(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-527317
(P2011-527317A)
(43)公表日　平成23年10月27日(2011.10.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C084
A61K 45/06	(2006.01)	A61K	45/06		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4C086
A61K 31/428	(2006.01)	A61K	31/428		4H045
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-517170 (P2011-517170)
(86)(22)出願日　平成21年7月10日 (2009.7.10)
(85)翻訳文提出日　平成23年2月2日 (2011.2.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP2009/058832
(87)国際公開番号　WO2010/004031
(87)国際公開日　平成22年1月14日 (2010.1.14)
(31)優先権主張番号　61/079,874
(32)優先日　平成20年7月11日 (2008.7.11)
(33)優先権主張国　米国 (US)

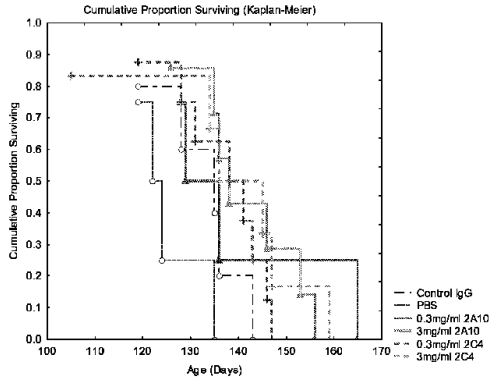
(71)出願人　397009934
グラクソ　グループ　リミテッド
ＧＬＡＸＯ　ＧＲＯＵＰ　ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス　ミドルセックス　ユービー６　０エヌエヌ　グリーンフォード　バークレー　アベニュー　グラクソ　ウェルカム　ハウス　（番地なし）
Ｇｌａｘｏ　Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｈｏｕｓｅ，Ｂｅｒｋｅｌｅｙ　Ａｖｅｎｕｅ　Ｇｒｅｅｎｆｏｒｄ，Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ　ＵＢ６　ＯＮＮ，Ｇｒｅａｔ　Ｂｒｉｔａｉｎ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＮＯＧＯ－Ａアンタゴニストによる筋萎縮性側索硬化症の治療

(57)【要約】
本発明は、その必要がある患者に治療上有効量のＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを投与するステップを含む、筋萎縮性側索硬化症の治療または予防方法に関する。
【選択図】図１

Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
その必要がある患者に治療上有効量のＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを投与するステップを含む、筋萎縮性側索硬化症の治療または予防方法。
【請求項２】
治療上有効量の抗グルタミン酸活性を有する少なくとも１種の化合物を前記患者に投与するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記抗グルタミン酸活性を有する少なくとも１種の化合物がリルゾールである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストが抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストがヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記Ｎｏｇｏ－Ａ抗体がＨ２０Ｌ１６、Ｈ２８Ｌ１６、Ｈ２８Ｌ１３およびＨ２７Ｌ１６のうちの１種である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記Ｎｏｇｏ－Ａ抗体がＨ２８Ｌ１６（配列番号２および配列番号４）である、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストおよびリルゾールを前記患者に共投与する、請求項３～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
１日約５０ｍｇ～約１５０ｍｇのリルゾールを前記患者に投与する、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
１日１００ｍｇのリルゾールを前記患者に投与する、請求項８または９に記載の方法。
【請求項１１】
リルゾールを経口投与する、請求項８～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
約２ｍｇ／ｋｇ～４０ｍｇ／ｋｇのＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを前記患者に投与する、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを前記患者に静脈内投与する、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを１週間に１回、前記患者に投与する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを２週間に１回、前記患者に投与する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを４週間に１回、前記患者に投与する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記患者が、ＡＬＳの治療または予防でのリルゾールの使用に応答しなかったか、または不十分な応答を示したことがある、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１８】
筋萎縮性側索硬化症の治療または予防での使用のためのＮｏｇｏ－Ａアンタゴニスト。
【請求項１９】
患者に、抗グルタミン酸活性を有する化合物と共投与される、請求項１８に記載のＮｏｇｏ－Ａアンタゴニスト。
【請求項２０】
筋萎縮性側索硬化症の治療または予防のための医薬の製造における、Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストの使用。
【請求項２１】
筋萎縮性側索硬化症の治療または予防のために、前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを、抗グルタミン酸活性を有する化合物と共投与する、請求項２０に記載の使用。
【請求項２２】
少なくとも１種のＮｏｇｏ－Ａ抗体を含む医薬組成物。
【請求項２３】
前記Ｎｏｇｏ－Ａ抗体が、Ｈ２８Ｌ１６（配列番号２および配列番号４）、Ｈ２８Ｌ１３（配列番号２および配列番号３）およびＨ２７Ｌ１６（配列番号１および配列番号４）である、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項２４】
抗グルタミン酸活性を有する少なくとも１種の化合物をさらに含む、請求項２２または２３に記載の医薬組成物。
【請求項２５】
少なくとも１種の抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体および抗グルタミン酸活性を有する少なくとも１種の化合物を含むキット（kit-of-parts）。
【請求項２６】
前記抗グルタミン酸活性を有する化合物がリルゾールである、請求項２４に記載の医薬組成物または請求項２５に記載のキット。
【請求項２７】
前記Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストおよび抗グルタミン酸活性を有する少なくとも１種の化合物が、前記患者に共投与したときに相乗効果を有する、請求項２～１７のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、筋萎縮性側索硬化症および他の神経変性疾患の治療または予防に関する。さらに具体的には、本発明は、筋萎縮性側索硬化症の治療または予防での抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
ルー・ゲッリック病またはシャルコー病（Maladie de Charcot）としても知られる筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）は、最も一般的な成人発症型運動ニューロン疾患である。原疾患の特徴は皮質脊髄路の上位および下位運動ニューロンの進行性変性である。（脳幹および脊髄の）下位運動ニューロンの機能障害は、全身衰弱、筋肉萎縮症および麻痺を引き起こす。呼吸筋の不全が一般に致死的イベントであり、発症の１～５年以内に生じる。
【０００３】
ＡＬＳは成人の最も一般的な運動ニューロン疾患であり、毎年、米国の約３０，０００人および英国の約５，０００人が罹患している（Leigh & Swash, 1991）。典型的な発症年齢は５０～７０歳の範囲であるが、より若い年齢で発症することもある。ほとんどの症例（９０～９５％）は散発性ＡＬＳ（ｓＡＬＳ）として分類され、残りは遺伝的であり、家族性ＡＬＳ（ｆＡＬＳ）と称される。散発性および家族性型は臨床的かつ病理学的に類似であり、共通の病原が示唆される（Bruijn et al, 2004）。しかし、ほとんどの症例の

正確な原因は依然として未知であり、該疾患の過程を停止させるための有効な治療法は存在しない。ＡＬＳの治療および予防は、依然として、重大な、満たされていない医療上の必要性である。

【発明の概要】

【０００４】

発明の要旨

本発明は、その必要がある患者に治療上有効量のＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを投与するステップを含む、ＡＬＳの治療または予防方法を提供する。

【０００５】

Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストは、マウス抗体２Ａ１０および２Ｃ４（ＷＯ２００５０１６５４４（該文献の内容は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）に記載されている）などの中和抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体またはその断片であってよい。典型的に抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体は、２Ａ１０のヒト化変異体、例えばＨ２０Ｌ１６、Ｈ２８Ｌ１６、Ｈ２８Ｌ１３およびＨ２７Ｌ１６（ＷＯ２００７／０６８７５０（該文献の内容は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）に記載されている）などのヒト化抗体、ヒト抗体、またはその断片である。好ましくは、抗体はＨ２８Ｌ１６である。２Ａ１０の重鎖および軽鎖可変領域のヒト化構築物のアミノ酸配列は本明細書中で配列番号１１～１５として示される。２Ａ１０の完全長重鎖および軽鎖ヒト化変異体は配列番号１～４として示される。

【０００６】

抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体はＷＯ２００４／０５２９３２（該文献の内容は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）に記載の任意の抗体であってよい。ＷＯ２００４／０５２９３２で開示されている抗体の例は１１Ｃ７であり、そのヒト化変異体を含む。１１Ｃ７の可変領域の配列は配列番号１６および１７に示される。ヒト抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体はＷＯ２００５／０２８５０８およびＷＯ２００９／０５６５０９（該文献の内容は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）にも開示されている。ＷＯ２００９／０５６５０９で開示されている具体的な抗体には、配列番号１８および１９に示される可変領域を有するヒト抗体６Ａ３が含まれる。

【０００７】

Ｎｏｇｏ－Ａ抗体は、配列番号１または２の重鎖、および配列番号３または４の軽鎖を含んでよい。一実施形態では、Ｎｏｇｏ－Ａ抗体またはその断片は、２Ａ１０、Ｈ２８Ｌ１６または６Ａ３の１個以上、場合により６個のＣＤＲを含む。一実施形態では、Ｎｏｇｏ－Ａ抗体またはその断片は、Ｈ２８Ｌ１６と同じヒトＮｏｇｏ－Ａエピトープ（ＶＬＰＤＩＶＭＥＡＰＬＮ（配列番号６）を含むヒトＮｏｇｏ－Ａ　６１０－６２１ａａ）と結合するかまたはＨ２８Ｌ１６とヒトＮｏｇｏ－Ａとの結合と競合する抗体である。

【０００８】

ヒトＮｏｇｏ－Ａは、以下の配列番号１０に記載のアミノ酸配列によって説明することができる。

【０００９】

一実施形態では、Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを、抗グルタミン酸活性を有する化合物とともに投与する。特定の実施形態では、抗グルタミン酸活性を有する化合物はリルゾールである。別の実施形態では、抗グルタミン酸活性を有する化合物は、２，３－ベンゾジアゼピン化合物、特に、タランパネル（talampanel）などのＡＭＰＡ受容体のアンタゴニストである。別の実施形態では、抗グルタミン酸活性を有する化合物はＴＲＯ１９６２２またはセフトリアキソンである。Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストおよび抗グルタミン酸活性を有する化合物は、同時に、連続してまたは別々に、患者に投与することができる。抗グルタミン酸活性を有する化合物がリルゾールである場合、約５０ｍｇ～約１５０または２００ｍｇのリルゾールを毎日患者に投与することができ、典型的に１００ｍｇのリルゾールを毎日患者に投与する。リルゾールは典型的には経口投与される。抗グルタミン酸活性を有する化合物がタランパネルである場合、約１０ｍｇ～約２５０ｍｇのタランパネルを

１日あたり１～５回、典型的には経口で投与する。一実施形態では、タランパネルを、２５ｍｇまたは５０ｍｇの用量で、１日あたり１～５回、場合により１日あたり３回、投与する。

【００１０】

Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを、０．１ｍｇ／ｋｇ～３００ｍｇ／ｋｇの量で投与することができる。通常、約２ｍｇ／ｋｇ～約４０ｍｇ／ｋｇのＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを典型的に静脈内経路によって患者に投与する。一実施形態では、Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストを皮下投与する。Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストは、一般に、１週間に１回、２週間に１回、または４週間に１回、患者に投与する。

【００１１】

別の実施形態では、本発明は、抗グルタミン酸活性を有する化合物での治療に不十分な応答を示したか、または該治療に不応性である被験体のＡＬＳの治療または予防方法を提供する。抗グルタミン酸活性を有する化合物は典型的にリルゾールである。

【００１２】

別の実施形態では、本発明は、ＡＬＳの治療または予防のためのＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを提供する。

【００１３】

別の実施形態では、本発明は、ＡＬＳの治療または予防のための医薬の製造におけるＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストの使用を提供する。本発明はまた、少なくとも１種のＮｏｇｏ－Ａ抗体を含む医薬組成物、および少なくとも１種のＮｏｇｏ－Ａ抗体および本発明の少なくとも１種の疾患の治療での該抗体の使用のための使用説明書を含むキット（ｋｉｔ ｏｆ ｐａｒｔｓ）（該疾患はＡＬＳまたはＭＳであり、該使用説明書はＮｏｇｏ－Ａ抗体を抗グルタミン酸活性を有する化合物と共投与するための指示を含んでよい）を提供する。Ｎｏｇｏ－Ａ抗体は、Ｈ２８Ｌ１６（配列番号２および配列番号４）、Ｈ２８Ｌ１３（配列番号２および配列番号３）およびＨ２７Ｌ１６（配列番号１および配列番号４）からなる群より選択される。本発明はまた、少なくとも１種のＮｏｇｏ－Ａ抗体および抗グルタミン酸活性を有する少なくとも１種の化合物を含む医薬組成物を提供する。一部の例では、抗グルタミン酸活性を有する化合物はリルゾールである。

【００１４】

さらに、本明細書中に含まれる知見は、Ｎｏｇｏ－Ａ拮抗作用が、Ｎｏｇｏ－Ａが筋肉生検でアップレギュレーションされることが示されている他の筋肉疾患での治療目的にもかなうことを示唆する。そのような疾患には、非限定的に、封入体筋炎（ＩＢＭ）、多発性筋炎、皮膚筋炎、形態学的に特定されていない筋障害（Ｗｏｊｃｉｋ ｅｔ ａｌ (2007) Ａｃｔａ Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ 114(5) 517-526）および、さらに、心不全、特にうっ血性心不全を含む心筋疾患（ＴＡ Ｂｕｌｌａｒｄ, 2007）が含まれる。実際、本明細書中の知見は、Ｎｏｇｏ－Ａ拮抗作用の使用が、除神経によって引き起こされるかまたは除神経と関連するすべての筋肉疾患におよぶことを示唆する。

【００１５】

全身性抗Ｎｏｇｏ－Ａ治療がＣＮＳでの顕著な神経保護を生じさせる能力は、さらに、アルツハイマー病、パーキンソン病、卒中、多発性硬化症、神経因性疼痛および、Ｎｏｇｏ－Ａ発現のアップレギュレーションまたは再生もしくはニューロン生存のＮｏｇｏ－Ａ媒介性阻害が関与する他の疾患を非限定的に含む広範囲の神経系疾患でのその治療的使用と合致する。

【００１６】

したがって、別の実施形態では、本発明は、その必要がある患者に治療上有効量のＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストを投与するステップを含む、封入体筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、形態学的に特定されていない筋障害および（うっ血性）心不全を含む筋肉疾患、またはアルツハイマー病、パーキンソン病、卒中、多発性硬化症、神経因性疼痛を含む神経系疾患および障害などの、Ｎｏｇｏ－Ａ発現がアップレギュレーションされている疾患の治療または予防方法を提供する。Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストは、Ｈ２８Ｌ１６（配列番号２

および配列番号４）または６Ａ３（配列番号１８および配列番号１９に記載の可変重鎖および軽鎖を有する）などの抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体であってよい。

【００１７】

グルタミン酸拮抗作用も多発性硬化症の治療のために提唱されている（Killestein et al. J. Neurol. Sci. 15 June 2005, Pages 113-115）。したがって、別の実施形態では、本発明は、その必要がある患者に治療上有効量のＮｏｇｏ－Ａアンタゴニストおよび抗グルタミン酸活性を有する化合物を投与するステップを含む、多発性硬化症、特に原発性進行性ＭＳの治療または予防方法を提供する。Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストは、Ｈ２８Ｌ１６（配列番号２および配列番号４）または６Ａ３（配列番号１８および配列番号１９に記載の可変重鎖および軽鎖を有する）などの抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体であってよい。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】図１は、０．３および３ｍｇ／ｍＬの２Ａ１０、３ｍｇ／ｍＬの対照ＩｇＧまたはＰＢＳでの治療後の累積生存率を示す図である。３ｍｇ／ｍＬの２Ａ１０は、ＰＢＳと比較して１６．４日間、死亡日齢を有意に増加させる（９５％ ＣＩ ０．３～３２．６日）。Ｐ＜０．０５、一元配置ＡＮＯＶＡ後のＬＳＤ検定。

【図２】図２は、０．３および３ｍｇ／ｍＬの２Ａ１０、３ｍｇ／ｍＬの対照ＩｇＧまたはＰＢＳでの治療後の累積無症候率を示す図である。０．３ｍｇ／ｍＬの２Ａ１０は、ＰＢＳと比較して１５．５日間、発症日齢を有意に増加させる（９５％ ＣＩ ２～２９日）。Ｐ＜０．０５、二元配置ＡＮＯＶＡ後のＬＳＤ検定。

【図３】図３は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスのＥＤＬ（長指伸（extensor digitorum longus））筋のＭＵＮＥ（運動単位数評価（motor unit number estimation））を示す図である。

【図４】図４は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウス集団のマウス脊髄の運動ニューロン数を示す図である。

【図５】図５は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスのＥＤＬ筋の最大強縮力（Maximal tetanic force）を示す図である。

【図６】図６は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスのＥＤＬ筋の最大単収縮（１回の電気的に誘発された単収縮下での最大力）を示す図である。

【図７】図７は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスの９０日の時点のＥＤＬ筋の重量を示す図である。

【図８】図８は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスで電気刺激後にＥＤＬ筋がピークの力の発生に達するためにかかる時間を示す図である。

【図９】図９は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスで刺激後にＥＤＬ筋が弛緩するためにかかる時間を示す図である。

【図１０】図１０は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスでの強縮刺激後のＴＡ（前脛骨）筋の最大強縮力を示す図である。

【図１１】図１１は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスのＴＡ筋の最大単収縮を示す図である。

【図１２】図１２は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスの９０日の時点のＴＡ筋の重量を示す図である。

【図１３】図１３は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスで電気刺激後にＴＡ筋がピークの力の発生に達するためにかかる時間を示す図である。

【図１４】図１４は、ビヒクルまたは抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスで刺激後にＴＡ筋が弛緩するためにかかる時間を示す図である。

【図１５】図１５は、ビヒクル（Ｂ－ＰＢＳ）、抗体（低用量［ＬＡ－３ｍｇ／ｋｇ］および高用量［ＨＡ－３０ｍｇ／ｋｇ］）、リルゾール（Ｒ－３０ｍｇ／ｋｇ）、または抗

体（低用量または高用量）＋リルゾール（ＬＡ＋ＲおよびＨＡ＋Ｒ）で処置されたＷＴおよびＳＯＤ１マウスのＥＤＬ筋のＭＵＮＥを示す図である。処置群は図１６～２０のそれぞれで同一であった。

【図１６】図１６はＴＡ筋の最大強縮力を示す図である。

【図１７】図１７はＴＡ筋の最大単収縮を示す図である。

【図１８】図１８はＴＡ筋重量を示す図である。

【図１９】図１９は、電気刺激後にＴＡ筋がピークの力の発生に達するためにかかる時間を示す図である。

【図２０】図２０は、刺激後にＴＡ筋が弛緩するためにかかる時間を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

発明の詳細な説明

ＡＬＳの原因またはきっかけは現在未知である。散発性ＡＬＳは公知の遺伝的要素を有しないが、ｆＡＬＳ症例の約２０％は、タンパク質Ｃｕ／Ｚｎスーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ１）中の優性遺伝する突然変異によって引き起こされる（Rosen et al. 1993, Nature. 1993; 362:59-62, Andersen 2004, Suppl Clin Neurophysiol. 2004; 57: 211-27）。突然変異型「ＳＯＤ１」マウスは、ＡＬＳの特徴をよく模倣する疾患を発症する。

【００２０】

ヒトＡＬＳに酷似する運動ニューロン疾患を誘発するために十分なレベルで突然変異型ＳＯＤ１（ｍＳＯＤ１）を遍在的に過剰発現するいくつかのマウス系統が作製されている（Gurney et al. 1994, Science 264, 1772-1775）。これらのマウスで観察される臨床徴候は、Gonzalez de Aguillar et al, 2007, Journal of Neurochemistry, 2007, 101, 1153-1160から得られるこの概要表にまとめられている。

【表１】

	筋力低下	筋萎縮	筋線維タイプスイッチング	ウィーラー変性（坐骨神経）	前根軸索数低下	運動ニューロン変性	ユビキチン染色	星状膠細胞増殖	ミクログリア増殖	上位運動ニューロン徴候	時期尚早の死亡	参考文献
突然変異型SOD1[a]	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	(Brujin et al. 2004)

【００２１】

これらの理由から、ｍＳＯＤ１マウス（特にＳＯＤ１^{G93A}）をＡＬＳの動物モデルとして研究する。

【００２２】

２つの重要なミエリンタンパク質、ミエリン関連糖タンパク質（ＭＡＧ）およびＮｏｇｏ－Ａがクローニングされ、神経突起伸長のインヒビターとして同定されている（Prinjha et al, Nature, 403: 383-384, 2000; GrandPre et al, 2000 Nature, 403:439-444）。Ｎｏｇｏ－Ａは、脊髄損傷後のラットの機能回復を促進することが以前の研究で示されている機能阻止抗体ＩＮ－１の抗原として元々同定された（Chen et al 2000, Nature, 403(6768):434-9）。いくつかの独立した実験室での後の研究により、脊髄損傷後の機能回復を増強する、抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体の形式でのＮｏｇｏ－Ａ中和、Ｎｏｇｏ－Ａ派生ペプチドでの活性ワクチン接種（Hauben et al 2001, Proc Natl Acad Sci USA, 98(26):15173-8）、およびマウスでのＮｏｇｏ－Ａ遺伝子欠失（Kim et al 2003, Neuron, 38(2):187-99; Simonen et al 2003, Neuron, 38(2):201-11）の能力が確認された。

【００２３】

本発明者らは、ここで、（抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体を使用する）Ｎｏｇｏ－Ａの薬理学的遮断がＳＯＤ１トランスジェニックマウスの疾患の徴候を減弱することを示した。この知見は、Ｎｏｇｏ－Ａの遮断がヒト患者のＡＬＳの治療または予防を導くことを示唆する。

【００２４】

発明者ら自身の研究および他者の研究で、ＳＯＤ１トランスジェニックマウスおよびＡ

ＬＳ患者の脊髄および罹患した筋肉でＮｏｇｏ－Ａがアップレギュレーションされることが示されたが、このことの機能的重要性は不明のままであり、重大な論争の対象のままである。Jokic et al（EMBO Reports, 2006:7(11), 1162-1167）は、後に、ＳＯＤ１トランスジェニックマウスとＮｏｇｏ－Ａ欠損マウスとの遺伝的交雑により、疾患発症の小さいが有意な遅延、マウス生存の改善および運動ニューロン数の増加が生じたことを示した。しかし、いくつかの重要な問題が未解答のままであった。該問題には、前記利益が、発生の間のＮｏｇｏ－Ａの喪失に応じたものであるかどうか、または実際には、前記マウスでアップレギュレートされることが知られかつＡＬＳで変化することも知られている（Simonen et al (2003) Neuron 38 201-211; DuPuis et al (2002) Neurobiol Dis 10 359-365）Ｎｏｇｏ－ＢおよびＮｏｇｏ－Ｃの任意の代償性変化に応じたものであるかどうかが含まれる。

【００２５】

本発明者らは、ここで、ＳＯＤ１トランスジェニックマウスを抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体で治療すると、有意に遅延した疾患発症、死亡時期、改善した筋肉生理学および運動ニューロン生存が生じることを予想外に見出した。さらに、その非常に異なる作用様式にもかかわらず、本発明者らは、筋肉機能のいくつかの測定において、抗Ｎｏｇｏ－Ａおよび抗グルタミン酸作動性化合物リルゾールの相加効果、さらには相乗効果の証拠が存在することを予想外に見出した。

【００２６】

３つの型のヒトＮＯＧＯ：１１９２アミノ酸残基を有するＮＯＧＯ－Ａ（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＪ２５１３８３、配列番号１０）；推定細胞外ドメイン中の残基１８６－１００４を欠くスプライス変異体であるＮＯＧＯ－Ｂ（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＪ２５１３８４）および、やはり残基１８６－１００４を欠き、小さい代替のアミノ末端ドメインを有する短いスプライス変異体であるＮＯＧＯ－Ｃ（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＪ２５１３８５）が同定されている（Prinjha et al（2000）上掲）。Ｎｏｇｏ－Ａは神経突起伸長の強力なインヒビターである。

【００２７】

本明細書中で使用される「Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニスト」とは、Ｎｏｇｏ－Ａによって直接または間接的に誘発される任意の経路を阻害、遮断、減弱、または妨害する任意の化合物を表す。ゆえに、用語「アンタゴニスト」は、非限定的に、Ｎｏｇｏ－Ａの影響を中和する分子を含むものとする。

【００２８】

本明細書中で使用される「Ｎｏｇｏ－Ａ抗体」は、Ｎｏｇｏ－Ａに結合可能な任意の抗体または、抗体断片、ドメイン抗体または単鎖抗体を非限定的に含むその変異体型を表す。Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストは、中和抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体などの抗体アンタゴニストであってよい。Ｎｏｇｏ－Ａ抗体は、マウス、キメラ、ヒト化、または完全ヒト抗体またはそれらの断片であってよい。

【００２９】

本明細書中で使用される「抗体アンタゴニスト」とは、Ｎｏｇｏ－Ａ経路などの所定の経路、酵素、受容体またはリガンドの活性を低減可能な任意の抗体または、抗体断片、ドメイン抗体もしくは単鎖抗体を非限定的に含むその変異体型を表す。抗体アンタゴニストには、慣用の免疫グロブリン形式（ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭ）の抗体、およびさらにその断片または、ヒトＮｏｇｏ－Ａに結合する任意の他の「抗体様」形式（例えば、単鎖Ｆｖ、Ｆｃ、Ｆｄ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、ダイアボディ（diabodies）、Ｔａｎｄａｂｓ^{TM}、ドメイン抗体（ｄＡｂ）など（代替の「抗体」形式の概要に関しては、Holliger and Hudson, Nature Biotechnology, 2005, Vol 23, No. 9, 1126-1136を参照のこと））が含まれる。用語Ｆｖ、Ｆｃ、Ｆｄ、Ｆａｂ、またはＦ（ａｂ）$_2$は、その標準的意義で使用される（例えばHarlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)を参照のこと）。

【００３０】

「中和」およびその文法上のバリエーションは、任意のＮＯＧＯ機能の全体的または部分的な阻害を表す。

【００３１】

本明細書中で使用される「ＮＯＧＯ機能」とは、任意のＮＯＧＯ経路の誘発、ニューロンとの結合および神経突起伸長の阻害を非限定的に含む、Ｎｏｇｏタンパク質によって誘発される任意の生物学的活性を表す。

【００３２】

本明細書中で使用される「治療」とは、筋萎縮性側索硬化症に関連しかつ／または筋萎縮性側索硬化症の原因である疾患症状の低減または排除を表し、それには、皮質脊髄路でのニューロンの進行性変性、筋線維の除神経、および／または筋力低下および／または痙縮性の低減または排除が含まれる。

【００３３】

本明細書中で使用される「予防」とは、筋萎縮性側索硬化症に関連する疾患症状の遅延、防止または最小化を表し、それには、皮質脊髄路でのニューロンの進行性変性、筋線維の除神経、および／または筋力低下および／または痙縮性の遅延、防止または最小化が含まれる。

【００３４】

「抗グルタミン酸活性」とは、グルタミン酸受容体の生物学的活性の低減を含む、グルタミン酸受容体によって誘発される任意の生物学的活性を部分的または完全に阻害する、化合物の能力を表す。抗グルタミン酸活性を有する化合物は抗グルタミン酸作動性化合物としても知られる。したがって、抗グルタミン酸活性を有する化合物は、とりわけ、グルタミン酸受容体アンタゴニストまたはシナプス前末端からのグルタミン酸放出のアンタゴニストであってよい。

【００３５】

グルタミン酸はＣＮＳの主要な興奮性神経伝達物質である。過剰のグルタミン酸はグルタミン酸受容体を過剰刺激し、ニューロンの変性を導く。この細胞メカニズムは興奮毒性として知られ（Leigh et al., Neurology (1996) 47:S221-S227）、Ca^{2+}透過性の増加およびグルタミン酸受容体の脱感作の遅延に主に起因すると考えられる。異常なグルタミン酸放出はいくつかの神経病理学的状態にかかわり、グルタミン酸レベルの広範囲の変化がＡＬＳ患者のＣＮＳで観察されている。

【００３６】

グルタミン酸受容体は、その構造、機能および薬理学に基づいて、イオンチャネル型および代謝調節型グルタミン酸受容体に分類される。ニューロンへのカチオン流動を許容するイオンチャネルであるイオンチャネル型グルタミン酸受容体は、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）サブタイプ、α－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチルイソオキサゾール－４－プロピオン酸（ＡＭＰＡ）サブタイプ、カイニン酸（ＫＡ）サブタイプおよびδサブタイプに細分される（δ２グルタミン酸様受容体は他のイオンチャネル型グルタミン酸受容体と類似のコンフォメーション変化を受ける（MacLean, J Neurosci. 2009 29(21):6767-8））。運動ニューロンのグルタミン酸受容体の集団は他の細胞型と異なり；ほとんどのニューロンでは、ＮＭＤＡサブタイプがグルタミン酸細胞傷害性を主に媒介し；運動ニューロンでは、ＡＭＰＡ／カイニン酸（kainite）サブクラスがより重要である可能性がある。

【００３７】

リルゾール（Rilutek（登録商標）、２－アミノ－６－（トリフルオロメトキシ）ベンゾチアゾール；６－トリフルオロメトキシ－２－アミノベンゾチアゾール；６－（トリフルオロメトキシ）－１，３－ベンゾチアゾール－２－アミン、ＣＡＳ登録番号１７４４－２２－５）はシナプス前末端からのグルタミン酸放出を阻害し、脳損傷の動物モデルで興奮毒性損傷に対する神経保護効果を示している（Wahl et al. Eur. J. Pharmacol. (1993), 230:209-214）。リルゾールの正確なメカニズムは未知であるが、イオンチャネル型グルタミン酸受容体系に対する複数の効果を有すると考えられ、該効果には、シナプス間隙

へのグルタミン酸のＧタンパク質依存的放出の阻害（Kwon et al, Anesth Analg (1998) 86:128-133）；Ｎ－メチル－ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）チャネル活性の低減を生じさせる、グリシンの放出の低減（Umemiya and Berger, Br J Pharmacol (1995) 116:3227-3230）；シナプス後ＡＭＰＡ受容体の感度の減弱（Centonze et al, Neuropharmacology (1998) 37:1063-1070）；Na^+のα－サブユニットの不活性化状態の延長（Herbert et al, Mol Pharmacol (1994) 45:1055-1060およびStutzmann at al.. Eur J Pharmacol (1991) 193:223-229）、ＮＭＤＡ媒介性興奮の減弱（Kretschmer et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (1998) 358:181-190）；活性型Ｇタンパク質によるCa^{2+}動員の妨害（Kretschmer et al. 上記）、およびグルタミン酸作動性受容体のシナプス後応答の間接的な遮断（Yoshida et al., Epilepsy Res (2001) 46:101-109）が含まれる。

【００３８】

タランパネル（［（Ｒ）－７－アセチル－５－（４－アミノフェニル）－８，９－ジヒドロ－８－メチル－７Ｈ－１，３－ジオキソロ［４，５－ｈ］［２，３］ベンゾジアゼピン］、ＣＡＳ登録番号１６１８３２－６５－１）はＡＭＰＡ受容体の負のアロステリックモジュレーターである。２，３－ベンゾジアゼピンは、カイニン酸（kainite）またはＡＭＰＡに曝露されたニューロン培養物において神経保護性であることが示されている（Szenasi and Harsing Jr., Drug Discovery Today (2004) 69-76）。

【００３９】

追加の抗グルタミン酸作動性化合物には、非限定的に、ＴＲＯ１９６２２（コレスト－４－エン－３－オン、オキシム）；ＯＮＯ－２５０６（Ｃｅｒｅａｃｔ™、アルンド酸、（Ｒ）－（－）－２－プロピルオクタン酸）；メマンチン（Ｎａｍｅｎｄａ™、１－アミノ－３，５－ジメチル－アダマンタン）、セフトリアキソン（５－チア－１－アザビシクロ［４．２．０］オクター２－エン－２－カルボン酸、７－［［（２－アミノ－４－チアゾリル）（メトキシイミノ）アセチル］アミノ］－８－オキソ－３－［［（１，２，５，６－テトラヒドロ－２－メチル－５－，６－ジオキソ－１，２，４－トリアジン－３－イル）チオ］メチル］－，二ナトリウム塩，［６Ｒ－［６ａ，７ｂ（Ｚ）］］－，水和物，（２：７））、ＮＢＱＸ（１，２，３，４－テトラヒドロ－６－ニトロ－２，３－ジオキソ－ベンゾ［ｆ］キノキサリン－７－スルホンアミド）およびＮＡＡＬＡＤアーゼインヒビター、例えばＧＰＩ－１６０６２（Guilford Pharmaceuticals）が含まれる。

【００４０】

リルゾールなどの抗グルタミン酸活性を有する化合物での治療に「不応性」とは、該化合物での以前または現在の治療に対する不十分なまたは維持できない応答を表す。したがって、例えば、リルゾールでの治療に不応性である被験体には、該治療に以前に応答したが、もはや、該治療に同程度には応答しない被験体が含まれる。不応性被験体には、その疾病がその以前の状態に戻り、明らかな回復または部分的回復後に疾患症状が再発する、被験体が含まれる。

【００４１】

リルゾール治療に不十分な応答を有する患者は、典型的に、重度でかつ／または長く続く疾患を有する。「不十分な応答」は治療の不十分な効力に起因する。特定の治療に対する不十分な応答は、１種以上の臨床マーカーを研究することによって確立され、該マーカーは該疾患または障害に関連し、当業者に公知である。したがって、不十分な応答は、ＡＬＳの治療に熟練した臨床家が決定することができる。

【００４２】

本明細書中で使用される「共投与」または「共投与する」とは、２種以上の化合物を同じ患者に投与することを表す。そのような化合物の共投与は同時またはほぼ同時（例えば同時間内）であるか、またはお互いの数時間以内または数日以内であってよい。例えば、第１の化合物を１週間に１回投与し、第２の化合物を１日に１回共投与する。典型的に、第１および第２の化合物の両者（または共投与される化合物のすべて）がその生物学的効果を同時に発揮する期間が存在する。

【００４３】

ＮＯＧＯと結合するモノクローナル抗体は、とりわけ、ＷＯ０４／０５２９３２、ＷＯ２００５／０２８５０８、ＷＯ２００５／０６１５４４およびＷＯ２００７／０６８７５０（該文献の内容はその全体が本明細書中に組み入れられる）に記載されている。ＷＯ２００５／０６１５４４はマウス抗Ｎｏｇｏ－Ａモノクローナル抗体２Ａ１０、１５Ｃ３および２Ｃ４を開示し、ＮＯＧＯ－Ａ５６の神経突起伸長阻害活性を遮断する、これらの抗体の能力を示すデータを提供する。ＷＯ２００７／０６８７５０は、Ｈ２８Ｌ１６、Ｈ２８Ｌ１３およびＨ２７Ｌ１６を含む、高親和性でヒトＮＯＧＯと結合するヒト化抗体を開示し、これらのヒト化抗体が、神経突起伸長アッセイにおいて親抗体２Ａ１０に匹敵する活性を有することを示すデータを提供する。

【００４４】

「ヒト化抗体」とは、非ヒトドナー免疫グロブリン由来のそのＣＤＲを有し、分子の残りの免疫グロブリン由来の部分が１種（またはそれ以上）のヒト免疫グロブリン（群）由来である、操作された抗体のタイプを表す。さらに、フレームワーク支持残基（framework support residues）を、結合親和性を保存するように改変することができる（例えばQueen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を参照のこと）。好適なヒトアクセプター抗体は、慣用のデータベース、例えばＫＡＢＡＴ（登録商標）データベース、Ｌｏｓ　Ａｌａｍｏｓデータベース、およびＳｗｉｓｓ　Ｐｒｏｔｅｉｎデータベースから、ドナー抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に対する相同性によって選択されるものであってよい。ドナー抗体のフレームワーク領域に対する（アミノ酸に基づく）相同性によって特徴付けられるヒト抗体は、ドナーＣＤＲの挿入のための重鎖定常領域および／または重鎖可変フレームワーク領域を提供するために好適である。軽鎖定常または可変フレームワーク領域を提供可能な好適なアクセプター抗体を類似の様式で選択することができる。アクセプター抗体重鎖および軽鎖は同じアクセプター抗体由来である必要はないことに留意すべきである。先行技術は、そのようなヒト化抗体を生産するいくつかの方法を記載している。例えばＥＰ－Ａ－０２３９４００およびＥＰ－Ａ－０５４９５１を参照のこと。

【００４５】

用語「ドナー抗体」とは、その可変領域、ＣＤＲ、または他の機能的断片またはその類似性のアミノ酸配列をヒト化抗体に与え、それにより、ドナー抗体に特徴的な抗原特異性および中和活性を有するヒト化抗体を提供する、非ヒト抗体を表す。

【００４６】

用語「アクセプター抗体」とは、その重鎖および／または軽鎖フレームワーク領域および／またはその重鎖および／または軽鎖定常領域のアミノ酸配列をヒト化抗体に提供する、ドナー抗体と異種の抗体を表す。アクセプター抗体は、ヒトにおいて非免疫原性であれば、任意の哺乳動物由来であってよい。好ましくはアクセプター抗体はヒト抗体である。

【００４７】

あるいは、「ベニアリング（veneering）」の方法によってヒト化を達成してよい。特有のヒトおよびマウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域の統計解析により、露出残基の厳密なパターンがヒトおよびマウス抗体で異なり、最も特有の表面位置では、少数の異なる残基が強く優先されることが明らかになった（Padlan E.A. et al; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498およびPedersen J.T. et al (1994) J.Mol.Biol. 235; 959-973を参照のこと）。したがって、ヒト抗体で通常見出されるものと異なるそのフレームワーク領域中の露出残基を置換することによって非ヒトＦｖの免疫原性を低減することが可能である。タンパク質抗原性は表面到達性と相関するため、表面残基の置換は、マウス可変領域をヒト免疫系に「不可視に」するために十分である（Mark G.E. et al (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp105-134も参照のこと）。このヒト化手順は「ベニアリング」と称される。その理由は、抗体の表面のみを改変し、支持残基は元のままであるからである。さらなる代替アプローチはＷＯ０４／００６９５５に記載されている。

【００４８】

「ＣＤＲ」は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である、抗体の相補性決定領域のアミノ酸配列として定義される。例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照のこと。免疫グロブリンの可変部分に３つの重鎖および３つの軽鎖ＣＤＲ（またはＣＤＲ領域）が存在する。ゆえに、本明細書中で使用される「ＣＤＲ」とは、すべての３つの重鎖ＣＤＲ、またはすべての３つの軽鎖ＣＤＲ（または、適切な場合には、すべての重鎖およびすべての軽鎖ＣＤＲの両者）を表す。抗体の構造およびタンパク質フォールディングにより、他の残基が抗原結合領域の部分とみなされることになり、そうなることが当業者によって理解される。例えば、Chothia et al., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p877-883を参照のこと。

【００４９】

本発明の方法で特に有用な抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体には、Ｈ２８Ｌ１６（配列番号２および配列番号４）、Ｈ２８Ｌ１３（配列番号２および配列番号３）およびＨ２７Ｌ１６（配列番号１および配列番号４）が含まれる。完全長（ＦＬ）ＩｇＧ１重鎖配列Ｈ２７およびＨ２８は、それぞれ、以下の配列番号１および２として示される。

【００５０】

配列番号１：重鎖ヒト化構築物Ｈ２７

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQRP
GQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCELMQGY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【００５１】

配列番号２：重鎖ヒト化構築物Ｈ２８

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP
GQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCELMQGY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【００５２】

ＦＬ ＩｇＧ１軽鎖配列Ｌ１３およびＬ１６は、それぞれ、以下の配列番号３および４として示される。

【００５３】

配列番号３：軽鎖構築物Ｌ１３

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQR
PGQSPQLLIYLMSTRASGVPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAGDVGVYYCQQLVEYPLTFGQ
GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【００５４】

配列番号４：軽鎖構築物Ｌ１６

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPLSNPVTLGQPVSISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQR
PGQSPQLLIYLMSTRASGVPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVEYPLTFGQ
GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【００５５】
別の実施形態では、Ｎｏｇｏ－Ａアンタゴニストは、ＥＬＩＳＡアッセイにおいてＧＳＴ－ＮＯＧＯ－Ａ５６タンパク質（配列番号５）などのヒトＮｏｇｏ－Ａタンパク質またはその断片と結合可能な抗体、またはその断片であり、ＥＬＩＳＡアッセイでのヒトＮＯＧＯタンパク質またはその断片との該抗体またはその断片の結合は、以下の配列ＶＬＰＤＩＶＭＥＡＰＬＮ（配列番号６）（ヒトＮｏｇｏ　６１０－６２１ａａ）、またはＴＰＳＰＶＬＰＤＩＶＭＥＡＰＬＮ（配列番号７）またはＶＬＰＤＩＶＭＥＡＰＬＮＳＡＶＰ（配列番号８）を有するペプチドの存在下で減少し、無関係のペプチド、例えば、配列番号６とオーバーラップしない、ヒトＮｏｇｏ由来のペプチド（例えば配列番号９：ＹＥＳＩＫＨＥＰＥＮＰＰＰＹＥＥ）の存在下で減少しない。

【００５６】
配列番号５：ＧＳＴに融合されたヒトＮＯＧＯ Ａ（ＮＯＧＯ－Ａ５６）のアミノ酸５８６－７８５

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV
KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLP
EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQI
DKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFQGPLGSMQESLYPAAQLCPSFEESE
ATPSPVLPDIVMEAPLNSAVPSAGASVIQPSSSPLEASSVNYESIKHEPENPPPYEEAMSVSL
KKVSGIKEEIKEPENINAALQETEAPYISIACDLIKETKLSAEPAPDFSDYSEMAKVEQPVPDHS
ELVEDSSPDSEPVDLFSDDSIPDVPQKQDETVMLVKESLTETSFESMIEYENKELERPHRD

【００５７】
配列番号６：

VLPDIVMEAPLN

【００５８】
配列番号７：

TPSPVLPDIVMEAPLN

【００５９】
配列番号８：

VLPDIVMEAPLNSAVP

【００６０】
配列番号９：

YESIKHEPENPPPYEE

【００６１】
配列番号１０：ヒトＮｏｇｏ－Ａ

MEDLDQSPLVSSSDSPPRPQPAFKYQFVREPEDEEEEEEEEEEDEDEDLEELEVLERKPAA
GLSAAPVPTAPAAGAPLMDFGNDFVPPAPRGPLPAAPPVAPERQPSWDPSPVSSTVPAPSP
LSAAAVSPSKLPEDDEPPARPPPPPPASVSPQAEPVWTPPAPAPAAPPSTPAAPKRRGSSG
SVDETLFALPAASEPVIRSSAENMDLKEQPGNTISAGQEDFPSVLLETAASLPSLSPLSAASF
KEHEYLGNLSTVLPTEGTLQENVSEASKEVSEKAKTLLIDRDLTEFSELEYSEMGSSFSVSPK
AESAVIVANPREEIIVKNKDEEEKLVSNNILHNQQELPTALTKLVKEDEVVSSEKAKDSFNEKR
VAVEAPMREEYADFKPFERVWEVKDSKEDSDMLAAGGKIESNLESKVDKKCFADSLEQTNH
EKDSESSNDDTSFPSTPEGIKDRSGAYITCAPFNPAATESIATNIFPLLGDPTSENKTDEKKIE
EKKAQIVTEKNTSTKTSNPFLVAAQDSETDYVTTDNLTKVTEEVVANMPEGLTPDLVQEACE
SELNEVTGTKIAYETKMDLVQTSEVMQESLYPAAQLCPSFEESEATPSPVLPDIVMEAPLNSA
VPSAGASVIQPSSSPLEASSVNYESIKHEPENPPPYEEAMSVSLKKVSGIKEEIKEPENINAAL
QETEAPYISIACDLIKETKLSAEPAPDFSDYSEMAKVEQPVPDHSELVEDSSPDSEPVDLFSD
DSIPDVPQKQDETVMLVKESLTETSFESMIEYENKEKLSALPPEGGKPYLESFKLSLDNTKDT
LLPDEVSTLSKKEKIPLQMEELSTAVYSNDDLFISKEAQIRETETFSDSSPIEIIDEFPTLISSKTD
SFSKLAREYTDLEVSHKSEIANAPDGAGSLPCTELPHDLSLKNIQPKVEEKISFSDDFSKNGS
ATSKVLLLPPDVSALATQAEIESIVKPKVLVKEAEKKLPSDTEKEDRSPSAIFSAELSKTSVVDL
LYWRDIKKTGVVFGASLFLLLSLTVFSIVSVTAYIALALLSVTISFRIYKGVIQAIQKSDEGHPFR
AYLESEVAISEELVQKYSNSALGHVNCTIKELRRLFLVDDLVDSLKFAVLMWVFTYVGALFNG
LTLLILALISLFSVPVIYERHQAQIDHYLGLANKNVKDAMAKIQAKIPGLKRKAE

【００６２】

配列番号１１：２Ａ１０　ＶＨヒト化構築物Ｈ２０

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNINPSNGGTN
YNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCELGQGYWGQGTLVTVSS

【００６３】

配列番号１２：ＶＨヒト化構築物Ｈ２７

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNINPSNGGTN
YNEKFKSKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCELMQGYWGQGTLVTVSS

【００６４】

配列番号１３：ＶＨヒト化構築物Ｈ２８

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNINPSNGGTN
YNEKFKSKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCELMQGYWGQGTLVTVSS

【００６５】

配列番号１４：２Ａ１０　ＶＬヒト化構築物Ｌ１３

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPQLLIYLMSTRASG
VPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVEYPLTFGQGTKLEIK

【００６６】

配列番号１５：２Ａ１０　ＶＬヒト化構築物Ｌ１６

DIVMTQSPLSNPVTLGQPVSISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQRPGQSPQLLIYLMSTRASG
VPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVEYPLTFGQGTKLEIK

【００６７】

配列番号１６：リーダー配列を有する１１Ｃ７の重鎖の可変部分

MDFGLIFFIVGLLKGVQCEVKLLESGGLVQPGGSLKLSCVVSGFDFRRNWMSWVRQAPGKG
LEWIGEINPDSSKINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQVSTVRSEDTALYTCVRPVWMYAMDY
WGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG
VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS STWPSETVTCNVA

【００６８】

配列番号１７：リーダー配列を有する１１Ｃ７の軽鎖

MSPAQFLFLLVLWIRETSGDVLLTQTPLTLSITIGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLNWLLQRP
GQSPKRLIYLVSKLDSGVPDEFTGSGSGTDFTLKISRVEAGDLGLYYCWQGTHFPQTFGGG
TKLEIKRADAAPTVSIFPPSSGQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSW
DQDSKDSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRGEC

【００６９】

配列番号１８：リーダー配列を有する６Ａ３の重鎖の可変部分

MEFGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAP
GKGLEWVATIKQDGSQKNYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLRLNSLRAEDTAVYYCATELFDL
WGRGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
P

【００７０】

配列番号１９：リーダー配列を有する６Ａ３の軽鎖の可変部分

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【実施例】

【００７１】

以下の実施例は本発明を説明するが、本発明を限定するものではない。

【００７２】

実施例１　－　２Ａ１０および２Ｃ４でのｉｎ　ｖｉｖｏのＡＬＳモデル生存および発症研究

２Ａ１０が疾患進行を変化させる能力をＡＬＳのマウスモデル（Benatar 2007, Neurobiol Dis. 26(1):1-13で総説されている）において調べた。

【００７３】

図１および図２は、それぞれ、ＰＢＳおよび対照ＩｇＧ（３．０ｍｇ／ｍＬ）と比較した、２Ａ１０（０．３および３．０ｍｇ／ｍＬ、それぞれ３．０および３０ｍｇ／ｋｇに相当）での治療後のマウス累積生存率および累積無症候率を示す。この研究の結果は、３ｍｇ／ｍＬの２Ａ１０がＰＢＳと比較して１６．４日間、死亡日齢を有意に増加させること（９５％ ＣＩ ０．３～３２．６日、Ｐ＜０．０５）、および０．３ｍｇ／ｍＬの２Ａ１０がＰＢＳと比較して１５．５日間、発症日齢を有意に増加させること（９５％ ＣＩ ２～２９日、Ｐ＜０．０５）を示す。これらの結果は、別のエピトープと結合する別の抗ＮＯＧＯ－Ａモノクローナル抗体２Ｃ４（ＷＯ２００５／０６１５４４に開示されている）を使用して確認された。

【００７４】

したがって、抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体２Ａ１０は、ＡＬＳモデルにおいてマウスの生存を延長する。この結果は、特に２Ａ１０、および２Ａ１０の同じエピトープを共有する、Ｈ２８Ｌ１６（配列番号２および配列番号４）、Ｈ２８Ｌ１３（配列番号２および配列番号３）およびＨ２７Ｌ１６（配列番号１および配列番号４）などの２Ａ１０のヒト化変異体（および２Ａ１０と同じエピトープを共有する他の抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体）でのＮｏｇｏ－Ａの遮断は、特にＮｏｇｏ－Ａ遮断による治療がリルゾールによる治療と組み合わされた場合に、ヒトでのＡＬＳの治療または予防に有用であることを示唆する。

【００７５】

実施例２　－　２Ａ１０でのｉｎ　ｖｉｖｏ　ＡＬＳモデル筋肉生理学研究

９０日の時点でのビヒクル処置ＳＯＤ１マウスおよび野生型マウスと３０ｍｇ／ｋｇの抗Ｎｏｇｏ－Ａ　２Ａ１０処置マウスを比較するＳＯＤ１マウスでの追加の研究を実施し、いくつかの重要でかつ臨床的に関連するマウス筋肉生理学測定での著明な治療関連利益と合致するデータパッケージを得た。

【００７６】

材料および方法

元々Jackson Laboratories（Ben Harbor, ME, USA）から購入したヒトＣｕ／Ｚｎ－ＳＯＤ Ｇ９３Ａ突然変異体を過剰発現するトランスジェニックマウス（（Ｂ６ＳＪＬ－ＴｇＮ （ＳＯＤ１－Ｇ９３Ａ）１ Ｇｕｒ）をBiological Services, UCL IONで繁殖させ、維持した。Jackson Laboratoryによって推奨されるように、ＳＯＤ１^{G93A}ヘミ接合オスを野生型Ｆ１（ＳＪＬ×Ｃ５７ＢＬ／６）メス）と交配させた（ヘミ接合ＳＯＤ１^{G93A}メスは不妊性である）。本発明者らのコロニーでは、オスＳＯＤ１^{G93A}マウスは１２３日の平均寿命を有し、メスＳＯＤ１^{G93A}マウスは１３０日の平均寿命を有する。この研究では、メス動物のみを調べた。離乳齢でのポリメラーゼ連鎖反応によるマウス耳または尾ＤＮＡの増幅によってトランスジェニックＳＯＤ１^{G93A}マウスの遺伝子型を決定した。各動物に関して、研究の終了時に約３月齢で遺伝子型を確認した。

【００７７】

すべての実験は、Medical Research Council in Responsibility in the Use of Animals for Medical Research (1993)が発行する指針下で、UCL IONの倫理審査にしたがうUK Home Officeのライセンス下で実施した。

【００７８】

処置プロトコール： ＳＯＤ１^{G93A}マウスでの抗ＮｏｇｏＡ処置

動物をＳＯＤ１および野生型（ＷＴ）同腹子からなる４実験群に分けた。２つのＷＴ同腹子群（ｎ＝１０）は対照として働き、該群をビヒクル（ＰＢＳ：処置Ｂ）または３０ｍｇ／ｋｇの抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体（処置ＨＡ）で処置した。２つのＳＯＤ１マウス群（ｎ＝１０）をビヒクル（ＰＢＳ：処置Ｂ）または３０ｍｇ／ｋｇの抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体（処置ＨＡ）で処置した。ゆえに、以下の実験群が確立された：

群Ｉ： ビヒクル（ＰＢＳ）で処置されたＷＴ（ｎ＝１０）（処置Ｂ）

群ＩＩ： 抗Ｎｏｇｏ抗体（３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＷＴ（ｎ＝１０）（処置ＨＡ）

群ＩＩＩ： ビヒクル（ＰＢＳ）で処置されたＳＯＤ１（ｎ＝１０）（処置Ｂ）

群ＩＶ： 抗Ｎｏｇｏ抗体（３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＳＯＤ１（処置ＨＡ）。

【００７９】

抗ＮｏｇｏＡ抗体またはビヒクル（ＰＢＳ）を、１週間に１回、腹腔内注射によって投与し、該注射は７０日齢から開始し９０日齢までであった（３回の注射）。

【００８０】

疾患進行の評価

１． 行動および体重評価：

マウスを毎日観察し、１週間に２回体重測定した。握力検査を使用して運動能力を７０日齢から評価した。握力検査では、電子デジタルフォースゲージを用いて、プルバーに取り付けられた１０ｃｍ×８ｃｍワイヤーグリッド（Bioseb Instruments）を握る際に動物が加えた力のピーク量を測定することによって神経筋機能を評価した。マウスを、フォースゲージに連結された平らなワイヤーグリッド上に置き、前足および後足で固定した。マウスを尾の基部によって保持し、マウスがその握りを離すまでグリッドから穏やかに引き離し、離した時点でプルバー上のピーク張力を記録した。各検査日に各マウスで４回の測定の平均を決定した。本発明者らがしたがった、握力のStandard Operating Procedureについてのさらなる詳細は、以下のEumorphiaウェブサイト：http://www.eumorphia.org/EMPReSS/servlet/EMPReSS.Framesetに見出せる。

【００８１】

２． 筋力および運動単位数のｉｎ ｖｉｖｏ評価

（ｉ）最大力および運動単位生存性

各動物の前脛骨（ＴＡ）および長指伸（ＥＤＬ）筋の最大力を９０日齢の時点で評価した。動物を麻酔（４．５％抱水クロラール溶液、１ｍＬ／体重１００ｇ、ｉ．ｐ．；Sigma-Aldrich, Poole, UK）し、筋収縮の等尺性張力記録のために準備した（Kieran and Greensmith, 2004）。後肢ＴＡおよびＥＤＬ筋の遠位腱を露出させ、解剖して周囲組織を除

去し、切断した。坐骨神経を露出させて切断し、そのすべての分岐を切断して、ＴＡおよびＥＤＬ筋を神経支配する深腓骨神経から離した。動物の後肢をステンレス鋼のピンでテーブルに強固に固定し、ＴＡおよびＥＤＬ筋の遠位腱を等尺性力変換器（Dynamometer UF I Devices, Welwyn Garden City, UK）に糸で取り付けた。取り付け後、各筋肉の長さを最大単収縮張力が得られるように調節した。筋肉および神経をともに、生理食塩水で湿った状態に保ち、実験を室温で実施した。白金電極によって０．０２ｍｓの持続時間および過最大強度の矩形波パルスを使用してＴＡおよびＥＤＬに通じる神経を刺激することによって等尺性収縮を誘発した。２０、４０、および８０Ｈｚの周波数での一連の刺激によって収縮を誘発した。単収縮、最大強縮力、ピークまでの時間、および半弛緩時間（half-relaxation time）の値を測定した。

【００８２】

運動神経に漸増強度の刺激を加えて、運動性軸索の連続動員に起因する単収縮張力の段階的増加を生じさせることによって、両ＥＤＬ筋中の運動単位の数を評価した。

【００８３】

（ｉｉ）疲労試験

等尺性張力記録の終了時に、反復刺激の間の疲労に対するＥＤＬ筋の抵抗性を検査した。ＥＤＬ筋を４０Ｈｚで２５０ｍｓ、毎秒刺激し、収縮をペンレコーダー（Multitrace 2; Lectromed）で記録した。３分の刺激後の張力の減少を測定し、疲労指標（Ｆ．Ｉ．）を（初期強縮性張力－刺激後の強縮性張力）／初期強縮性張力）として算出した。１に接近するＦ．Ｉ．は筋肉が非常に疲れやすいことを示す。

【００８４】

３．　筋肉組織化学

各実験の終了時に、ＴＡおよびＥＤＬ筋を取り出し、重量測定し、液体窒素中で冷却されたイソペンタン中で瞬間凍結し、処理まで－８０℃で保存した。ＴＡ筋の連続切片（１０μｍ）をクリオスタットで作製し、コハク酸デヒドロゲナーゼ（ＳＤＨ）活性に関して染色して、以前（Kieran and Greensmith, 2004）に記載されているように筋線維の酸化能力を測定した。

【００８５】

４．　運動ニューロン生存性

４％パラホルムアルデヒド（４％ＰＦＡ）での噴門を横切る灌流（transcardial perfusion）後、脊髄の腰部を取り出し、４％ＰＦＡ中で６時間、後固定し（post-fixed）、３０％スクロースに最低８時間浸した。クリオスタットを使用して連続切片（２０μｍ）を作製し、ガロシアニン（gallocyanin）、ニッスル染色で染色した。脊髄のＬ２～Ｌ５レベルの範囲の３番目毎の切片の坐骨運動プール（ｎ＝６０）中のニッスル染色された運動ニューロンの数をカウントした。識別可能な核および核小体および明らかに特定可能なニッスル構造を有する大きな多角形ニューロンのみをカウントに含めた。

【００８６】

５．　顕微鏡観察

Leica HC PL Fluotar対物レンズ（１０×、２０×および４０×倍率）を使用する光学顕微鏡（Leica DMR）下で脊髄および筋肉切片を調べた。Nikon E995デジタルカメラを使用して画像を取り込み、該画像をAdobe Photoshop CSにダウンロードした。画像のコントラストを最適にするために、レベル調節操作を実施したが、他の画像操作は施さなかった。

【００８７】

６．　統計学

マン・ホイットニーＵ検定を使用して、群間の統計学的有意性を評価した。有意性をＰ＜０．０５で定めた。

【００８８】

結果

ｉ．　ＥＤＬ運動単位数評価

漸増強度での長指伸（ＥＤＬ）筋の電気刺激は連続的に大きな運動単位の活性化を誘発することができ、それぞれ特徴的なトレースを生じさせる。トレースの総和を使用して生存運動単位数の概算を得ることができる。ＳＯＤ１マウスでの疾患進行は運動単位トレースの有意でかつ進行性の減少を生じさせる。３０ｍｇ／ｋｇの抗Ｎｏｇｏ－Ａ ２Ａ１０での処置は運動単位数の有意な改善を生じさせた（ｐ値０．０４９４）。結果を図３に示す。

【００８９】

電気刺激アッセイで観察された運動単位数のこの改善が、図４に示される脊髄の運動ニューロン数の対応する改善と完全に相関することは非常に有望であるが、予想外であった（ＳＯＤ Ａ対ＳＯＤ Ｂ ｐ値０．００３）。疾患モデルにおける抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体の全身投与後の脊髄でのＣＮＳ神経保護活性のこの直接の証拠は、ＡＬＳ患者で類似の有益な活性が観察される可能性に関する強い理論的根拠を提供する。また、神経保護利益の早期検出にＭＵＮＥなどの臨床測定が有用であることを示唆する。

【００９０】

このデータパッケージは、上記の疾患などの、筋肉生検でＮｏｇｏ－Ａがアップレギュレートされることが示されているＡＬＳおよび他の筋肉疾患の治療での抗Ｎｏｇｏ－Ａ抗体の用途と合致する。ＣＮＳで顕著な神経保護を生じさせる全身性抗Ｎｏｇｏ－Ａ治療の能力は、さらに、上記のような広範囲の神経系疾患でのその治療的用途と合致する。

【００９１】

ｉｉ．　ＥＤＬ最大強縮力

ＥＤＬによって生成される最大強縮力は抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置によって部分的に改善した（図５）。

【００９２】

ｉｉｉ．　ＥＤＬ最大単収縮

１回の電気的に誘発された単収縮の間に生成された最大力を測定し、抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置群で有意に改善されることがわかった（ｐ値０．０１）。結果を図６に示す。

【００９３】

ｉｖ．　ＥＤＬ筋重量

ＳＯＤ１マウスでは、９０日の時点で筋重量の減少に対する大きな影響はなかったが、この群の抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置マウスでは、ＥＤＬ筋重量の有意な改善があった（ｐ値０．０２７６）。結果を図７に示す。

【００９４】

ｖ．　ＥＤＬのピークまでの時間

９０日の時点のＳＯＤ１マウスでの電気刺激後のピークの力の発生に達するためにかかる時間は、９０日の時点で小さいが有意な遅延を示し、該遅延は、抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置によって回復した（ｐ値０．０２３２）。結果を図８に示す。

【００９５】

ｖｉ．　ＥＤＬの１／２弛緩までの時間

刺激後にＥＤＬが弛緩するためにかかる時間は、ＳＯＤ１マウスで増加し、これは抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置によって有意に減少した（ｐ値０．０３１２）。結果を図９に示す。

【００９６】

ｖｉｉ．　ＴＡ最大強縮力

強縮刺激後にＴＡ筋によって生成された最大力はＳＯＤ１マウスで減少し、それは、治療に関連してＨＡ群で最大強縮力の増加へ向かう傾向を示す（図１０）。

【００９７】

ｖｉｉｉ．　ＴＡ最大単収縮

９０日の時点でＴＡ筋によって生成される最大力はＳＯＤ１マウスで有意に減少し、これは抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置によって有意に改善した（ｐ値０．０３１４）。結果を図１１に示す。

【００９８】

ｉｘ．　ＴＡ筋重量

ＴＡ筋の重量はＳＯＤ１マウスで９０日の時点でいくらかの減少を示し、抗Ｎｏｇｏ－Ａを用いた場合、治療に関連して改善に向かう傾向が存在するが、この段階ではこれは有意には達していなかった（ｐ値０．０５７８）。結果を図１２に示す。

【００９９】

ｘ．　ＴＡのピークまでの時間

この段階では、ピークの力の発生に達するための時間に関して、いずれの群間でも有意差は観察されなかった（図１３）。

【０１００】

ｘｉ．　ＴＡの１／２弛緩までの時間

これらの群ではこの段階でこの測定において有意差は観察されなかった（図１４）。

【０１０１】

実施例３　－　２Ａ１０およびリルゾールでのｉｎ　ｖｉｖｏ　ＡＬＳモデル筋肉生理学研究

メストランスジェニックＳＯＤ１^{G93A}マウス（実施例２のように選択）をＳＯＤ１および野生型（ＷＴ）同腹子からなる９実験群に分けた。３群のＷＴ同腹子（特に指定されない限りｎ＝１０）は対照として働き、該群をリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）、リルゾール単独（３０ｍｇ／ｋｇ）または抗ＮｏｇｏＡ抗体（２Ａ１０、ＷＯ２００５０６１５４４）単独（３０ｍｇ／ｋｇ）で処置した。

【０１０２】

６群のＳＯＤ１マウス（特に指定されない限りｎ＝１０）を２つの濃度（３ｍｇ／ｋｇまたは３０ｍｇ／ｋｇ）の抗ＮｏｇｏＡ抗体（２Ａ１０、ＷＯ２００５０６１５４４）単独で、またはリルゾール（３０ｍｇ／ｋｇ）と組み合わせて処置した：

群Ｉ：　ＰＢＳで処置されたＷＴ（ｎ＝５）

群ＩＩ：　リルゾール（１日あたり３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＷＴ

群ＩＩＩ：　抗Ｎｏｇｏ抗体（３０ｍｇ／ｋｇ）＋リルゾール（１日あたり３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＷＴ

群ＩＶ：　ＰＢＳで処置されたＳＯＤ１（ｎ＝５）

群Ｖ：　抗Ｎｏｇｏ抗体（３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＳＯＤ１

群ＶＩ：　抗Ｎｏｇｏ抗体（３ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＳＯＤ１（ｎ＝５）

群ＶＩＩ：　リルゾール（１日あたり３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＳＯＤ１

群ＶＩＩＩ：　抗Ｎｏｇｏ抗体（３０ｍｇ／ｋｇ）＋リルゾール（１日あたり３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＳＯＤ１

群ＩＸ：　抗Ｎｏｇｏ抗体（３ｍｇ／ｋｇ）＋リルゾール（１日あたり３０ｍｇ／ｋｇ）で処置されたＳＯＤ１。

【０１０３】

リルゾールは、６５日齢から９０日齢まで飲料水中で経口投与した。１日の水摂取５ｍＬに基づいて１日量を算出した。総消費量を測定して、新鮮な溶液を１週間に１回調製し、一定の１日量および１週間の用量を確保した。水摂取をモニターしたが、群間で差異はなく、５ｍＬの予測された範囲であった。

【０１０４】

抗ＮｏｇｏＡ抗体またはビヒクル（ＰＢＳ）を、１週間に１回、腹腔内注射によって投与し、該注射は７０日齢から開始し９０日齢までであった（３回の注射）。

【０１０５】

疾患進行を実施例２のように評価した。

【０１０６】

結果

リルゾール－抗Ｎｏｇｏ－Ａ　ＳＯＤ１研究は、９処置群にわたって多数のパラメータを調べることを目的にする大型研究であった。これは、通常より多数の同腹仔由来のマウスの使用を必要とした。そして、それは、有益でかつ相加的または相乗的治療効果を観察

するにあたっての追加のばらつきおよび感度の減少に寄与している。必要な群の総数を制限するために、本発明者らは、ＳＯＤ１マウスモデルでの公開されている効力（Waibel et al 1994）に基づいて３０ｍｇ／ｋｇ用量を選択することを決定し、これが高用量であることおよびそれが引き起こしうる無力症（asthesia）（筋力低下）などのリルゾール薬理学の一部の側面が、観察される組み合わせ治療効果を制限することに留意した。以後の研究では、本発明者らの現状の知見を拡張するために追加の低用量のリルゾールを調査することが可能であり、それは、１００ｍｇ／日までを一般に投与されるＡＬＳ患者で観察される考えられる曝露に、より密接に相関する用量である。高用量のリルゾールは患者での無力症を含む有害事象に関連し、これらは、医師が用量を大きく増やす能力を制限する可能性がある。したがって、ヒト治療で利用可能な低用量のリルゾールで、抗Ｎｏｇｏ－Ａ＋リルゾールまたは他のグルタミン酸調節物質の大きく増強された効力を観察するためのさらに重要な機会が存在することが妥当である。

【０１０７】

ｉ．　ＥＤＬ運動単位数評価

漸増強度での長指伸（ＥＤＬ）筋の電気刺激は、連続的に大きな運動単位の活性化を誘発することができ、それぞれ特徴的なトレースを生じさせる。トレースの総和を使用して生存運動単位数の概算を得ることができる。ＳＯＤ１マウスでの疾患進行は、運動単位トレースの有意でかつ進行性の減少を生じさせる。本発明者らの以前の研究では、本発明者らは、運動単位評価と脊髄の運動ニューロン数の直接カウントとの良好な相関を見出した。重要なことに、この運動単位数の決定は、ＭＵＮＥ（運動単位数概算）などの類似の臨床決定の良好な相関を意味する可能性が高い。この研究では、本発明者らは、２Ａ１０処置ＳＯＤ１マウスで運動単位数の有意でかつ用量依存的な増加を観察した（ＬＡ　３ｍｇ／ｋｇ、ＨＡ　３０ｍｇ／ｋｇ、７０日目から１週間に１回投与）。高用量の抗Ｎｏｇｏ－Ａ　２Ａ１０では、効果の大きさは高用量リルゾール（３０ｍｇ／ｋｇ、６５日目から飲料水中で投与）と匹敵した。結果を図１５に示す。

【０１０８】

リルゾールと２Ａ１０との組み合わせ効果の検出はこの試験では困難であった。使用された３０ｍｇ／ｋｇ用量のリルゾール単独、および２Ａ１０　ＨＡはともに、明らかに効果的であり、ＳＯＤ－Ｂビヒクル動物と統計学的に有意に異なったからである。

【０１０９】

ｉｉ．　ＴＡ最大強縮力

マウス前脛骨（ＴＡ）筋の反復強縮性電気刺激を使用して、この筋肉によって生成される最大力の尺度を得ることができる。ＳＯＤ１マウスでの疾患進行は有意かつ進行性の筋力低下を生じさせ、本明細書中で示されるように、それは９０日の時点で明らかにはっきりわかる（図１６）。そのような強度の測定は、ＡＬＳ患者で観察される強度の減退と直接かつ重要な相関を有する。興味深いことに、リルゾール単独（３０ｍｇ／ｋｇ）および抗Ｎｏｇｏ－Ａ単独３０ｍｇ／ｋｇはそれぞれ、ＳＯＤ１－Ｂビヒクル群と比較して統計学的有意性に達しない（それぞれｐ値０．０６０７および０．１２１９）が、２つの組み合わせは有意な改善を生じさせ（ｐ値０．０３９）、このことはリルゾールおよび抗Ｎｏｇｏ－Ａ処置の相乗効果を示す（この研究で使用された高用量のリルゾールにかかわらない）。

【０１１０】

ｉｉｉ．　ＴＡ最大単収縮

ＴＡ筋の１回の拍動性電気刺激を使用して、筋肉の単収縮の間に生成された力を測定することができる。やはり、最大強縮力の測定のように、ＳＯＤ１処置群でリルゾール（３０ｍｇ／ｋｇ）および高用量抗Ｎｏｇｏ－Ａ（３０ｍｇ／ｋｇ）の組み合わせのみがＳＯＤ１ビヒクル群と比較して統計学的有意性に達した（ｐ値０．０１９９）ことが興味深かった。このことは２つの処置の相加または相乗効果を示唆する。

【０１１１】

ｉｖ．　ＴＡ筋重量

ＳＯＤ１マウスでの疾患進行は筋重量の減少を伴い、該減少は、疾患の後期（＞１２０日）に非常に明らかであるが、本明細書中で示されるように９０日目を含む、より早期に検出することもできる。筋重量に対する遺伝子型の小さいが顕著な影響が存在したが、いずれの処置もビヒクルＳＯＤ１群と比較して有意性に達しなかった（図１８）。

【０１１２】

ｖ．　ＴＡのピークまでの時間

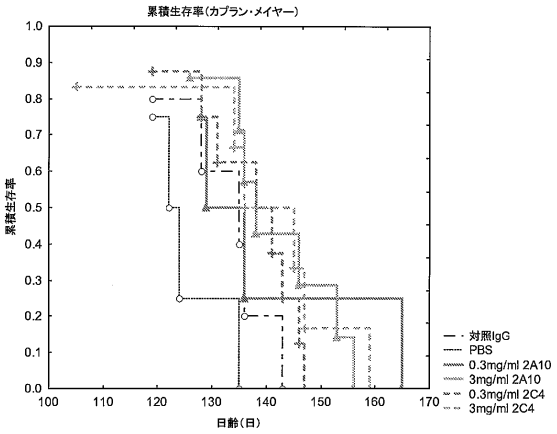
ＴＡ筋の電気刺激の間に、測定できるパラメータの１つは、力発生のピークに達するまでにかかる時間である。この測定の有意性は明らかではなく、実際、野生型とＳＯＤ１ビヒクル群との間で統計学的差異を示さなかった（図１９）。したがって、この測定で観察された小さな変化をこの時点で解釈することは困難である。

【０１１３】

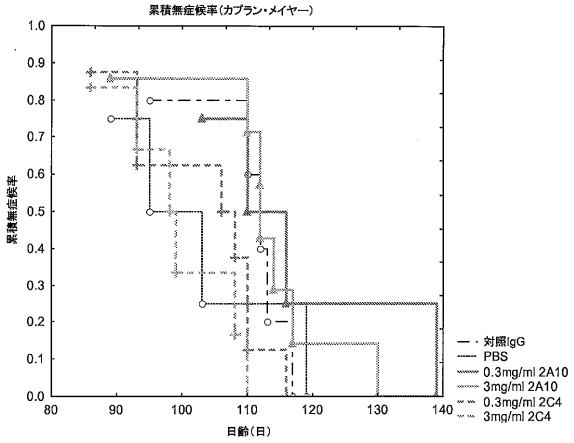
ｖｉ．　ＴＡの１／２弛緩までの時間

電気刺激後のＴＡ筋の収縮および続く弛緩を測定することができ、後期の疾患進行はこの測定に劇的な影響を生じさせる。本明細書中（図２０）で示されるように９０日の時点で、影響はより限定的であり、ＷＴとＳＯＤ１ビヒクル群との間で小さな差異しかなかった（ｐ値０．０２０５）。リルゾールおよび抗Ｎｏｇｏ－Ａ群で正常化への傾向が存在するが、統計学的有意性に達したのはリルゾール＋３ｍｇ／ｋｇ抗Ｎｏｇｏ－Ａのみである（ｐ値０．０２１２）。アッセイの、限定された動的範囲は、この時点で、この段階でのこのデータのさらなる解釈を制限する。

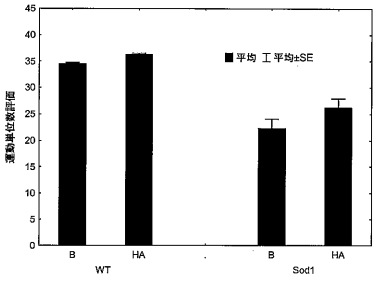
【図１】



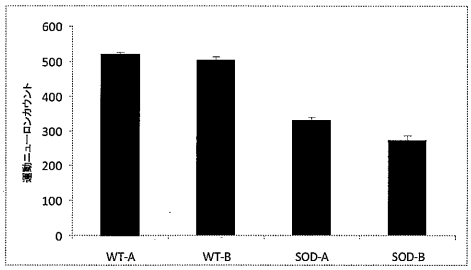
【図２】



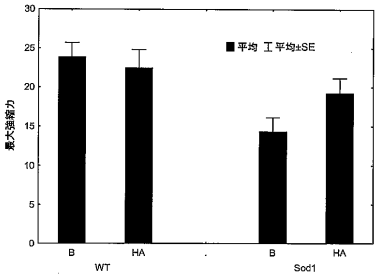
【図３】



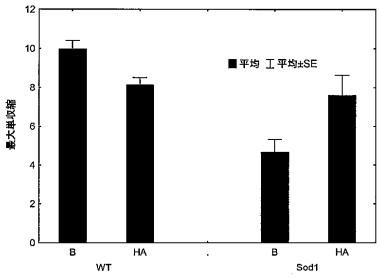
【図４】



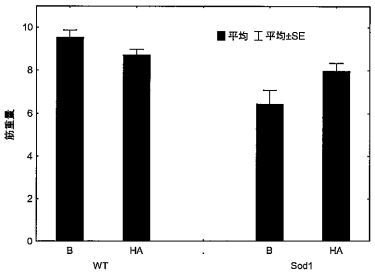
【図５】



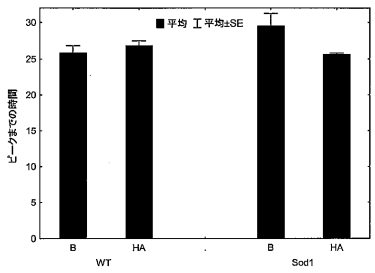
【図６】



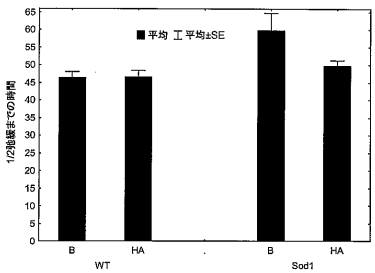
【図７】



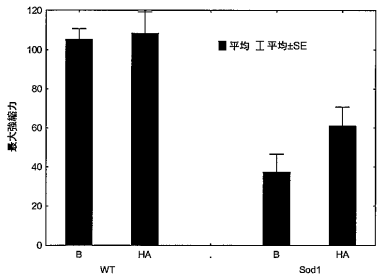
【図８】



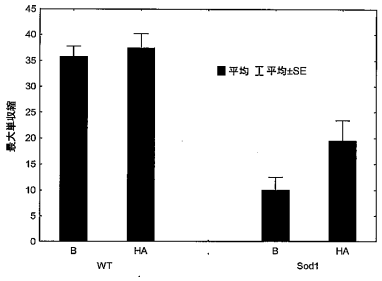
【図９】



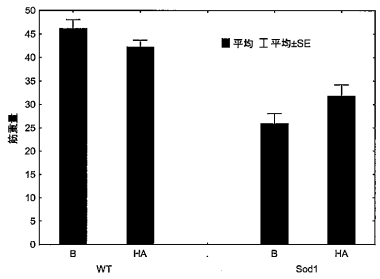
【図１０】



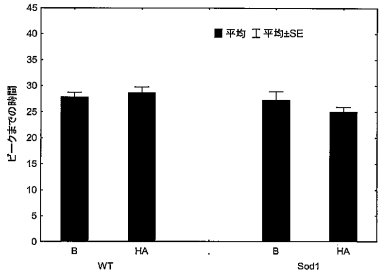
【図１１】



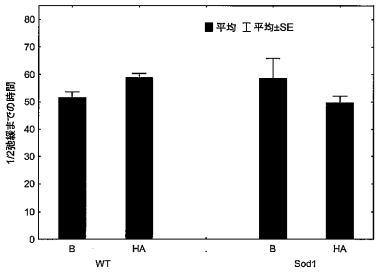
【図１２】



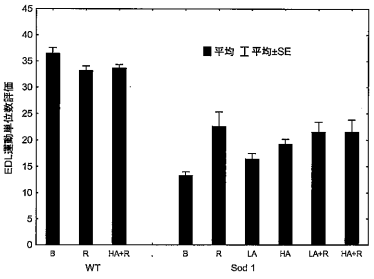
【図１３】



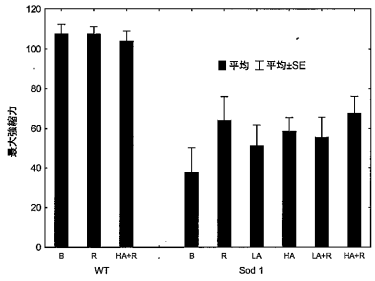
【図１４】



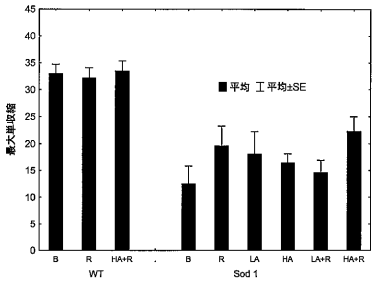
【図１５】



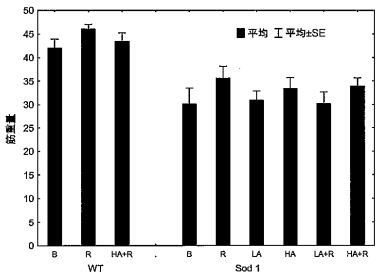
【図１６】



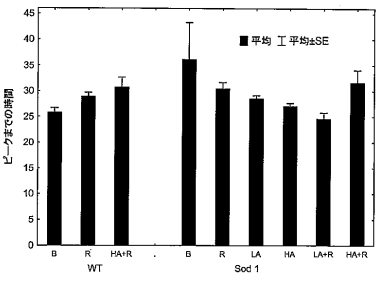
【図１７】



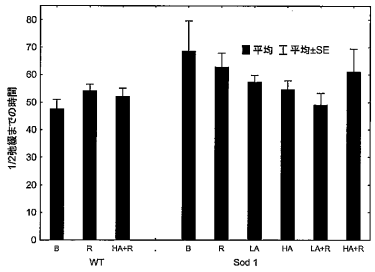
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【配列表】

2011527317000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/058832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/068750 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; CLEGG STEPHANIE JANE [GB]; ELLIS JONATHAN HENRY) 21 June 2007 (2007-06-21) page 18, lines 12-20, paragraphs 26,137,183; claims 10, 13	1,4-7, 18,20, 22-23 1-27
X Y	WO 2004/014311 A2 (UNIV YALE [US]; BIOGEN INC [US]; LEE DANIEL H S [US]; PEPINSKY R BLAKE) 19 February 2004 (2004-02-19) abstract	1,4-5, 18,20,22 1-27
Y	WO 2007/133731 A2 (AVICENA GROUP INC [US]; NIVAGGIOLI BELINDA TSAO [US]) 22 November 2007 (2007-11-22) page 13, para 3; page 1, lines 12-24	2-3, 8-11,17, 19,21, 24-27

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 February 2010	18/02/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Ludwig, Gerald

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/058832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/178306 A1 (BOWSER ROBERT P [US]) 10 August 2006 (2006-08-10) abstract	1-27

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/058832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007068750 A2	21-06-2007	AR 057239 A1	21-11-2007
		AU 2006325228 A1	21-06-2007
		CA 2633501 A1	21-06-2007
		CN 101374863 A	25-02-2009
		EA 200801343 A1	30-12-2008
		EP 1960429 A2	27-08-2008
		JP 2009519025 T	14-05-2009
		KR 20080080644 A	04-09-2008
WO 2004014311 A2	19-02-2004	AU 2003264033 A1	25-02-2004
		BR 0313331 A	24-07-2007
		CA 2495121 A1	19-02-2004
		CN 1681838 A	12-10-2005
		EP 1534736 A2	01-06-2005
		IS 7677 A	28-01-2005
		JP 2005535329 T	24-11-2005
		KR 20050062525 A	23-06-2005
		MX PA05001615 A	19-08-2005
		US 2005271655 A1	08-12-2005
		US 2009215691 A1	27-08-2009
		ZA 200501135 A	25-10-2006
		ZA 200601909 A	30-05-2007
WO 2007133731 A2	22-11-2007	AU 2007249811 A1	22-11-2007
		EP 2023718 A2	18-02-2009
		US 2008003208 A1	03-01-2008
US 2006178306 A1	10-08-2006	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 43/00	１２１	
Ａ６１Ｐ 9/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 21/02		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 9/04		
Ａ６１Ｐ 25/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 25/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/04		
Ａ６１Ｐ 25/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/16		
Ｃ０７Ｋ 16/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/28		
		Ｃ０７Ｋ 16/18	ＺＮＡ	

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

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 アビラ，バムズ
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 クリーブランド，ショーン マシュー
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 ハンブリン，ポール アンドリュー
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 プリンジャ，ラビンダー クマー
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン

Ｆターム(参考) 4C084 AA17 AA20 MA02 MA52 MA66 NA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA08
ZA16 ZA36 ZA37 ZA94 ZC02 ZC75
4C085 AA14 CC23 EE01 EE03 GG02
4C086 AA01 AA02 BC84 MA01 MA02 MA04 MA52 MA66 NA05 NA14
ZA01 ZA02 ZA08 ZA16 ZA36 ZA37 ZA94 ZC02 ZC75
4H045 AA11 EA20