｇＭ１２で処置した後、膜結合ｒＨＩｇＭ１２は、ニューロン表面に凝集する（Ｂ１～Ｃ１）。ｒＨＩｇＭ１２で処置する結果として、凝集したｒＨＩｇＭ１２（Ｂ３～Ｃ３）と共局在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ｒＨＩｇＭ１２（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）との共局在を示す図である。

【図２１】図２１は、ｒＨＩｇＭ１２が、ニューロン膜のマイクロドメイン上のＧＭ１と共局在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、ｒＨＩｇＭ１２で染色したことを示す図である。ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２で標識するのに続き、抗βＩＩＩ－チューブリン抗体で染色したことを示す図である。ｒＨＩｇＭ１２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の生存海馬ニューロンを、３７℃で３０分間にわたりメチル－β－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、ｒＨＩｇＭ１２（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。ｒＨＩｇＭ１２は、コレラ毒素Ｂで標識したＧＭ１を共局在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、ｒＨＩｇＭ１２が、脂質ラフトに結合することを示す図である。ＤＩＶ７の生存皮質ニューロンを、ｒＨＩｇＭ１２または対照のＩｇＭ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ＩｇＭ二次抗体でブロッティングした。ｒＨＩｇＭ１２は、ニューロンには結合せずに洗い流される対照のＩｇＭ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分画したことを示す図である。結果として得られる画分は、続いて、特異的抗体により、ｒＨＩｇＭ１２、カベオリン－１、トランスフェリン受容体、β３－チューブリン（Ｂ３－Ｔｕｂ）、およびベーター－アクチンに

ついてブロッティングした。ｒＨＩｇＭ１２は、カベオリン－１およびβ３－チューブリンを含有する低密度画分に局在する。高密度画分は、トランスフェリン受容体、β３－チューブリン、およびアクチンを含有する。一部のｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２が微小管と会合することを示す図である。Ａ：ＤＩＶ１の海馬ニューロンを、まず、３７℃で３０分間にわたりｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２（緑色）、β３－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。ｒＨＩｇＭ１２は、神経突起軸に沿った束化微小管および成長円錐の中央ドメインにおける束化微小管とは共局在する（Ａ２および４）が、成長円錐末梢に局在するＦ－アクチンとは共局在しない（Ａ３および４）、洗浄剤不溶性分子に結合する。Ｂ：ＤＩＶ７の皮質ニューロンを、まず、ｒＨＩｇＭ１２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。ｒＨＩｇＭ１２およびβ３－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、ｒＨＩｇＭ１２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：ｒＨＩｇＭ１２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査し、ラフトマイクロドメインが、ｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２（Ａ１：緑色）およびβ３－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、ｒＨＩｇＭ１２による染色については陰性であるが、β３－チューブリンは発現させる。Ｂ：Ｎ２Ａ細胞溶解物の上清を、ｒＨＩｇＭ１２と共にインキュベートし、ｒＨＩｇＭ１２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、ウェスタンブロット法にかけたことを示す図である。ｒＨＩｇＭ１２は、ペレットと会合しない。β３－チューブリンは、上清中に検出されるが、ｒＨＩｇＭ１２にはプルダウンされなかった。

【図２６】図２６は、ｒＨＩｇＭ１２が、アクチンはプルダウンするが、Ｆ－アクチンとは共局在しないことを示す図である。Ａ：ＤＩＶ１の生存海馬ニューロンを固定した後、まず、４℃で、ｒＨＩｇＭ１２（Ａ１：緑色）により染色し、Ｆ－アクチン（Ａ２：赤色）をＴｅｘａｓ－ｒｅｄファ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、ｒＨＩｇＭ１２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：ｒＨＩｇＭ１２により少量のアクチンがプルダウンされ、免疫沈降では３つの被験抗アクチン抗体のいずれもが作用しなかった。β３－チューブ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ＩｇＧ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２００ｎｍとする）穿通された金薄膜上に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ＩｇＭでコーティングした基板上に播種し、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。ｓＨＩｇＭ４２は、非許容性のヒトＩｇＭ（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をクラスター形成させることを示す図である。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℃まで温めると、ｓＨＩｇＭ４２は、軸索の細胞表面上におけるより個別の斑点へと局在する（Ｂ）。

【図３０】図３０は、ｉｎ　ｖｉｖｏ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ＳＣＩ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ＩｇＭ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ＩｇＭに結合する平行線維を示す（Ａ）。対照のヒトＩｇＭを施されたマウスに由来する脊髄の損傷領域は、ヒトＩｇＭ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Ｆｅｊｏｔａ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。

【図３２】図３２は、ＴＭＥＶ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圧縮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。

【図３３】図３３は、ニューロン結合抗体（ｒＨＩｇＭ１２）の単回腹腔内投与が、慢性感染ＳＪＬ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ＳＪＬマウス５匹ずつの３つの群を、ＡｃｃｕＳｃａｎ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）各日のビンとして提示される平均の夜間活動により、ｒＨＩｇＭ１２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（ＧＢ＝２日間）を示す図であり、Ｅ）Ｚ値を標準化した６次の多項式フィッティングにより、ｒＨＩｇＭ１２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、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３４】図３４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。ｒＨＩｇＭ１２で処置したマウスの水平方向の夜間活動は、対照のＩｇＭ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。

【図３５】図３５は、疾患の早期に施した場合のｒＨＩｇＭ１２が、ＳＪＬ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ＳＪＬマウス５匹ずつの３つの群を、ＡｃｃｕＳｃａｎ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）各日のビ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次の多項式フィッティングにより、ｒＨＩｇＭ１２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ＩｇＭ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３６】図３６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）ｒＨＩｇＭ１２で処置したマウスの水平方向の夜間活動は、対照のＩｇＭ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）ｒＨＩｇＭ１２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。

【図３７】図３７は、正常な非感染ＳＪＬ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ＳＪＬマウス５匹ずつの３つの群を、ＡｃｃｕＳｃａｎ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３８】図３８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、ｒＨＩｇＭ１２またはＰＢＳ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、瀕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。ｒＨＩｇＭ１２で処置したマウスにおいては、ＰＢＳ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ＳＯＤ＋／＋マウスは、正常に生存し、体重も減少しなかった（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、ｒＨＩｇＭ１２　２００μｇ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。ｒＨＩｇＭ１２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、２５０μｇのｒＨＩｇＭ１２またはＰＢＳ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。ｒＨＩｇＭ１２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）で潅流し、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、ｒＨＩｇＭ１２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。ｒＨＩｇＭ１２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多かった（Ｔ検定でＰ＝０．００２５およびＰ＝０．０１８）。ｒＨｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２（Ａ、Ｃ、Ｅ、およびＧ）で染色し、同じ細胞を、ニーロフィラメント（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。ｒＨＩｇＭ１２は、蛍光タグ付けした二次抗体で検出した。
【００４９】
【図４３】図４３は、ＣＤ－１マウスにおける脳虚血を示す図である。Ａ：２４時間後における脳虚血領域（ａｒｅａ）（高信号領域（ｈｙｐｅｒｉｎｔｅｎｓｅ　ｒｅｇｉｏｎ））を示す、ＤＷＩ－ＭＲＩ画像走査を示す図である。Ｂ：脳虚血後のマウス脳における虚血性損傷（脳の右半球上の青白い円形の領域）を示す図である。Ｃ：損傷した組織（黒色で強調される）を４倍で示すＨ＆Ｅ切片を示す図である。
【００５０】
【図４４】図４４は、ニューロン結合抗体（ｒＨＩｇＭ１２）の単回腹腔内投与が、光血栓性脳虚血に陥ったＣＤ１マウスの水平方向の活動（Ａ）および垂直方向の活動（Ｂ）を改善することを示す図である。マウスは、２００μｇのｒＨＩｇＭ１２（ｎ＝５）またはＰＢＳ（ｎ＝５）の単回投与により処置した。ｒＨＩｇＭ１２処置群では、３日目から活動が改善された。Ｃ：マウスは、小動物用ＭＲＩシステムで走査して、脳虚血の全容積を測定し、これを、mm^3単位でグラフに表したことを示す図である。
【００５１】
【図４５】図４５は、ＭＴ－ＭＲＩ計量により、転帰の改善が裏付けられることを示す図である。マウスを脳虚血に陥らせ、ｒＨＩｇＭ１２またはＰＢＳで処置した。虚血性傷害の３日後、脳の虚血半球（赤色の輪郭）および対側半球（緑色の輪郭）のＭＴＲマップ（パネルＡ）を算出した。ｒＨＩｇＭ１２で処置された群は、脳卒中のＲＯＩ内で、ＰＢＳで処置された群と比較して、ＭＴＲの相対的増加（パネルＢ；青色のバーは、対照側で算出された値を表す）および脳卒中容積の減少（パネルＣ）を裏付けた。
【００５２】
【図４６】図４６は、ポリ－Ｄ－リシン上で５日間にわたり成長させ、低酸素状態（２．７％のO_2、５％のCO_2）下で４～４４時間にわたりインキュベートした皮質ニューロン（ＣＮ）についてのウェスタンブロット解析を示す図である。４時間、２１時間、および４４時間にわたる低酸素処置後における切断型カスパーゼ３のレベルを対照（ブロット内の４４時間、０時間のインキュベーション）と比較して示す代表的なブロットである。
【００５３】
【図４７】図４７は、ミエリンマーカーであるＭＢＰおよびアポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ（ｃａｐａｓｅ）３による３回の独立の実験に由来するウェスタンブロットについての定量的解析を示す棒グラフを描示する図である。混合神経膠培養物を、ＦＢＳ（１０％）含有培地中で４日間にわたり成長させ、既知組成培地中で、再ミエリン化促進ＩｇＭであるｒＨＩｇＭ２２、再生性ｍＡｂであるｒＨＩｇＭ１２、アイソタイプ対照であるｓＨＩｇＭ１１６（各々１０μｇ／ｍｌずつ）、または培地だけにより、７日間

にわたり処置した。新鮮な抗体を含む培地で、１日おきに交換した。４日間の終了時に、ウェスタンブロットを用いて、培養物を、ＭＢＰまたはカスパーゼ３について評価し、領域１つ当たりのＯＤにより定量化し、プロットした。

【００５４】

【図４８】図４８は、多様なタンパク質およびマーカー：希突起膠細胞前駆細胞（ＯＰＣ）マーカーであるＰＤＧＦαＲ、ミエリンマーカーであるＣＮＰアーゼおよびＭＯＧ、小膠細胞マーカーであるＣＤ６８およびＬｙｎ、増殖マーカーであるＫｉ－６７およびヒストンＨ３、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３、ならびに細胞周期マーカーであるｐＲｂＳ７９５のレベルを示す代表的なウェスタンブロットを提示する図である。ＯＰＣ－小膠細胞共培養物は、表示される通り、再ミエリン化促進ｍＡｂであるＡ２Ｂ５、Ｏ４、Ｏ１、７８．０９、９４．０３、ｒＨＩｇＭ２２、再生性ｍＡｂであるｒＨＩｇＭ１２、アイソタイプ対照（ＬＥＡＦ、５Ａ５、ＣｈｒｏｍＰｕｒｅ　ＩｇＭ、ｒＨＩｇＭ４２、ｓＨＩｇＭ１４、ｓＨＩｇＭ２４、ｓＨＩｇＭ２６）（各々１０μｇ／ｍｌずつ）を含む星状細胞馴化培地中または培地中で培養した。

【００５５】

【図４９】図４９は、活性化小膠細胞についてのマーカーであるＣＤ６８、および小膠細胞中では非常に豊富であり、ＯＰＣ中では量が少なく、星状細胞では存在しないキナーゼである、Ｌｙｎキナーゼによる３回の独立の実験に由来するウェスタンブロットについての定量的解析を示す棒グラフを描示する図である。図４８について上記で言及し、表示した通り、混合培養物（ＯＰＣ－小膠細胞共培養物）を抗体で処置した。

【００５６】

【図５０】図５０は、培養の４日目のｍＡｂ処置の前、ならびにｒＨＩｇＭ１２、ｒＨＩｇＭ２２、およびアイソタイプ対照であるｓＨＩｇＭ２４（各々１０μｇ／ｍｌずつ）による処置の７日後である培養の１１日目における、混合神経膠培養物中のＣＤ６８（緑色）および核マーカーであるＤＡＰＩ（青色）のレベルを示す代表的な免疫蛍光画像を提示する図である。

【００５７】

【図５１】図５１は、低酸素誘導因子１（ＨＩＦ１α）、希突起膠細胞マーカーであるＮＧ２、ＰＤＧＦα、Ｏｌｉｇ－２、ミエリンマーカーであるＭＢＰおよびＣＮＰアーゼ、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、小膠細胞マーカーであるＣＤ６８、細胞周期マーカーであるｐＲｂＳ７９５、ならびにアポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３のレベルを示す代表的なウェスタンブロットを提示する図である（ベーターアクチンを、ローディング対照として用いた）。混合神経膠培養物を、ＦＢＳ（１０％）含有培地中で４日間にわたり成長させ、正常酸素状態（２１％のＯ２）と比較した低酸素（３％のＯ２）下の既知組成培地中で、さらに最長７日間にわたり処置した。タンパク質は、注記される通り、１、３、５、および７日目に、ウェスタンブロットにより評価した。

【００５８】

【図５２】図５２は、タンパク質マーカーについての発現の定量値を低酸素状態と正常酸素状態と比較して提示する、図５１のウェスタンブロットの定量的解析を描示する図である。

【００５９】

【図５３】図５３は、増殖マーカーであるＫｉ－６７、小膠細胞マーカーであるＩＢＡ－１、ＣＤ６８、およびｉＮＯＳ、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、細胞周期マーカーであるｐＲｂＳ７９５およびｐＲｂＳ８０７、希突起膠細胞マーカーであるＰＤＧＦαＲ、ＮＧ２、Ｏｌｉｇ－１およびＯｌｉｇ－２、ならびにミエリンマーカーであるＭＢＰについての代表的なウェスタンブロットを提示する図である。混合神経膠培養物を、正常酸素状態下のＦＢＳ（１０％）含有培地中で４日間にわたり成長させ、その後、既知組成培地中、低酸素（３％のＯ２）下、ヒト再生性抗体であるｒＨＩｇＭ１２または培地だけで、１～７日間にわたり処置した。

【００６０】

【図５４】図５４は、正常酸素状態下および低酸素状態下で成長させ、培地単独と対比したｒＨＩｇＭ１２抗体またはｒＨＩｇＭ２２抗体で処置した、７日目の混合培養物中の、小膠細胞マーカーであるＩＢＡ－１およびＣＤ６８、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、希突起膠細胞マーカーであるＰＤＧＦαＲ、ＮＧ２、Ｏｌｉｇ－２、ならびにミエリンマーカーであるＭＢＰおよびＣＮＰアーゼのレベルを示す代表的なウェスタンブロットを提示する図である。混合神経膠は、前出で記載した通りに培養し、低酸素状態下または正常酸素状態下の既知組成培地中、７日間にわたり、ｒＨＩｇＭ１２、ｒＨＩｇＭ２２、または培地だけで処置した。

【００６１】

【図５５】図５５は、低酸素性および正常酸素性のＰ１３におけるＣ５７／Ｂｌ６新生仔マウスからの皮質に由来する多様なマーカーについてのＲＴ－ＰＣＲ解析を提示する図である。Ｃ５７／Ｂｌ６新生仔マウスを、ＣＤ１母体マウスで交差養育し（ｃｒｏｓｓ－ｆｏｓｔｅｒｅｄ）、Ｐ３～Ｐ７の４日間にわたり低酸素（１０％のＯ２）へと曝露した。マウスは、その後、さらに６日間にわたり室内空気へと曝露し、Ｐ１３に屠殺した。いずれの処置群においても、ＲＮＡを皮質から単離し、ミエリンマーカーであるＰＬＰ１、ＭＯＧ、ＭＢＰ１、希突起膠細胞前駆細胞マーカーであるＰＤＧＦαＲおよびＯｌｉｇ－１、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、ニューロンマーカーであるＮｅｓｔｉｎおよびβ３－チューブリン、低酸素誘導因子１αおよびサルコスパンタンパク質ＳＳＰＮについてプローブした。発現レベルは、ＲＴ－ＰＣＲにより解析し、結果は、β－アクチンのレベルに対して正規化した。

【図５６】図５６は、各パネルに表示されるとおり、対照（偽操作された）マウスおよび脳卒中マウス（Ｒｏｓｅ　Ｂｅｎｇａｌプロトコール）に由来する多様な組織における、放射性標識したｒＩｇＭ１２抗体の量（１００μｌ当たりのｃｐｍとして測定される放射能により表示される）を表示するグラフを提示する図である。脳卒中の３０～４０分後、容量５００ｕｌの生理食塩液中に約６０ｕｇのＩｇＭである、１０００万ｃｐｍの３５Ｓで標識されたｒＨＩｇＭ１２を、各マウスへと腹腔内投与した。ＩｇＭ処置の６、１２、および２４時間後、血液をマウスから回収し、血管系を、３０ｍｌの生理食塩液で洗浄し、組織を速やかに回収した。脳卒中組織内の放射性標識について解析するため、病変領域を含有する脳の右前頭皮質（ｒｉｇｈｔ　ｆｒｏｎｔ　ｃｏｒｔｅｘ）を、７５ｍｇの組織ブロックとして摘出した（パネル内で「脳」と表示される）。他の組織の一部も摘出し、秤量し、処理した。ＣＢ＝小脳、ｃｏｒｄ＝脊髄。

【発明を実施するための形態】

【００６２】

詳細な説明

本発明に従い、当技術分野内にある従来の分子生物学、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）］；「Ｏｌｙｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　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）］；「Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌｓ　Ａｎｄ　Ｅｎｚｙｍｅｓ」［ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ（１９８６年）］；Ｂ．　Ｐｅｒｂａｌ、「Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ

Ｔｏ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ」（１９８４年）を参照されたい。

【００６３】

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。

【００６４】

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の特定の空間組織および極性組織に特異的に結合し、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－抗体型の反応に関与する。

【００６５】

「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、ＣＤＲ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４，８１６，３９７号および同第４，８１６，５６７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Ｉｇ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（Ｉｇ）分子を包含し、これらには、Ｉｇ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、バリアント、または誘導体が含まれ、これらには、二重特異性（ｄｕａｌ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ、ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ）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、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、またはサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２）の分子でありうる。「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。

【００６６】

「抗体断片」とは、（ｉ）軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン、重鎖可変（ＶＨ）ドメイン、軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）、および重鎖定常１（ＣＨ１）ドメインからなる一価断片であるＦａｂ断片；（ｉｉ）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Ｆａｂ断片を含む二価断片であるＦ（ａｂ’）２断片；（ｉｉｉ）ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインからなるＦａｂの重鎖部分（Ｆｄ）断片；（ｉｖ）抗体の１本のアームのＶＬドメインおよびＶＨドメインからなる可変領域断片（Ｆｖ断片）；（ｖ）単一の可変ドメインを含むドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ、Ｅ．Ｓ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、３４１巻、５４４～５４６頁（１９８９年））；（ｖｉ）ラクダ科抗体；（ｖｉｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）；（ｖｉｉｉ）ＶＨドメインおよびＶＬ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Ｆｖ断片（Ｂｉｒｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４２巻、４２３～４２６頁、１９８８年；Ｈｕｓｔｏｎら、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、８５巻、５８７９～５８８３頁、１９８８年）；（ｉｘ）ＶＨドメインおよびＶＬ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（ＷＯ９４／１３８０４；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、バリアント、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。

【００６７】

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、または必要と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、抗体の誘導体、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。

【００６８】

「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から成る抗体分子の構造的部分である。

【００６９】

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。

【００７０】

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。

【００７１】

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、創傷治癒、炎症、がん、または腫瘍の特定の領域へと誘導するかまたは標的化することができる。

【００７２】

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。

【００７３】

「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。抗原が大きい場合、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。

【００７４】

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、または薬物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。

【００７５】

「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。

【００７６】

「～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。

【００７７】

「～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十分に理解するであろう。

【００７８】

「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、なお実際的な目的では、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を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）。

【００７９】

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。

【００８０】
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アント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、本明細書で記載され、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ァイ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。

【００８１】
本明細書で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」異性体形態の残基で、任意のＬ－アミノ酸残基を置換することができる。NH_2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。

【００８２】

【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
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
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
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
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

【００８３】

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。

【００８４】

「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。

【００８５】

「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セグメントを結合させうる、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。

【００８６】

「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。

【００８７】

「複製起点」とは、ＤＮＡ合成に関与するＤＮＡ配列を指す。

【００８８】

ＤＮＡによる「コード配列」とは、適切な調節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。

【００８９】

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の調節配列である。

【００９０】

「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の調節領域である。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－ダルガルノ配列を含有する。

【００９１】

「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。

【００９２】
「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ト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、タンパク質が宿主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そなわっている多様なタンパク質と関連することが見出されうる。
【００９３】
本発明のプローブ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からなる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、また、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。
【００９４】
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応じて、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。
【００９５】
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。
【００９６】
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。
【００９７】
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または異種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ム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からなる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祖先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。
【００９８】
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

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、配列データバンク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。

【００９９】

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うることが周知である：

【０１００】

【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
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
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
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
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)

【０１０１】

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。

【０１０２】

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

または図５もしくは６に示される核酸配列では、特定のコドンを、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。このような保存的変化は一般に、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。非保存的変化は、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変化を含有する配列を包含すると考えるべきである。

【０１０３】

以下は、アミノ酸の多様な群分けの一例である。

非極性Ｒ基を有するアミノ酸

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基を有するアミノ酸

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

帯電した極性Ｒ基（Ｐｈ６．０で負に帯電している）を有するアミノ酸

アスパラギン酸、グルタミン酸

塩基性アミノ酸（ｐＨ６．０で正に帯電している）

リシン、アルギニン、ヒスチジン（ｐＨ６．０で正に帯電している）。

【０１０４】

別の群分けは、フェニル基を有する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。

【０１０５】

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。

【０１０６】

【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
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

【０１０７】
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NH_2が維持されうるような、ＧｌｎによるＡｓｎの置換
である。
【０１０８】
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。
【０１０９】
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との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β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。
【０１１０】
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。

【０１１１】

ＤＮＡ構築物の「異種」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、異種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。異種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の異種領域をもたらさない。

【０１１２】

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。

【０１１３】

「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十分に理解するであろう。「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。

【０１１４】

「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。

【０１１５】

「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。

【０１１６】

「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方法を意味する。「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方法を意味する。

【０１１７】

「～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

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。

【０１１８】

「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、不動に起因する血栓症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うる。

【０１１９】

「治療有効量」とは、医師または他の臨床家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状態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。

【０１２０】

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、被験体により同定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、同定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。

【０１２１】

「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、例えば胃の不調、めまいなどをもたらさない分子的実体および組成物を指す。

【０１２２】

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。

【０１２３】

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

は神経保護剤であれば、複数の障害において用いうるであろう。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カテゴリーに由来する生成物を含め、多くの生成物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、複数の神経保護候補の生成物が、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。

【０１２４】

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、および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有用とし、かつ適用可能とする、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。

【０１２５】

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。特に、本出願は、脳卒中および脳血栓症または脳虚血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の証拠を提示する。本明細書で提示される研究は、脳卒中および脳虚血の認知された動物モデルにおける能力および活性を裏付ける。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神経傷害の防止または障害の例における神経の保護もしくは障害の危険性がある神経の保護に使用される組成物が提供される。

【０１２６】

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板上で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阻害を凌駕することを示した（Ｗａｒｒ

ｉｎｇｔｏｎ 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（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓ 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。特に、脳虚血および脳卒中の動物モデルを用いる研究は、脳卒中、脳虚血、および脳もしくはＣＮＳ内の細胞における血流または脳もしくはＣＮＳ内の細胞への血流の喪失の状態あるいはこれから生じる状態における、これらの血清由来のおよび組換え抗体、特に、組換えＩｇＭ１２、ｒＨＩｇＭ１２の治療的に関与性の効果についての裏付けを提示する。

【０１２７】

抗体および組成物

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ーであり、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。通常文脈にない分子は、まとまっ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）。

【０１２８】

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）。

【０１２９】

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、ｒＨＩｇＭ２２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（Ｐｉｒｋｏ　Ｉら（２００４年）、Ｆａｓｅｂ　Ｊ、１８巻：１５７７～１５７９頁）。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７，８０７１６６号で対象とされている。

【０１３０】

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。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、出産前酸素欠乏症／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。

【０１３１】

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または複数を有する：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。

【０１３２】

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　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　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　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。

【０１３３】

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、Ｆａｂ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ＩｇＭ１２およびＩｇＭ４２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、ＩｇＭ１２および／またはＩｇＭ４２の抗原結合領域または重鎖ＣＤＲ領域および／もしくは軽鎖ＣＤＲ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。

【０１３４】

一般に、図５および６のＣＤＲ領域として実質的に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ領域は、ＣＤＲ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、本発明の可変領域配列、および／または、特に、ＣＤＲ配列が、図５および６の指定した領域と同一であるか、またはこれらと相同性が高いことを意味する。「相同性が高い」とは、可変領域配列および／またはＣＤＲ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。

【０１３５】

ＣＤＲ以外の可変領域配列では、ＣＤＲ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、ＣＤＲ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、ＣＤＲにおいて施すこともできる。本発明の抗体のＣＤＲ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ＣＤＲ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　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　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。上に記載し想定した置換を有する本発明の抗体は、抗体ＩｇＭ１２および抗体ＩｇＭ４２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。

【０１３６】

本発明のＣＤＲ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、ＣＤＲ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ＶＨ可変ドメインおよびＶＬ可変ドメインのＣＤＲ領域に対応す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、Ｋａｂａｔ，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パートリーへと導入することができる。

【０１３７】

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パートリ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可変ドメインのレパートリ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パートリーを、特定の抗体のＣＤＲと組み合わせう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、レパートリーを、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。レパートリーは、約10^4を超える個別のメンバー、例えば、10^6～10^8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、β－ラクタマ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うることに気付いている。

【０１３８】

さらなる代替法は、例えば、可変ドメイン全体の内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。用いうる別の方法は、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ことが可能であろう。

【０１３９】

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いずれかまたは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末端の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しうる。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。

【０１４０】

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。

【０１４１】

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みうる。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末端の端において、図５または６に示されるそれぞれの定常ドメインと異なるか、またはこれらに由来するバリアントである定常ドメインを含め、ヒトＣκ鎖またはヒトＣλ鎖、好ましくは、Ｃλ鎖を含めた抗体の軽鎖定常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末端の端において、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のいずれか、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。

【０１４２】

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、毒素の全体の場合もあり、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；Ｓｃｈｎｅｌｌ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）。

【０１４３】

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の化学反応を用いて本発明の抗

体に結合させうる同位体である、^{3}H、^{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、ローダミン、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含まれる。これらにはまた、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β－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、プロドラッグを上記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。

【０１４４】

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、それらのバリアント、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；ｄｅｌＺｏｐｐｏ　ＧＪ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　ＭＥら（１９９４年）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２６４巻：１７７２～１７７５頁）。

【０１４５】

脳卒中および治療法

本明細書で提示される実施例および研究は、本明細書で提示され、記載され、想定される抗体の有効性および適用を、脳卒中、虚血、および脳またはニューロン細胞に対する低酸素の例のモデルにおいて裏付ける。したがって、特定の態様では、本発明は、脳卒中、脳虚血、脳卒中が疑われるかもしくは推測される状態、一過性脳虚血発作（ＴＩＡ）もしくは軽度脳卒中に関する介入、または脳卒中もしくは脳虚血性イベントもしくは脳における低酸素性イベントの危険性が高い個体における抗体の使用に関する。

【０１４６】

脳卒中に由来する最悪の損傷は通常、最初の数時間以内に生じるので、脳卒中であるか

または脳卒中が疑われる場合は、迅速な処置が重要である。より迅速な処置の結果として、初期損傷および永続的損傷または長期損傷は軽度となる。処置は、血餅（虚血性）に起因する虚血性脳卒中において血流の回復がなされているのかどうか、または出血性脳卒中で出血のコントロールがなされているのかどうかという、脳卒中の性質または原因に依存する。ＣＴスキャンおよびＭＲＩを用いて、脳卒中の種類または程度を評価または診断する。急性虚血性脳卒中の最新の処置は、特に、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）によるＩＶ血栓溶解療法、ならびに動脈内血栓溶解療法および血餅回収デバイスの使用を含めた血管内療法を含む。しかし、ｔＰＡは治療域が限定されており、脳卒中発症から３時間以内に投与することが典型的である。脳虚血後に損傷したニューロンの保護は、永続的な身体障害を抑制するのに有望な戦略である。炎症反応を調節する治療は、神経保護特性を有しうるが、ニューロンに直接作用してそれらを保護する薬物は、現在のところ極めて少数である。

【０１４７】

危険性の高い患者、特に、一過性脳虚血発作（ＴＩＡ）または軽度脳卒中をかつて有したことがある患者における脳卒中を防止する一助となりうる多数の医薬が入手可能である。これらの薬物は、２つの主要な類型：抗凝固剤および抗血小板剤に分かれる。抗凝固剤の例は、ヘパリン、Ｃｏｕｍａｄｉｎ、ワルファリン、キシメラガトラン、およびＥｘａｎｔａを含む。これらの薬物は、深部静脈血栓症および肺塞栓症の例における血餅形成を含めた血餅形成を防止する一助となるように血液を低粘稠化することにより働き、心房細動のある患者における脳卒中を防止する一助となるのに極めて有効である。抗血小板剤は、アスピリン、Ｐｅｒｓａｎｔｉｎｅ、ジピリダモール、Ｐｌａｖｉｘ、およびクロピドグレルを含む。これらの薬剤は、血小板の凝集を防止または低減し、これにより、血餅または血餅形成を低減し、ＴＩＡまたは既往の虚血性脳卒中を有したことのある患者における脳卒中の危険性を低減しうる。米国では、血栓溶解療法の利用可能性にもかかわらず、脳卒中は依然として、３番目に多い死因であり、成人の身体障害の最も一般的な原因である。研究者および医師は、脳卒中患者におけるより良好な機能回復を達成する方途を調査し続けている。神経保護剤は、強い関心を生み出しており、脳を、脳卒中の損傷作用を受けにくくする潜在性を有する。

【０１４８】

脳卒中の程度および影響を評価する（ａｓｓｅｓｓｉｎｇ）および評価する（ｅｖａｌｕａｔｉｎｇ）にあたり、臨床医および医療従事者は、患者の能力および機能の多様な側面を精査し、考慮する。脳卒中または血餅および虚血の領域を同定および位置特定する画像化法に加えて、脳卒中評価（ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ）スケールおよび機能評価（ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ）スケールを用いて、患者を評価（ｅｖａｌｕａｔｅｄ）する。多数のスケールが許容されるかまたは用いられており、臨床医および当業者に認知され、公知である。機能評価スケールは、例えば、Ｂｅｒｇ Ｂａｌａｎｃｅ Ｓｃａｌｅ、Ｌａｗｔｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｌ Ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ ｏｆ Ｄａｉｌｙ Ｌｉｖｉｎｇ（ＩＡＤＬ）Ｓｃａｌｅ、Ｒａｎｋｉｎ Ｓｃａｌｅまたは改変Ｒａｎｋｉｎ Ｓｃａｌｅ、およびＮＩＨ Ｓｔｒｏｋｅ Ｓｃａｌｅ（ＮＩＨＨＳ）を含む。これらのスケールは、上肢および下肢の運動機能、四肢の失調、感覚機能、言語、構音、注意、凝視および視覚機能、腕部、手掌部、および脚部の力および運動を含めた、複数または多数の多様なパラメータを評価および決定する。可能なまたは候補の薬剤の処置を評価し、処置または薬剤を比較するために、患者を、脳卒中または虚血性イベントの直後、イベント後、処置の前および後における１または複数のスケールにより評価することができ、数日間、数週間、数カ月間、数年間を含めた期間にわたり、１または複数のスケールにより評価することができる。

【０１４９】

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、特に、確立されているか、疑われるか、または可能な脳卒中または脳虚血の例における神経保護の方法であって、上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を処置、防止、または診断する方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るか、もたらす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の使用を含め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、脳への血液供給または酸素が低減されるかまたは障害された状態を含め、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、脳卒中、ＴＩＡ、脳虚血、出生前酸素欠乏症／周産期虚血および／または脳性まひが含まれる。

【０１５０】

本発明の薬剤、特に、組換え抗体またはそれらの断片は、脳卒中または脳虚血を防止、処置、または改善するための方法における薬剤として用いることができる。本発明は、脳卒中または脳虚血を処置または改善する方法であって、本発明の抗体、特に、組換え抗体、特に、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　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　ＱＱＳＹＨＴＰＷ（配列番号３６）を含む抗体またはその断片を含めた、抗体ＩｇＭ１２または組換えＩｇＭ１２を投与するステップを含む方法を提供する。

【０１５１】

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、特に、抗体ｒＨＩｇＭ２２および／またはｒＨＩｇＭ４６のうちの１または複数を含めた、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と組み合わせて、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）と組み合わせて、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と組み合わせて、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ＧＶＴＧＳＰＴＬＤＹ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）ＴＷＤ

ＳＳＬＳＡＶＶを含む軽鎖可変領域のＣＤＲ；または（ｂ）ＣＤＲ１配列であるＳＧＦＴＦＳＳＹＷ、ＣＤＲ２配列であるＩＫＫＤＧＳＥＫ、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。

【０１５２】

本発明の方法は、単独であるか、または血栓溶解薬剤、抗血小板剤、血圧調節剤、血圧降下剤、抗炎症剤、興奮性アミノ酸もしくはそれらの受容体を変化させる薬剤、細胞内カルシウム調節剤、チャネル調節剤、フリーラジカルスカベンジャーのうちの１もしくは複数を含めた、脳卒中もしくは虚血のための薬剤の投与と組み合わせるか、これらの投与と組をなすか、もしくはこれらの投与に後続する、本発明の抗体の投与を含みうる。特定の態様では、抗体またはそれらの活性断片、特に、抗体ＩｇＭ１２および／またはＩｇＭ４２は、血栓溶解薬剤および／または抗血小板剤と共に投与する。ある態様では、抗体は、ＴＰＡなど、血栓溶解薬剤と共に投与することもでき、この後で投与することもできる。

【０１５３】

共に投与することは、ほぼ同時、直後、数分間後、最長１時間後、数時間後、１日後を含みうる。特に、抗体ＩｇＭ１２もしくはＩｇＭ４２としての単独の、または組合せによる、もしくは他の薬剤とともに抗体（複数可）の投与は、脳卒中が確認されたもしくは脳卒中が疑われたまたは脳虚血性イベントが確認されたもしくは脳虚血性イベントが疑われた後の、ＴＰＡまたは血栓溶解薬剤を投与するための３時間、４時間、５時間、６時間、最長で９時間の治療域内の場合もあり、これらの治療域後の場合もある。抗体（複数可）は、単回投与で投与することもでき、複数回投与で投与することもできる。例を目的とするものであり、限定を目的とするものではなく述べると、抗体（複数可）は、脳卒中が確認されたもしくは脳卒中が疑われたまたは脳虚血性イベントが確認されたもしくは脳虚血性イベントが疑われた後の、３時間以内に、３時間、最長で４時間、最長で５時間、最長で６時間、最長で８時間、最長で１２時間、最長で２４時間、最長で１日間、最長で２日間、最長で３日間、最長で数日間、最長で１週間、またはそれより長い期間後に投与することができる。抗体（複数可）は、例を目的とするものであり、限定を目的とするものではなく述べると、脳卒中が確認されたもしくは脳卒中が疑われたまたは脳虚血性イベントが確認されたもしくは脳虚血性イベントが疑われた後の、３～６時間以内に初回投与した後、初回投与または任意の後続の投与の最長で１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、１週間、１週間超、２週間、２週間超、またはそれより後において、１回または複数回のさらなる抗体（複数可）の投与を行うことができる。投薬は、患者の応答または機能に基づき調節することができる。例えば、患者は、抗体の初回投与の前もしくは後、その前および後、またはその後において、例えば、ＮＩＨＳＳなどの脳卒中スケールを用いて評価することができ、このようなスケールまたは患者に対する他の神経学的評価もしくは運動評価に基づき、抗体の投与を改変することもでき、持続することもでき、変化させることもできる。本発明および本方法の特定の態様では、抗体（複数可）は、特に、抗体の非投与、ＴＰＡもしくは他の薬剤単独の投与と比較した場合、または代替的抗体もしくは神経保護剤を含めた代替的薬剤と対比した場合の脳卒中スケールの尺度または他の神経学的スケールもしくは機能的なスケールを改善するのに有効である。

【０１５４】

したがって、本明細書の動物脳卒中モデルで裏付けられる通り、本発明の抗体（複数可）を投与される動物は、機能的活動の改善を裏付ける。本発明の抗体（複数可）は、脳卒中または脳虚血の後におけるその投与により、水平方向の運動機能の改善を含めた運動活動を改善するのに有効である。虚血性傷害または脳卒中の後において、臨床的欠損と関連する身体障害は、ニューロンの機能不全に主に起因する。機能的な回復の欠如は、再生および神経可塑性の制約に部分的に帰せられる（Ｗａｌｍｓｌｅｙ，　Ａ．Ｒ．およびＭｉｒ，　Ａ．Ｋ．（２００７年）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｅ

ｓｉｇｎ、１３巻：２４７０～２４８４頁）。脳卒中は、身体の一方の側における１もしくは複数の肢を動かすことができないことなど、運動機能の変化、発話を理解することができないかもしくは発話を行うことができないことなどの認知的影響、または視野の一方の側を見ることができないことなどの視覚的影響を含めた他の欠損を結果としてもたらしうる。本発明およびその方法の態様では、本発明の抗体（複数可）は、脳卒中に関連する神経欠損を防止または逆転するのに有効である。したがって、本発明の抗体（複数可）は、脳卒中または脳虚血の例における１または複数の神経学的症状または神経欠損を改善しうる。本発明の抗体（複数可）は、特に、脳卒中の場合または例における、ＣＮＳ内の神経学的影響または神経学的損傷を和らげるのに有効である。抗体（複数可）は、神経学的損傷またはニューロン細胞死を軽減する方法において有用であり、脳卒中または脳虚血の場合に、ニューロンを保存または保護するのに有効である。

【０１５５】

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、特に、脳卒中もしくは脳虚血性イベントの間、脳卒中もしくは脳虚血性イベントの後、または脳卒中もしくは脳虚血性イベントの発生時における、神経が障害され、傷害されもしくは損傷した例、または神経もしくはニューロンが障害、傷害もしくは損傷を受け易い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ための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、脳卒中もしくは脳卒中が疑われるなどの疾患、外傷、もしく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、または脳卒中後に繰り返されるなどの疾患、外傷、もしくは状態の経過もしくは持続時間にわたり反復使用する。

【０１５６】

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、適切な単回の最大線量は、約４５ｍＣｉ／ｍ^2、～約２５０ｍＣｉ／ｍ^{2}の最大量とすることができる。好ましい照射線量は、１５～４０ｍＣｉの範囲とし、さらに好ましい照射線量範囲は、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必要とする場合がある。臨床的に承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２０～５００ｍｇのタンパク質、または投与１回当たり２０～１００ｍｇのタンパク質とする。臨床的に承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３～５ｍｇ／ｋｇ、５～１０ｍｇ／ｋｇ、投与１回当たり３００～４００ｍｇ、投与１回当たり３００～５００ｍｇ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、μｇ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μｇ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μｇまたは投与１回当たりμｇ／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１００μｇ～１ｍｇ、１ｍｇ未満、１ｍｇ～５ｍｇ、１ｍｇ～１０ｍｇ、５ｍｇ～１５ｍｇ、１０ｍｇ～２０ｍｇ）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の使用を容易とすることである。

【０１５７】

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、緩衝剤、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るべきではない。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、腫瘍部位における沈積を介する場合もある、投与経路に依存する。

【０１５８】

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、必要に応じて包含されうる。

【０１５９】

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。加えて、本発明は、本明細書で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うる。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、ｒＨＩｇＭ２２および／またはｒＨＩｇＭ４６を含めた再ミエリン化抗体を含めた他の

ＣＮＳ反応性抗体と共に投与することもでき、これらとの組合せを包含する場合もある。

【０１６０】

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または複数を包含する。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、注射前に液体中に溶解するのに適するか、または注射前に液体中に懸濁するのに適する固体形態を、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。

【０１６１】

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、必要とされる希釈剤、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、ヒト用の単位投与量として適切な物理的に個別の単位を指す。

【０１６２】

組成物は、投与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、処置される被験体、被験体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。投与するために必要と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投与計画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もしくは複数カ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。

【０１６３】

投与時期は、規格による教示、患者または被験体の臨床パラメータ、状態または疾患の状況または重症度、または神経傷害、合併症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、疾患が発症または臨床的に顕在化した早期に投与することにより増強することもできる。ある態様では、神経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。

【０１６４】

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。それらの断片を含めた本抗体は、ある種の診断的適用を保有し、例えば、外傷性脳傷害を含めた脳卒中または脳傷害を含めた脳虚血を伴う状態または疾患を検出および／または測定する目的で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画像増強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、ラジオイムノコンジュゲートが、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。

【０１６５】

放射性免疫治療（ＲＡＩＴ）は、診療所に導入され、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。^{131}Ｉ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）、^{90}Ｙ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）も診療所に導入され、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 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）。

【０１６６】

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、ラジオイ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し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。

【０１６７】

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、損傷し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、患者または被験体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。

【０１６８】

本発明は、例として挙げると、ニューロンの損傷、障害、もしくは傷害の存在の程度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。

【０１６９】

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有する。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。

【０１７０】

したがって、ニューロンの状態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、（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。

【０１７１】

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。
【０１７２】
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。
【０１７３】
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。
【０１７４】
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、必要と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。
【０１７５】
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。異種の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十分に確立されている。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調節配列、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 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。

【０１７６】
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、リポ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、ワクシニアウイルス、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うる。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うる。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しうる。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。

【０１７７】
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ｃｏｌ　Ｅｌ、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λ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、ＣＭＶ、ワクシニアウイルス、ポリオーマウイルスまたはアデノウイルスの初期プロモーターまたは後期プロモーター、ｌａｃ系、ｔｒｐ系、ＴＡＣ系、ＴＲＣ系、ＬＴＲ系、ファージλ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。

【０１７８】
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）などの動物細胞、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、周知の真核生物宿主、および原核生物宿主を包含しうる。

【０１７９】
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。

【０１８０】

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。

【０１８１】

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】

【０１８２】

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。

【０１８３】

（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　Ｃｌｉｎｉｃ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板として、３）ストレッサー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ＷＯ０１８５７９７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。

【０１８４】

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、神経突起伸長を、強力な基質であるラミニンと同様に支持し、ＣＮＳミエリンによる神経突起成長の阻害を凌駕することがｉｎ

ｖｉｔｒｏにおいて示されている（２３）。

【０１８５】

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。

【０１８６】

【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

【０１８７】

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。

【０１８８】

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逆転させ、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、神経変性、ニューロン損傷、またはニューロン死滅を伴う多様な疾患および状態に対する固有の適用を有する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。

【０１８９】

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（＞１０ｍｇ／ｍｌ）を伴う血清試料を、抗体の、生存Ｃ

ＮＳ組織のスライス（皮質および小脳）におけるニューロン層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）。

【０１９０】

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βＩＩＩ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、小脳顆粒細胞（２３）、皮質ニューロン、海馬ニューロン、ヒト側頭葉の生検に由来するニューロン（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。

【０１９１】

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、ニューロン膜においてＧＭ１と共に共局在する（実施例１１および図２１Ｃを参照されたい）。

【０１９２】

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つの抗体の使用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。

【０１９３】

（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）。

【０１９４】

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と比較して有意に異なった（Ｐ＜０．０１）。

【０１９５】

したがって、ニューロン結合ｓＨＩｇＭ１２またはニューロン結合ｓＨＩｇＭ４２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、ＩｇＭ１２およびＩｇＭ４２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。

【０１９６】
（実施例３）
ｓＨＩｇＭ１２に由来する組換え抗体
ｓＨＩｇＭ１２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ＩｇＭ２２抗体（ｒＨＩｇＭ２２）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、ＷＯ０１８５７９７）。ベクターは、ＳＶ４０プロモーターの制御下で発現させた選択用ｄＨｆＲ遺伝子を包含する。マウスＪ鎖を伴う部分ヒト組換えＩｇＭ１２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Ｆ３Ｂ６細胞により抗体を生成させた。

【０１９７】
組換えＩｇＭ１２抗体（ＰＡＤ１２）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ｃＤＮＡ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ｃＤＮＡとを、下記のプライマーを用いる既に記載された方法（６）と同様の方法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ＩｇＭ１２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。

【０１９８】
ｒＨＩｇＭ１２ＶＨを作製し、これを、データベース（Ｍ２９８１２）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（Ｈｏｒｔｏｎ　ＲＭら（１９８９年）、Ｇｅｎｅ、７７巻：６１～６８頁）は、以下の通りである。

【０１９９】
【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 ggacctcct gtgcaagaac atgaaacatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgtga gtatctcagg gatccagaca

(3) cagg gatccagaca tggggatatg ggaggtgcct ctgatcccag ggctcactgt gggtctctct gttcacaggg gtcctgtccc aggtgcagct gcaggagtcg ggcccaggac

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

【０２００】
ｒＨＩｇＭ１２Ｖｋ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：Ｘ５９３１２）への重複伸長を介してスプライシングする（ｓｏｅ）のに用いたプライマーは、以下の通りである。

【０２０１】
【化５】

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

(2) Xho 1を伴う3’側Ckプライマー　：CCGCTCGAGTATCTAACACTCTCCCCTGTT

(3) Nhe Iを伴う5’側Lym 12 Vk ：
AGCATTACTAGCTAGCTC AAGACTCAGCCTGGAC atggaca tgagggtccc cgctcagctc ctggggctcc tgctactctggctccgag gtgccaga tgt GAC ATC CAG ATG ACC CA

【０２０２】
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。

【０２０３】
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 ＩＩ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、１０μｇ／ｍｌを超えるＩｇＭを産生する細胞を生成した。

【０２０４】
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（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；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ＰｏｗｅｒＣｈｏ１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ーニングした。サブクローンを増殖させ、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）。

【０２０５】
同様で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。

【０２０６】
（実施例４）
ｒＨＩｇＭ１２の単回末梢投与は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、多発性硬化症（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）という事実に照らして、ＴＭＥＶ感染マウスのｒＨＩｇＭ１２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。

【０２０７】
軸索の喪失が始まる時点である、ＴＭＥＶ感染の９０日後におけるマウス５匹の群を、ｒＨＩｇＭ１２ １００μｇまたは対照のヒトＩｇＭ １００μｇ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らないことを確認した。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（３４、３５）。夜間挙動の変化は、ＴＭＥＶ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。ＴＭＥＶ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。

【０２０８】

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７２時間にわたり収容し、次いで、処置後各週につき７２時間にわたり収容した。解析時間である７２時間における午後６時～午前６時の１２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６００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、ｒＨＩｇＭ１２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＜０．０１）（図７）。細胞に結合しない対照のヒトＩｇＭは、活動を改善しなかった。

【０２０９】

同様の研究において、血清由来のｓＨＩｇＭ１２について見られる効果、および、今やまた、組換え抗体ｒＩｇＭ１２について見られる効果とも異なり、ヒト抗体ｓＨＩｇＭ４２は、同じ条件下で、ＴＭＥＶ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ｓＨＩｇＭ４２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。

【０２１０】

機能の改善についての１つの可能な説明は、有効なＩｇＭ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ＴＭＥＶ疾患を伴うマウスを、ｒＨＩｇＭ１２、ｓＨＩｇＭ４２、または対照のＩｇＭ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、ＴＭＥＶ　ＲＮＡ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ＰＣＲ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＜０．０１）（データは示さない）。

【０２１１】

（実施例５）

脊髄疾患を伴うマウスの脳幹におけるＮＡＡ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

ＮＡＡとは、ニューロン機能と関連する代謝物質である（３６、３７）。ＮＡＡ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ＮＡＡレベルの保存は、本発明者らのグループによりＴＭＥＶ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、ＮＡＡが低減される。ＭＲＳを介して測定されるＮＡＡレベルは、主にニューロン密度を反映する。ＮＡＡは、他の神経細胞でも発現するが、ＮＡＡの主な発現は、ニューロンにおいてである。精製されたＣＮＳ細胞のＭＲＳプロファイルを研究すると、ＮＡＡ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、希突起膠細胞または星状細胞のＮＡＡ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％であったことが示される（３８）。

【０２１２】

ｓＨＩｇＭ１２およびＩｇＭ４２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、ＴＭＥＶ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投射する場所である。その後、既に報告されたプロトコール（８）を用いて、ＴＭＥＶ感染マウスにおいて、磁気共鳴分光法（ＭＲＳ）を介して、脳幹におけるＮ－アセチルアスパラギン酸（ＮＡＡ）レベルを評価した（図８）。

【０２１３】

本発明者らは、ＴＭＥＶ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ＮＡＡの低減を観察した（図９）。ＮＡＡ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。ＴＭＥＶに感染したＳＪＬ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的検査で顕著なのは、この時点においてである（２）。したがって、ＮＡＡは、軸索における機能不全の高感度の尺度である。

【０２１４】

最後のＭＲＳ収集の後、軸索を、Ｔ６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、ＴＭＥＶ感染の２７０日後のＳＪＬ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ＮＡＡレベルと脊髄のＴ６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）。

【０２１５】

ニューロン結合ヒトＩｇＭの単回投与は脳幹におけるＮＡＡ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ＩｇＭがＴＭＥＶ感染マウスにおけるＮＡＡ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。ＴＭＥＶ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ＩｇＭであるｓＨＩｇＭ１２またはｓＨＩｇＭ４２　１００μｇ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より高いことが見出された。

【０２１６】

感染の９０日後におけるマウス１０～１５匹の群を、１００μｇのｓＨＩｇＭ１２、ｓＨＩｇＭ４２、対照のヒトＩｇＭ、または生理食塩液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ＭＲＳ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、Ｔ６レベルで切断した断面をパラフェニレンジアミン（ｐａｒａｐｈｅｎｙｌａｍｉｎｄｉａｍｉｎｅ）で染色して、髄鞘を可視化し、４００，０００μｍ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ＩｇＭ（ｓＨＩｇＭ１２、ｓＨＩｇＭ４２）のうちのいずれで処置した群においても、ＮＡＡ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ＩｇＭ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。

【０２１７】

ｓＨＩｇＭ１２およびｓＨＩｇＭ４２で処置した群のＮＡＡレベルは、それぞれ、９．１３および９．３ｍＭまで増大したが、これらの各々は、非感染マウスの１２．０ｍＭのレベルを大きく下回った。Ｔ６レベルにおける軸索を処置群間で比較した（表２）ところ、ｓＨＩｇＭ１２またはｓＨＩｇＭ４２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。

【０２１８】

ＴＭＥＶモデルにより証拠立てられる通り、これらの結果は、ｓＨＩｇＭ１２抗体およびｒＨＩｇＭ１２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、ｓＨＩｇＭ４２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、ｓＨＩｇＭ４２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。

【０２１９】

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役割を果たす。

【０２２０】

ｓＨＩｇＭ４２およびｓＨＩｇＭ１２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より多かった。ＴＭＥＶ感染ＳＪＬマウス１０～１５匹の群を、感染の９０日後に、１００μｇのｒＨＩｇＭ２２、ｓＨＩｇＭ４２、ｓＨＩｇＭ１２、対照のｓＨＩｇＭ３９、および生理食塩液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、４００，０００μｍ^{2}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±ＳＥＭを表２に列挙する。

【０２２１】

【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
sHIgM42	17,771 ± 436	p<0.001
sHIgM12	17,303 ± 505	p=0.008
対照 IgM	15,508 ± 627	
生理食塩液	15,198 ± 484	p=0.701
非感染マウス	21,284 ± 829	

【０２２２】

（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、ｓＨＩｇＭ２２およびｓＨＩｇＭ４６）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。ｓＨＩｇＭ１２およびｓＨＩｇＭ４２が媒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）。

【０２２３】

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）。ｒＨＩｇＭ２２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、ｓＨＩｇＭ１２およびｓＨＩｇＭ４２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、ＴＭＥＶモデルにおける神経欠損が、著明な再ミエリン化を必要とすることなしに改善され（例えば、ＩｇＭ１２）、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。

【０２２４】

（実施例７）

ｒＨＩｇＭ１２（ヒトＪ鎖を伴う）およびｓＨＩｇＭ４２の血清半減期

ヒトＩｇＭ、ｒＨＩｇＭ１２（ヒトＪ鎖を伴う）、およびｓＨＩｇＭ４２の半減期を決定するために、２００μｌの生理食塩液中に１００μｇのヒトＪ鎖を含有するｒＨＩｇＭ１２、または１００μｇのｓＨＩｇＭ４２を、正常ＣＤ－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ＥＬＩＳＡを用いて、ヒトＩｇＭミュー鎖の存在についてアッセイした。

【０２２５】

ｒＨＩｇＭ１２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。ｓＨＩｇＭ４２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ｒＨＩｇＭ２２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。

【０２２６】

（実施例８）

放射性標識したヒトモノクローナルＩｇＭは血液脳関門を越える

分子量が百万に近いＩｇＭは、循環から血液脳関門（ＢＢＢ）を越え、これにより、ＣＮＳ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ＩｇＭはＢＢＢを越えるという特定の証拠は存在する。

【０２２７】

正常ＳＪＬマウスおよびＴＭＥＶ感染ＳＪＬマウスの組織における^{35}Ｓ標識したｒＨＩｇＭ１２の分布を測定した（図１３）。５０μｇのｒＨＩｇＭ１２（１×１０^{7}ｃｐｍ）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潅流し、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。ＴＭＥＶ感染マウスのＣＮＳ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。

【０２２８】

また、ｒＨＩｇＭ１２（ヒトＪ鎖を伴うｒＨＩｇＭ１２、およびヒトＪ鎖を伴わないｒＨＩｇＭ１２の両方）およびｓＨＩｇＭ４２は、正常マウスおよびアルツハイマー病のモデルであるＳＡＭＰ８マウスにおいてＢＢＢを越えうることも見出された。したがって、^{125}Ｉ標識したヒトＩｇＭ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、ＩｇＭを、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逆転する。

【０２２９】

（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、超微細構造的に希突起膠細胞と同定された細胞に局在することを裏付けた。^{35}Ｓ　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、従来の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）。

【０２３０】
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）を、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潅流し、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。

【０２３１】
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）で免疫標識した後、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、線維の並列経路において、および断続的に切断される軸索の線維束として、病変内のＮＦ＋軸索に共局在することを裏付けた（図１５）。

【０２３２】
（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、疾患を増悪させうる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（２００μｇ）誘導性ＥＡＥを伴うＣ５７ＢＬ６マウス１０匹の群に、１００μｇのｒＨＩｇＭ１２、ｓＨＩｇＭ４２、対照のヒトＩｇＭ、または生理食塩液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瀕死となるまで追跡した。

【０２３３】
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の炎症および脱髄の存在について、盲検により評価した（６）。髄膜の炎症（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。

【０２３４】

【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.
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.
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.
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.
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.

【０２３５】

【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.
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.
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.
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.
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.

【０２３６】

【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.
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. Vandevert, 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.
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. Linington, and S. L. Hauser. 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96:2966-2974.
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.
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.

【０２３７】

【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.

【０２３８】

（実施例１１）

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

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。

【０２３９】

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凝集物は、微小管には共局在するが、線維状アクチンには共局在しない。共免疫沈降研究は、ｒＨＩｇＭ１２とβ３－チューブリンとが複合体で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。

【０２４０】

ニューロンは、神経突起成長の調節を介して軸索を発生させる（ＢａｒｎｅｓおよびＰｏｌｌｅｕｘ、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。

【０２４１】

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化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。

【０２４２】

スクロース密度勾配の分画は、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、β３－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。表面における基板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。

【０２４３】

組換えヒトＩｇＭ１２（ｒＨＩｇＭ１２）：ｒＨＩｇＭ１２は、ＣＨＯ細胞（ＧｉｂｃｏＢＲＬ、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、サブクロ

ーニングし、増殖させた。培養上清に由来するｒＨＩｇＭ１２抗体を、クロマトグラフィーを介して、ＨＰＬＣ解析を介して測定される通りに９７％まで精製した。

【０２４４】

細胞の培養および神経突起成長アッセイ：ＦＶＢマウスから初代海馬ニューロンを調製した。胎生期１５日目の海馬ニューロンをトリプシン－ＥＤＴＡ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（ＰＤＬ）基板、ラミニンを含むＰＤＬ基板、またはｒＨＩｇＭ１２基板上に播種し、２％（ｖ／ｖ）のＢ２７を含有するＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地中で増殖させた。ニューロンを播種した１２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β３－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Ｔｅｘａｓ－Ｒｅｄファロイジンで標識し、核はＤＡＰＩで標識した。Ｎｅｕｒｏｎ　Ｊソフトウェアを用いて神経突起長を測定し、Ｅｘｃｅｌ（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ）で処理し、Ｐｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ）で統計学的に解析した。ステージ３のニューロンとは、Ｔａｕ１染色を介して軸索として決定される最も長い神経突起（Ｄｏｔｔｉら、１９８８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。Ｔａｕ１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。

【０２４５】

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分画：ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて１～３日間（ＤＩＶ）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Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過処理した後に免疫染色した。Ｏｌｙｍｐｕｓ製の正立顕微鏡を用いて画像を収集し、Ｐｈｏｔｏｓｈｏｐ（Ａｄｏｂｅ）を用いて処理した。ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２を、ＤＩＶ７の生存皮質ニューロンに４℃で３０分間にわたり結合させ、次いで、氷冷溶解緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ．ＨＣｌ、ｐＨ　７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、およびプロテアーゼ阻害剤によるカクテル）中で３０分間にわたり溶解させた。ニューロン溶解物を、等容量の１００％（ｗ／ｖ）スクロースと混合した。混合物を遠心分離管に移し、３５％のスクロース８ｍｌと５％のスクロース３．５ｍｌとを続けて重層させた。４℃、２×10^5 ｇで２０時間にわたり遠心分離した後、６画分（各画分２ｍｌずつ）を勾配の最上部から回収した。各画分およびペレットを、ＳＤＳ－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。

【０２４６】

ｒＨＩｇＭ１２を細胞骨格タンパク質と共免疫沈降させるため、ＤＩＶ７の生存皮質ニューロンを、４℃で３０分間にわたりｒＨＩｇＭ１２により処置し、０．５％のＮＰ－４０を含有する溶解緩衝液中で溶解させた。ｒＨＩｇＭ１２は、プロテインＬ－アガロースビーズにより捕捉し、β３－チューブリンは、プロテインＧ－樹脂（Ｔｈｅｒｍｏ）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ｒＨＩｇＭ１２により染色し、０．２％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過処理した。生存ニューロンの抽出および固定は、６０ｍＭのＰｉｐｅｓ、２５ｍＭのＨｅｐｅｓ、５ｍＭのＥＧＴＡ、１ｍＭの$MgCl_2$、４％のパラホルムアルデヒド、および０．１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含有する緩衝液中で実施した。

【０２４７】

この例における抗体および他の試薬：抗β３－チューブリン抗体（Ｐｒｏｍｅｇａ）；抗アクチン、ＥＤＴＡ、ポリ－Ｄ－リシン、メチル－β－シクロデキストリン、およびフィリピン（Ｓｉｇｍａ）；抗Ｔａｕ１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（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）；Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ－ファロイジン、コレラ毒素Ｂ、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地、およびＢ２７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）；プロテアーゼ阻害剤錠（Ｒｏｃｈｅ）。

【０２４８】
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にある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（Ｄｏｔｔｉら、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、基板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）。
【０２４９】
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、基板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。
【０２５０】
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、異なる基板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板であり（Ｃｈｅｎら、２００９年）、陽性対照として用いた。
【０２５１】
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。
【０２５２】
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
基板としての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）

。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ことが必要であることを示唆した。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、コレステロールのクラスター（図２０Ｂ２）およびＧＭ１のクラスター（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コレステロール（図２０Ｂ３）またはＧＭ１（図２０Ｃ３）と共局在したが、成長円錐の末梢では共局在しなかった。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。基板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。

【０２５３】

ｒＨＩｇＭ１２は脂質ラフトに結合した

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スフィンゴ糖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、脂質ラフトについて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。

【０２５４】

ニューロン膜は融点（Ｔｍ）が高いコレステロールおよびスフィンゴ糖脂質に富む（Ｓａｍｓｏｎｏｖら、２００１年）ので、Ｔｍ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た。加えて、ニューロンの成長円錐も収縮した（図２１Ｂ）。

【０２５５】

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（ＭβＣＤ）で処置してコレステロールを枯渇させ（Ｋｏら、２００５年）、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。コレステロールを枯渇させ、ＣＴＢ標識したＧＭ１と共局在させた後、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と結論付けた。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（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）、異なる形態的構造として存在することが確認された。これらの結果は、ｒＨＩｇＭ１２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。

【０２５６】

本発明者らはさらに、ｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２の局在を解析した。ニューロン溶解物を、抗ヒトＩｇＭ二次抗体でブロッティングしたところ、膜結合ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２が、一方は上清中の「洗浄剤可溶性」画分に局在し、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。

【０２５７】

第２の実験では、皮質ニューロンを、まず、ｒＨＩｇＭ１２で標識し、次いで、４℃のスクロース密度勾配を介して分画した。異なる画分のブロッティングは、ｒＨＩｇＭ１２が、脂質ラフトのマーカーであるカベオリン－１もまた含有する軽い画分に局在するが、トランスフェリン受容体に富む非ラフト画分には局在しないことを示した（図２２Ｂ）。しかし、この厳密な分画工程（１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および２×１０５ｇにおける超遠心分離）においてもなお、一部のｒＨＩｇＭ１２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）。チューブリン（Ｓｏｒｉｃｅら、２００９年）およびアクチン（ＬｅｖｉｔａｎおよびＧｏｏｃｈ、２００７年）のいずれもが脂質ラフトに存在するが、ラフト中ではβ３－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ｒＨＩｇＭ１２の２つのプールの存在を示した。

【０２５８】

ｒＨＩｇＭ１２は微小管と会合する

本発明者らのデータは、凝集したｒＨＩｇＭ１２が、微小管が優勢である細胞体、神経突起軸、および成長円錐の中央ドメインなどの領域に局在する（図２０）ことを示した（ＦｏｒｓｃｈｅｒおよびＳｍｉｔｈ、１９８８年）。膜結合ｒＨＩｇＭ１２が、これらのいずれもがβ３－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、ｒＨＩｇＭ１２が、細胞骨格の構成要素（複数可）と会合しうることを示唆した。この仮説を検証するために、海馬ニューロンを、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２で標識した洗浄剤不溶性膜の点が、神経突起軸において束ねられた微小管束に沿って並んだ（図２３Ａ２）。成長円錐では、ｒＨＩｇＭ１２が、脱束化微小管により占められる中央ドメインに主に局在したが、Ｆ－アクチンに富む成長円錐末梢には局在しなかった（図２３Ａ３およびＡ４）。これらの結果は、ｒＨＩｇＭ１２が微小管と会合しうることを示した。

【０２５９】

本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２が、ＧＭ１と共局在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、ｒＨＩｇＭ１２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可能性がある。この仮説をさらに検証するため、４℃でｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２およびβ３－チューブリンの両方が、互

いに共免疫沈降する（図２３Ｂ）ことを見出し、このことから、ｒＨＩｇＭ１２とβ３－チューブリンとが、複合体として存在することが示唆された。ＩｇＭ分子は五量体構造を有し、分子量は約９００ｋＤａである。ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２に結合しないが、β３－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）。ｒＨＩｇＭ１２は、β３－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。ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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。

【０２６０】

本明細書のデータは、基板として存在する場合の完全ヒト組換えＩｇＭであるｒＨＩｇＭ１２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、ニューロンの極性化を駆動することを裏付けた（図１８および１９）。ｒＨＩｇＭ１２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）。ｒＨＩｇＭ１２は、ＧＭ１と共局在する（図２１）。スクロース勾配によるニューロン溶解物の分画は、膜結合ｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２が、微小管と共局在し、β３－チューブリンと共免疫沈降することを示した（図２３）。

【０２６１】

前出は、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２は、軸索成長を駆動する微小管の安定化を媒介する。この例は、ｒＨＩｇＭ１２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）。

【０２６２】

近年、本発明者らは、ヒト血清由来ＩｇＭであるｓＨＩｇＭ１２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、ＨＩｇＭ１２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。

【０２６３】

ニューロンは、神経突起伸長を調節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、最も速い伸長速度もまた有する神経突起である、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（Ｄｏｔｔｉら、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勢であり、成長円錐の中央ドメインに限局される微小管は、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が見出された。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（ＷｉｔｔｅおよびＢｒａｄｋｅ、２００８年）。

【０２６４】

本発明者らのｒＨＩｇＭ１２とβ３－チューブリンとが共免疫沈降したという結果、ｒＨＩｇＭ１２が微小管と共局在したという結果、およびｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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（ＤｅｎｔおよびＫａｌｉｌ、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、ＩｇＭ１２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。

【０２６５】

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（１０～２００ｎｍ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（ＬｉｎｇｗｏｏｄおよびＳｉｍｏｎｓ）。

【０２６６】

本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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ＧＭ１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、ｒＨＩｇＭ１２が、コレステロールおよびＧＭ１を含有する脂質ラフトドメインに結合することを示す。小さなラフトは、脂質および／またはタンパク質と相互作用しうる。個別の小さなラフトは、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調節する、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ＩｇＭ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、ｒＨＩｇＭ１２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（Ｔｍ）。Ｔｍ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低下し、これにより、凝集した脂質ラフトの可視化が促進される。ｒＨＩｇＭ１２が、コレステロールを枯渇させた後においてもなおＧＭ１と共局在するという知見（図２１）と併せると、これらの結果は、ｒＨＩｇＭ１２が、ＧＭ１と共局在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ｓＨＩｇＭ１２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、ｓＨＩｇＭ１２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、正確な同定は明らかでない（Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎら、２００４年）。第三に、ニューロン溶解物をスクロースにより分画した後、膜結合ｒＨＩｇＭ１２は、脂質ラフトマーカーであるカベオリン－１もまた含有する軽い画分へと局在した。まとめると、本発明者らの結果は、ｒＨＩｇＭ１２が脂質ラフトに結合するという仮説を裏付ける。

【０２６７】

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、軸索の特化にとって中心的である。ｒＨＩｇＭ１２の凝集物は、微小管が優勢であり、線維状アクチンは優勢でない（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）。ｒＨＩｇＭ１２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、束化微小管の束に局在した（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、ｒＨＩｇＭ１２結合分子の別のプールの存在を示す。スクロース分画研究により、洗浄剤不溶性ペレット中に局在するｒＨＩｇＭ１２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するプールでありうることがさらに確認された。

【０２６８】

これらの結果は、ｒＨＩｇＭ１２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）ｒＨＩｇＭ１２が、β３－チューブリンとも共免疫沈降した（図２３Ｂ）という知見は、ｒＨＩｇＭ１２結合分子（複数可）と、β３－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、ｒＨＩｇＭ１２が結合しないＮ２Ａ神経芽細胞腫細胞において、ｒＨＩｇＭ１２は、β３－チューブリンをプルダウンしなかった（図２５）ため、ｒＨＩｇＭ１２が、β３－チューブリンと直接相互作用するという可能性はない。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ｒＨＩｇＭ１２は、チューブリンの近傍に局在する分子に結合する。この概念は、ｒＨＩｇＭ１２が、ＧＭ１と共局在するという観察（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る（Ｐａｌｅｓｔｉｎｉら、２０００年）。

【０２６９】

脂質ラフトドメイン内のｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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）、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、ＨＩｇＭ１２は、ＨＩｇＭ１２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。

【０２７０】

Ｆ－アクチンがｒＨＩｇＭ１２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（Ｌｅｖｉｔａｎ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（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚら、２００３年）。したがって、アクチンはまた、ｒＨＩｇＭ１２誘導性シグナル伝達において役割を果たす可能性がある。β３－チューブリンと共に、少量のアクチンが、ｒＨＩｇＭ１２によりプルダウンされた（図２６Ｂ）。したがって、ｒＨＩｇＭ１２は、アクチンおよびβ３－チューブリンの両方を含有する脂質ラフトに結合する。

【０２７１】

しかし、ニューロンを４℃で処理したところ、ｒＨＩｇＭ１２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分画の後、アクチンは主にラフト以外の画分に局在し、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、その大半が脱重合することを示す。したがって、アクチンが、ｒＨＩｇＭ１２を介するシグナル伝達に関与しうる。

【０２７２】

本発明者らは、ヒトＩｇＭであるｒＨＩｇＭ１２が、脂質ラフトに結合し、これらを再編成すること、および微小管が下流の標的のうちの１つであることを結論付ける。ｒＨＩｇＭ１２は、基板として提示される場合に限り、軸索の伸長を促進する。基板としてのｒＨＩｇＭ１２を固定し、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、固定されたｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２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、ラフト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。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）ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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）。

【０２７３】

【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.

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.

【０２７４】

【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--bipotential 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.
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.
Levitan 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, Delling 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.
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.
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.
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.

【０２７５】

（実施例１２）

脊髄損傷に有益なヒトＭＡｂ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（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の、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。

【０２７６】

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。抗体が媒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）。

【０２７７】

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。

【０２７８】

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。

【０２７９】

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。

【０２８０】

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。

【０２８１】

小さな差異を定量化するのに重要な結合反応速度は、開発中におけるリード分子を選択する根拠をもたらし、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける治療用分子の投与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板は、支持脂質膜を形成するのには適さない。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、ガラス製の基板上に配置され、微小なウェルを形成して、支持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うるので、金膜に加工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）。

【０２８２】

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センシング性能とシームレスに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が、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評価し、同定し、特徴付けるのに用いられる迅速な無標識法を提供する。

【０２８３】

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ために、表面のタンパク質－脂質間における、治療用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ニングすることにより、ヒト抗体が同定されている。さらなるヒトＩｇＭ抗体（本明細書では、ＩｇＭ１２およびＩｇＭ４２により例示される）は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてニューロンの表面に結合し、神経突起成長を促進し、ニューロンの死滅を防止した。

【０２８４】

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、損傷および疾患の病態を有する特定のＣＮＳ細胞、構造に対する特異的免疫反応性を呈示した。

【０２８５】

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阻害を凌駕する（Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎら、２００４年）。

【０２８６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける研究は、ヒトモノクローナル抗体の、ニューロン表面の原形質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、表面の再構成により１５℃では点状構造が形成される（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）。

【０２８７】

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）。ビブ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に結合する平行線維を示す（図３０Ａ）。対照のヒトＩｇＭを施されたマウスに由来する脊髄の損傷領域は、ヒトＩｇＭを含有しない（図３０Ｂ）。

【０２８８】
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。
【０２８９】
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。
【０２９０】
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が媒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、特異的抗体が媒介する活性について特徴付ける。
【０２９１】
原形質膜タンパク質－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、特定の膜の種類の結合反応速度を決定する。
【０２９２】
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」組織表面の原形質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。
【０２９３】
プロトコールデザイン：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、小嚢胞性（ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｃ）キャビテーション、軸索変性、および頑強なアストログリオーシス、ヒト外傷性ＳＣＩの全ての特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ＳＣＩ後に実行して神経欠損を評価する。図３１に技法を示す。
【０２９４】
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。
【０２９５】
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１週間に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。

【０２９６】

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、マウスを潅流し、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、蛍光顕微鏡法を介して群を通してカウントする（ＵｒｅおよびＲｏｄｒｉｇｕｅｚ、２００２年）。脳幹（ビブラトーム切片）内の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、β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β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。

【０２９７】

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（ｇｌｕｔｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ）で潅流し、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、ミエリンが富化された保存された軸索を可視化する。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１ｍｍ^{2}当たりの保存された軸索数として表す。実験群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。

【０２９８】

【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. Ultrasmooth 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 lysolecithin-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, Kuncl RW. 1999. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. Neurobiol Dis 6(5):335-346.

【０２９９】

【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.
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.
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.
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.

【０３００】

（実施例１３）

多発性硬化症モデル：用量反応評価

ＩｇＭ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。

【０３０１】

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

イルス（２×１０^{5}プラーク形成単位のＤａｎｉｅｌ株：１０μＬ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調べ、処置群へと無作為に割り付ける（処置表に示すとおり）。次いで、マウスを、ビヒクル（通常の生理食塩液）または組換えヒトＩｇＭ抗体（０．０２５～２．５ｍｇ／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。

【０３０２】

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点数化を包含した。被毛外観については、点数化を以下の通り：疾患なし（０）、最小の被毛変化（１）、つやのない被毛（２）、失禁および変色した被毛（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＞９０ｃｍ／秒を用いるディ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、スタンス幅および持続時間、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量として定量化する。

【０３０３】

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（立体的解析評価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。

【０３０４】

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。

【０３０５】

【表３Ａ】

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

【０３０６】

【表３Ｂ】

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)

【０３０７】

（＊）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、所与の抗体の投与量と関係する。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。

【０３０８】

この実施例では、組換え抗体であるＩｇＭ１２、ＩｇＭ４２、ＩｇＭ２２、およびＩｇＭ４６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＜０．０５）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、ＴＭＥＶ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、０．０２５～２．５ｍｇ／ｋｇ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０．２５ｍｇ／ｋｇ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２．５ｍｇ／ｋｇ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、抗体ＩｇＭ１２、ＩｇＭ４２、ＩｇＭ２２、およびＩｇＭ４６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。

【０３０９】

この実施例では、ＩｇＭ１２およびＩｇＭ４２が、立体的解析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、ＴＭＥＶ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、０．０２５～２．５ｍｇ／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０．２５ｍｇ／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２．５ｍｇ／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。

【０３１０】

ＩｇＭ２２およびＩｇＭ４６は、立体的解析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、ＴＭＥＶ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、０．０２５～２．５ｍｇ／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０．２５ｍｇ／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２．５ｍｇ／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。

【０３１１】

（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ＩｇＭ抗体の多様な組合せを、前出の例で記載したＭＳのＴＭＥＶモデルにおける神経学的転帰の改善について調べる。ＴＭＥＶへの曝露の６カ月後、マウスにおける組換えＩｇＭ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ＩｇＭ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調べる。評価される組合せを表４Ａおよび表４Ｂに示す。

【０３１２】

【表４Ａ】

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
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
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
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
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

【０３１３】

【表４Ｂ－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
ビヒクル (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	(IgM42 による X+の感覚運動の改善) および (IgM22 による X+の感

【０３１４】

【表４Ｂ－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

【０３１５】
（＊）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、所与の抗体の投与量と関係する。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。
【０３１６】
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。
【０３１７】
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。
【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、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。
【０３１９】
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

誘発する。
【０３２０】
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＋ＩｇＭ２２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ＩｇＭ１２またはＩｇＭ２２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。
【０３２１】
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＋ＩｇＭ４６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ＩｇＭ１２またはＩｇＭ４６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。
【０３２２】
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＋ＩｇＭ４２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ＩｇＭ２２またはＩｇＭ４２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。
【０３２３】
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、ＩｇＭ４６＋ＩｇＭ４２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ＩｇＭ４６またはＩｇＭ４２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。
【０３２４】
（実施例１５）
脊髄損傷モデル
ＩｇＭ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

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とする改変カバースリップ用ピンセットの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）。

【０３２５】

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。

【０３２６】

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（立体的解析評価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。

【０３２７】

（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。

【０３２８】

【表５Ａ】

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

【０３２９】

【表５Ｂ】

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 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)

【０３３０】

（＊）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、所与の抗体の投与量と関係する。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。

【０３３１】

この実施例では、ＢＢＢパラメータの改善により、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、ＢＢＢの改善により、抗体Ｉｇ

Ｍ１２、ＩｇＭ４２、ＩｇＭ２２、およびＩｇＭ４６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。

【０３３２】

ＩｇＭ１２およびＩｇＭ４２が、立体的解析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、ＴＭＥＶ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、０．０２５～２．５ｍｇ／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０．２５ｍｇ／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２．５ｍｇ／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。

【０３３３】

ＩｇＭ２２およびＩｇＭ４６は、立体的解析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、ＴＭＥＶ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、０．０２５～２．５ｍｇ／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０．２５ｍｇ／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２．５ｍｇ／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。

【０３３４】

（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ＩｇＭ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調べる。したがって、ＩｇＭ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調べる。評価した組合せを、表６Ａおよび表６Ｂに示す。

【０３３５】

【表６Ａ】

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
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
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

【０３３６】

【表６Ｂ－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(*)
ビヒクル(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

【０３３７】

【表６Ｂ－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

【０３３８】
（＊）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、所与の抗体の投与量と関係する。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。
【０３３９】
この実験では、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の各々が、ＢＢＢ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。
【０３４０】
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。
【０３４１】
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。
【０３４２】
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誘発する。
【０３４３】

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＋ＩｇＭ２２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ＩｇＭ１２またはＩｇＭ２２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。

【０３４４】

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＋ＩｇＭ４６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ＩｇＭ１２またはＩｇＭ４６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。

【０３４５】

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＋ＩｇＭ４２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ＩｇＭ２２またはＩｇＭ４２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。

【０３４６】

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、ＩｇＭ４６＋ＩｇＭ４２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ＩｇＭ４６またはＩｇＭ４２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。

【０３４７】

（実施例１８）

ヒトニューロン結合ＩｇＭである組換えｒＨＩｇＭ１２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ｓＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２を生成させた。サイラーマウス脳脊髄炎ウイル

ス（ＴＭＥＶ）による感受性マウス系統の脳内感染は、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ＩｇＭクラスの抗体で処置すると、ＣＮＳの再ミエリン化が改善される（Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎら（２００７年）、Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ Ｒｅｓ、８５巻：９６７～９７６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（ｓＨＩｇＭ１２）は、ラミニンと同程度に頑健な神経突起成長を促進し、ＣＮＳミエリンの神経突起成長に対する阻害効果を低減する（Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎら（２００４年）、Ｊ Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ Ｅｘｐ Ｎｅｕｒｏｌ、６３巻（５号）：４６１～４７３頁）。より近年には、上記と同一の生物学的特性を伴うヒトｓＨＩｇＭ１２の組換え形態（ｒＨＩｇＭ１２）を生成させた。ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３４８】

方法

逆行標識法：マウスに麻酔をかけた後、下部胸椎（Ｔ１０～１１）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％Ｆｌｕｏｒｏｇｏｌｄ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（４０ｍｍ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。

【０３４９】

結果

ＴＭＥＶ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１５）を介して確認される通り、１ｍｇの単回腹腔内注射の後、ｒＨＩｇＭ１２は脊髄に入り、ニューロフィラメント＋（ＮＦ）の軸索に局在する。ｒＨＩｇＭ１２はまた、クロスカット形としてＮＦ＋線維束にも共局在する（図１５Ｄ）。動物研究では、ｒＨＩｇＭ１２が、逆行標識した脳幹ニューロン数を増大させる。感染の９０日後（ｄｐｉ）に、ｒＨＩｇＭ１２または生理食塩液をＳＪＬ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。ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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より多かった。

【０３５０】

（実施例１９）

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ｓＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２を生成させた。サイラーマウス脳脊髄炎ウイルス（ＴＭＥＶ）による感受性マウス系統の脳内感染は、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。ｒＨＩｇＭ１２のＴＭＥＶ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

既に、ＩｇＭ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）この系統におけるＴＭＥＶ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、処置群間の差異を十分に理解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（ＧＦ）の適用、および（３）多項式フィッティングを適用した。３つの方法の各々を用いて、本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２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ＩｇＭ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。ｒＨＩｇＭ１２は、正常な非感染マウスの活動を変化させなかった。この研究は、ニューロン結合ＩｇＭによる処置は、ｉｎｖｉｔｒｏにおいてニューロンを保護するだけでなく、また、運動機能の改善にも影響を及ぼすという仮説を裏付ける。

【０３５１】

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、動作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（ｒＨＩｇＭ２２）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実にするために、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した。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、および多項式フィッティングの使用を比較した。

【０３５２】

サイラーマウス脳脊髄炎ウイルス（ＴＭＥＶ）による感受性マウス系統の脳内感染は、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ＩｇＭクラスの抗体で処置すると、ＣＮＳ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（ｓＨＩｇＭ１２）は、ラミニンと同程度に頑健な神経突起成長を促進し、ＣＮＳ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、同一の生物学的特性を伴うヒトｓＨＩｇＭ１２の組換え形態（ｒＨＩｇＭ１２）を生成させた。本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２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）。ｒＨＩｇＭ１２のＴＭＥＶ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）ＩｇＭ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）この系統におけるＴＭＥＶ誘導性脱髄性疾患の進行は、ＭＳの純粋に自己免疫的なＥＡＥ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。

【０３５３】

【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)

【０３５４】

材料および方法

マウス：ＳＪＬ／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。動物用のプロトコールは、Ｍａｙｏ ＣｌｉｎｉｃのＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより承認された。

【０３５５】

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ＴＭＥＶ２．０×１０^{5}プラーク形成単位を含有する１０μｌ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］。

【０３５６】

抗体による処置：ＳＪＬマウス（非感染、感染の４５日後および９０日後）を、０．５ｍｌのＰＢＳ中に溶解させた抗体（ｒＨＩｇＭ１２またはアイソタイプのＩｇＭ対照）２００μｇの単回腹腔内投与で処置した。第３群は、０．５ｍｌのＰＢＳだけで処置した。

【０３５７】

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．４．１２－１ＡＦＥ（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

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。ＳＪＬ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、ｒＨＩｇＭ１２、対照のＩｇＭ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、Ｖｅｒｓａｄａｔプログラム、ｖ．３．０２－１ＡＦＥ（Ａｃｃｕｓｃａｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を用いて記録した。本発明者らは、これがＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）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。

【０３５８】

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、処置群間の差異を十分に理解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）多項式フィッティングを適用した。

【０３５９】

データビニングとは、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の群を、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有する平均値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。

【０３６０】

ガウスフィルタリング（ＧＦ）（また、データの平滑化、または感度の増強である、ローパスフィルタリング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、値の両側から採取した点からの情報を用い、これらの点の影響を重みづけ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（Ｍａｔｌａｂ（Ｍａｔｈｗｏｒｋｓ）またはＭａｔｈｅｍａｔｉｃａ（Ｗｏｌｆｒａｍ））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。

【０３６１】

比較のために、かつ、簡略化した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、多項式をデータに適合させる。これらのモデルは、任意の次数（ｘｎ）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適合させたため、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「最良適合」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の増分を釣り合わせるが、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次の適合が、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次適合、なおまたは線形適合が「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、多項式フィッティングを用いて、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「過剰適合」の影響は最小限である。

【０３６２】

多項式フィッティングの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、多項式フィッティングは、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。

【０３６３】

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、または多項式を適合させた。

【０３６４】

統計学的な解析：Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃａ（Ｗｏｌｆｒａｍ）で書かれたマクロ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、典型的なα＝０．０５の閾値で決定した。多重比較のための調整は行わなかった。

【０３６５】

結果

感染の９０日後において施すと、ｒＨＩｇＭ１２はＳＪＬ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ＳＪＬ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、ｒＨＩｇＭ１２またはアイソタイプの対照ＩｇＭ　２００μｇ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、処置群間の差異を十分に理解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、および多項式フィッティング）全てにより、ｒＨＩｇＭ１２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）。多項式フィッティングの後、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）。

【０３６６】

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（後肢による立脚挙動）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。後肢による立脚挙動は影響を受けず、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どうかを問うた。第２の実験では、マウス５匹の群を、感染の４５日後に、２００μｇのｒＨＩｇＭ１２、アイソタイプの対照ＩｇＭ、または生理食塩液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フィッティング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）。

【０３６７】

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動の増強と比較して、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。

【０３６８】

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制限し、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の病理学的特徴である脱髄は、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］。

【０３６９】

ニューロン結合抗体であるｓＨＩｇＭ１２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どうかを問うた。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、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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。逆に、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約２週間であり、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す、マウスにおける抗ヒト抗体免疫反応のために、ヒトＩｇＭの複数回投与を試験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マウスモノクローナル抗体であり［５］、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試験することが可能な候補を表す。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、ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３７０】

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ｒＨＩｇＭ１２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による侵襲例も存在するため［１２、１３］、本発明者らおよび他者は、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ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３７１】

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）ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３７２】

【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.

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.

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 ed1996, 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.

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.

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.

【０３７３】

【数１０】

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.

【０３７４】

（実施例２０）

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ＭＡｂ

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、有効な処置は存在しない。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、スーパーオキシドから酸素および過酸化水素への触媒を行う。ＳＯＤ１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ＳＯＤ１の機能獲得が存在するようである［４］。家族性ＡＬＳにおけるＳＯＤ変異の頻度は１２～２３％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。

【０３７５】

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、根底にある原因は、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ヒトにおいても作用する。ヒトＳＯＤ１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にある欠損が関連している可能性がある。ＳＯＤ１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り得る。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。

【０３７６】
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の遺伝形態および特発性形態の両方）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。

【０３７７】
結果
本発明者らは、Ｇ８６Ｒ ｈＳＯＤ１変異を伴うマウス（ＦＶＢＴｇ ＳＯＤ１ Ｇ８６Ｒ Ｍ１Ｊｗｇ、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｓ）［１３］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、それらが瀕死となるまで、別の「盲検の」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。

【０３７８】
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どうかを決定した。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。

【０３７９】
動物が瀕死期に到達したら、それらを屠殺し、Ｔｒｕｍｐ固定剤で潅流した。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調べた。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。ｒＨＩｇＭ１２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、ＰＢＳ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４０）。

【０３８０】

また、脊髄切片を、ＣＮＳ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ＮｅｕＮに対する抗体でも染色した。多くの前角細胞を、ｒＨＩｇＭ１２を施された動物の脊髄胸部において、ＰＢＳと比較して定量化した（図４１、左）。ｒＨＩｇＭ１２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、ＰＢＳ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、ｒＨＩｇＭ１２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４１、右）。

【０３８１】

ヒト抗体であるｒＨＩｇＭ１２は、マウス、ヒト（図４２）、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ＣＮＳのニューロンの表面に結合する。これにより、ｒＨＩｇＭ１２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。ＳＯＤ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ｒＨＩｇＭ１２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９０％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、ｒＨＩｇＭ１２またはニューロンに結合しない別のヒトＩｇＭで同時に処置した。ｒＨＩｇＭ１２による処置は結果として、ニューロンのうちの８０％の保存をもたらした。これに対し、対照のＩｇＭ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９０％の死滅をもたらした。本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２が、ニューロンを細胞死から保護することにより、ＡＬＳを伴う動物における寿命を延長すると仮定した。

【０３８２】

ヒト抗体はまた、組織培養プレート上における基板としても調べ、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プロセスである伸長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ｒＨＩｇＭ１２およびｓＨＩｇＭ４２と、ニューロンに結合しない抗体であるｒＨＩｇＭ２２およびｓＨＩｇＭ３９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ｒＨＩｇＭ１２またはｓＨＩｇＭ４２の基板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、ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３８３】

分子量が百万に近いＩｇＭは、循環から血液脳関門（ＢＢＢ）を越えてＣＮＳに入るには大型に過ぎるというのが一般に受容された定説であった［１５］［１６］。しかし、一部の抗体は、ＢＢＢ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、ｒＨＩｇＭ１２を脊髄内で検出することについて記載した。ｒＨＩｇＭ１２または対照のヒトＩｇＭ　１．０ｍｇ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ＩｇＭ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。ｒＨＩｇＭ１２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することが裏付けられた（図１５を参照されたい）。対照のＩｇＭを施されたマウスの脊髄病変内では、ヒトＩｇＭが見出されなかった。

【０３８４】

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ＩｇＭ１２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う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、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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。ｒＨＩｇＭ１２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ベースで患者に施すこともできる。ｒＨＩｇＭ１２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。ｒＨＩｇＭ１２がヒトにおいて安全であることの証拠が多く存在する。ＡＬＳ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、血清形態の抗体であるｓＨＩｇＭ１２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）１ｍｇの投与後、ウイルスを介する脱髄を伴うマウスにおけるＣＮＳ病態の増大が見られないこと、２）２００μｇの投与後、活動性ＥＡＥ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）３００μｇの投与後、正常ＣＤ－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、ＡＬＳ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。

【０３８５】

ｒＨＩｇＭ１２は既に、ＧＭＰグレードの施設で、ＦＤＡ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、ＦＤＡ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、＞５０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、組織培養物中に大量の抗体（１５０μｇ／ｍｌ）が作製される。ｒＨＩｇＭ１２を、ＦＤＡのガイドラインに従い、外膜のウイルス、ＤＮＡ、ＲＮＡ、または他の外因性物質を伴わずに、純度＞９７％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ｒＨＩｇＭ１２の、早期ＡＬＳを伴う患者における将来の初期臨床試験のための強力な基礎がもたらされている。

【０３８６】

進行中の研究

上記で、組換えヒトモノクローナル抗体（ｒＨＩｇＭ１２）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ＡＬＳ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、ＡＬＳ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学を介する前臨床データを作成する研究が進行中である。

【０３８７】

プラセボ抗体と対比した盲検研究

ＡＬＳの表現型を伴うＳＯＤマウスの２つの系統（ＳＯＤ１　Ｇ８６ＲおよびＳＯＤ１　Ｇ９３Ａ）において、組換えヒト抗体ｒＨＩｇＭ１２を、アイソタイプ対照のヒト抗体であるｓＨＩｇＭ３９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ｒＨＩｇＭ１２　２００μｇの単回投与の、疾患を軽減する有効性を、Ｇ８６Ｒ　ＳＯＤ１およびＧ９３Ａ　ＳＯＤ１両方［１４］（Ｂ６　Ｃｇ－Ｔｇ　ＳＯＤ１　Ｇ９３Ａ　１Ｇｕｒ、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｓ）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ｓＨＩｇＭ３９　２００μｇの投与と比較して調べる。ＥＮＭＣによる発症前処置の推奨に従い、抗体による処置を５５日齢で行うと［１８］、ｒＨＩｇＭ１２をＰＢＳ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る（図３８～４１）。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２４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ＣＮＳも調べ、ＮｅｕＮについての標識を用

いて胸部中央の脊髄における前角細胞の数を決定する。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する。Ｇ９３Ａ　ＳＯＤ１変異体モデルである（Ｂ６．Ｃｇ－Ｔｇ）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、ｒＨＩｇＭ１２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。ｒＨＩｇＭ１２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つの系統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）ｒＨＩｇＭ１２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）ｒＨＩｇＭ１２で処置したマウスが発作を発症する場合、３）ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３８８】

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必要と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２５０μｇの単回投与を施す）を着手する。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、ｒＨＩｇＭ１２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２５０μｇ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日目または最終走査時の任意のｒＨＩｇＭ１２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。

【０３８９】

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、２００μｇの静脈内単回投与後の５０～７０日齢のＳＯＤ１　Ｇ８６ＲマウスおよびＳＯＤ１　Ｇ９３Ａマウス［１８］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＜１．５ｍｌ）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。

【０３９０】

ｒＨＩｇＭ１２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ｒＨＩｇＭ１２の追跡を用いる。３５Ｓ標識したｒＨＩｇＭ１２の２つの

用量レベルである、２５０μｇ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ｒＨＩｇＭ１２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の百分率を決定する。加えて、既に公表されているオートラジオグラフィー法［１９］を用いて、脳／脊髄における３５Ｓの局在部位も決定する。

【０３９１】

血清半減期研究

ｒＨＩｇＭ１２が有効性を裏付けた、ＳＯＤ１系統（複数可）における２００μｇの用量を用いて、ｒＨＩｇＭ１２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。ｒＨＩｇＭ１２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。同位体（３５Ｓ）標識したｒＨＩｇＭ１２を追跡する研究では、上記の最小限の有効用量の決定が必要とされる。５０～７０日齢のＳＯＤ１マウスに、ｒＨＩｇＭ１２　２５０μｇおよびｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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を決定する。同位体で標識したｒＨＩｇＭ１２は、オートラジオグラフィーを用いた脊髄切片中で局在する［１９］。この実験では、主要評価項目を、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２がＣＮＳに入りうることの証拠であると考える。オートラジオグラフィー研究では、マウスに標識したｒＨＩｇＭ１２を投与し、ｒＨＩｇＭ１２がＣＮＳ内で増大した時点において脊髄を摘出する。脊髄切片中のニューロン全体１ｍｍ^{2}当たりの銀粒の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る。

【０３９２】

初期毒性研究

ｒＨＩｇＭ１２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どうかを決定する：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ｒＨＩｇＭ１２の最小限の有効用量の１倍（１×）、１０倍（１０×）、および２０倍（２０×）、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、毒性学評価において熟練した獣医学の病理学者が「盲検により」調べる。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、通常の一連の毒性スクリーニング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羽ずつを各用量で調べる。加えて、ｒＨＩｇＭ１２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どうかを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一連の組織切片を、ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２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への新薬臨床試験開始届の予備的毒性試験の項と一致して、ｒＨＩｇＭ１２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。

【０３９３】

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。市販される組織アレイ（Ｚｙｍｅｄ）およびヒトおよびカニクイザル（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）の切片を、１０μｇ／ｍｌのｒＨＩｇＭ１２および対照のヒトＩｇＭであるｓＨＩｇＭ３９で免疫標識する。ディジタル画像を用いて標識の強度を比較する。ｒＨＩｇＭ１２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、ｒＨＩｇＭ１２の血清形態が同定された最初のスクリーニングである。

【０３９４】

【数１１】

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.

【０３９５】

【数１２】

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.

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.

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.

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.

（実施例２１）

ニューロン保護性ヒトｍＡｂによる脳虚血および脳卒中の処置

【０３９６】

虚血性脳卒中の発生率は、年齢と共に増加する。われわれの人口集団の老齢化は、毎年の脳卒中例数の増加を結果としてもたらし、われわれの医療ケア基盤および家族に対して累積的な負荷を負わせる。米国では、脳卒中は、長期にわたる身体障害の主要な原因である。毎年、８００，０００近くの人々が、脳卒中を被っている。虚血性傷害後において、臨床的欠損と関連する身体障害は、ニューロンの機能不全に主に起因する。機能的な回復の欠如は、再生および神経可塑性の制約に部分的に帰せられる（１）。現在のところ、脳卒中に関連する神経欠損を防止または逆転するのに有効な処置は存在しない。

【０３９７】

ミエリンの修復および軸索／ニューロンの回復を含めた、ＣＮＳの保護および修復を促進する、天然ヒトモノクローナルＩｇＭクラス抗体が同定され、用いられている（２）。本発明者らは、ニューロンの表面に結合する、血清由来のヒトモノクローナルＩｇＭを同定した。ＩｇＭは、ヒトを含め、種を超えてニューロンに結合し、神経突起の伸長を促進する。このＩｇＭは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ニューロンをアポトーシスから保護し、脊髄の磁気共鳴分光法および組織学により測定される通り、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、脊髄軸索を保存する。血清由来形態の特徴を保存する組換え形態であるｒＨＩｇＭ１２が合成されている。ｒＨＩｇＭ１２の神経保護特性は、ガングリオシドであるＧＭ１について観察される神経保護特性と同様である。ガングリオシドは、抗体であるＩｇＭ１２およびｒＨＩｇＭ１２の抗原でありうる。ｒＨＩｇＭ１２は、ニューロン膜上で、ＧＭ１、コレステロール、およびインテグリンβ１と共局在する。ＧＭ１は、細胞受容体およびシグナル伝達分子をクラスター化するように機能する膜のマイクロドメインに富む。ｒＨＩｇＭ１２は、ニューロン膜ドメインをクラスター化することにより、ＧＭ１の多面的効果を模倣すると考えられる。

【０３９８】

本研究は、脳虚血性傷害後における神経欠損を逆転するｒＨＩｇＭ１２の有効性を評価するために着手した。これらの研究は、早期の脳虚血性傷害を有するかまたは脳卒中を患う患者における抗体の適用を目的とする。中心的な仮説は、抗体であるＩＧＭ１２およびｒＨＩｇＭ１２により媒介される神経保護効果が、細胞および組織の回復を増強し、虚血性脳卒中からの全体的な回復を促進する治療において適用可能なことである。

【０３９９】

脳虚血の治療的管理は、血圧の上昇、血栓症、および頸動脈のアテローム性動脈硬化などの危険性因子の防止および低減に依拠する。脳虚血の介入的治療は、組換え組織プラスミノーゲン活性化因子ｒｔＰＡの使用による酵素的血栓溶解（３～５）、および直接的なカテーテル法を介する血餅の介入的摘出（６）に依然として限定されている。しかし、ｒｔＰＡの治療域は３時間と短く、３時間の時間枠を超えて注入すると、出血性脳虚血の発生率を増加させる（７、８）。脳虚血後に損傷したニューロンの保護は、永続的な身体障害を抑制するのに有望な戦略である。炎症反応を調節する治療は、神経保護特性を有しうるが、ニューロンに直接作用してそれらを保護する薬物は、現在のところ極めて少数である。神経保護は、虚血領域における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。抗体を用いて脳虚血を処置する以前の研究は、潜在的利益をもたらしていない：細胞間接着分子に対するアンタゴニストが大規模多施設試験で採用されたが、処置された被験体は、プラセボ群と比較したところ、死亡率が高く、転帰も不良であった（９）。脳虚血についての第ＩＩＩ相臨床試験における抗血小板抗体の使用は、小規模の患者コホートにおいて致死性の出血をもたらした（１０）。ポリクローナルヒトＩｇＧ（ＩＶＩｇ）の使用は、脳虚血の動物モデルの改善を結果としてもたらした（１１）が、臨床試験では、ＩＶＩｇ投与の後において、血栓塞栓性合併症が報告され、脳虚血を処置するためのＩＶＩｇの使用については賛否こもごもであった（１２、１３）。目標は、神経系を直接標的とする治療用試薬を同定することであった。完全ヒト抗体の組換え形態であるｒＨＩｇＭ１２は、ニューロンの生存を促進し、回復／神経保護用治療剤としての適用可能な使用が可能である。本実施例における実験は、脳虚血のマウスモデルにおける抗体ＩｇＭ１２、ｒＨＩｇＭ１２の治療的効果に焦点をあてる。用いられるモデルは、感光性色素

を用いる非侵襲的光血栓モデルであり、よって、侵襲的モデルより生理学的である。
【０４００】
完全ヒトモノクローナル抗体を用いて、脳虚血後の動物におけるニューロンを保護し、挙動を改善する本発明者らの手法は、独創的かつ革新的であり、抗体は、脳虚血および脳卒中におけるニューロンを標的とし、保護するようにデザインされた最初の薬物としての潜在性を有する。分子の関与性の側面を、以下に列挙する。
【０４０１】
１）ｒＨＩｇＭ１２は、ニューロンの表面に結合し（図１を参照されたい）、ニューロンをアポトーシス細胞死から保護する（図３を参照されたい）。
【０４０２】
２）ｒＨＩｇＭ１２は、天然ヒト自己抗体であり、有害作用は生じにくい。
【０４０３】
３）ｒＨＩｇＭ１２は、ＩｇＭであるにもかかわらず、正常ＳＪＬマウスおよび炎症を有する動物において血液脳関門（ＢＢＢ）を越える（図１３を参照されたい）。
【０４０４】
４）ここで、本研究は、虚血性脳卒中の誘導後において、ｒＨＩｇＭ１２を動物へと投与すると、ｒＨＩｇＭ１２は、動物の機能の明確な改善を結果としてもたらし（図４４）、組織の完全性を保護することを裏付ける（図４５）。
【０４０５】
結果および考察
【０４０６】
固有の手法を用いて、中枢神経系（ＣＮＳ）に対する傷害を処置するための新規の治療を開発した（１４、１５）。希突起膠細胞（１６）またはニューロン（１７）に結合し、ＣＮＳで適用される一連のヒトモノクローナル抗体が同定されている。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の患者から単離された抗体に由来する。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（１７）。ＩｇＭ抗体であるにもかかわらず、ｒＨＩｇＭ１２は、血液脳関門（ＢＢＢ）を越え（図１３を参照されたい）、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。修復性ＩｇＭ自己抗体の作用機構についての本発明者らの最新の仮説は、それらが、マイクロドメイン内の分子を架橋して、保護および修復に関与するシグナル伝達イベントを刺激することである。
【０４０７】
脳虚血のためのマウスモデルの標準化
【０４０８】
本発明者らの実験室における虚血性脳卒中（光血栓性脳虚血）の色素媒介型光血栓モデルにおいて、感光性色素（Ｒｏｓｅ　Ｂｅｎｇａｌ、ＲＢ）を用いた。１９８５年に、Ｗａｔｓｏｎらは、限局性脳虚血の単純型モデルとしての脳ＰＴを導入した（Ｗａｔｓｏｎ　ＢＤら（１９８５年）、Ａｎｎ　Ｎｅｕｒｏｌ、１７巻：４９７～５０４頁）。血栓症を達成するため、感光性色素を全身注射する。無傷の頭蓋を介する後続の照射は、フリーラジカルの形成および内皮の光過酸化による、色素の局所的な活性化をもたらす。これにより、照射された血管内では、血餅の形成が媒介され、血管の閉塞は、脳虚血を模倣する（Ｄｉｅｔｒｉｃｈ　ＷＤら（１９８７年）、Ａｃｔａ　Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ、７２巻：３１５～３２５頁）。ＰＴ病変は、強力であるが遅延した炎症反応を誘発する（Ｓｃｈｒｏｅｔｅｒ　Ｍら（１９９７年）、Ｓｔｒｏｋｅ、２８巻：３８２～３８６頁）。このモデルは、虚血領域をあらかじめ規定し、高度に限局しうるという利点を有し、別個の皮質領域を定位的精度で凝固させる可能性を開く。
【０４０９】
ＰＢＳ中に１０ｍｇ／ｍＬで溶解させたＲＢを、尾静脈を介して注射した（体重１ｇ当

たり０．０２ｍｇ）。光源（１５０Ｗのハロゲンランプ）につないだ連接型光ファイバーの開口部（５ｍｍ）を、マウス頭部上の標準的な位置に設置した。ＲＢ注射の１分後、脳を、無傷の頭蓋を介して、３０秒間にわたり（ＲＢを活性化させるために）一定の光に曝露した。活性化されると、ＲＢは、微小血管内の内皮細胞を障害するフリーラジカルを生成し、血小板の凝集を結果としてもたらし、小血管の閉塞をもたらし、血栓性脳虚血を引き起こす、凝固を誘発する。本発明者らは、全ての実験を、６週齢の雌ＣＤ－１（登録商標）マウスにおいて実施した。

【０４１０】

無作為化「盲検」試験では、マウスに、脳虚血を誘導した３０分後において、ＧＭＰグレードで精製されたｒＨＩｇＭ１２を、単回の腹腔内投与（ｉ．ｐ．；５００μｌ中に２００μｇ）として施した（ヒト臨床条件を模倣する試み）。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。本発明者らは、脳虚血後における虚血領域を可視化および定量化する技法を標準化した（図４３および４５）。

【０４１１】

ｒＨＩｇＭ１２は、脳虚血後の動物における機能活性を、拡散強調画像（ＤＷＩ）により規定された梗塞容積の有意差を伴わずに改善する

【０４１２】

機能欠損は、Ａｃｃｕｓｃａｎオープンフィールド装置を用いて算出した。装置は、別個の水平方向および垂直方向の運動を測定する光セルを有する、個別のアクリルケージからなる。ＣＤ－１マウス５匹ずつの群を、各ケージ内に入れ、脳虚血を誘導する前の１週間のベースライン値を記録した。データは、１時間のブロック当たりのビーム遮断回数として収集し、ベースラインからの水平方向の変化％（図４４Ａ）または垂直方向の変化％（図４４Ｂ）として表した。脳虚血誘導後の１日目には、いずれの群のマウスにおいても、運動活動の同様の欠損があった。２つの処置についての直接的な対応のある比較は、処置後３日目において、ｒＨＩｇＭ１２処置マウスにおける水平方向の運動機能の改善が、ＰＢＳと比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示した（図４４Ａ）。同様に、処置後３日目において、ｒＨＩｇＭ１２処置マウスにおける垂直方向の運動機能も、ＰＢＳと比較して有意に異なった（図４４Ｂ）。改善は、実験を終了した３０日間までにわたり持続した。

【０４１３】

ＤＷＩ－ＭＲＩを用いて、虚血容積を確定し、機能改善を梗塞サイズの低減に相関させた。１、３、７、および２１日目に、Ｂｒｕｋｅｒ　Ａｖａｎｃｅ　３００ＭＨｚ（７Ｔｅｓｌａ）小動物用ＭＲＩシステムによりマウスを走査し、得られた三次元画像（図４３Ａ）を、ＮＩＨ　Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアを用いて定量化した。ＤＷＩは、走査された日のうちのいずれにおけるマウスの２群間でも、統計学的な有意性を示さず（図４４Ｃ）、いずれの群のマウスにおける脳虚血容積も同様であることを示した。本発明者らが知る限りにおいて、これは、ニューロンを指向する完全組換え天然ヒトモノクローナルＩｇＭ抗体が、実験による脳虚血後の動物における挙動についての転帰の改善に有効であることの最初の裏付けを提供する。

【０４１４】

ｒＨＩｇＭ１２による処置は、ＭＴ－ＭＲＩ計量を改善し、ＭＴ比の有意差を裏付ける

【０４１５】

ＤＷＩ画像化により、虚血性脳卒中後の水拡散時における細胞傷害性浮腫の存在および程度が推定される。後続の実験では、傷害後における組織の完全性および回復に対する感受性が大きいＭＲＩ尺度を評価するために、本発明者らは、脳卒中誘導後の３日目およびｒＨＩｇＭ１２による処置またはＰＢＳによる偽処置の後の１０匹のマウスにおいて、磁化移動ＭＲＩ（ＭＴ－ＭＲＩ）を用いた。得られた画像は、ＦＳＬへとインポートし（２３、２４）、３ＤパラメトリックＭＴＲマップを、ＦＳＬ　ＭＡＴＨＳにより計算した。本発明者らは、標準式：１００×（（Ｍｏ－Ｍｔ）／Ｍｏ）［式中、Ｍｏは、ＭＴパルスを伴わない３Ｄ画像であり、Ｍｔは、ＭＴパルスを伴う３Ｄ画像である］を用いた。画像

を適切にスケーリングして、０～１００の範囲の値によるグレースケールの百分位数マッピング出力をもたらした（図４５Ａ）。病変におけるＭＴ値は、Ａｎａｌｙｚｅ１１．０中の標準的な３Ｄ　ＲＯＩツールを用いて解析したが、これにより、虚血領域内のＭＴ感受性の組織損傷の解析が可能となった。対側半球内の比較用ＲＯＩを用いて、比較のための対照値をもたらした。対照側におけるＭＴＲ値は、ｒＨＩｇＭ１２処置群およびＰＢＳ処置群において、それぞれ、（５９．９±０．９）および（５８．３±０．８）であり、予測された通り、統計学的解析は、対照半球における２群間で有意差を示さなかった。興味深いことに、ｒＨＩｇＭ１２による処置は、脳卒中の部分容積中のＭＴＲ値の、ＰＢＳによる偽処置と比較した相対的な増加（４６．０±０．９対４１．９＋０８、ｐ＝０．０１）を結果としてもたらした。これは、抗体処置群におけるＭＴ－ＭＲＩで検出可能な組織構造の相対的正常化を示した。さらに、統計学的な有意性に到達しなかった（ｐ＝０．３９）一方で、ＰＢＳ処置対照と対比したｒＨＩｇＭ１２処置マウスにおいて、脳卒中容積の減少（２６．１±６．６ｍｍ^{3}と対比した１８．１±５．９ｍｍ^3）が認められた。ＭＴ－ＭＲＩにおける高度な有意差は、抗体により誘導された変化が、脳卒中容積の直接的な低減と対照的に、組織回復の増強を結果としてもたらすことを支持する。

【０４１６】

ｒＨＩｇＭ１２は、マウスおよびヒトのニューロンに結合し、マウスの皮質ニューロンを酸化的損傷により誘導される死滅から保護する

【０４１７】

ｒＨＩｇＭ１２は、ニューロンに結合することにより、虚血領域内のニューロンを保護することが仮定される。ヒト抗体であるｒＨＩｇＭ１２は、マウスおよびヒトから得られる多くの種類のＣＮＳニューロンの表面に結合する（図１を参照されたい）。これは、ｒＨＩｇＭ１２により媒介される神経保護および機能改善が、マウスからヒトへと保存されることを支持する。ｒＨＩｇＭ１２が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、活性アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ３の、過酸化物に誘導される活性化からニューロンを保護するのかどうかは、既に評価されている。マウス初代皮質ニューロンの培養物を、ｒＨＩｇＭ１２または対照のヒトＩｇＭおよび過酸化水素と共に同時に処置した。カスパーゼ３の活性化度は、ＦＬＩＣＡカスパーゼ３アッセイキット（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、２４時間後に決定した（図３を参照されたい）。傷害ニューロンのｒＨＩｇＭ１２による処置は、カスパーゼ３の活性化を８０％低減した。対照ＩｇＭで処置された傷害ニューロンが示したカスパーゼ３の活性化の低減は、１０％未満であった。

【０４１８】

異なる神経毒性アッセイでは、培養された皮質ニューロンを、４、２１、および４４時間（４４時間、非低酸素チャンバー細胞は、０時間の対照と考えた）にわたり、直接低酸素状態（２．７％のO_2、９２．３％のN_2、５％のCO_2による雰囲気）曝した。カスパーゼ３のレベルは、ウェスタンブロットにより決定し（図４６）、カスパーゼ３レベルは、４時間までに上方調節され、２１時間にピークに達することを見い出した。４４時間までに、大半の細胞は死滅し、カスパーゼ３レベルは下がった。これらのアッセイは、ｒＨＩｇＭ１２が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの虚血様状態において、神経保護性であることを裏付けるのに用いられる。

【０４１９】

本研究では、脳虚血性脳卒中のマウスモデルを用いて、後続する神経欠損を逆転し、脳虚血性傷害からの保護をもたらすｒＩｇＭ１２の能力を裏付けた。さらに、このモデルは、用量の処方を最適化して、血液脳関門を越える抗体の百分率を決定し、培養されたニューロンの、ｒＨＩｇＭ１２による、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける虚血様状態からの保護をよりよく理解するのにも適用される。

【０４２０】

神経改善のための用量およびバイオマーカー

【０４２１】

マウスにおいてｒＨＩｇＭ１２を用いるプラセボ対照無作為化試験を、自発活動の改善に要請される最小用量を決定し、神経改善のための代謝バイオマーカーを同定するのに用いる。上記のデータは、２００μｇのｒＨＩｇＭ１２が、虚血性脳卒中のマウスモデルにおける神経機能を改善したことを示す。最小有効用量を決定することは、安全性研究をデザインすることと関連する。ｒＨＩｇＭ１２の用量滴定研究を、脳虚血後のマウスにおいて実施する。

【０４２２】

色素ＲＢによる光血栓モデルを用いる、雌ＣＤ－１マウスにおける脳虚血を、投薬研究に用いる。マウス５匹ずつの群を、脳虚血誘導後３０分以内に、５、５０、１００、もしくは５００μｇのｒＨＩｇＭ１２、またはニューロンに結合しない市販の対照ヒトＩｇＭ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ；型番００９－０００－０１２）、または生理食塩液で腹腔内処置する。神経機能は、活動ボックス内で、脳虚血の誘導前または処置前に測定し、毎週測定する。マウス５匹ずつの群を活動ボックス内に収容し、垂直方向および水平方向の自発活動を記録する。夜間における水平方向の活動は、動物の機能的能力についての高感度の尺度である（２５）。加えて、全てのマウスにＤＷＩ－ＭＲＩを施し（図２Ｃ）、全ての群における梗塞サイズをモニタリングする。

【０４２３】

主要評価項目は、自発活動をモニタリングすることにより評価される運動の改善である。ｒＨＩｇＭ１２処置群の５日間を通して、対照群と比較した７２時間にわたり記録された平均夜間活動の２０％の増加（１時間当たり２０００回のビーム遮断）（Ｐ＜０．０５）は、有意な生物学的改善であると考えられる（２５）。本発明者らの実験室により確立された方法（２５）を用いて、群間の統計学的差違を計算する。ＤＷＩ－ＭＲＩ解析を、Ｍａｙｏ　Ｃｌｉｎｉｃにおいて開発された生物医学的画像解析ソフトウェアパッケージであるＡｎａｌｙｚｅ１１．０の３Ｄ　ＲＯＩ解析ツールを用いて、盲検様式で実施する（２６、２７）。

【０４２４】

ｒＨＩｇＭ１２による処置後における神経機能の改善が、ＮＡＡ代謝物（ニューロンの機能と関連する代謝物（２８））の保存、および脳におけるＭＴ－ＭＲＩによる磁化移動比の相対的正常化と相関するのかどうかを決定する。ＭＴとは、組織の完全性についての全体的マーカーであり、ヒト虚血性脳卒中における周縁部の完全性について高感度のマーカーとして用いられている（２９）。これらのアッセイは、ヒトにおける、脳虚血におけるｒＨＩｇＭ１２についての臨床試験の将来的な評価項目として有用である。

【０４２５】

この実験では、ＭＴ－ＭＲＩデータについて得られる検出力計算に基づき、１群当たり１２匹ずつのマウスを用いる。技法は、ＣＮＳ内のＮ－アセチル－アスパラギン酸（Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－ａｓｐａｒａｔｅ）（ＮＡＡ）レベルを測定するように既に標準化した（３０）。ＮＡＡを、脳虚血後においてｒＨＩｇＭ１２により媒介される機能改善についての代謝物画像化バイオマーカーとして用いうるのかどうかを調査するために、本発明者らは、ボクセルを標準化して、虚血領域内でＭＲＳを実施した。ＮＡＡ代謝物を、最小有効用量、またはアイソタイプ対照のＩｇＭもしくは生理食塩液で処置された動物において測定する。７Ｔ垂直ボアＮＭＲ分光計を用いてＭＲＳを実施し、ＤＷＩおよびＴ２強調ＭＲＩ上で同定される虚血領域の内部に配置された３×２×１．５ｍｍのボクセルからＭＲＳデータを得る。対側半球は、各マウスについての適切な対照として用いられる。さらなる対照として、他の群におけるマウスを、対照ＩｇＭまたはＰＢＳで処置する。ＰＢＳまたはｒＨＩｇＭ１２による処置を後続させる虚血性脳卒中の前および後に、５００Ｈｚの励起パルスバンド幅および１５００Ｈｚのオフセットによる、全ＭＴ時間２７０ミリ秒のＭＴパルスを伴い、かつ、これを伴わずに、マトリックスサイズを２５６×９６×９６とし、ＦＯＶを６．４×１．９２×１．９２ｃｍとし、ＴＲ：１５００とし、ＴＥ：３０とし、ＲＡＲＥファクターを１６として、標準的なＰＤ強調ＲＡＲＥシークェンスを収集することにより、ＭＴ－ＭＲＩデータを得る。この実験では、各実験を３回にわたり繰り返し

て、画像化バイオマーカーを、のべ１０８匹のマウス（合計３つの群について１群当たり１２匹ずつのマウスであり、３回にわたり繰り返す）についての機能改善の評価項目として用いることの再現性を確認する。

【０４２６】

ＭＲＳのスペクトルは、Ｂｒｕｋｅｒ　Ｂｉｏｓｐｉｎ製のＴｏｐＳｐｉｎソフトウェアを用い、ＬＣＭｏｄｅｌを介して定量化する（３１～３４）。群間の統計学的差違は、ＡＮＯＶＡにより計算する（３０）。ＭＴＲデータは、ＦＳＬ　ＭＡＴＨＳおよびＡｎａｌｙｚｅ１１．０ソフトウェアを用いて算出する。対照群と比較したｒＨＩｇＭ１２処置群における、ＭＴＲの相対的正常化およびＮＡＡレベルの、保存または相対的な増加を決定する。任意のｒＨＩｇＭ１２処置群において保存されるＮＡＡの、対照群と比較した１０％の増大は、改善であると考えられる。グルタミン酸およびグリシンなど、興奮性の神経伝達物質（３５）は、脳虚血後において高レベルで存在することが報告されている。ＭＲＳ分光光度法は、多目的な技法であるので、本発明者らはまた、乳酸、ミオイノシトール、コリン、クレアチン、グリシン、およびグルタミン酸など、他の代謝物も定量化する。

【０４２７】

血液脳関門の評価

【０４２８】

血液脳関門（ＢＢＢ）を越えるｒＨＩｇＭ１２の比率を、光血栓ＲＢ脳卒中モデルにより決定する。大型のＩｇＭ分子がＣＮＳに入り得るのかどうかについては議論が分かれる。一般に許容される定説は、以下の通りである。分子量が１００万に近いＩｇＭは、循環からＢＢＢを越えて、ＣＮＳに入るには大きすぎるというものである（３６、３７）。しかし、一部のＩｇＭはＢＢＢを越えうるという証拠が蓄積されている。ｒＨＩｇＭ１２は、正常非感染マウスのＣＮＳのほか、ＴＭＥＶ感染マウスのＣＮＳにも入り得ることが示されている（図１３を参照されたい）。ＢＢＢを越える抗体の百分率を決定し、ＩｇＭが虚血領域内のニューロンに直接作用することをさらに裏付けるのには、^{35}Ｓ標識抗体を用いる。本発明者らは、脳虚血モデルにおいて静脈内注射後のＣＮＳ内のニューロンへの結合について評価する。

【０４２９】

同位体標識された（^{35}Ｓ）ｒＨＩｇＭ１２を作製し、ニューロンの表面への結合について検証する。有効用量のｒＨＩｇＭ１２またはアイソタイプ対照のＩｇＭもしくは対照の非特異的ＩｇＧを、脳虚血誘導後の１つの時点ごとに、マウス３匹ずつの群へと静脈内投与する。虚血のない正常のＣＤ－１マウスは、対照として用いられる。実験は、のべ１４４匹のマウス（合計５つの時点について１群当たり３匹ずつのマウス３群に、非処置マウス３匹の１つの群を加え、３回にわたり繰り返す）を用いて、３回にわたり実行する。

【０４３０】

注射の４、８、２４、４８、および７２時間後において、ＢＢＢを越え、脳／脊髄実質内で見出される^{35}Ｓの百分率を決定する。加えて、本発明者らは、本発明者らの実験室により公表されているオートラジオグラフィー法（３８）を用いて、脳／脊髄内の^{35}Ｓ局在部位も決定する。本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２が、末梢への注射の後でＢＢＢを越えてニューロンと相互作用し、ニューロンを死滅から保護することで、神経系に直接作用することを提起している。

【０４３１】

ニューロンの培養物

【０４３２】

ｒＨＩｇＭ１２による神経保護はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける「虚血様」ニューロン培養物アッセイでも評価する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ環境におけるニューロンの保護におけるｒＨＩｇＭ１２の有効性を裏付けることは、ニューロン結合自己抗体が、ニューロンに対して毒性でありうるという懸念に取り組むことになる。本発明者らは、正常の皮質ニューロン、酸素および／またはグルコースを除去された皮質ニューロンの、ｒＨＩｇＭ１２

または対照抗体による処置後におけるカスパーゼレベルを解析することにより、これに取り組む。加えて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイの開発は、将来のシグナル伝達研究に必要なツールももたらす。

【０４３３】

脳虚血後における損傷は、複数の異なる機構により生じうる。損傷の１つの種類に対して神経保護性である試薬は、必ずしも全ての種類に対して保護性であるわけではない（３９）。本発明者らは、脳虚血後において観察される傷害と同様な傷害である、グルコース枯渇（ＧＤ）、酸素除去（ＯＤ）、およびＯＤとＧＤとの組合せ（ＯＧＤ）を用いて、神経毒性アッセイを確立する。本発明者らは、ｒＨＩｇＭ１２の、マウスの皮質ニューロンに対する保護効果を評価するために、過酸化水素（図３）および低酸素チャンバー（図４６）を用いて類似のアッセイを実行した。ｒＨＩｇＭ１２の神経保護特性は、ＧＭ１について観察される神経保護特性を想起させるので、ＧＭ１を陽性対照として用いる。

【０４３４】

新皮質断片の解離細胞培養物は、１６日目のＣＤ－１マウス胚から確立する。このような培養物中の細胞のうちの約９５％はニューロンであり、残りの細胞は星状細胞である。ＧＤは、ニューロンを、グルコース非含有ロック培地中で２４時間にわたりインキュベートすることにより誘導する。９５％のN_2、５％のCO_2の大気を有する無酸素チャンバーを用いて、ＯＤ（ニューロンを、通常培地中で１２時間にわたりインキュベートする）およびＯＧＤ（ニューロンを、グルコース非含有ロック培地中で１２時間にわたりインキュベートする）を誘導する。ニューロンを、培養培地単独、またはｒＨＩｇＭ１２（有効用量で）、または対照ＩｇＭまたはＧＭ１を補充した培養培地の存在下でインキュベートする。実験は、バイアスを回避するため、異なる日においてコード化された処置を用いて、３連で独立に３回にわたり実施する。

【０４３５】

主要評価項目は、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ溶液を用いるミトコンドリア活性アッセイにより決定される、ニューロンの細胞生存率である。ニューロンの培養物を、ＦＬＩＣＡ　Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔを用いて、活性化カスパーゼについて解析する。２つの異なる蛍光検出法：定性的解析のための蛍光顕微鏡法；および定量化のための９６ウェルマイクロ滴定プレート蛍光光度法を用いる。細胞の生存は、細胞を、ヘキスト染料と共に、３０分間にわたりインキュベートし、励起波長を３６５ｎｍとし、発光波長を４８０ｎｍとしてＵＶフィルターを用いて読み取ることにより評価する。細胞を蛍光顕微鏡により調べる場合、アポトーシス細胞が、赤色で蛍光発光するのに対し、非アポトーシス細胞は、ほとんど染色されていない外見を呈する。アポトーシスのより後期にある細胞は、早期にある細胞より明るい赤色として現れる。蛍光プレートリーダーを（黒色のマイクロ滴定プレートと共に）用いて、アポトーシスを、カスパーゼに結合したＦＬＩＣＡプローブから発せられる赤色の蛍光の量として定量化する。ＡＮＯＶＡを用いて、群間の有意差を比較する。この実験からの結果は、神経保護に関与する下流のシグナル伝達イベントを決定する一助となる。

【数１３】

引用参考文献

1. Walmsley, A.R., and Mir, A.K. 2007. Targeting the Nogo-A signalling pathway to promote recovery following acute CNS injury. *Current pharmaceutical design* 13:2470-2484.
2. Rodriguez, M., Warrington, A.E., and Pease, L.R. 2009. Invited article: human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease. *Neurology* 72:1269-1276.
3. Brott, T.G., Haley, E.C., Jr., Levy, D.E., Barsan, W., Broderick, J., Sheppard, G.L., Spilker, J., Kongable, G.L., Massey, S., Reed, R., et al. 1992. Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 23:632-640.
4. Haley, E.C., Jr., Levy, D.E., Brott, T.G., Sheppard, G.L., Wong, M.C., Kongable, G.L., Torner, J.C., and Marler, J.R. 1992. Urgent therapy for stroke. Part II. Pilot study of tissue plasminogen activator administered 91-180 minutes from onset. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 23:641-645.
5. Group, T.N.I.o.N.D.a.S.r.-P.S.S. 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 333:1581-1587.
6. Gobin, Y.P., Starkman, S., Duckwiler, G.R., Grobelny, T., Kidwell, C.S., Jahan, R., Pile-Spellman, J., Segal, A., Vinuela, F., and Saver, J.L. 2004. MERCI 1: a phase 1 study of Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:2848-2854.

【数１４】

7. Clark, W.M., Wissman, S., Albers, G.W., Jhamandas, J.H., Madden, K.P., and Hamilton, S. 1999. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 282:2019-2026.
8. Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., et al. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 359:1317-1329.
9. Investigators, E.A.S.T. 2001. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology* 57:1428-1434.
10. Adams, H.P., Jr., Effron, M.B., Torner, J., Davalos, A., Frayne, J., Teal, P., Leclerc, J., Oemar, B., Padgett, L., Barnathan, E.S., et al. 2008. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II). *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:87-99.
11. Arumugam, T.V., Tang, S.C., Lathia, J.D., Cheng, A., Mughal, M.R., Chigurupati, S., Magnus, T., Chan, S.L., Jo, D.G., Ouyang, X., et al. 2007. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:14104-14109.
12. Vucic, S., Chong, P.S., Dawson, K.T., Cudkowicz, M., and Cros, D. 2004. Thromboembolic complications of intravenous immunoglobulin treatment. *European neurology* 52:141-144.
13. Rajabally, Y.A., and Kearney, D.A. 2011. Thromboembolic complications of intravenous immunoglobulin therapy in patients with neuropathy: a two-year study. *J Neurol Sci* 308:124-127.
14. Bieber, A.J., Warrington, A., Pease, L.R., and Rodriguez, M. 2001. Humoral autoimmunity as a mediator of CNS repair. *Trends in neurosciences* 24:S39-44.
15. Warrington, A.E., Bieber, A.J., Ciric, B., Van Keulen, V., Pease, L.R., Mitsunaga, Y., Paz Soldan, M.M., and Rodriguez, M. 2001. Immunoglobulin-mediated CNS repair. *J Allergy Clin Immunol* 108:S121-125.
16. Warrington, A.E., Asakura, K., Bieber, A.J., Ciric, B., Van Keulen, V., Kaveri, S.V., Kyle, R.A., Pease, L.R., and Rodriguez, M. 2000. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6820-6825.
17. Warrington, A.E., Bieber, A.J., Van Keulen, V., Ciric, B., Pease, L.R., and Rodriguez, M. 2004. Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63:461-473.
18. Ciric, B., VanKeulen, V., Rodriguez, M., Kyle, R.A., Gertz, M.A., and Pease, L.R. 2001. Clonal evolution in Waldenstrom macroglobulinemia highlights functional role of B-cell receptor. *Blood* 97:321-323.
19. Mitsunaga, Y., Ciric, B., Van Keulen, V., Warrington, A.E., Paz Soldan, M., Bieber, A.J., Rodriguez, M., and Pease, L.R. 2002. Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:1325-1327.
20. Wright, B.R., Warrington, A.E., Edberg, D.D., and Rodriguez, M. 2009. Cellular mechanisms of central nervous system repair by natural autoreactive monoclonal antibodies. *Archives of neurology* 66:1456-1459.
21. Howe, C.L., Bieber, A.J., Warrington, A.E., Pease, L.R., and Rodriguez, M. 2004. Antiapoptotic signaling by a remyelination-promoting human antimyelin antibody. *Neurobiol Dis* 15:120-131.
22. Watzlawik, J., Holicky, E., Edberg, D.D., Marks, D.L., Warrington, A.E., Wright, B.R., Pagano, R.E., and Rodriguez, M. 2010. Human remyelination promoting antibody inhibits apoptotic signaling and differentiation through Lyn kinase in primary rat oligodendrocytes. *Glia* 58:1782-1793.
23. Woolrich, M.W., Jbabdi, S., Patenaude, B., Chappell, M., Makni, S., Behrens, T., Beckmann, C., Jenkinson, M., and Smith, S.M. 2009. Bayesian analysis of neuroimaging data in FSL. *NeuroImage* 45:S173-186.
24. Smith, S.M., Jenkinson, M., Woolrich, M.W., Beckmann, C.F., Behrens, T.E., Johansen-Berg, H., Bannister, P.R., De Luca, M., Drobnjak, I., Flitney, D.E., et al. 2004. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage* 23 Suppl 1:S208-219.
25. Denic, A., Macura, S.I., Warrington, A.E., Pirko, I., Grossardt, B.R., Pease, L.R., and Rodriguez, M. 2011. A single dose of neuron-binding human monoclonal antibody improves spontaneous activity in a murine model of demyelination. *PloS one* 6:e26001.
26. Robb, R.A. 1999. 3-D visualization in biomedical applications. *Annual review of biomedical engineering* 1:377-399.

【数１５】

27. Robb, R.A. 2001. The biomedical imaging resource at Mayo Clinic. *IEEE transactions on medical imaging* 20:854-867.
28. De Stefano, N., Matthews, P.M., Fu, L., Narayanan, S., Stanley, J., Francis, G.S., Antel, J.P., and Arnold, D.L. 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.
29. Tourdias, T., Dousset, V., Sibon, I., Pele, E., Menegon, P., Asselineau, J., Pachai, C., Rouanet, F., Robinson, P., Chene, G., et al. 2007. Magnetization transfer imaging shows tissue abnormalities in the reversible penumbra. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38:3165-3171.
30. Denic, A., Bieber, A., Warrington, A., Mishra, P.K., Macura, S., and Rodriguez, M. 2009. Brainstem 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: marker of demyelination and repair in spinal cord. *Ann Neurol* 66:559-564.
31. Henry, P.G., Oz, G., Provencher, S., and Gruetter, R. 2003. Toward dynamic isotopomer analysis in the rat brain in vivo: automatic quantitation of 13C NMR spectra using LCModel. *NMR in biomedicine* 16:400-412.
32. Opstad, K.S., Provencher, S.W., Bell, B.A., Griffiths, J.R., and Howe, F.A. 2003. Detection of elevated glutathione in meningiomas by quantitative in vivo 1H MRS. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 49:632-637.
33. Provencher, S.W. 2001. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. *NMR in biomedicine* 14:260-264.
34. Pfeuffer, J., Tkac, I., Provencher, S.W., and Gruetter, R. 1999. Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the rat brain. *Journal of magnetic resonance* 141:104-120.
35. Castillo, J., Davalos, A., and Noya, M. 1997. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349:79-83.
36. Banks, W.A. 2008. Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 9 Suppl 3:S2.
37. Kozlowski, G.P., Sterzl, I., and Nilaver, G. 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.
38. Hunter, S.F., Miller, D.J., and Rodriguez, M. 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.
39. Ryu, B.R., Choi, D.W., Hartley, D.M., Costa, E., Jou, I., and Gwag, B.J. 1999. Attenuation of cortical neuronal apoptosis by gangliosides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 290:811-816.

（実施例２２）

正常（正常酸素）状態下および低酸素状態下における抗体の活性および効果

【０４３６】

細胞内で、脳卒中、心筋梗塞、または虚血と関連し、これらを模倣する状態下における、神経作用性抗体、特に、抗体ＩｇＭ１２の、効果および能力をさらに評価する（ａｓｓｅｓｓ）ため、抗体を正常酸素状態下および低酸素状態下で評価する（ｅｖａｌｕａｔｅ）研究に着手した。培養下の低酸素状態は、臨床状況における脳卒中および虚血から生じる酸素枯渇の側面をまねるのに用いられる。まず、正常酸素下の培養物を、混合神経膠培養物中の多様なマーカーについて評価した。次いで、効果および能力を評価するために、関与性のマーカーを、神経作用性抗体および対照抗体を伴い、かつ、これらを伴わずに、低酸素状態下で評価した。

【０４３７】

正常酸素状態

【０４３８】

正常状態または正常酸素状態を評価するため、混合神経膠培養物を、ＦＢＳ（１０％）含有培地中で４日間にわたり成長させ、既知組成培地中で、再ミエリン化促進ＩｇＭであるｒＨＩｇＭ２２、再生性ｍＡｂであるｒＨＩｇＭ１２、アイソタイプ対照であるｓＨＩｇＭ１１６（各々１０μｇ／ｍｌずつ）、または培地だけにより、７日間にわたり処置した。新鮮な抗体を伴う培地で、１日おきに交換した。結果を、図４７に示す。棒グラフは、ミエリンマーカーであるＭＢＰ、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３および活性化小膠細胞のマーカーとしてのＣＤ６８による３回の独立の実験に由来するウェス

タンブロットについての定量的解析を示す。これらの結果は、再生性抗体であるｒＨＩｇＭ１２が、混合神経膠培養物中での希突起膠細胞前駆細胞（ＯＰＣ）の分化および生存を刺激することを示す。これらのデータは、再生性抗体であるｒＨＩｇＭ１２は、ＯＰＣの分化を刺激し、神経膠アポトーシスレベルを低減し、小膠細胞を活性化するが、再ミエリン化促進抗体であるｒＨＩｇＭ２２やアイソタイプ対照であるｓＨＩｇＭ１１６はそうではないことを示す。アポトーシスを受けることからレスキューされる特定の細胞型（複数可）は決定されなかった。

【０４３９】

次いで、ＯＰＣ－小膠細胞共培養物を、再ミエリン化促進ｍＡｂであるＡ２Ｂ５、Ｏ４、Ｏ１、７８．０９、９４．０３、ｒＨＩｇＭ２２、再生性ｍＡｂであるｒＨＩｇＭ１２、アイソタイプ対照（ＬＥＡＦ、５Ａ５、ＣｈｒｏｍＰｕｒｅ　ＩｇＭ、ｒＨＩｇＭ４２、ｓＨＩｇＭ１４、ｓＨＩｇＭ２４、ｓＨＩｇＭ２６）（各々１０μｇ／ｍｌずつ）を含む星状細胞馴化培地中または培地中で培養した。新鮮な抗体を含む培地で、１日おきに交換した。図４８中の代表的なウェスタンブロットは、ＯＰＣマーカーであるＰＤＧＦαＲ、ミエリンマーカーであるＣＮＰアーゼおよびＭＯＧ、小膠細胞マーカーであるＣＤ６８およびＬｙｎ、増殖マーカーであるＫｉ－６７およびヒストンＨ３、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３、ならびに細胞周期マーカーであるｐＲｂＳ７９５のレベルを示す。星状細胞および小膠細胞は、星状細胞馴化培地中のＯＰＣの分化および生存を刺激するＧＳＬ結合再生性ｍＡｂを必要とする。

【０４４０】

上記の正常酸素のデータは、（ｉ）再ミエリン化促進ｍＡｂ（Ａ２Ｂ５、Ｏ４、Ｏ１、７８．０９、９４．０３）または再生性ｍＡｂであるｒＨＩｇＭ１２は、アイソタイプ対照と比較して、ＯＰＣ／ＯＬ－小膠細胞共培養物中のＯＰＣの分化または生存を誘導しないこと；（ｉｉ）星状細胞馴化培地中の可溶性因子は、処置群間の差違を刺激するのに十分でなかったこと；（ｉｉｉ）再ミエリン化促進ｍＡｂおよび再生性ｍＡｂは、星状細胞の非存在下で、小膠細胞（ＣＤ６８、Ｌｙｎ）を活性化しなかったこと；（ｉｖ）可溶性の星状細胞因子は、ＩｇＭ処置の６日後における、ｒＨＩｇＭ２２によるＯＰＣの増殖（Ｋｉ－６７、ヒストンＨ３）を媒介するのに十分なようであることを裏付ける。

【０４４１】

正常酸素研究の次のセットでは、混合神経膠培養物を、既に記載した通り（図４７上）に成長させ、処置した。図４９は、活性化小膠細胞についてのマーカーであるＣＤ６８、および小膠細胞中では非常に豊富であり、ＯＰＣ中では量が少なく、星状細胞では存在しないキナーゼである、Ｌｙｎキナーゼによる３回の独立の実験に由来するウェスタンブロットについての定量的解析を示す棒グラフを提示する。代表的な免疫蛍光画像を、図５０に提示し、培養の４日目のｍＡｂ処置の前、ならびにｒＨＩｇＭ１２、ｒＨＩｇＭ２２、およびアイソタイプ対照であるｓＨＩｇＭ２４（各々１０μｇ／ｍｌずつ）による処置の７日後である培養の１１日目における、混合神経膠中のＣＤ６８（緑色）および核マーカーであるＤＡＰＩ（青色）のレベルを示す代表的な免疫蛍光画像を提示する。これらのデータは、再生性ｍＡｂであるｒＨＩｇＭ１２が、混合神経膠培養物中のＣＤ６８およびＬｙｎキナーゼの発現を増加させることを裏付ける。ウェスタンブロットにおけるＣＤ６８の発現レベルがより高いこと（図４９）は、免疫細胞化学による活性化小膠細胞数がより多いこと（図５０）と相関し得る。したがって、これらの研究において示される通り、再ミエリン化促進抗体（例示的な抗体であるＡ２Ｂ５およびＯ１）および再生性ｍＡｂであるＩｇＭ１２は、混合神経膠培養物中の小膠細胞（ＣＤ６８）を活性化する。

【０４４２】

低酸素状態

【０４４３】

次いで、混合神経膠細胞培養物に対する低酸素の分子的効果を、正常酸素の培養物と比較した。混合神経膠培養物を、ＦＢＳ（１０％）含有培地中で４日間にわたり成長させ、正常酸素状態（２１％のＯ２）と比較した低酸素（３％のＯ２）下の既知組成培地中で、

さらに７日間にわたり処置した。代表的なウェスタンブロット（図５１）は、低酸素誘導因子１（ＨＩＦ１α）、希突起膠細胞マーカーであるＮＧ２、ＰＤＧＦα、Ｏｌｉｇ－２、ミエリンマーカーであるＭＢＰおよびＣＮＰアーゼ、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、小膠細胞マーカーであるＣＤ６８、細胞周期マーカーであるｐＲｂＳ７９５、ならびにアポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３のレベルを示す。ベーター－アクチンを、ローディング対照として用いた。図５１において示される通り、低酸素および正常酸素へと曝露した、混合神経膠培養物に由来するウェスタンブロットについての定量的解析は、３回の独立の実験により完了し、これを図５２に示す。これらのデータは、正常酸素状態と比較した、低酸素下における、混合神経膠培養物中の、小膠細胞マーカーレベルおよび星状細胞マーカーレベルの発現の低下、ならびにミエリンマーカーレベルの増加を裏付ける。低酸素モデルの検証は、低酸素下におけるＨＩＦ１αの発現の増加により示される。

【０４４４】

低酸素モデルを検証したら、次いで、脳卒中、梗塞、および虚血の影響に関与性であり、これらを模倣する状態における抗体の効果を評価するために、低酸素下の培養物の、再生性抗体であるＩｇＭ１２による処置に着手した。混合神経膠培養物を、正常酸素状態下のＦＢＳ（１０％）含有培地中で４日間にわたり成長させ、その後、既知組成培地中、低酸素（３％のＯ２）下、ヒト再生性抗体であるｒＨＩｇＭ１２または培地だけで、１～７日間にわたり処置した。代表的なウェスタンブロット（図５３）は、増殖マーカーであるＫｉ－６７、小膠細胞マーカーであるＩＢＡ－１、ＣＤ６８、およびｉＮＯＳ、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、細胞周期マーカーであるｐＲｂＳ７９５およびｐＲｂＳ８０７、ならびに希突起膠細胞マーカーであるＰＤＧＦαＲ、ＮＧ２、Ｏｌｉｇ－１およびＯｌｉｇ－２、ならびにミエリンマーカーであるＭＢＰのレベルを示す。これらのデータからの結果は、低酸素下におけるｒＨＩｇＭ１２による処置の有効性を示す。ｒＨＩｇＭ１２は、小膠細胞を活性化させ、神経膠細胞の細胞周期離脱（ｐＲｂ）を刺激し、神経膠のアポトーシスレベルを低減し、低酸素下におけるミエリン産生レベルの上昇を低減する。したがって、再生性抗体であるｒＨＩｇＭ１２は、低酸素下の混合神経膠培養物中の神経膠の生存を刺激し、ＯＰＣの分化を低減する。

【０４４５】

正常酸素下と対比した低酸素下におけるｒＨＩｇＭ１２の分子的転帰を、正常酸素下と比較した低酸素下における混合神経膠に対する、ｒＨＩｇＭ１２により媒介される効果を直接的に比較することにより評価した。混合神経膠は、前出で記載した通りに培養し、低酸素状態下または正常酸素状態下の既知組成培地中、７日間にわたり、ｒＨＩｇＭ１２、ｒＨＩｇＭ２２、または培地だけで処置した。代表的なウェスタンブロット（図５４）は、小膠細胞マーカーであるＩＢＡ－１およびＣＤ６８、アポトーシスマーカーである切断型カスパーゼ３、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、希突起膠細胞マーカーであるＰＤＧＦαＲ、ＮＧ２およびＯｌｉｇ－２、ならびにミエリンマーカーであるＭＢＰおよびＣＮＰアーゼのレベルを示す。ｒＨＩｇＭ１２は、正常酸素状態下および低酸素状態下の両方において、小膠細胞発現マーカーであるＣＤ６８およびＩＢＡ－１を刺激する有効性を示す。最も顕著なことは、ｒＨＩｇＭ１２が、正常酸素状態と比較して、ミエリンマーカーであるＭＢＰおよびＣＮＰアーゼの発現に対する低酸素の影響を均衡させることである。

【０４４６】

培養物マーカーの妥当性および一貫性を点検するために、低酸素状態を動物において評価した。Ｐ１３齢の新生仔Ｂ１６マウスに由来する低酸素皮質および正常酸素皮質についての分子的解析を実施した。Ｃ５７／Ｂｌ６新生仔マウスを、ＣＤ１母体マウスで交差養育し、Ｐ３～Ｐ７の４日間にわたり低酸素（１０％のＯ２）へと曝露した。マウスは、その後、さらに６日間にわたり室内空気に曝露し、Ｐ１３に屠殺した。いずれの処置群（正常酸素マウスおよび低酸素マウス）においても、ＲＮＡを皮質から単離し、ミエリンマーカーであるＰＬＰ１、ＭＯＧ、ＭＢＰ１、希突起膠細胞前駆細胞マーカーであるＰＤＧＦαＲおよびＯｌｉｇ－１、星状細胞マーカーであるＧＦＡＰ、ニューロンマーカーである

Ｎｅｓｔｉｎおよびβ３－チューブリン、低酸素誘導因子１αならびにサルコスパンタンパク質ＳＳＰＮについてプローブした。発現レベルは、ＲＴ－ＰＣＲにより解析し、結果は、β－アクチンのレベルに対して正規化した。Ｐ１３における低酸素および正常酸素のＣ５７／Ｂ１６新生仔に由来する皮質中のマーカーについてのＲＴ－ＰＣＲ解析を実行し、結果を図５５に示す。これらのデータからの結果は、新生仔マウスの低酸素処置が、ミエリンマーカーの発現レベルを選択的に低減するが、皮質組織内のニューロンマーカー、ＯＰＣマーカー、および星状細胞マーカーの発現レベルは低減しないことを示す。

（実施例２３）

マウス脳卒中モデルにおける、ＩｇＭ抗体であるｒＨＩｇＭ１２の局在

【０４４７】

脳卒中後または虚血性イベント後の介入のための、抗体の接近および局在を評価するために、モノクローナル抗体のＩＰ投与を伴う脳卒中動物モデルを用いた。マウスにおいて脳卒中を誘導し、放射性標識された抗体を投与し、次いで、投与の最長で２４時間後の時期における放射性標識を決定することにより、動物の組織を抗体について評価した。脳卒中病変を含有する脳（皮質）のほか、小脳、脊髄、肝臓、脾臓、腎臓、および血清を評価した。

【０４４８】

脳卒中は、上記で記載した、光活性化Ｒｏｓｅ　Ｂｅｎｇａｌプロトコールを用いて、３匹の成体ＣＤ－１マウスの右側の大脳皮質において誘導し、他の３匹のマウスに、Ｒｏｓｅ　Ｂｅｎｇａｌは伴うが、光活性化は伴わない偽脳卒中手順を施した。脳卒中の３０～４０分後、約６０ｕｇのＩｇＭに相当する１０００万ｃｐｍの^{35}Ｓで標識されたｒＨＩｇＭ１２を、容量５００ｕｌの生理食塩液により、各マウスへと腹腔内投与した。ＩｇＭの投与または処置の６、１２、および２４時間後、血液をマウスから回収し、血管系を、３０ｍｌの生理食塩液で洗浄し、組織を速やかに回収した。組織における放射性標識について解析するため、病変領域を含有する脳の右前頭葉皮質を、７５ｍｇの組織ブロックとして摘出した。組織は、Ｓｏｌｖａｂｌｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）中に溶解させ、ｃｐｍは、製造元のプロトコールに従い、ＵｌｔｒａＧｏｌｄ液体シンチレーションカクテル中で決定した。他の組織の一部も、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒにより提示される比に従い摘出し、秤量し、処理した。結果を、図５６に描示する。

【０４４９】

この研究では、各時点（ｔｉｎｅ　ｐｏｉｎｔ）に１匹のマウスを用いたが、ｒＨＩｇＭ１２は、２４時間にわたりＣＮＳ組織に蓄積されたが、これに対し、血液代謝を担当する組織および血清自体のｒＨＩｇＭ１２レベルは低下したことが注意される。脳卒中を被ったマウスの６時間後における、皮質内の高レベルのｒＨＩｇＭ１２（図５６の「脳」と表示される第１のパネル）は、この時間内において、ＩｇＭが、脳卒中領域への接近を改善したことを示唆する。脳卒中を被った動物の脳／皮質内では、この時点において、正常／偽手順動物と対比して有意に高量の標識が存在する。また、ｒＨＩｇＭ１２が、脳卒中を有するマウスおよび対照マウスのＣＮＳ組織に同等に入ることも興味深く、このことから、無傷のＢＢＢが、ＣＮＳ損傷の領域に到達するこの治療用ＩｇＭの能力を完全には遮断しないことが示唆される。ｒＩｇＭ１２抗体は、この薬物がその最大の効果を及ぼすことが予測される、脳卒中後の極めて重要な最初の１２時間中に脳卒中領域に到達した。

【０４５０】

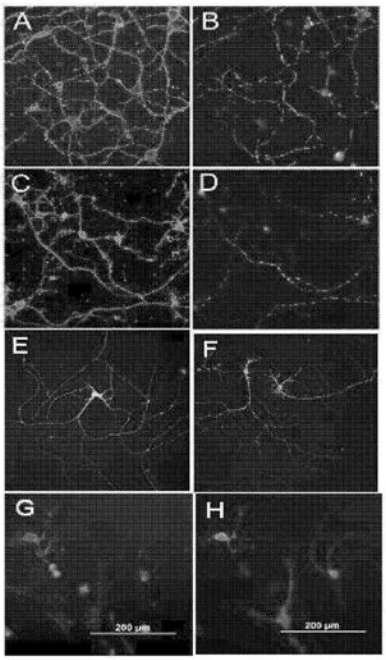
本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱しない限りにおいて、他の形態で実施することもでき、他の方式で実行することもできる。したがって、本開示は、例示的なものであり限定的なものではない全ての態様、付属の特許請求の範囲により示される本発明の範囲にあるものと考えられ、同等性の意味および範囲内に収まる全ての変化がその中に包含されることを意図する。

【０４５１】

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。

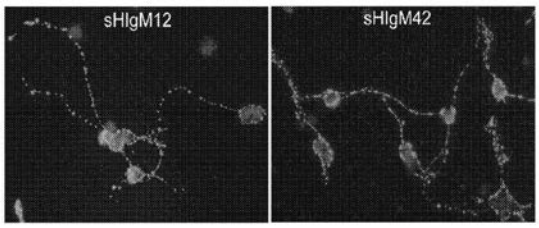
【図１】

FIGURE 1



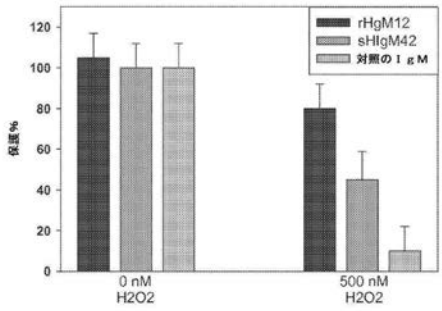
【図２】

FIGURE 2



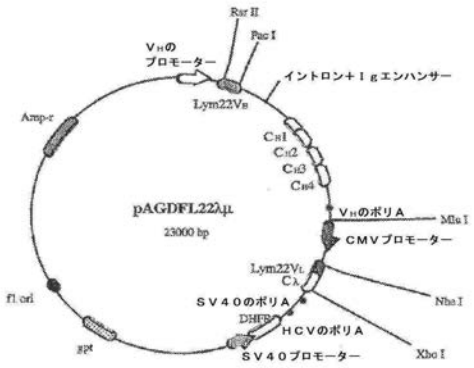
【図３】

FIGURE 3



【図４】

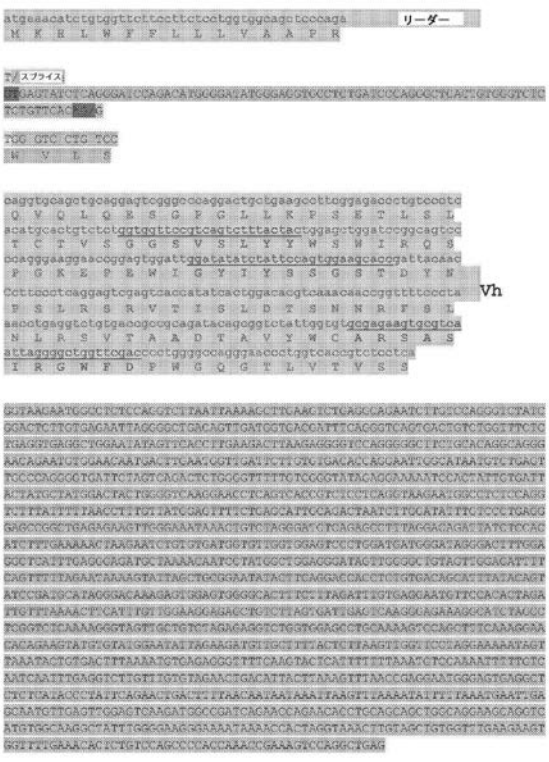
FIGURE 4



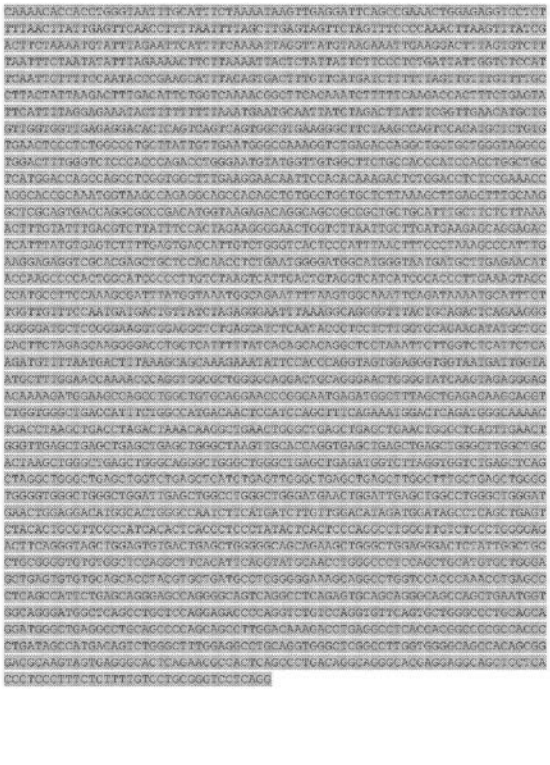
【図５－１】

【図５－２】

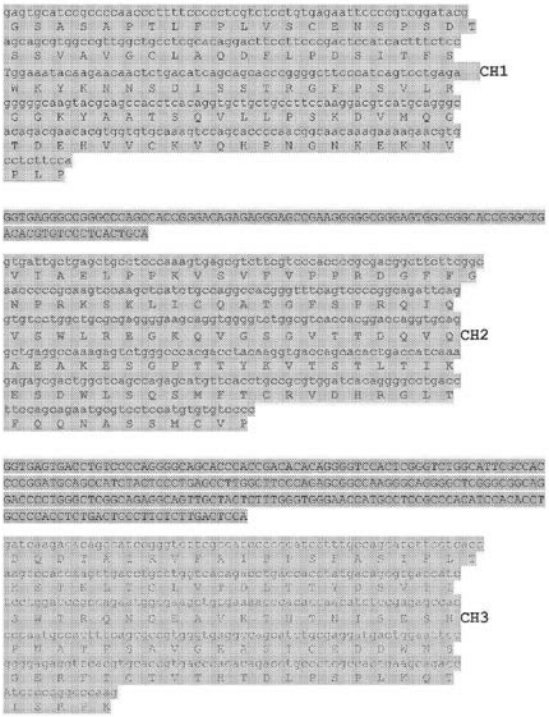
【図５－３】



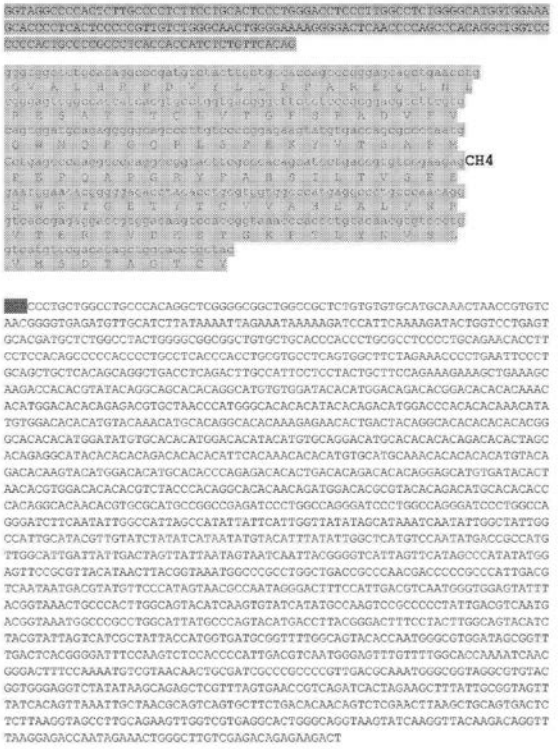
【図５－４】



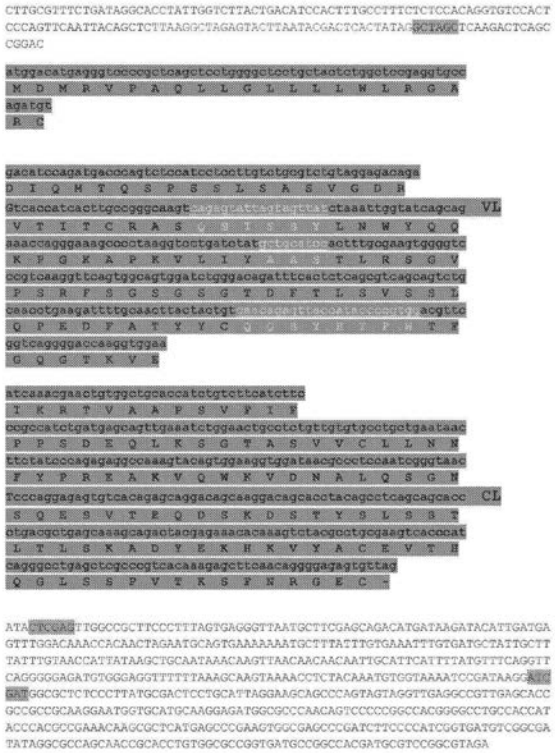
【図５－５】



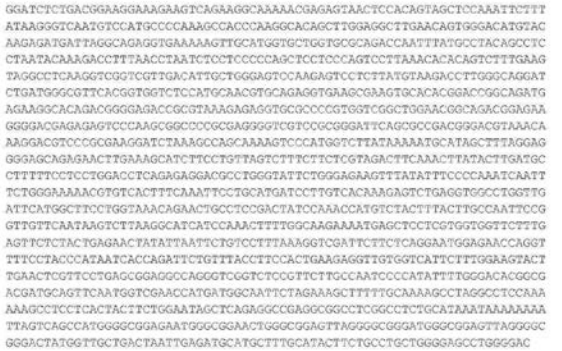
【図５－６】



【図５－７】



【図５－８】



【図５－９】

ヒトJ鎖のタンパク質配列（AAH38982）

1 MKNHLLFWGV LAVFIKAVHV KAQEDERIVL VDNKCKCARI TSRIIRSSED

51 PNEDIVERNI RIIVPLNNRE NISDPTSPLR TRFVYHLSDL CKKCDPTEVE

101 LDNQIVTATQ SNICDEDSAT ETCYTYDRNK CYTAVVPLVY GGETKMVETA

151 LTPDACYPD

用いられるヒトJ鎖のコード配列（黄色）

CATATAAGAATTCGCCACC ATGAAGAACCATTTGCTTT

TCTGGGGAGTCCTGGCGGTTTTTATTAAGGCTGTTCATGTGAAAGCCCAA

GAAGATGAAAGGATTGTTCTTGTTGACAACAAATGTAAGTGTGCCCGGAT

TACTTCCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAGATCCTAATGAGGACATTGTGG

AGAGAAACATCCGAATTATTGTTCCTCTGAACAACAGGGAGAATATCTCT

GATCCCACCTCACCATTGAGAACCAGATTTGTGTACCATTTGTCTGACCT

CTGTAAAAAATGTGATCCTACAGAAGTGGAGCTGGATAATCAGATAGTTA

CTGCTACCCAGAGCAATATCTGTGATGAAGACAGTGCTACAGAGACCTGC

TACACTTATGACAGAAACAAGTGCTACACAGCTGTGGTCCCACTCGTATA

TGGTGGTGAGACCAAAATGGTGGAAACAGCCTTAACCCCAGATGCCTGCT

ATCCTGACTAAGTCGAC

【図６－１】

FIGURE 6

IgM 42の配列

注

黄色 = E1Aプロモーター

青色 = 重鎖

グレー = 可変重鎖

ブラム = 可変重鎖内のCDR領域

紫色 = 軽鎖

紫色 = 可変軽鎖内のCDR領域

緑色 = 制限酵素

GCGCGC= BSSHI

TCCGGA= BspeI

GCTAGC= NheI

CTCGAG= XhoI

ATCGAT= ClaI

TTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGA

CTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCT

GACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAG

GGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTA

TACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCA

CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG

TCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT

AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC

GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC

CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTG

CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG

GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACC

GCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA

GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA

CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG

TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATT

ACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA

AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAA

AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT

GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAAC

TACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC

CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCC

TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGT

TGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCC

AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATC

GTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATG

【図６－２】

GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC

CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCG

CGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATC

TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTT

CACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA

AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC

GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC

ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC

GTCTTCAAGAATTCCTTTGCCTAATTTAAATGAGGACTTAACCTGTGGAAATATTTTGATGTGGGAAGCTG

TTACTGTTAAAACTGAGGTTATTGGGGTAACTGCTATGTTAAACTTGCATTCAGGGACACAAAAAACTCAT

GAAAATGGTGCTGGAAAACCCATTCAAGGGTCAAATTTTCATTTTTTTGCTGTTGGTGGGGAACCTTTGGA

GCTGCAGGGTGTGTTAGCAAACTACAGGACCAAATATCCTGCTCAAACTGTAACCCCAAAAAATGCTACAG

TTGACAGTCAGCAGATGAACACTGACCACAAGGCTGTTTTGGATAAGGATAATGCTTATCCAGTGGAGTGC

TGGGTTCCTGATCCAAGTAAAAATGAAAACACTAGATATTTTGGAACCTACACAGGTGGGGAAAATGTGCC

TCCTGTTTTGCACATTACTAACACAGCAACCACAGTGCTTCTTGATGAGCAGGGTGTTGGGCCCTTGTGCA

AAGCTGACAGCTTGTATGTTTCTGCTGTTGACATTTGTGGGCTGTTTACCAACACTTCTGGAACACAGCAG

TGGAAGGGACTTCCCAGATATTTTAAAATTACCCTTAGAAAGCGGTCTGTGAAAAACCCCTACCCAATTTC

CTTTTTGTTAAGTGACCTAATTAACAGGAGGACACAGAGGGTGGATGGGCAGCCTATGATTGGAATGTCCT

CTCAAGTAGAGGAGGTTAGGGTTTATGAGGACACAGAGGAGCTTCCTGGGGATCCCTAGGTGGGACTGTCT

CCCTTTGGACTTTCCTTCAATATCTTCTTTTAATATCTTTTGTGTCAAGATACAGAAGTGATAGAAAGAAT

TTGACAGTAATCCATCATTTCCTTAGACATGGGAAAAGTTATGAAGAATTGATAAGGAATTTTTTTTGTAA

GTCTGACACATTCAACAGTGACATTCTCTGTTCCTAGGCTTTTGGTTAAGGTGCTGCTTTTAAGAACAACA

TGAATTTCATTAAAAATTCATGTTTTTCCATTATTTACACCTTAAGGACTTAATTCTAGTAGATAATATAA

TATTAGAGATTTTCTTTTGTCCAGTTTATCTAGCATTGTTAGAGTGTAAGTTTTTATATTAATTACAATTT

TAATTTAGAGTGTGTGTATACTGTTCAGATGAAGAATGAGTCAAGCAAATGTGACTATTATTATCATTTGT

AGAACTATTATCCAGGATTACTGTGTATATGACCAGATACCATTCAAGTGTCAGGACACCAATTGATTACC

CATTTATACCTTGATGTCTTGTGAGTCTCTTCAAGTTTTGTAGCCTTACATTGAACAAGGCTTCAGTGGAT

GAACTTGGAATGATCAGAGTCAGGAGGCACAAAGCCTGTGAGATAAGAGGTGGGAAAGGCAACTTATAGCA

TTAAAGGTGCAAGCACATTCAGTGGTATGGGGGGGGCGGGAATACTGGCAAAGCCAGGAAGTCTGTCAGCA

CTTGGATACAAGAGTCTAGAGGAGTGCTTGTCCTATGAGGTGAGAGCAATGTGTACTTAATAGCTCAGAAA

AGCAAGCCAATGGAGAATAGTGCTAATGATGAGGGAGGAGAAAGGCAACATGAGAGAGAAGAGAAGGAGA

TTACAGGAAGAAATTAAGCTGTGGGAGAGGAAGGGGCTGGACTACCAGACATGCAGGATAGGCAAGTTTCA

ATGTGACCAGATGGGTCCTTTTTGTGAGAAAAAGCAGACCTAGATGTTGATGAGAGAAAGGCAAGTCCTTG

GTGATTATCAGAACACAAACATATAGCATGCAAAATTATCTTTACGTGGTACTTAGGGAGGTCACAAATGA

GCTGGACATGCATTTGGAATAGAGAGGAGGTAGTCTATATGGTGGATGAGAAGTTCAGCACTGGAGGAACT

AAGTGATACACACAGACCCCAGTGTATATTCACTTTTAAATCAAGAAATAATGTCAAGTATAATCCATA

TCTATTTATGAAGTTCTATGATTAAATTTTAAGCTGGCGCGCTATACCTTATTTTGCATTCAAGCCAAT

ATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCGTGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGG

CGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTGGT

GTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTCTCGCCGCGTTTAGGCCGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGT

AACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGAAAACTGAATAAGAGGAAGTGAAATCTGAATAATTTTGTGT

TACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGTTTACGTGGAGACTCGCCCAGGTG

TTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCGGGTCAAAGTTGGCGTTTTATTATTATAGTCAGCATGCATGCTCG

AGCGGCCGCGACGCGCAGTGTATTTATATCCGGACGGTCCGGGACCTCCTGTGCAAGAAC

【図６－３】

atggagtttgggctgagctggctttttcttgtggctattttaaaa リーダー

M E F G L S W L F L V A I L K

G/Aスプライス

GTAATTCATGGACAAATAGAAAAATTCAGTCTGAATGCATAAGACTGAAGAAACAGTCGATACGTGTCGC

AGTTTCTGACCAGGGTTTCTTTTTGTTGCAG

ggtgtccagtgtgag

G V Q C E

gtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcc

V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S

tgtgcagcctctggattcacctttagcacctatgccatgagctgggtccgccaggctcca

C A A S G F T F S T Y A M S W V R Q A P

ggggaggggctggagtgggtctcagatattaatgttggtggtgttaccacatactacgca

G E G L E W V S D I N V G G V T T Y Y A

gactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcta Vh

D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L

caaatgaacagcctgagagtagaggcacgcggccatgtattactgtgtgaggcggtcggcgg

Q M N S L R V E D T A M Y Y C V R R S G

cccgatggcaactctgctgcccgctgacttctggggccagggatccctggtcatcgtctcc

P D R N S S P A D F W G Q G S L V I V S

tcagggagtgcatccgccccaaccctttcccctcgtctga

S G S A S A P T L F P L V -

GGTAAGAATGGCCTCTCCACGTCTAATTAAAAGCTTGAAGTCTCAGCCAGAATCTTGTCCAGGGTCTATC

GGACTCTTGTGAGAATTAGGGGCTGACAGTTGATGGTGACGATTTCAGGGTCAGTGACTGTCTGGTTCTC

TGAGGTGAGGCTGGAATATAGTTCACCTTGAAGACTTAAGAGGGGTCCAGGGGGCTCTGTCAGCAGGG

AACAGAATGTGAACAATGACTTGAATCGTCGATCCTTGTGTGACACCAGGAATTGGCATAATGTCTGAGT

TGCCCAGGGGTGATTCTAGTCAGACTCTGGGGTTTTGTCCCGTATACAGGAAAAATCCAGTATTGTGATT

ACTATGCTATTGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGG

TCTTATTTTAACCTTGTTATGGAGTTTCTGAGCATTCCAGACTAATCTTGCATGCCTGAGG

GAGCCGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTTAGGACAGATTATCTCCAC

ATCTTGAAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTTGGTGGAGTCCCTGGATGATGGGATAGGGACTTGGA

GGCTCATTTGAGCGACATGCTAAAACAATCCTATGGCTGGAGGATAGTGGGGCTGTAGTCGGACATTT

CAGTTTTAGAATAAAGTATTAGCTGCGAATATACTTCAGGACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGT

ATCCGATGCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTGTGAGGAATGTTCCACACTAGA

TTGTTTAAAACTTCATTTGTTGCAACGAGACCTCTTTACTCATTGACTCAAGCAGAAAGCCATCTACCC

TCGGTCTCAAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTGCAAAAGTCCAGCTTCAAAGGAA

CACAGAAGTATGTGTATGGAATATAGAAGATGTTGCTTTACTCTAAGTTGGTCCTAGGAAAAATAGT

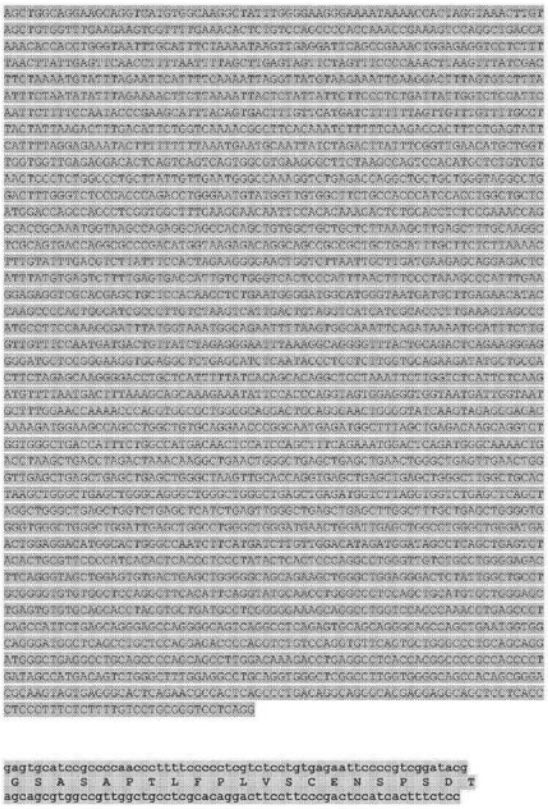
TAAATACTGTGACTTTAAAATGTGAGAGGGTTTCAAGTACTCATTTTTTAATGTCCAAAATTTTGTC

AATCAATTTGAGGTCTTGTTGTGTAGAACTGACATTACTTAAAGTTTAACCGAGGAATGGCAGTGAGGCT

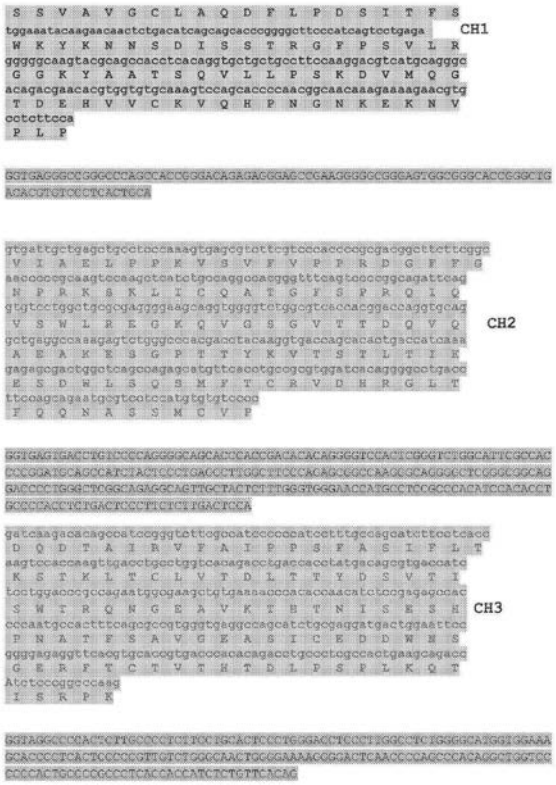
CTCTCATACCCTATTCAGAACTGACTTTAACAATAATAAATTAAGTTTAAAATATTTTAAATGAATTGA

GCAATGTTGAGTTGGAGTCAAGATGGCCGATCAGAACCAGAACACCTGCAGC

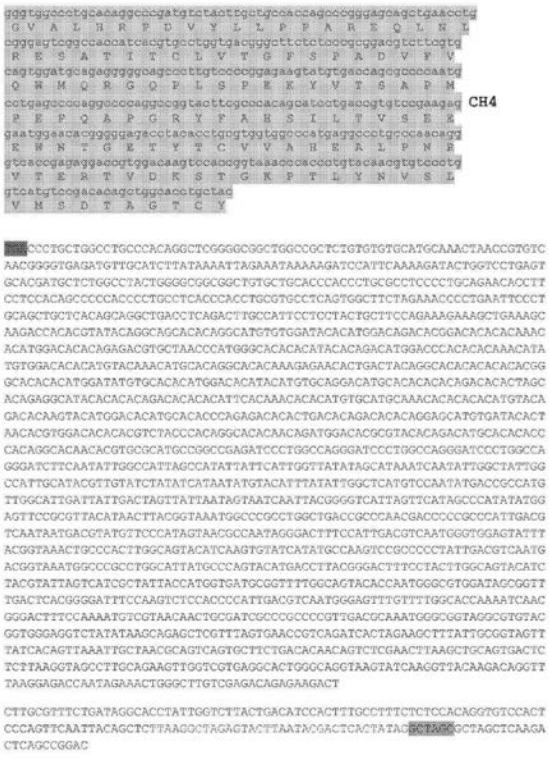
【図６－４】



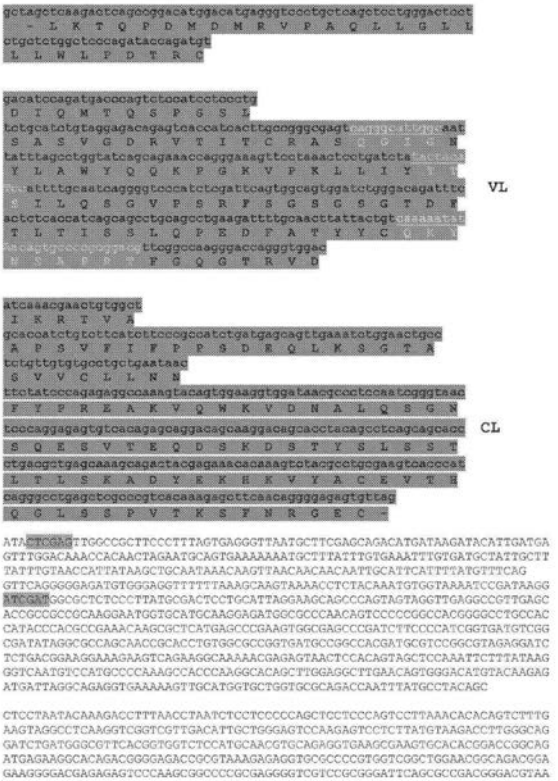
【図６－５】



【図６－６】



【図６－７】

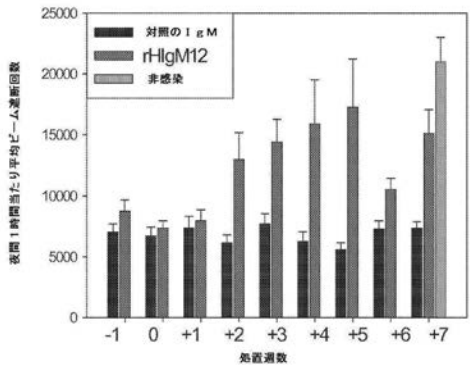


【図６－８】

ACAAAGGACGTCCCGCGAAGGATCTAAAGCCAGCAAAAGTCCCATGGTCTTATAAAAATGCATAGCTTTAG
GAGGGGAGCAGAGAACTTGAAAGCATCTTCCTGTTAGTCTTTCTTCTCGTAGACTTCAAACTTATACTTGA
TGCCTTTTTCCTCCTGGACCTCAGAGAGGACGCCTGGGTATTCTGGGAGAAGTTTATATTTCCCCAAATCA
ATTTCTGGGAAAAACGTGTCACTTTCAAATTCCTGCATGATCCTTGTCACAAAGAGTCTGAGGTGGCCTGG
TTGATTCATGGCTTCCTGGTAAACAGAACTGCCTCCGACTATCCAAACCATGTCTACTTTACTTGCCAATT
CCGGTTGTTCAATAAGTCTTAAGGCATCATCCAAACTTTTGGCAAGAAAATGAGCTCCTCGTGGTGGTTCT
TTGAGTTCTCTACTGAGAACTATATTAATTCTGTCCTTTAAAGGTCGATTCTTCTCAGGAATGGAGAACCA
GGTTTTCCTACCCATAATCACCAGATTCTGTTTACCTTCCACTGAAGAGGTTGTGGTCATTCTTTGGAAGT
ACTTGAACTCGTTCCTGAGCGGAGGCCAGGGTCCGTCTCCGTTCTTGCCAATCCCCATATTTTGGGACACG
GCGACGATGCAGTTCAATGGTCGAACCATGATGGCAATTCTAGAAAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCC
AAAAAAGGCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAA
AAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGG
GGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGA
C

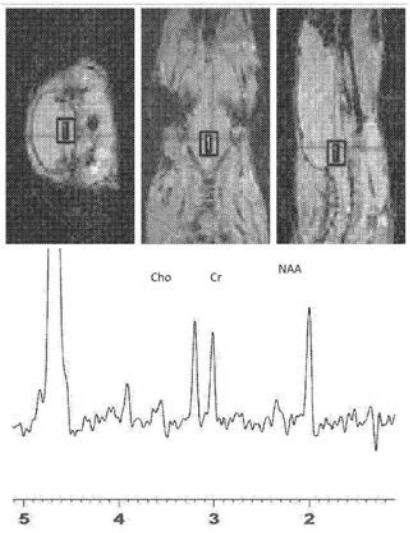
【図７】

FIGURE 7



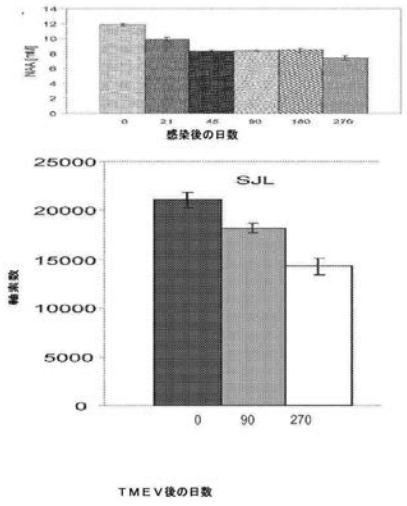
【図８】

FIGURE 8



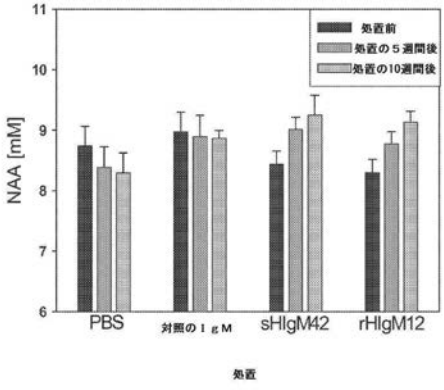
【図９】

FIGURE 9



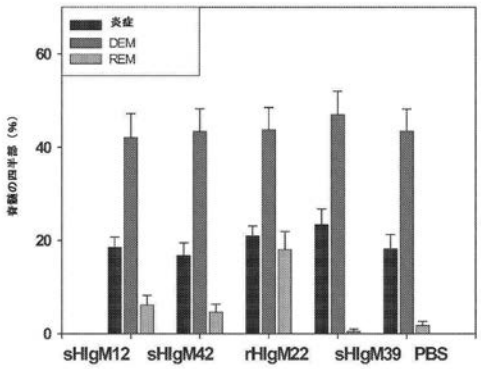
【図１０】

FIGURE 10



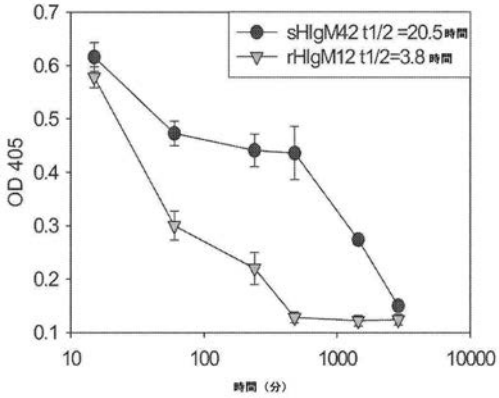
【図１１】

FIGURE 11



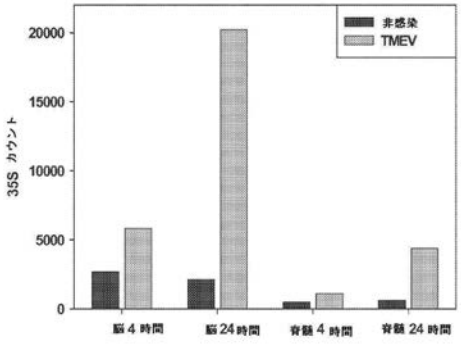
【図１２】

FIGURE 12



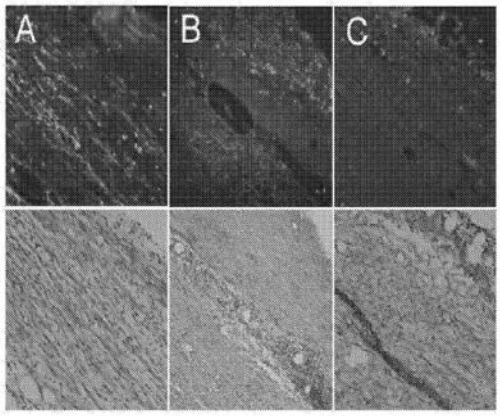
【図１３】

FIGURE 13



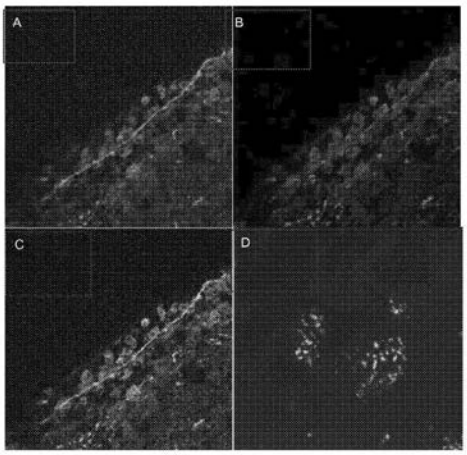
【図１４】

FIGURE 14



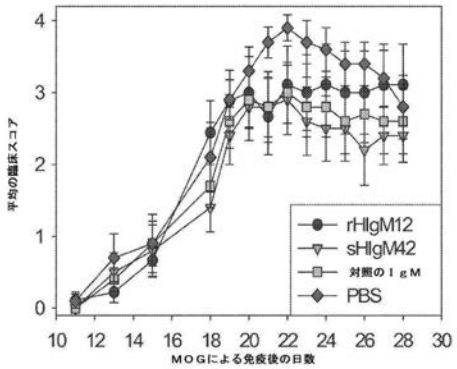
【図１５】

FIGURE 15



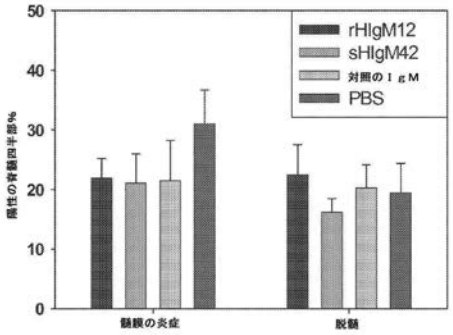
【図１６】

FIGURE 16



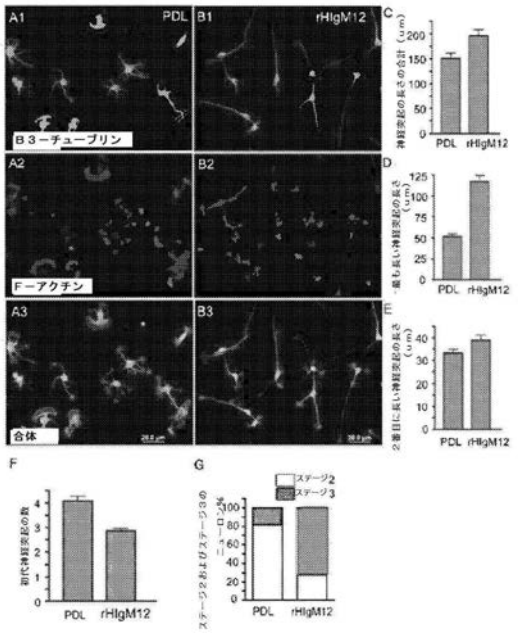
【図１７】

FIGURE 17



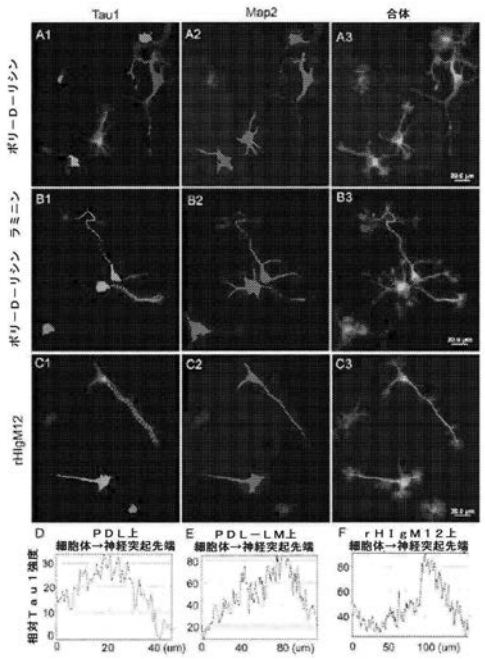
【図１８】

FIGURE 18



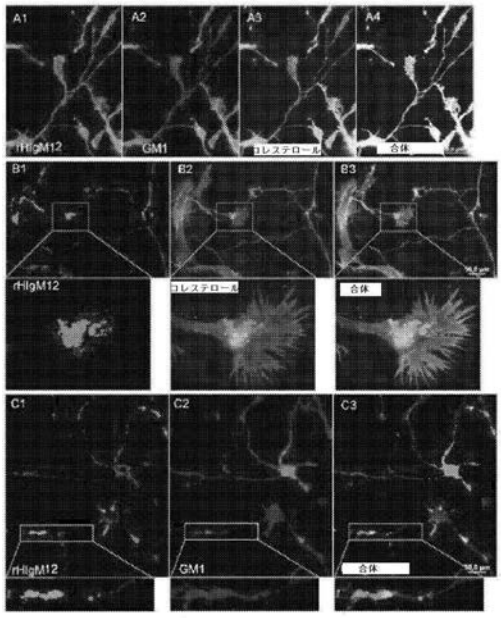
【図１９】

FIGURE 19



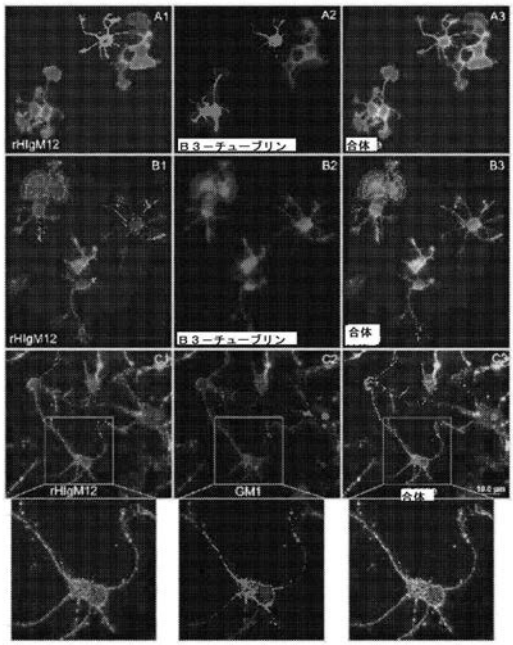
【図２０】

FIGURE 20



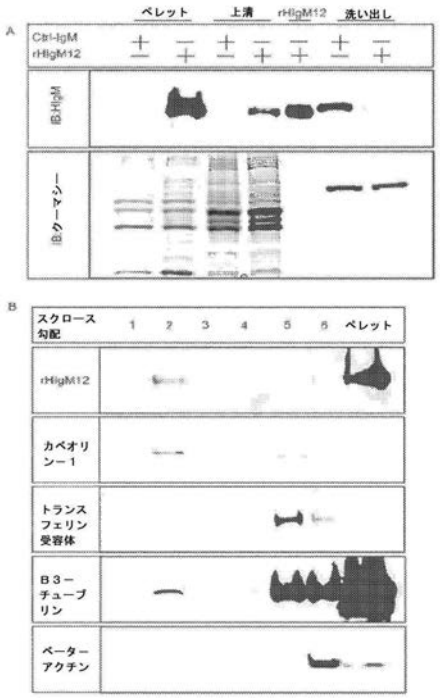
【図２１】

FIGURE 21



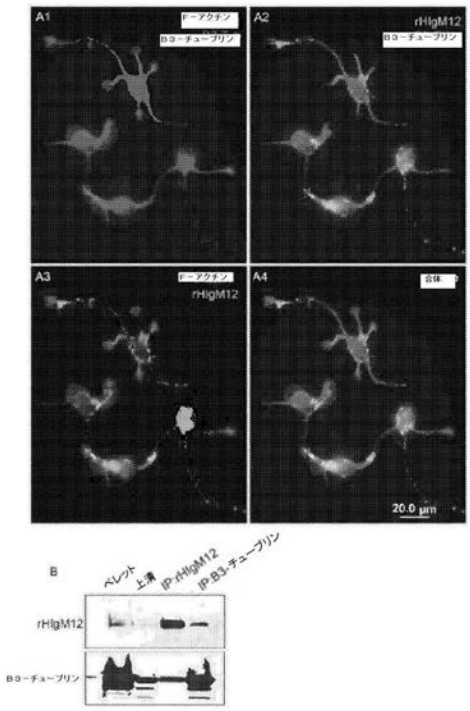
【図２２】

FIGURE 22



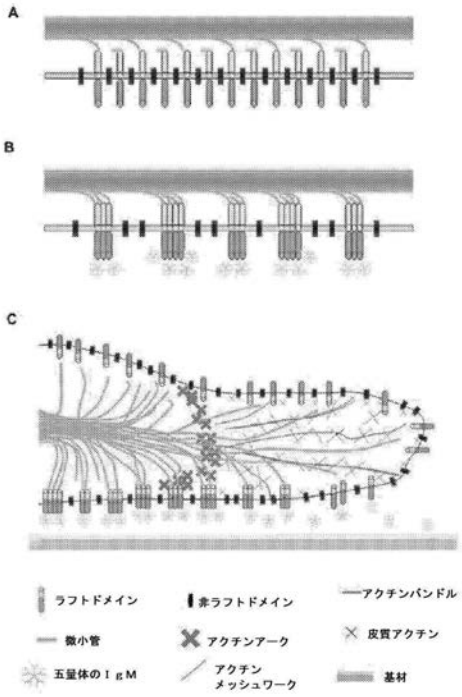
【図２３】

FIGURE 23



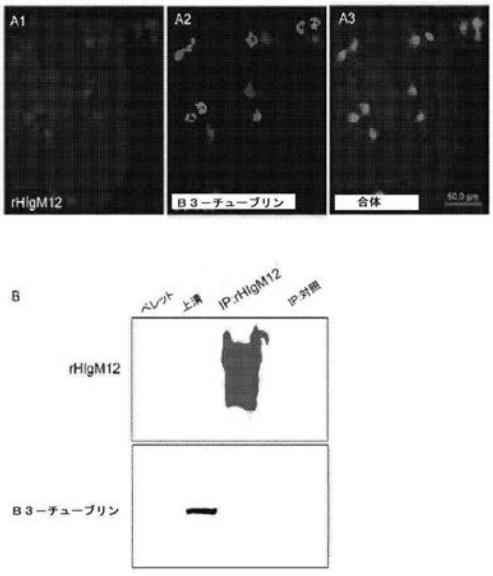
【図２４】

FIGURE 24



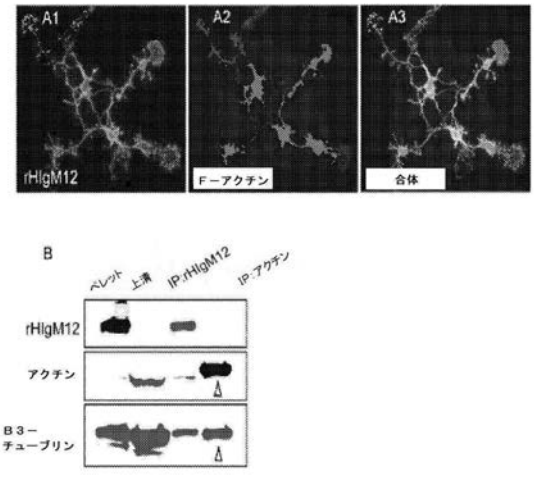
【図２５】

FIGURE 25



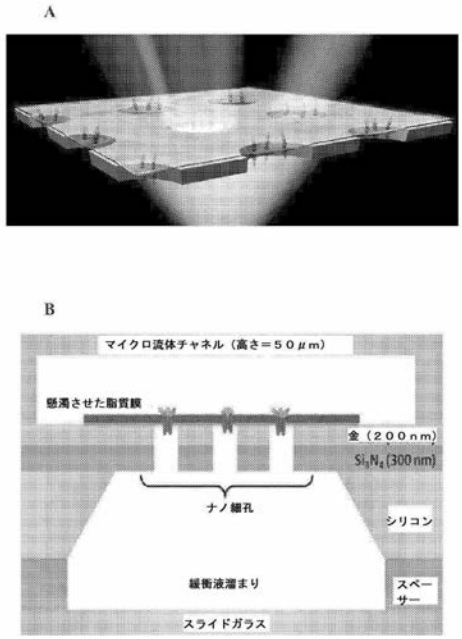
【図２６】

FIGURE 26



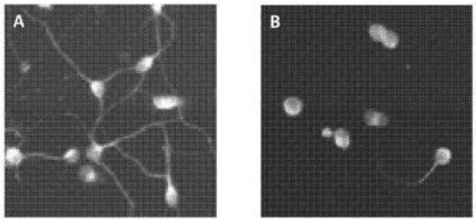
【図２７】

FIGURE 27



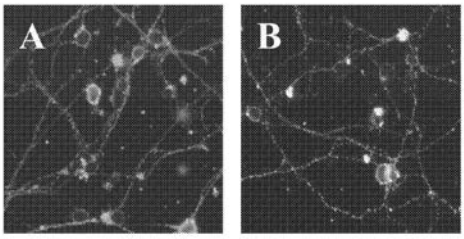
【図２８】

FIGURE 28



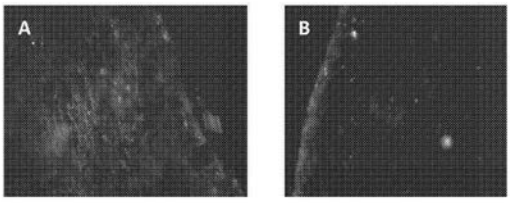
【図２９】

FIGURE 29



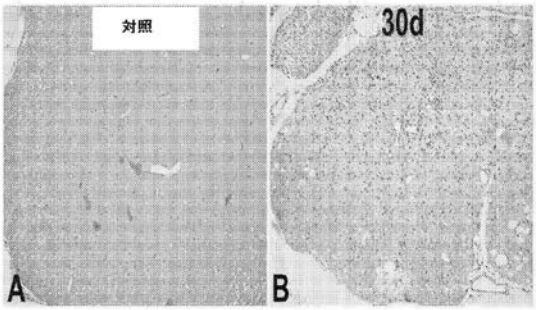
【図３０】

FIGURE 30



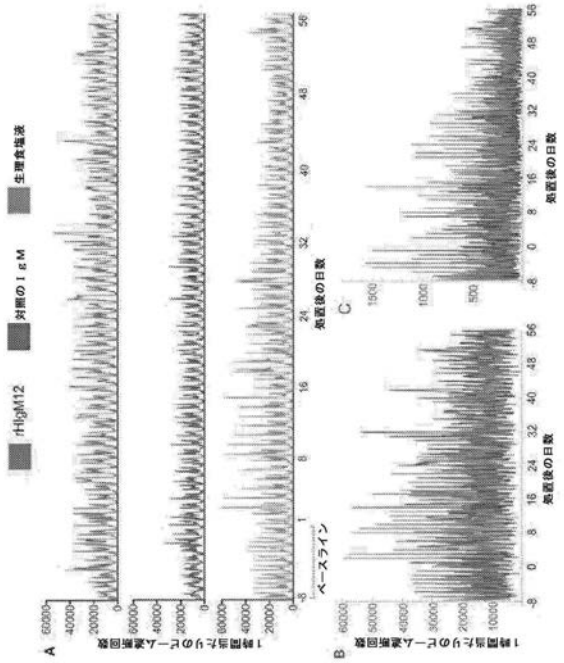
【図３１】

FIGURE 31



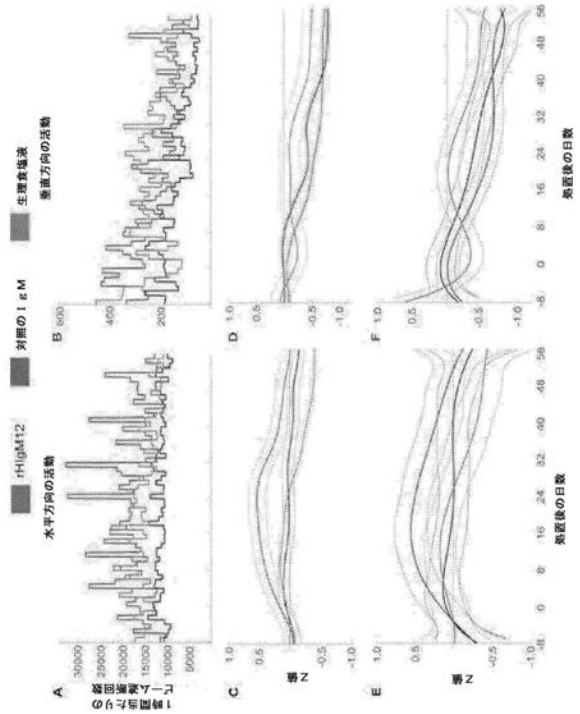
【図３２】

FIGURE 32



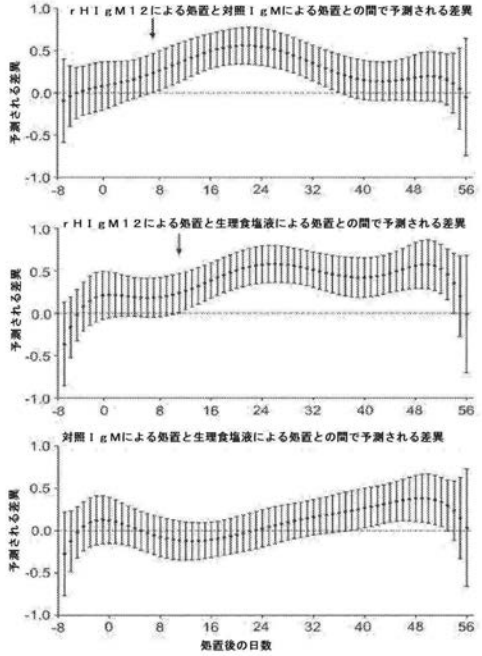
【図３３】

FIGURE 33



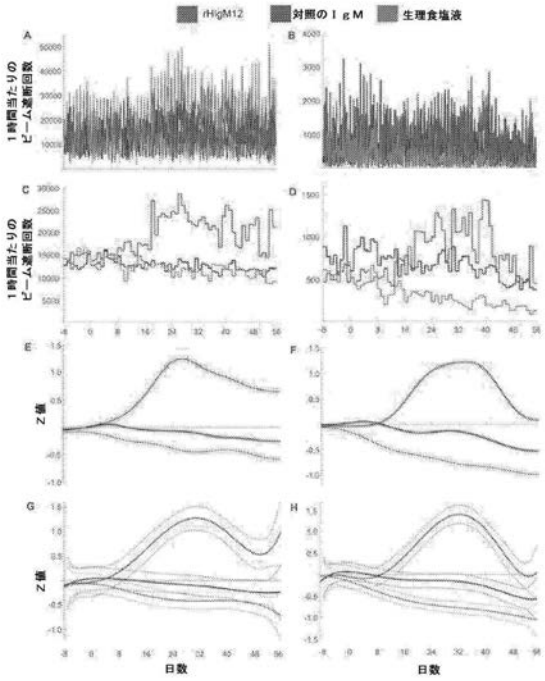
【図３４】

FIGURE 34



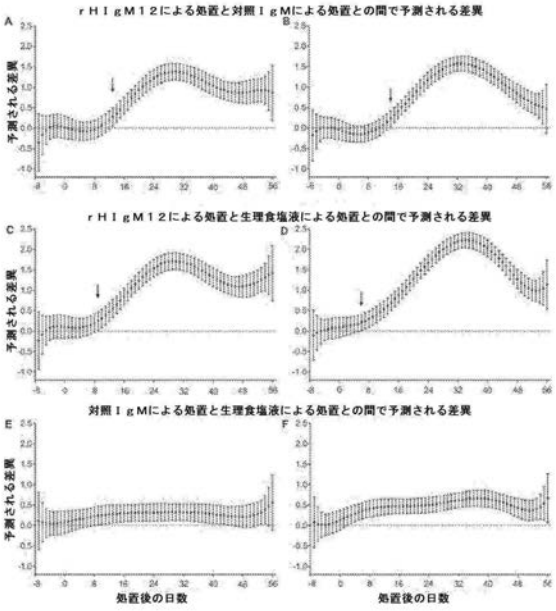
【図３５】

FIGURE 35



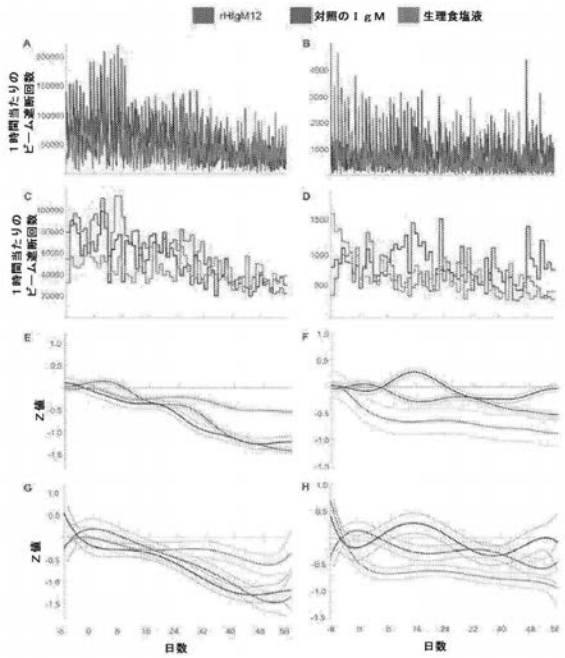
【図３６】

FIGURE 36



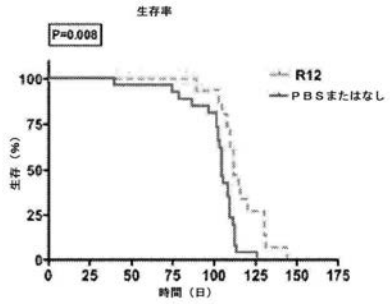
【図３７】

FIGURE 37



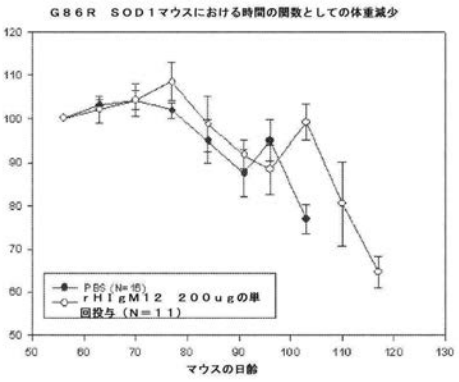
【図３８】

FIGURE 38



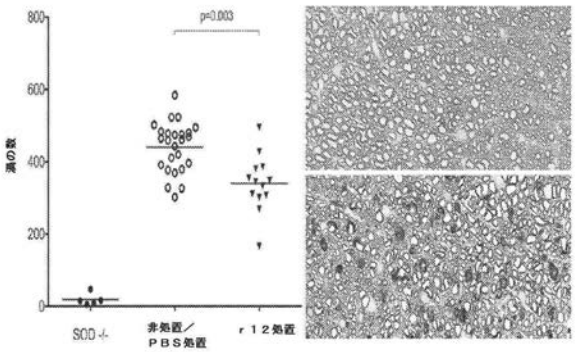
【図３９】

FIGURE 39



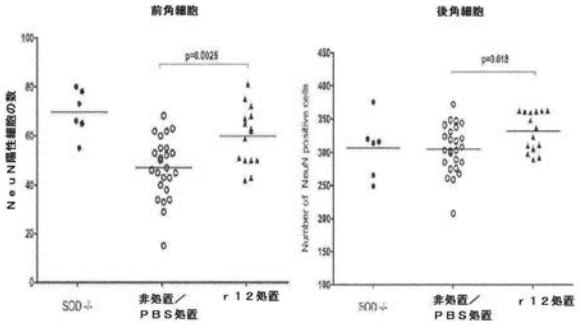
【図４０】

FIGURE 40



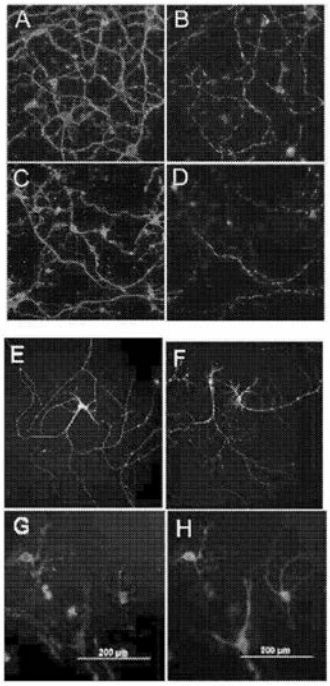
【図４１】

FIGURE 41



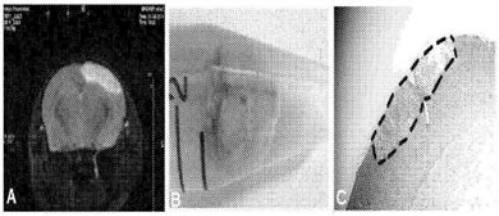
【図４２】

FIGURE 42



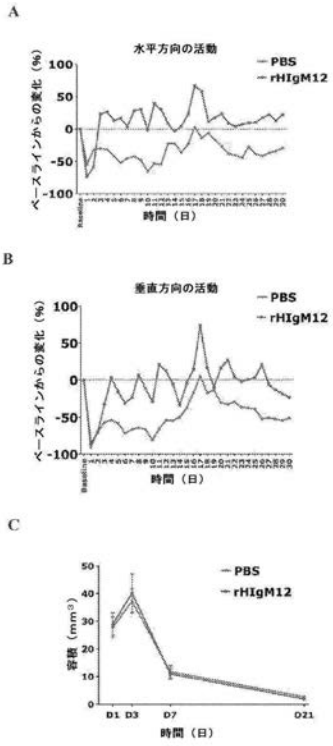
【図４３】

FIGURE 43



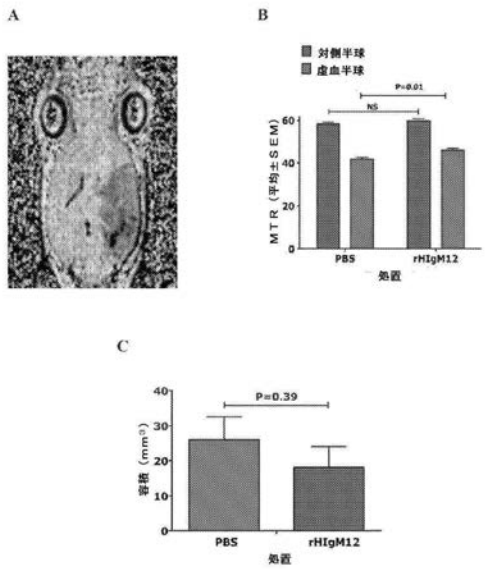
【図４４】

FIGURE 44



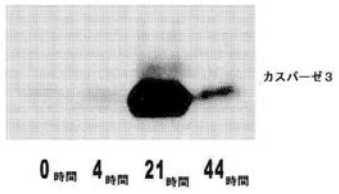
【図４５】

FIGURE 45



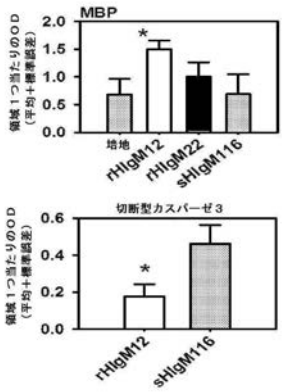
【図４６】

FIGURE 46



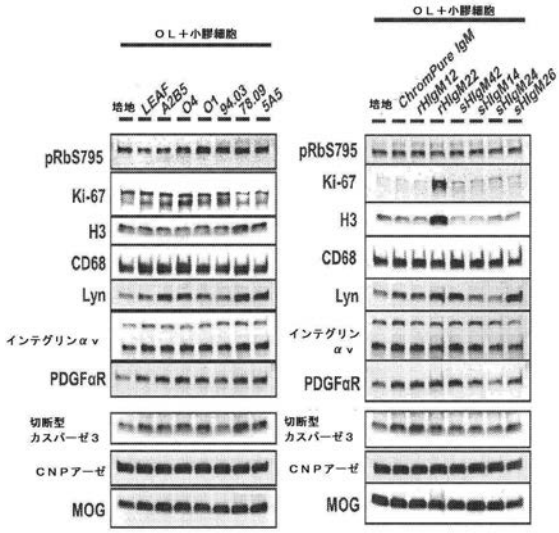
【図４７】

FIGURE 47



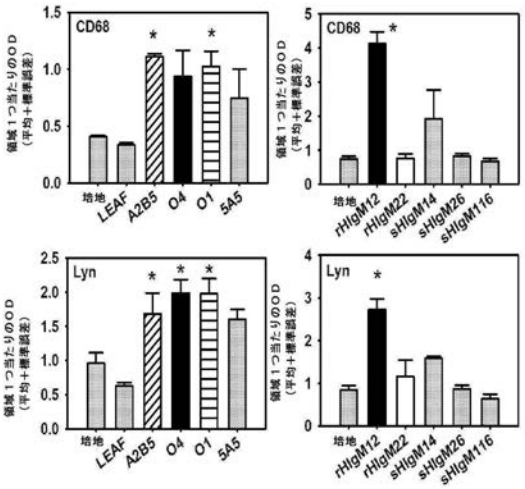
【図４８】

FIGURE 48



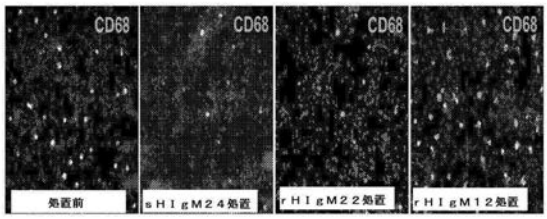
【図４９】

FIGURE 49



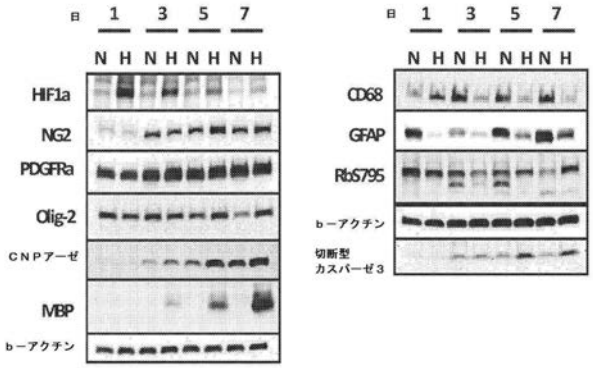
【図５０】

FIGURE 50



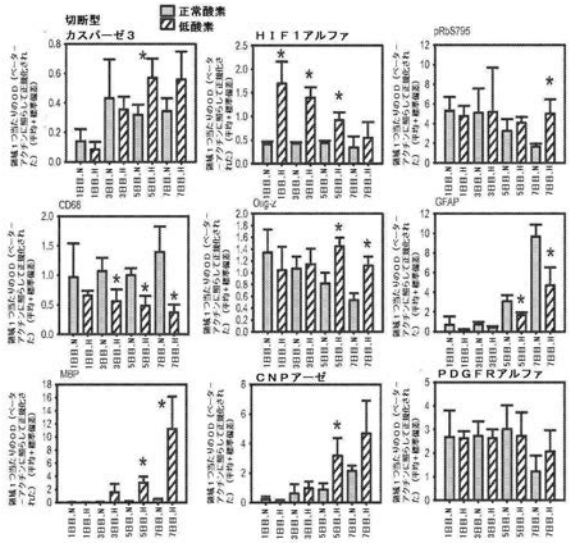
【図５１】

FIGURE 51



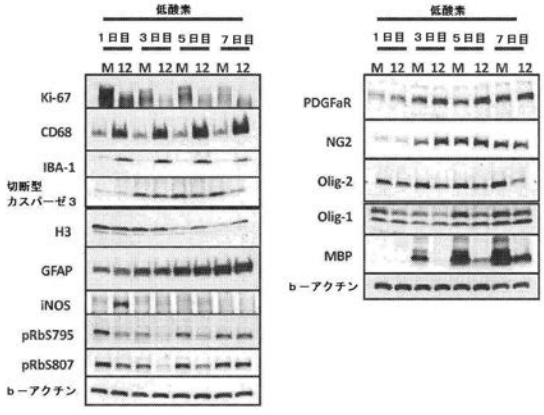
【図５２】

FIGURE 52



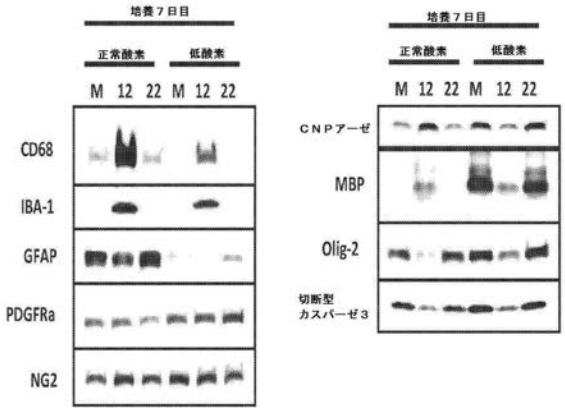
【図５３】

FIGURE 53



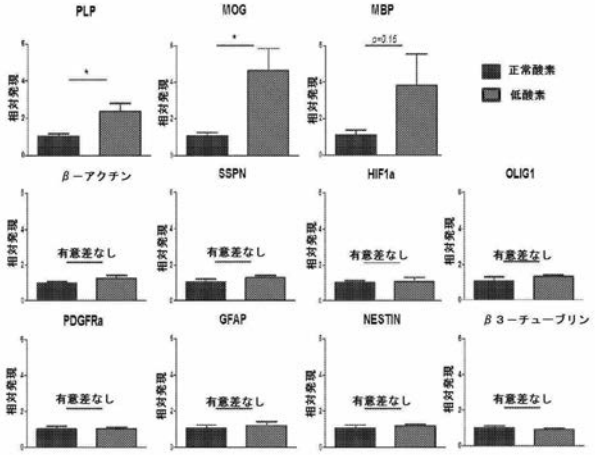
【図５４】

FIGURE 54



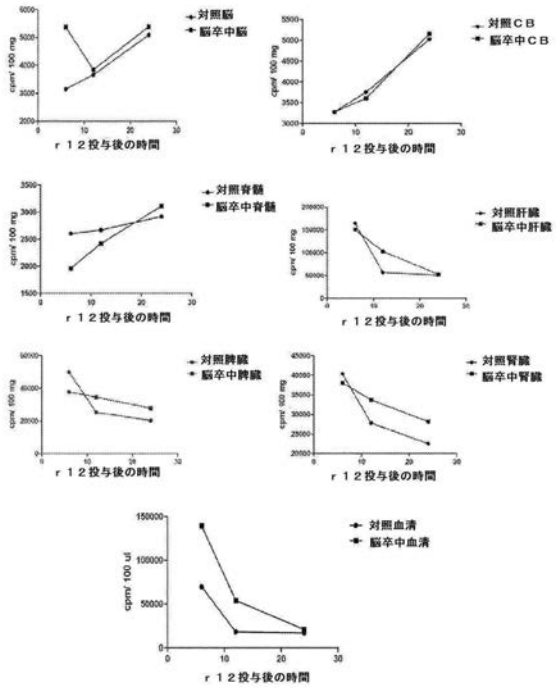
【図５５】

FIGURE 55



【図５６】

FIGURE 56



【配列表】
2019050832000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	*49/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61K	*51/10*	*(2006.01)*	A61K	49/00		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61K	51/10	200	
A61P	*9/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	9/00		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61P	9/10		
C12N	*15/08*	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y	
			C12N	15/08	100	

(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 ５５９０２, ロチェスター, ヒルサイド レーン エス. ダブリュー. ２４０２
(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 ５５９０６, ロチェスター, １５ティーエイチ ストリート エヌ. イー. ２００４
(72)発明者 ラリー アール. ピーズ
アメリカ合衆国 ミネソタ ５５９０６, ロチェスター, コリーン レーン エヌイー ２４２６

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4C084 AA19 NA05 NA13 ZA36 ZC75
4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41
BB43 BB44 CC22 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01 HH03 HH11
HH13 KA03 KA04 KA05 LL07
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 DA76 EA21 EA50 FA74

【外国語明細書】
2019050832000001.pdf

专利名称(译)	用于中风和缺血或缺血性病症的人抗体及其特异性结合序列		
公开(公告)号	JP2019050832A	公开(公告)日	2019-04-04
申请号	JP2019000205	申请日	2019-01-04
[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 ラリーアールピーズ		
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	C12N15/13 C07K16/18 C12P21/08 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61K51/10 A61P43/00 A61P9/00 A61P9/10 G01N33/53 C12N15/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/507 A61K2039/545 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/06 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/92 A61K39/39541 A61K45/06 A61K51/1018 A61K2039/55 C07K2317/24 C07K2317/52 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/18 C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K49/00 A61K51/10.200 A61P43/00.121 A61P9/00 A61P9/10 G01N33/53.Y C12N15/08.100		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZA36 4C084/ZC75 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/LL07 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/625628 2012-04-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供用于中风和缺血或缺血性病症的人抗体及其特异性结合序列。 摘要：提供了特异性结合成员，特别是人抗体，特别是重组抗体及其片段，其能够结合CNS中的神经元，识别它们并在CNS的神经元中引发反应。这一点。这些抗体可用于诊断和治疗神经损伤，神经损伤或与神经变性和神经变性疾病相关的病症，特别是用于治疗或改善中风或脑缺血。本发明的抗体，其可变区或CDR结构域序列及其片段也在与化学治疗剂，免疫调节剂或神经活性剂和/或其他抗体或其片段的治疗中组合。也可以用。 【选择图表】无

(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2019-50832
(P2019-50832A)
(43)公開日　平成31年4月4日(2019.4.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B064
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C084
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4H045
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 150 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-205 (P2019-205)
(22)出願日　平成31年1月4日 (2019.1.4)
(62)分割の表示　特願2017-89783 (P2017-89783)の分割
原出願日　平成25年4月17日 (2013.4.17)
(31)優先権主張番号　61/625,628
(32)優先日　平成24年4月17日 (2012.4.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(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
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脳卒中および虚血または虚血状態において使用するためのヒト抗体およびその特異的結合配列