

(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2019-201655

(P2019-201655A)

(43) 公開日 令和1年11月28日(2019.11.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 7

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-133416 (P2019-133416)	(71) 出願人	505081191
(22) 出願日	令和1年7月19日 (2019.7.19)		パイオン ドイチュラント ゲーエムベ ハー
(62) 分割の表示	特願2016-514405 (P2016-514405) の分割		PA I O N D e u t s c h l a n d G m b H
原出願日	平成26年5月21日 (2014.5.21)		ドイツ国, 5 2 0 6 2 アーヘン, マルテ インシュトラッセ 1 0 - 1 2
(31) 優先権主張番号	13002641.2		M a r t i n s t r a s s e 1 0 - 1 2
(32) 優先日	平成25年5月21日 (2013.5.21)		, 5 2 0 6 2 A a c h e n, D e u t s c h l a n d
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	13002850.9		
(32) 優先日	平成25年6月3日 (2013.6.3)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経学的疾患又は神経変性疾患に有用な新規抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体によって媒介される組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) の有害な作用を阻害する上で効果的である抗NMDA抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体の提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を含むエピトープに結合することができるか、特定のアミノ酸配列を有する1つ以上の相補性決定領域を含むか、あるいは1つ又は2つのアミノ酸の位置において変化しているか、又は1つ以上のアミノ酸の挿入を含有し、かつ、対応する未変化の相補性決定領域の機能的等価体である、特定のアミノ酸配列を有する1つ以上の相補性決定領域を含む、抗NMDA受容体抗体、フラグメント、又は誘導体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 NMDA 受容体抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体が、

(a) 配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 及び 28 からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むエピトープに結合することができるか、

(b) 配列番号 29、30、31、32、33 及び 34 からなる群より選択されたアミノ酸配列を有する 1 つ以上の相補性決定領域を含むか、あるいは

(c) 1 つ又は 2 つのアミノ酸の位置において変化しているか、又は 1 つ以上のアミノ酸の挿入を含有し、かつ、対応する未変化の相補性決定領域の機能的等価体である、配列番号 29、30、31、32、33 及び 34 からなる群より選択されたアミノ酸配列を有する 1 つ以上の相補性決定領域を含む、
該抗体、フラグメント、又は誘導体。

【請求項 2】

t-P A と相互作用する NMDA 受容体の一領域の少なくとも一部分に結合することができ、該結合は NMDA 受容体と t-P A との間の相互作用を阻害し、これにより、NMDA 受容体の少なくとも 1 つの機能が選択的に阻害される、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体である、請求項 1 又は 2 記載の抗体。

【請求項 4】

以下：

(a) 配列番号 35、36、37 及び 38 からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するフレームワーク領域に対して 80 % 以上の相同性又は同一性を共有する重鎖フレームワーク領域、及び／又は配列番号 39、40、41 及び 42 からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するフレームワーク領域に対して 80 % 以上の相同性又は同一性を共有する軽鎖フレームワーク領域を含むか、あるいは

(b) 15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4 及び 6C9A3F6 からなる群より選択された寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体との交差反応性を示す
の特徴の 1 つ以上を有する、請求項 1～3 のいずれか一項記載の抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体。

【請求項 5】

配列番号 43 のアミノ酸配列を含む 1 つ又は 2 つの重鎖可変領域を含む、及び／又は、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む 1 つ又は 2 つの軽鎖可変領域を含む、請求項 1～4 のいずれか一項記載の抗体、あるいは、該抗体との交差反応性を示すそのフラグメント又はその誘導体。

【請求項 6】

その重鎖可変領域が互いに同一であり、かつ、その全長にわたって配列番号 43 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に対して 80 % 以上の相同性又は同一性を共有し、及び／又は、その軽鎖可変領域が互いに同一であり、かつ、その全長にわたって配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に対して 80 % 以上の相同性又は同一性を共有する、請求項 5 記載の誘導体。

【請求項 7】

15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4 及び 6C9A3F6 からなる群より選択された寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体、又は、該抗体との交差反応性を示すそのフラグメント又はその誘導体。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項記載の抗体、フラグメント、又は誘導体をコードする核酸。

【請求項 9】

請求項 8 記載の核酸と、該核酸と作動可能に接続されたプロモーターとを含む、発現カセット又はベクター。

【請求項 10】

請求項 8 記載の核酸又は請求項 9 記載の発現カセット又はベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1～7 のいずれか一項記載の抗体、フラグメント、又は誘導体、請求項 8 記載の核酸、請求項 9 記載の発現カセット又はベクター、又は請求項 10 記載の宿主細胞、及び場合により、担体、溶媒、希釈剤、及び賦形剤からなる群より選択された 1 つ以上の成分を含む、医薬組成物。

【請求項 12】

医薬に使用するための、請求項 1～7 のいずれか一項記載の抗体、フラグメント又は誘導体、請求項 8 記載の核酸、請求項 9 記載の発現カセット又はベクター、請求項 10 記載の宿主細胞、又は、請求項 11 記載の医薬組成物。

【請求項 13】

神経学的疾患又は神経変性疾患の処置、予後予測、診断、及び／又はモニタリングに、又は神経保護剤として使用するための、請求項 1～7 のいずれか一項記載の抗体、フラグメント又は誘導体、請求項 8 記載の核酸、請求項 9 記載の発現カセット又はベクター、請求項 10 記載の宿主細胞、あるいは、請求項 11 記載の医薬組成物。

【請求項 14】

神経学的疾患又は神経変性疾患が、多発性硬化症、血栓性疾患、脳卒中、脳内出血、一過性脳虚血発作、癲癇、側頭葉癲癇、筋萎縮性側索硬化症、脳腫瘍、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳浮腫、寄生虫感染、細菌感染、真菌感染又はウイルス感染から生じた中枢神経系の合併症、髄膜炎、脳炎、外傷性脳損傷、脊髄損傷、頭蓋内病変、脊椎内病変、虚血性疾患、及び、急性血管閉塞後又は緑内障における視神経障害からなる群より選択される、請求項 13 記載の抗体、フラグメント、誘導体、核酸、発現カセット、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体の分野に関する。特に、本発明は、ニューロンに対して毒性でありかつ神経血管単位／血液脳関門（BBB）に障害を与える、又はそれを病理学的な影響をもたらす態様で調節する、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体によって媒介される組織型プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）の有害作用を阻害する上で効果的である、抗NMDA抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体を提供する。また、特に、神経学的疾患又は神経変性疾患、例えば多発性硬化症の処置のための医療使用も提供する。

【0002】

多発性硬化症（MS）は、中枢神経系（CNS）の炎症性かつ変性性の疾病である。それは、浸潤している免疫細胞、希突起膠細胞死に起因するミエリンの減少、及び軸索障害によって特徴付けられる。

【0003】

MSの原因（群）は明確には判明していない。MSは、生体自身の免疫系が神経系の構造を障害するという免疫介在性の疾病であると考えられている。その生理病理はあまり解明されていないが、動物モデルの結果は、興奮毒性プロセスがMSの病態に関与していることを示唆する（Pitt et al., 2000; Correa et al., 2007）。実際、ヒトMSにおいてはグルタミン酸の不均衡な恒常性が軸索及び希突起膠細胞の病態に寄与し、このことは、この不均衡を、治療目的で操作することもできることを示唆する（Werner et al., 2001

10

20

30

40

50

）。例えば、NMDA受容体の遮断剤、例えばメマンチンは、白質の障害を減弱させることが示されている(Manning et al., 2008)。白血球及び膠細胞によるグルタミン酸の強力な放出、グルタミン酸の変化した代謝、又はグルタミン酸の変化した取り込みが、細胞外の上昇したグルタミン酸レベルをもたらす主な機序をなし得る。MSとは別に、グルタミン酸の興奮毒性は、他の脱髄性疾患、例えばデビック病又は特発性横断性脊髄炎にも関与しているようである。

【0004】

MSにおいては、グルタミン酸による興奮毒性の他に、セリンプロテアーゼ（例えばt-PA）の関与も示唆されている。実際に、t-PAは脱髄を促進する可能性がある。なぜなら、プラスミン（これはプラスミノゲンに対するt-PAの作用によって生成される）は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を直接分解し得るからである(Cammer et al., 1978)。さらに、プラスミンは、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)活性化カスケードの重要な開始因子である。MMP活性は、ミエリン膜の分解において重要な役割を果たすことが記述されている(Cuzner及びOpdenakker, 1999)。興味深いことに、t-PAはまた、興奮毒性的な神経細胞死も促進し(Nicole et al., 2001)、グルタミン酸により誘発された希突起膠細胞損傷に寄与する(Pitt et al., 2000)と報告された。さらに、損なわれたt-PAにより駆動される線維素溶解は、MSにおける軸索障害に寄与し得る(East et al., 2005)。いくつかのグループがt-PAとグルタミン酸作動性伝達との関係を示唆する(Nicole et al., 2001, Fernandez-Monreal et al., 2004; Samson et al., 2008、概説についてはYepes et al., 2009)。注目すべきことに、生体内のt-PAの機能が様々であることから、t-PAを完全に無効化するようなアプローチを用いることができない。これは、MSの実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルにおいてt-PA^{-/-}マウスが、症候性疾病を遅延して発症した後に、増加した重度及び遅延した回復を示すという所見によって示される(Lu et al., 2002)。

【0005】

t-PAは、血管内空間において、血液と脳との間の境界において、及び脳実質内において重要な役割を果たす、二面性を有するセリンプロテアーゼである(概説については: Yepes et al., 2008)。血管内区画においては、t-PAの主な基質は、不活性な酵素前駆体であるプラスミノゲンであり、その主な役割は線維素溶解を促進することである。血液由来のt-PAは、インタクトな血液脳関門及び損傷された血液脳関門の両方を通してすることができ(Benchenane et al. 2005a, Benchenane et al., 2005b)、したがって、内因的に産生されたt-PAと一緒に、脳実質内で様々な基質と相互作用して、t-PA/プラスミ(ノーゲ)ンにより駆動される細胞外マトリックス分解を超えてその機能を拡張することができる。

【0006】

膠細胞及び/又はニューロンにおけるt-PAと、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体(NMDAR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)、アネキシン-Iとの相互作用は、細胞シグナル伝達プロセスを活性化し、これは過度である場合には、脳浮腫、出血性変化、及び細胞死をはじめとする有害な転帰に至る可能性があることを示すエビデンスが増えている。t-PAのこれらの複数の病態生理学的な作用に基づいて、虚血疾患において確立された役割の域を超えた、いくつかの神経学的疾患又は神経変性疾患(例えば癲癇、アルツハイマー病、多発性硬化症、又は髄膜炎)においての内因性t-PAの関与(外的に適用されたrt-PAの副作用によって裏付けられる)が議論されている。

【0007】

シナプスのNMDA受容体は、シナプスのNMDA受容体の活性低下がニューロンに対して有害であるという点で、シナプス外のNMDA受容体とは区別され得る。その活性を増強させると、複数の神経保護経路がトリガーされる。シナプス外のNMDARの活性化レベルが低いことはニューロンの生存に対して全く影響を及ぼさないが、その活性を上昇させると、細胞死経路が活性化され、特定の神経変性プロセスを悪化させることが報告さ

れている (Hardingham 及び Bading, 2010)。したがって、シナプスの NMDA 受容体を温存しつつ、シナプス外の NMDA 受容体の活性の特異的減少をもたらす手段は神経学的疾病における有望な治療目的となるだろう。

【0008】

脳炎症性浸潤物の形成は、MS のような多くの脳疾患においてニューロンの異常の発症の有意に寄与する (Zipp et al., 2006)。生理的条件下において、脳微小血管内皮は、付着した膠細胞及びその伸張物と共に、そのタイトジャンクション複合体を通して、血液脳関門 (BBB) として作用し、これにより、白血球の進入を制限する。

【0009】

脳への免疫細胞の浸潤は内皮タイトジャンクションの開口を必要とし、BBB への障害は多くの神経学的疾患の特徴である。脳炎症の基礎をなす BBB での分子及び細胞プロセスの知識は、BBB を保ちかつ細胞内への流入を調節することを目的とした新規な治療アプローチの開発に役立ち得る。興味深いことに、t-PA はまた、血液脳関門の透過性を高めることによって、CNS における炎症反応を変化させると記載された (Paterson et al., 1987)。近年の結果は、t-PA が、単球により誘導される BBB の開口を促進し、続いて、インビトロにおけるラット及びヒト BBB の単球の横断を促進することを示す (Reijerkerk et al., 2008)。

【0010】

MS の有病率は、100,000 人あたり 2~150 人である。多発性硬化症の治療法は不明である。MS 療法の目標は、主に、機能を回復し、MS の発病を予防し、身体障害の進行を止めることである。

【0011】

急性 MS の発病における対症療法のために、通常、副腎皮質ステロイドが使用される。しかし、それらは有意な長期効果を有さないようである。疾病修飾処置のために、フマル酸ジメチル、フィンゴリモド、酢酸グラチラマー、インターフェロナー β 1、ミトキサントロン、ナタリズマブ及びテリフルノミドが現在使用されている。これらの中の大半の薬物は、発病の回数を減少させるのに幾分効果的である再発寛解亜型の MS にのみ認可されている。さらに、MK-801 (ジゾシルピン) は、多発性硬化症モデルにおいて神経保護的かつ効果的であることが報告されている。しかし、MK-801 は、容認できない有害作用を有する、非選択的な NMDA 受容体アンタゴニストである。

【0012】

MS に現在使用される医薬品の問題としては、有害作用及び低い耐容性が挙げられる。多発性硬化症に現在使用されている抗体のナタリズマブは、細胞接着分子 α 4-インテグリンを認識するヒト化モノクローナル抗体である。神経学的容態である進行性多巣性白質脳症 (PML) と関連づけられた後、それは一過性に米国市場から撤退した。ナタリズマブの他の報告された有害作用としては肝毒性が挙げられる。

【0013】

NMDA 受容体に対する抗体は、それ自体公知であるが (例えば欧州特許第 2289542A1 号参照)、具体的なエピトープ又は相補性決定領域 (CDR) は開示されていない。

【0014】

NMDA 受容体に対する抗体は、ある自己免疫疾患である抗 NMDA 受容体抗体脳炎において見られる。これらの抗体は、NMDA 受容体の NR1 (GluN1 と呼ばれる) サブユニットに結合し、その結合しているエピトープが描写されている (Gleichman et al., 2012)。結合すると、これらの抗体は MK-801 と同じ効果をトリガーするが、効果はより重度である。該抗体は、NMDA 受容体の迅速な刺激、及び続いてその内部移行をトリガーする。したがって、NMDA 受容体、特にその活性化が神経保護作用を有する NMDA 受容体はもはや刺激されることができない。抗 NMDA 受容体抗体脳炎を患う患者は、急性不安、行動の変化、又は精神病を呈し、発作又は神経心理学的異常を発症する。数日間又は数週間以内に、意識低下、運動障害、低換気状態、及び自律神経失調症が

10

20

30

40

50

出現し、これにより集中治療室への入院が必要となることが多い。

【0015】

したがって、MSの処置のための新規な、好ましくは改善された手段が継続的に必要とされる。したがって、本発明の目的は、MSなどの神経学的疾患又は神経変性疾患の処置のための新規な手段を提供することである。

【0016】

本発明の第1の態様によると、この目的は、抗NMDA受容体抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体によって解決され、該抗体、フラグメント、又は誘導体は、

(a) 配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27及び28からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むエピトープに結合することができるか、

(b) 配列番号29、30、31、32、33及び34からなる群より選択されたアミノ酸配列を有する1つ以上の相補性決定領域を含むか、あるいは

(c) 1つ若しくは2つのアミノ酸の位置において変化しているか、又は1つ以上のアミノ酸の挿入を含有し、かつ、対応する未変化の相補性決定領域の機能的等価体である、配列番号29、30、31、32、33及び34からなる群より選択されたアミノ酸配列を有する1つ以上の相補性決定領域を含む。

【0017】

上記エピトープは、t-PAと相互作用し、かつ種間で保存されている、NMDA受容体のNR1 (GluN1とも呼ばれる) サブユニットの領域内にある。本発明者らは、このエピトープに結合するか又は上記の相補性決定領域を有する抗体が、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体によって媒介される組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) の有害な作用を阻害することができることを発見した。下記のように、このような抗体は、t-PAによって誘発される病変の増強を遮断し、また、外的に投与されたt-PAの非存在下においても効果を有し、このことは、それが内因的なt-PAに対して効果を及ぼすことを意味する。しかし、t-PAの完全な非存在下においては、該抗体は、全く効果を及ぼさない。該抗体は、NMDA受容体とt-PAとの間の相互作用を阻害すると結論付けることができる。これにより、この相互作用に伴う有害な結果は、軽減又は予防される。限局した標的におけるこの特異的な作用によって、有益であるt-PAの他の機能 (例えば、血管の血流の回復及び細胞内マトリックスの再編成におけるその役割) は、影響を受けないままである。

【0018】

したがって、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、MSなどの神経学的疾患又は神経変性疾患の処置のための手段として有用である。

【0019】

抗NMDA受容体抗体脳炎における自己反応性抗体は、残基368及び369の領域を含むNR1サブユニットのアミノ末端ドメイン内の領域、並びにアミノ酸144位～156位の領域に結合し、これらの領域は折り畳まれたドメインにおいて近接している (Gleichman et al., 2012)。

【0020】

t-PAとNMDA受容体との相互作用を遮断することを目的とした戦略の危険性が、標的としてt-PAとNR1サブユニットを共有しているこれらの自己免疫抗体によって例示される：抗体は、それが前記の損傷性の自己免疫抗体の結合するエピトープと相互作用するか、又は遮断するか、又は別様に影響を及ぼす場合に、脳炎を引き起こしがちであり得る。それにも関わらず、本発明者らは、このリスクを回避する抗体の開発に成功した。

【0021】

本発明者らは、NR1サブユニットのアミノ酸19～371に対応するフラグメントを用いて免疫化させた後に、本発明によるモノクローナル抗体を生成した。このフラグメン

10

20

30

40

50

トは、抗NMDA受容体抗体脳炎の抗体によって認識される免疫原性領域を含んでいたが、本発明者らは、作り出された抗体が、抗NMDA受容体抗体脳炎の抗体の有害な作用を惹起しなかったことを発見した。さらに、本発明による抗体は、NMDA受容体の特定の機能のみを選択的に遮断した。抗NMDA受容体抗体脳炎の抗体及び本発明による抗体の結合するエピトープは重複しない。本発明者らは、上記の選択肢（a）に記載されたエピトープ外に結合しかつ本発明による抗体のプラスの効果を示さなかった、19～371フラグメントを用いての免疫化後に生成された抗体も発見した。

【0022】

本発明による好ましい抗体は好ましい効力プロファイルを有する。本発明による特に好ましい抗体は、以下の特徴の1つ以上を有する：それは高まった効力を有する（例えば、MSの発病の予防、機能の改善若しくは回復、神経保護作用、又は身体障害の進行の停止に関して）、それは使用がより簡便であり、あまり頻繁に又はあまり定期的に投与する必要がないか、あるいは、以前のMS医薬品と比較して有害作用が少ないか又はより高い耐容性を有し、それは高親和性の抗体であるか、低い交差反応性を有するか、安全であるか、経済的であるか、又は現在適切な処置法が存在しないMSサブタイプに使用可能である。

【0023】

「抗体」という用語は好ましくは、ジスルフィド結合によって接続された少なくとも2本の重鎖と2本の軽鎖とを含むタンパク質を指す。「抗体」という用語は、天然抗体並びに全ての組換え形の抗体、例えば原核生物において発現させた抗体、非グリコシル化抗体、ヒト化抗体、及びキメラ抗体を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（VH）と重鎖定常領域（CH）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）と軽鎖定常領域（CL）からなる。重鎖定常領域は、3つ、又はIgM型若しくはIgE型の抗体の場合には4つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2、CH3及びCH4）を含み、第1の定常ドメインCH1は可変領域に隣接し、ヒンジ領域によって第2の定常ドメインCH2に接続されていてもよい。軽鎖定常領域は、1つの定常ドメインのみからなる。可変領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域の散在した、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性領域にさらに細分され得、各可変領域は、3つのCDRと4つのFRを含む。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）及び古典的な補体系の第1成分（C1q）をはじめとする宿主の組織又は因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介し得る。しかし、本発明による「抗体」という用語は、普通ではない抗体、例えば重鎖抗体、すなわち、1本以上、特に2本の重鎖からのみ構成される抗体、及びナノボディ、すなわち、1つのモノマー可変ドメインからのみ構成される抗体も含む。

【0024】

本明細書において使用される「タンパク質」という用語は、アミノ酸の分子鎖、又は2つ以上のアミノ酸鎖の複合体を指す。タンパク質は、任意の天然アミノ酸並びに人工アミノ酸を含有し得、生物学的起源であっても合成起源であってもよい。タンパク質は、例えばグリコシル化、アミド化、カルボキシル化、及び／又はリン酸化などによって、天然的に（翻訳後修飾）又は合成的に修飾されていてもよい。タンパク質は、少なくとも2つのアミノ酸を含むが、任意の特定の長さである必要はなく；この用語は、サイズの制限を全く含まない。本出願において、「タンパク質」、「ポリペプチド」及び「ペプチド」という用語は同義語として使用される。好ましくは、タンパク質は少なくとも10個のアミノ酸、好ましくは少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも100個のアミノ酸を含む。

【0025】

抗体の「フラグメント又は誘導体」は好ましくは、該抗体から誘導され、かつ、該抗体と同じ抗原、特に該抗体と同じエピトープと結合することのできる、タンパク質又は糖タンパク質である。したがって、本明細書における抗体のフラグメント又は誘導体は、一般的に、機能的フラグメント又は誘導体を指す。特に好ましい実施態様では、抗体のフラグ

メント又は誘導体は、重鎖可変領域を含む。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のフラグメント又はその誘導体によって発揮され得ることが示されている。抗体のフラグメント又は誘導体の例としては、(i) 各重鎖及び軽鎖の可変領域及び第1定常ドメインからなる一価フラグメントである、Fabフラグメント、(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである、F(ab)2フラグメント；(iii) 重鎖の可変領域及び第1定常ドメインCH1からなるFdフラグメント；(iv) 抗体のシングルアームの重鎖及び軽鎖可変領域からなるFvフラグメント；(v) 単一ポリペプチド鎖からなるFvフラグメントであるscFvフラグメント；(vi) 互いに共有結合で連結された2つのFvフラグメントからなる(Fv)2フラグメント；(vii) 重鎖可変ドメイン；及び(viii) 重鎖可変領域と軽鎖可変領域との会合が分子内ではなく分子間でのみ起こるように互いに共有結合で連結された重鎖可変領域と軽鎖可変領域からなるマルチボディが挙げられる。これらの抗体フラグメント及び誘導体は、当業者には公知である慣用的な技術を使用して得られる。

10

【0026】

標的アミノ酸配列は、例えば、標的アミノ酸配列がその全長にわたり、基準アミノ酸配列の対応する部分に対して、60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、より好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上の相同性又は同一性を共有するならば、基準アミノ酸配列から「誘導」される。例えば、ヒト化抗体のフレームワーク領域が、特定のヒト抗体の可変領域から誘導されるならば、ヒト化抗体のフレームワーク領域のアミノ酸はその全長にわたり、ヒト抗体の対応するフレームワーク領域に対して、60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、より好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の相同性又は同一性を共有する。「対応する部分」又は「対応するフレームワーク領域」は、例えば、標的抗体の重鎖可変領域のフレームワーク領域1(FRH1)が、基準抗体の重鎖可変領域のフレームワーク領域1に対応することを意味する。同じことが、例えば、FRH2、FRH3、FRH4、FRL1、FRL2、FRL3、及びFRL4にも該当する。特定の実施態様では、基準アミノ酸配列から「誘導」される標的アミノ酸配列はその全長にわたり、基準アミノ酸配列の対応する部分に対して100%相同、又は特に100%同一である。

20

【0027】

好ましくは、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、互いに同一である2つの重鎖可変領域及び／又は互いに同一である2つの軽鎖可変領域を有する。

30

【0028】

本明細書において使用される「含む」という表現は、その文字通りの意味の他に、文脈から特に指定されない限り、「本質的にからなる」及び「からなる」という表現も含み、好ましくはこれらの表現を指す。したがって、「含む」という表現は、具体的に列挙された要素を「含む」対象物がさらに他の要素を含まないという実施態様だけでなく、それがさらに他の要素を包含していてもよい及び／又は実際に包含するという実施態様も指す。同様に、「有する」という表現も、「含む」という表現と同じように理解されたい。

【0029】

上記のように、特定の実施態様によると、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、配列番号29、30、31、32、33及び34からなる群より選択されたアミノ酸配列、あるいは、各々の場合において1つ若しくは2つのアミノ酸の位置において変化している可能性があるか、又は各々の場合において1つ以上のアミノ酸の挿入（特に、1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸、好ましくは例えばヒトCDR配列とのアラインメントによって決定したところ配列番号29、30、31、32、33及び34のCDRに対して高い相同性を示すアミノ酸の挿入、ここで、好ましい挿入は、配列番号29のアミノ酸4と5の間、配列番号30のアミノ酸4と5の間、配列番号31のアミノ酸4と5の間、配列番号32のアミノ酸6と7の間、配列番号33のアミノ酸2と3の間、及び／又は配列番号34のアミノ酸5と6の間である）を含有している可

40

50

能性がある、その機能的等価体を有する、1つ以上の相補性決定領域を含む。

【0030】

本発明は、抗体、フラグメント、又は誘導体が、配列番号29、30、31、32、33及び34からなる群より選択されたアミノ酸配列又はその機能的等価体を有する、1、2、3、4、5又は好ましくは6個の相補性決定領域を含む、実施態様を包含する。この文脈において、配列番号29、30及び31は、好ましくは、それぞれ重鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3に対応し、配列番号32、33及び34は好ましくはそれぞれ軽鎖のCDR1、CDR2及びCDR3に対応する。

【0031】

本発明はまた、t-P Aと相互作用するNMDA受容体の一領域の少なくとも一部分（好ましくは完全領域）に結合することができる抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体（好ましくは上記したような）を提供し、該結合はNMDA受容体とt-P Aとの間の相互作用を阻害し（特に生理学的結果に関して部分的に又は完全に）、これによりNMDA受容体の少なくとも1つの機能が選択的に阻害される。この機能は、好ましくは、NMDA受容体の有害な機能であり、より好ましくはt-P Aによって媒介される又は悪化する機能である。t-P A-NMDA受容体結合は、特定の状況において、特に多発性硬化症において望ましくない結果をもたらすので、このようなt-P A-NMDA受容体結合の阻害は、有益な治療効果を有する。NMDA受容体の阻害の選択性は、好ましくは、NMDA受容体の特定の機能（例えば神経毒性的なカルシウム流入）の選択的阻害から、又は、NMDA受容体の特定のサブセット（例えば、有害な作用を媒介するサブセット、例えば、シナプスNMDA受容体及びシナプス外NMDA受容体からなる群より選択されたサブセット）、好ましくはシナプス外NMDA受容体の選択的阻害からもたらされる。好ましくは抗体、フラグメント又は誘導体の結合は、NMDA受容体の刺激をもたらさず、NMDA受容体の内部移行をもたらさず、及び／又はNMDA受容体の正常な機能を損なわない。好ましくは抗体、フラグメント又は誘導体の結合は、脳症を全く誘発しないか、行動的影響を全く誘発しないか、又は一般的に言って、それ自体有害な作用を誘発しない。

【0032】

好ましくは、NMDA受容体は、ラット又はヒトNMDA受容体である。好ましくは、t-P Aは、ラット又はヒトt-P Aである。好ましくは、t-P Aと相互作用するNMDA受容体の領域は、NMDA受容体のGluN1-1aサブユニットのアミノ末端ドメイン内（特にそのアミノ酸19～371）である。

【0033】

このような抗体、フラグメント又は誘導体は、NMDAサブユニットの1つの小さな部分にのみ結合する。これは、NMDA受容体の生理的機能に干渉しないが、しかしt-P Aにより誘発されたNMDA受容体活性の増強のみを阻害する、NMDA受容体における特異的な介入を可能とする。

【0034】

好ましくは、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体の結合は、NMDA受容体のNR1サブユニットの細胞外ドメインの切断を妨げる。

【0035】

好ましくは、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、（例えば、上記のエピトープ又は領域に）特異的に結合することができる。例えば、これは、有害作用を低減させることができるか、又は、抗体、フラグメント、若しくは誘導体の耐容性を増加させることができる。

【0036】

「特異的結合」は好ましくは、抗体などの作用物質が、別の標的への結合と比較して、それが特異的であるエピトープなどの標的により強力に結合することを意味する。作用物質は、それが第2標的の解離定数よりも低い解離定数（ K_d ）で第1標的と結合するならば、それは第2標的と比較して第1標的により強力に結合する。好ましくは、該作用物質

10

20

30

40

50

が特異的に結合する標的に対する解離定数は、該作用物質が特異的に結合しない標的に対する解離定数よりも2倍以上、好ましくは5倍以上、より好ましくは10倍以上、さらにより好ましくは20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、又は1000倍以上低い。最も好ましくは、該作用物質は、実質的な意味のある程度で第2標的に全く結合しない。

【0037】

本発明による好ましい抗体は、ニューロンのシナプス外のNMDA受容体の細胞表面拡散、特に、t-P Aにより促進されるニューロンのシナプス外のNMDA受容体の細胞表面拡散を部分的に又は完全に遮断する。

【0038】

好ましくは、本発明による抗体は、(i) 血液脳関門を横断する単球及び／又はT細胞の遊走を抑制し、及び／又は(ii) 脊髄のミエリンの障害及び免疫細胞の浸潤を止める。

【0039】

本発明の好ましい実施態様は、上記のような抗体であり、これはモノクローナル抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体である。

【0040】

好ましくは、上記のような抗体、フラグメント、又は誘導体は、以下の：

(a) それは、配列番号35、36、37及び38からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するフレームワーク領域に対して80%以上の相同性若しくは同一性を共有する重鎖フレームワーク領域、並びに／又は配列番号39、40、41及び42からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するフレームワーク領域に対して80%以上の相同性若しくは同一性を共有する軽鎖フレームワーク領域を含むか、あるいは

(b) それは、15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4及び6C9A3F6からなる群より選択された寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体との交差反応性を示すという特徴の1つ以上を有する。

【0041】

本明細書において、ハイブリドーマの名称は大文字であり（例えば15A4B2E5）、ハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の名称は小文字である（例えば15a4b2e5）。

【0042】

好ましくは、基準アミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列について上記されているように、配列相同性又は同一性は、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上、又は100%である。

【0043】

好ましい実施態様では、上記の配列相同性又は同一性のパーセントの値は、重鎖及び／又は軽鎖の完全なフレームワーク領域に適用される。このことは、重鎖については、CDRを除く抗体の完全な重鎖可変領域を、連結された配列番号35、36、37及び38と比較し、軽鎖についてはCDRを除く抗体の完全な軽鎖可変領域を、連結された配列番号39、40、41及び42と比較することを意味する。

【0044】

別の好ましい実施態様では、上記のような抗体は、配列番号43のアミノ酸配列を含む1つ若しくは2つの重鎖可変領域を含み、及び／又は、配列番号44のアミノ酸配列を含む1つ若しくは2つの軽鎖可変領域を含む。好ましいそのフラグメント又はその誘導体は、該抗体との交差反応性を示す。好ましくは、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、2つのこのような重鎖可変領域及び／又は2つのこのような軽鎖可変領域を有する。

【0045】

さらなる好ましい誘導体は、その全長にわたり、配列番号43のアミノ酸配列を含む重

10

20

30

40

50

鎖可変領域に対して例えば80%以上の相同性若しくは同一性を共有する、互いに同一である2つの重鎖可変領域を有し、及び／又は、その全長にわたり、配列番号44のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に対して例えば80%以上の相同性若しくは同一性を共有する、互いに同一である2つの軽鎖可変領域を有する。

【0046】

特異的な抗体は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、又はウマに抗原を注射することによって産生される。これらの動物から単離された血液は、血清中に該抗原に対して指向されるポリクローナル抗体を含有する。抗原の単一のエピトープに特異的である抗体を得るために、抗体分泌リンパ球を動物から単離し、それらを癌細胞株と融合させることによって不死化させ、その結果ハイブリドーマ細胞が得られる。その後、単一のハイブリドーマ細胞を、限界希釈クローニングをすることによって単離して、全て同じモノクローナル抗体を産生する細胞クローンを作製する。

【0047】

さらに、本発明による抗体は、好ましくは、ヒト、マウス、ヤギ、霊長類、もしくはラクダの抗体であるか、又はそれから誘導される。それは、キメラ抗体であっても、ヒト化抗体であってもよい。それは、任意のアイソタイプ又はそのサブクラス、特にIgG、IgM、IgA、IgE若しくはIgDアイソタイプ又はそのサブクラス、例えばIgG1の抗体であり得る。好ましくは、本発明による抗体のフラグメント又は誘導体は、Fabフラグメント、F(ab)₂フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、scFvフラグメント、(Fv)₂フラグメント、及びマルチボディからなる群より選択される。抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、ただ1つのアミノ酸分子を含む一本鎖の構築物であっても、好ましくは互いに例えばジスルフィド結合によって共有結合で接続された2つ以上のアミノ酸分子を含む複数の鎖の構築物であってもよい。

【0048】

特定の実施態様では、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、その重鎖可変領域(VH)が、残りのVHの少なくとも一部分とは異なる抗体から誘導される少なくとも1つのCDRを含有するように工学操作される。例えば、VHは、ある抗体、例えばマウス、ラクダ、ヤギ、又は霊長類の抗体から誘導される少なくとも1つのCDR、好ましくは2つ又は3つのCDR、及び、別の抗体又は抗体群、好ましくは、別の種の抗体、特にヒト抗体から誘導される少なくとも1つのFR、好ましくは2つ、3つ又は4つのFRを含む。この実施態様では、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体はさらに、軽鎖可変領域(VL)を含み得る。特に、VLは、VHの1つ以上のCDRの誘導元となる抗体から誘導され得るか、又は、VLは、1つ、2つ、若しくは3つのCDRが、VHの1つ以上のCDRと同じ抗体から誘導されるが、1つ、2つ、3つ、若しくは好ましくは4つ全てのFRは、VHの1つ以上のFRと同じ種、特に同じ抗体若しくは抗体群から誘導される構築物であり得る。さらに、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体はさらに、可変領域のFRと好ましくは同じ種、特に同じ抗体若しくは抗体群から誘導される、1つ、2つ、3つ、若しくは4つの重鎖定常領域(CH)及び／又は1つの軽鎖定常領域(CL)を含み得る。好ましい実施態様では、可変領域及び定常領域のFRは、1つの特定の抗体から誘導されないが、特定の抗体群、例えばヒト抗体群から誘導される共通配列又は別の好ましい配列を示すアミノ酸配列を有する。

【0049】

別の実施態様では、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体はキメラであり、1つの抗体から誘導される1つ以上の重鎖及び場合により軽鎖の可変領域、並びに、別の抗体から誘導される1つ以上の重鎖及び場合により軽鎖の定常領域を含む。好ましくは、2つの異なる抗体は異なる種のものであり、例えば、可変領域は、マウス抗体から誘導されるが、定常領域はヒト抗体から誘導される。

【0050】

本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、好ましくはグリコシル化されている。好ましい実施態様では、それは、ヒト生体によって産生される天然抗体上

10

20

30

40

50

にも見られるヒトグリコシル化パターンを有する。さらに、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体は、1つ以上のその活性を調節し、特に増強するグリコシル化パターンを含み得る。例えば、グリコシル化パターンは、抗体、フラグメント、若しくは誘導体の、その特異的エピトープに対する親和性を、及び／又は、その下流の受容体、例えばFc受容体、特にFcγ、Fcα、若しくはFcε受容体に対するその親和性を増強し得る。さらに又は代替的には、グリコシル化パターンは、その補体依存性細胞障害(CDC)及び／又はその抗体依存性細胞障害(ADCC)を増強させ得る。最後に、特定のグリコシル化パターンを使用して、医学的必要性に応じて、生体内の抗体の滞留時間を調節し得る。この目的を達成するために、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体のグリコシル化パターンを、例えば、所望のグリコシル化パターンを生じることのできる特定の細胞株を使用することによって工学操作又は最適化し得る。

10

【0051】

特定の実施態様では、本発明による工学操作された抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体を、さらなる他の作用物質と結合させて、コンジュゲートを形成する。さらなる他の作用物質は、好ましくは、治療、診断、予後予測に、及び／又は疾病、特に多発性硬化症のモニタリングに有用である。例えば、さらなる他の作用物質は、抗体又は抗体のフラグメント、特に異なる種及び／又は異なる特異性の抗体又は抗体のフラグメント、酵素、相互作用ドメイン、安定化ドメイン、シグナル伝達配列、検出可能な標識、蛍光色素、毒素、触媒性抗体、細胞溶解性成分、免疫調節物質、免疫エフェクター、MHCクラスI又はクラスII抗原、放射性標識のためのキレート剤、放射性同位体、リボソーム、膜貫通ドメイン、ウイルス、並びに、細胞からなる群より選択され得る。それは、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体に共有結合的に、特に融合又は化学結合によって付着していても、あるいは非共有結合的に付着していてもよい。

20

【0052】

「コンジュゲート」という用語は、好ましくは、各化合物に由来する特性の少なくとも一部がコンジュゲートにおいて保持されるように互いに連結された2つ以上の化合物を意味する。連結は、共有結合によって又は非共有結合によって達成され得る。好ましくは、コンジュゲートの化合物は、共有結合を介して連結されている。コンジュゲートの様々な化合物は、化合物の原子間の1つ以上の共有結合を介して互いに直接結合し得る。あるいは、該化合物はリンカー分子を介して互いに結合し得、該リンカーは該化合物の原子に共有結合的に付着している。コンジュゲートが3つ以上の化合物から構成される場合、これらの化合物は、例えば、ある化合物が次の化合物に付着している鎖のようなコンフォメーションで連結されていても、又は、いくつかの化合物が各々、1つの中心化合物に付着していてもよい。

30

【0053】

第2の態様によると、本発明の根底にある問題は、15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4及び6C9A3F6からなる群より選択された寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体(特に、15a4b2e5、15a4b2f3、15a4b2、6c9a3、6c9a3f4及び6c9a3f6からなる群より選択されたモノクローナル抗体)、又は、該抗体と交差反応性を示すそのフラグメント若しくはその誘導体によって解決される。

40

【0054】

本発明の第3の態様では、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体をコードする核酸を提供する。

【0055】

「核酸」という用語は、一本鎖及び二本鎖の核酸及びリボ核酸、並びに、デオキシリボ核酸を含む。それは、天然並びに合成のヌクレオチドを含み得る。核酸は、例えばメチル化、5'-及び／又は3'-キャッピングによって天然的に又は合成的に修飾されていてもよい。

【0056】

50

本発明による核酸の核酸配列は、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体をコードするのに適した任意のヌクレオチド配列を有し得る。しかし、好ましくは、核酸配列は、本発明による核酸を発現させようとする宿主細胞又は生物の特定のコドン使用頻度に少なくとも部分的に適応したものである。本発明による核酸は、二本鎖又は一本鎖DNA又はRNA、好ましくは二本鎖DNA、例えばcDNA又は一本鎖RNA、例えばmRNAであり得る。それは、1つの連続的な核酸分子であり得るか、又は、それは、各々が本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体の異なる部分をコードしているいくつかの核酸分子から構成され得る。

【0057】

本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体が一本鎖構築物である場合、本発明による核酸は、好ましくは、完全抗体又はそのフラグメント又はその誘導体をコードするコード領域を含有する単一の核酸分子である。本発明による抗体又はそのフラグメント又はその誘導体が、2つ以上のアミノ酸鎖から構成される場合、本発明による核酸は、例えば、別々のアミノ酸鎖を生じるためにIRES配列などの調節配列によって好ましくは隔てられているいくつかのコード領域（各々が、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体のアミノ酸鎖の1つをコードしている）を含有する単一の核酸分子であってもよいし、又は、本発明による核酸は、いくつかの核酸分子（各核酸分子は、各々が、抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体のアミノ酸鎖の1つをコードしている1つ以上のコード領域を含む）から構成されていてもよい。本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体をコードするコード領域の他に、本発明による核酸はまた、例えば、他のタンパク質をコードし得るか、コード領域（群）の転写及び／又は翻訳に影響を及ぼし得るか、核酸の安定性又は他の物理的若しくは化学的特性に影響を及ぼし得るか、あるいは全く機能を有さない可能性がある、さらなる他の核酸配列又は他の修飾を含み得る。

【0058】

本発明の第4の態様は、本発明による核酸及び該核酸と作動可能に接続されたプロモーターを含む、発現カセット又はベクターに関する。

【0059】

「発現カセット」という用語は好ましくは、核酸構築物に導入されたコード核酸配列の発現を可能としかつ調節することのできる、該核酸構築物を指す。発現カセットは、プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー、及び遺伝子の転写又はmRNAの翻訳を調節する他の制御配列を含み得る。発現カセットの正確な構造は、種又は細胞型の関数として変化し得るが、一般的には、それぞれ転写及び翻訳の開始に関与する5'-非転写配列並びに5'-及び3'-非翻訳配列、例えばTATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などを含む。より具体的には、5'-非転写発現制御配列は、作動可能に接続された核酸の転写制御のためのプロモーター配列を含む、プロモーター領域を含む。発現カセットはまた、エンハンサー配列又は上流アクチベーター配列も含み得る。

【0060】

本発明によると、「プロモーター」という用語は、発現させようとする核酸配列の上流（5'）に位置し、RNAポリメラーゼのための認識部位及び結合部位を与えることによって該配列の発現を制御する、核酸配列を指す。「プロモーター」は、遺伝子の転写の調節に関与するさらに他の因子のための認識部位及び結合部位をさらに含み得る。プロモーターは、原核生物又は真核生物の遺伝子の転写を制御することができる。さらに、プロモーターは「誘導性」であり得、すなわち、誘導作用物質に応答して転写を開始し得るか、又は、転写が誘導作用物質によって制御されない場合には「構成性」であり得る。誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導作用物質が存在しない場合には、発現されないか、又は僅かな程度で発現されるだけである。誘導作用物質の存在下では、該遺伝子はスイッチがオンとなるか、又は転写レベルが上昇する。これは、一般的に、特定の転写因子の結合によって媒介される。

【0061】

「ベクター」という用語は、本明細書において、その最も一般的な意味において使用され、前記核酸が例えば原核細胞及び／又は真核細胞に導入されることを可能とし、そして適宜、ゲノムに組み込まれることを可能とする、核酸のための任意の媒介ビヒクルを含む。この種のベクターは、好ましくは、細胞内で複製及び／又は発現される。ベクターは、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ、又はウイルスゲノムを含む。本明細書において使用される「プラスミド」という用語は、一般的に、染色体DNAとは独立して複製することのできる、染色体外遺伝子材料の構築物、通常、環状DNA二本鎖に関する。

【0062】

本発明による核酸及びプロモーターに加えて、本発明による発現カセット又はベクターは、さらに他の要素、特に、本発明による核酸の転写及び／又は翻訳、発現カセット又はベクターの増幅及び／又は複製、宿主細胞のゲノムへの発現カセット又はベクターの組み込み、並びに／あるいは宿主細胞内の発現カセット又はベクターのコピー数に影響を及ぼすことのできる及び／又は調節することのできる要素を含み得る。抗体を発現させるために適切な発現カセット、及びそれぞれの発現カセットを含むベクターは、当技術分野において周知であり、したがって、さらなる説明をここで必要としない。

【0063】

第5の態様では、本発明は、本発明による核酸又は本発明による発現カセット若しくはベクターを含む、宿主細胞に関する。

【0064】

本発明によると、「宿主細胞」という用語は、外的な核酸を用いて形質転換又はトランスフェクトされ得る任意の細胞を指す。「宿主細胞」という用語は、原核細胞（例えば大腸菌（*E. coli*））又は真核細胞（例えば、哺乳動物細胞、特にヒト細胞、酵母細胞及び昆虫細胞）を含む。特に好ましいのは、哺乳動物細胞、例えばヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、又は霊長類に由来する細胞である。該細胞は、複数の組織型から得ることができ、かつ初代細胞及び細胞株を含み得る。核酸は、単一コピー又は2つ以上のコピーの形態で宿主細胞内に存在し得、1つの実施態様では、宿主細胞内で発現される。

【0065】

本発明による宿主細胞は、任意の宿主細胞であり得る。それは、単離された細胞であっても、又は、組織内に含まれる細胞であってもよい。好ましくは、宿主細胞は培養細胞であり、特に初代細胞又は樹立された細胞株の細胞である。好ましくは、それは細菌細胞、例えば大腸菌、酵母細胞、例えばサッカロマイセス（*Saccharomyces*）（特に、出芽酵母（サッカロマイセス・セレビシエ））細胞、昆虫細胞、例えばSf9細胞、又は哺乳動物細胞、特にヒト細胞、ハムスター細胞、例えばCHO細胞、又は霊長類細胞である。好ましい実施態様では、宿主細胞は、特定のグリコシル化パターンを有する糖タンパク質、特に抗体の発現のために最適化される。好ましくは、本発明による核酸のコード領域並びに／又は発現カセット若しくはベクターのプロモーター及びさらなる他の配列におけるコードン使用頻度は、使用される宿主細胞の種類と適合性であり、より好ましくはそのために最適化されている。好ましくは、本発明による抗体又はそのフラグメント又はその誘導体は、上記のように、宿主細胞又は細胞株によって産生される。

【0066】

第6の態様において、本発明はまた、本発明による抗体、若しくはそのフラグメント、若しくはその誘導体、本発明による核酸、本発明による発現カセット若しくはベクター、又は、本発明による宿主細胞、並びに場合により、担体、溶媒、希釈剤、及び賦形剤、例えば緩衝液、保存剤、又は浸透圧調節剤からなる群より選択された1つ以上の成分を含む、組成物（好ましくは医薬組成物）を提供する。

【0067】

該組成物はまた、2つ以上の記載の各成分を含有し得る。本発明による好ましい医薬組成物では、全ての成分が薬学的に許容される。該組成物は、固体又は流動性の組成物、特に溶液（好ましくは水溶液）、エマルション、又は懸濁液、又は凍結乾燥粉末であり得る

。

【0068】

「医薬組成物」という用語は特に、患者に投与するのに適した組成物、すなわち、薬学的に許容される成分を含有する組成物を指す。

【0069】

「患者」という用語は、本発明によると、ヒト、非ヒト霊長類、又は別の動物、特に哺乳動物、例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、又はげっ歯類、例えばマウス及びラットを意味する。特に好ましい実施態様では、患者はヒトである。

【0070】

第7の態様では、本発明は、医薬に使用するための、本発明による抗体、若しくはそのフラグメント、若しくはその誘導体、本発明による核酸、本発明による発現カセット若しくはベクター、本発明による宿主細胞、又は、本発明による（好ましくは医薬）組成物を提供する。

10

【0071】

第8の態様では、本発明は、神経学的疾患若しくは神経変性疾患の処置、予後予測、診断、及び／若しくはモニタリングに、又は神経保護剤として使用するための、本発明による抗体、若しくはそのフラグメント、若しくはその誘導体、本発明による核酸、本発明による発現カセット若しくはベクター、本発明による宿主細胞、又は、本発明による（好ましくは医薬）組成物を提供する。

【0072】

「処置」という用語は、それを必要とする患者の生理学的疾患を予防、低減、軽減、又は治癒するためのあらゆる医学的措置を指す。

20

【0073】

本明細書において使用される「神経学的疾患」という用語は、被験体の神経系の正常な機能遂行又は解剖所見に直接的に又は間接的に影響を及ぼす、疾病、疾患、又は容態として定義される。

【0074】

本発明の文脈において、「神経変性疾患」という用語は、中枢神経系又は末梢神経系の細胞が冒されている又は失われている、疾病として定義される。

【0075】

好ましくは、神経学的疾患又は神経変性疾患は、多発性硬化症、血栓性疾患、脳卒中、一過性脳虚血発作、脳内出血（出血性脳卒中を含む）、癲癇、側頭葉癲癇（TLE）、筋萎縮性側索硬化症、脳腫瘍、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳浮腫、寄生虫感染、細菌感染、真菌感染又はウイルス感染から生じた中枢神経系の合併症、髄膜炎、及び脳炎からなる群より選択される。特に好ましい神経学的疾患又は神経変性疾患は多発性硬化症である。

30

【0076】

神経学的疾患及び／又は神経変性疾患の例はまた、外傷性脳損傷、脊髄損傷、頭蓋内病変、又は脊椎内病変（脊髄の挫傷、穿通、剪断、圧迫、若しくは断裂病変、又はむち打ち症乳児症候群を含むがこれに限定されない）である。

40

【0077】

本発明の文脈において、神経学的疾患はまた、例えばこの領域における血管の遮断又は閉塞によって引き起こされる不十分な血液供給（循環）に通常起因する、細胞又は組織内における任意の局所的又は限局的な低酸素状態として定義することのできる、虚血事象、又は虚血、又は虚血疾患を含む。

【0078】

低酸素症は、脳血管不全、脳内虚血又は脳梗塞（塞栓性閉塞及び血栓症から派生した脳内虚血又は脳梗塞を含む）、網膜虚血（糖尿病性、又は別の原因で、例えば、急性血管閉塞によって、特に急性血管閉塞後の視神経の障害によって）、緑内障（特に、緑内障における視神経の障害）、網膜変性、多発性硬化症、虚血性視神経症、急性脳虚血後の再灌流

50

、出生時低酸素性虚血性損傷、又はあらゆる種類の頭蓋内出血（硬膜外、硬膜下、くも膜下、又は脳内出血を含むがこれらに限定されない）を含むがこれらに限定されない低酸素症及び／又は虚血時のような急性又は慢性の損傷を引き起こし得る。

【0079】

したがって、「虚血性疾患」という用語は、血栓症又は血栓症の傾向に伴う又はそれから生じた容態を含む、血栓性疾患を包含する。これらの容態は、血栓溶解薬を用いて処置することのできる動脈又は静脈の血栓症に伴う容態を含む。

【0080】

本発明はまた、治療有効量の本発明による抗体、若しくはそのフラグメント、若しくはその誘導体、本発明による核酸、本発明による発現カセット若しくはベクター、本発明による宿主細胞、又は本発明による（好ましくは医薬）組成物を、それを必要とする患者に投与することによる、神経学的疾患又は神経変性疾患の処置法に関する。

10

【0081】

「治療有効量」は、神経学的疾患又は神経変性疾患、例えば多発性硬化症などに伴う症状を低減させるであろう活性成分の量として定義される。「治療に有効な」はまた、処置をしない場合と比較して、疾患の重度又は発症の頻度におけるなんらかの改善を指す。

【0082】

疾病の診断、予後予測、及び／又はモニタリングにおける検出剤としての使用のために、本発明による抗体、又はそのフラグメント、又はその誘導体を、好ましくは、検出可能なシグナルを発生することのできる標識化剤に結合させる。特に、該標識化剤は、放射性核種、フルオロフォア、又は酵素であり得る。

20

【0083】

さらなる態様では、本発明は、神経学的疾患又は神経変性疾患の処置のための第2の作用物質（第2の作用物質は代替的には神経保護剤であってもよい）と一緒に併用療法において（好ましくは、上記に定義したような神経学的疾患又は神経変性疾患、特に多発性硬化症の併用療法）において第1の作用物質としての使用のための、本発明による抗体、若しくはそのフラグメント、若しくはその誘導体、本発明による核酸、本発明による発現カセット若しくはベクター、本発明による宿主細胞、又は本発明による（好ましくは医薬）組成物を提供する。

【0084】

第1の作用物質及び第2の作用物質は単一の組成物内に存在していても、又は、2つの異なる組成物で同時に又は順次投与されてもよい。

30

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】図1は、ラットNR1-1aサブユニットに由来する、重複している各々15アミノ酸のペプチドを用いてモノクローナル抗体15a4b2e5及び15a4b2の結合エピトープをマッピングした後に得られた結果を示す。レーン1は精製された抗体15a4b2に対応し、レーン2は精製された抗体15a4b2e5に対応し、レーン3は、ハイブリドーマ15A4B2E5から得られた上清に対応する。該抗体はペプチド「110」から「113」を認識することが分かる。さらなる詳細を実施例4に記載する。

40

【図2】図2は、実施例5に記載のようなNMDA+/-t-PA+/-モノクローナル抗体15a4b2e5を用いて実施されたインビボでの神経毒性アッセイの結果を示す。モノクローナル抗体15a4b2e5は、t-PAによるNMDA神経毒性の増強を遮断し、また外的t-PAの非存在下におけるNMDA神経毒性も遮断することが分かる。

【図3】図3は、モノクローナル抗体15a4b2e5が、実施例6に記載のように、細胞培養液中のt-PAの作用を遮断することを示す。モノクローナル抗体15a4b2e5は、受容体の基礎活性を改変させることなく、インビトロでt-PAにより促進されたNMDA受容体シグナル伝達を防ぐ。上のパネルはニューロン死滅に対する作用を示す。下のパネルはカルシウム流入に対する作用を示す。

【図4】図4は、モノクローナル抗体15a4b2e5が、実施例7に記載のように、マ

50

ウスの実験的自己免疫性脳炎（EAE）における臨床スコアの大きな低減を引き起こすことを示す。

【図5】図5は、モノクローナル抗体15a4b2e5が、実施例8に記載のようにシナプス外NMDA受容体の拡散の遮断をもたらすことを示す。

【図6】図6、7及び8は、実施例9に記載のように、抗体15a4b2e5を用いて処置した場合、及び処置しない場合の、脱髄、細胞浸潤、及び炎症について染色されたEAEモデルマウスの胸部部分を示す。

【図7】図6、7及び8は、実施例9に記載のように、抗体15a4b2e5を用いて処置した場合、及び処置しない場合の、脱髄、細胞浸潤、及び炎症について染色されたEAEモデルマウスの胸部部分を示す。

【図8】図6、7及び8は、実施例9に記載のように、抗体15a4b2e5を用いて処置した場合、及び処置しない場合の、脱髄、細胞浸潤、及び炎症について染色されたEAEモデルマウスの胸部部分を示す。

【図9】図9及び10は、実施例10に記載のように、単球及びTーリンパ球が血液脳関門のモデルを横断して遊出するその作用について、抗体15a4b2e5を試験した結果を示す。

【図10】図9及び10は、実施例10に記載のように、単球及びTーリンパ球が血液脳関門のモデルを横断して遊出するその作用について、抗体15a4b2e5を試験した結果を示す。

【0086】

実施例

実施例1：ハイブリドーマ15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4及び6C9A3F6、並びにモノクローナル抗体15a4b2e5、15a4b2f3、15a4b2、6c9a3、6c9a3f4及び6c9a3f6の作製

ラットNMDA受容体のNR1-1a（GluN1-1a）サブユニットのポリヒスチジンでタグ化されたアミノ末端ドメイン（rATD-NR1、アミノ酸19～371（他のグルタミン酸受容体サブユニットには存在せず、t-PAとの相互作用のドメインに相当する配列））を、Benchenane et al.（2007）に記載のように組換え的に作製した。NTDに相当するアミノ酸19～371をコードするNR1-1aサブユニットの領域を、以前に記載されているように（Fernandez-Monreal et al., 2004）完全長のラットNR1-1a cDNAから増幅した。組換えタンパク質を、製造業者（Qiagen, Courtaboeuf, France）によって記載のように、ニッケルアフィニティマトリックス上でイソプロピル1-チオ-D-ガラクトピラノシドにより誘導された細菌培養液（大腸菌、M15株）の封入体から精製した。

【0087】

産物をBALB／Cマウスのための免疫原として使用して、マウスポリクローナル抗体を作製した。

【0088】

1つの標的につき3匹のマウスを免疫化した。各マウスは融合前に免疫原の3回の注射及び1回の最後のブーストを受け；2つの異なるアジュバントであるRIBIアジュバント及びミョウバンを使用した。

【0089】

血液検査を、免疫化から25日後及び40日後に実施して、間接ELISAによって抗体力価を決定することによって融合のためのマウス候補を選択した。脾臓細胞を、選択したマウスから単離した。

【0090】

ハイブリドーマ細胞を、TeMo TecanロボットでSP2／O-Ag14骨髓腫細胞との自動化された融合によって作り出した。融合後、TeMo Tecanロボットでの自動工程で、20個の96穴プレート上に細胞を播種し、培養した。ハイブリドーマ細胞を、選択化合物と

10

20

30

40

50

してアザセリンを含有する標準的な選択培地で培養した。ハイブリドーマ増殖の評価及び融合率の決定は、顕微鏡による検査下で行なった。

【0091】

ハイスループット一次スクリーニングを、ベイトとしてG l u N 1のラットアミノ末端ドメインの組換え形を使用して、間接E L I S Aによって実施した。

【0092】

以下の抗原に対してI g G及びI g Mを分泌しているクローンのスクリーニングを実施した：免疫原、陰性のポリヒスチジンでタグ化されたタンパク質、N M D A受容体陽性細胞膜、及び対照のN M D A受容体陰性細胞膜。

【0093】

E L I S Aによる一次スクリーニング後、94個のクローンが陽性シグナルを呈し；選択された94個のクローンの中でも、2個の陽性クローンがさらに、間接E L I S Aによって確認された。これらの2個のクローンを凍結させ（各々1個のバイアルに）、標準的な限界希釈法によってサブクローニングして、15A4B5及び6C9A3サブクローンを作製した。これらの2個のサブクローンを凍結させ（2個のバイアル／クローン）、再度サブクローニングして、サブクローン15A4B2E5及び15A4B2F3並びに6C9A3F4及び6C9A3F6を作製した。これらの最終のサブクローンを凍結させた（各々5個のバイアルに）。

【0094】

ニューロンに関する機能的検査を以下のように実施した：

【0095】

（a）インビトロにおける興奮毒性

急速にトリガーされる興奮毒性を、単独で又はr t - P A（20 µg/ml）及び／又はα A T D - G l u N 1又は対照I g（0.01mg/ml）と組み合わせて、ニューロンを50 µmol/lのN M D Aに1時間曝し、細胞を無血清培地に戻すことによって誘導した。ニューロン死滅を24時間後に、乳酸デヒドロゲナーゼの遊離（Roche）によって定量した。

【0096】

（b）カルシウムビデオ顕微鏡

培養皮質ニューロン中へのN M D Aにより惹起されたカルシウム流入を、以前に記載されているように記録した（Nicole et al., 2001）。詳細には、細胞培養液に、5 µM f u r a - 2 / a m + 0.1%プルロニックF-127（Molecular Probes, Leiden, the Netherlands）中f u r a - 2（30分間、室温）をローディングし、さらに30分間の期間かけてH E P E S緩衝化食塩水溶液中でインキュベートした。実験を室温で、75 Wのキセノンランプ及びニコンの40倍で開口数が1.3の蛍光液浸オイル対物レンズの具備されたニコンE c l i p s e倒立顕微鏡のステージ上で実施した。F u r a - 2（励起340、380nm、発光：510nm）のレシオイメージ(ratio image)をC C Dカメラ（Princeton Instrument, Trenton, New Jersey）を用いて取得し、Metafluor 4.11ソフトウェア（Universal Imaging Corporation, Chester, Pennsylvania）を使用してデジタル化した（256×512ピクセル）。ニューロンをN M D A（50 µmol/l）のみを用いて、あるいは、r t - P A（20 µg/ml）及び／又はα A T D - G l u N 1又は対照I g（0.01mg/ml）の存在下で30分間処理した後に処理した。

【0097】

実施例2：ハイブリドーマ15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4及び6C9A3F6の特徴

ハイブリドーマ15A4B2E5、15A4B2F3、15A4B2、6C9A3、6C9A3F4及び6C9A3F6をD S M Z（Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Germany）に寄託し、アクセッション番号D S M A C C 3 2 0 3（受託日2013年5月29日）、D S M A C C 3 2 1 7（受託日2013年9月25日）、D S M A C C 3 2 1 6（受託日2013年9月25日）、D S M A C C 3 2 1 4（受託日2013年

10

20

30

40

50

9月25日)、DSM ACC 3200 (受託日2013年5月29日)、及びDSM ACC 3215 (受託日2013年9月25日)がそれぞれ付与された。寄託者は、パイオン・ドイチュラント・ゲーエムベーハー (Martinstrasse 10-12, D-52062 Aachen, Germany) 及びインセルム (101 rue de Tolbiac, F-75013 Paris, France) であり、そのユニットであるINSERM-UCBN、UMR-S U919、GIP CYCERON (Boulevard Henri Becquerel, BP 5229-14074 Caen Cedex, France) を通して手続きした。

【0098】

これらの全てのハイブリドーマは、アイソタイプ IgG2 (κ 軽鎖) の抗体を産生する。

【0099】

適切な培養条件は以下の通りである。

【0100】

培養培地：10% FCS の補充された DMEM (グルタミン及びピルビン酸ナトリウムを含む 4.5 g/l) 参照番号 PAA E15-843；5～10% CO₂ で 37℃ のインキュベーター中で培養；37℃ の水浴中で細胞を数秒間かけて解凍し、角氷を、予熱した培地 30 ml (37℃) に移し；遠心分離後 (1200 rpm で 7 分間)、細胞を予熱培養培地 10 ml (37℃) 中に再懸濁し、T25 cm² フラスコ中に移し；フラスコをインキュベーター中に水平にして置き；細胞を月曜日及び水曜日に 1：5 に分割し；金曜日に 1：10 に分割する。

【0101】

ゲンタマイシン 0.1 mg/ml を使用し得る。

【0102】

実施例 3：モノクローナル抗体 15a4b2e5 の重鎖及び軽鎖の可変領域配列の決定

1. mRNA の抽出及び逆転写

15A4B2E5 クローンを使用した。

【0103】

全 RNA を、指数関数期の細胞から RNA bleed (登録商標) 試薬を用いて三通り (A、B、C) ハイブリドーマから抽出した。

【0104】

試料を、DNAアーゼ 1 を用いて処理し、ゲノム DNA の全ての痕跡を除去した。cDNA を、最終容量 40 µl (様々な PCR 反応を実現するのに必要な容量) 中で DNAアーゼ 1 で処理された RNA 2 µl から、オリゴ d (T) から合成して、mRNA の全ての鎖を逆転写した。同じ条件下であるが逆転写酵素 (RT) を用いずに処理された試料は、PCR においてゲノム DNA が存在しないことを確認するための対照としての役目を果たした。

【0105】

2. A、B、C の cDNA の PCR 増幅

15a4b2e5 の VH 及び VL の遺伝子セグメントを、Lefranc and Lefranc, 1997 によって記載の増幅条件 (T℃ ハイブリダイゼーションサイクル) を使用して PCR によって増幅した。

【0106】

増幅産物を、試料をのせた後に 0.1% Gel Red (商標) (INTERCHIM、参照番号：41003、ロット番号 12G0509) を含有する 1% アガロースゲル (Life Technologies、参考番号：AM9046、ロット番号 1205021) 上で可視化した：5 µl の PCR 産物/ウェル。100 bp のマーカー (Life Technologies、参考番号：15628-019、ロット番号 954661) 及びマーカー定量化 Low DNA Mass (商標) Ladder (Life Technologies、参考番号：10068-013、ロット番号 1169490) 0.5 µg/ウェル。

【0107】

3. シークエンス

10

20

30

40

50

増幅産物の配列を、標準的な技術によって決定した。

【0108】

実施例4：モノクローナル抗体15a4b2e5及び15a4b2の結合エピトープのマッピング

1. 実施例1の免疫原の全配列を網羅している15アミノ酸長を有する重複しているペプチドをスポット合成した。スポット膜を、精製されたモノクローナル抗体15a4b2及び15a4b2e5（各々1 µg/ml）と共に、並びにハイブリドーマ15A4B2E5から得られた上清と共にインキュベートした。

【0109】

3アミノ酸のオフセットを有するGluN1のラットアミノ末端ドメインの完全配列（アミノ酸19～371）に重複している一連のペプチド（各々15アミノ酸）をイムノブロットアッセイに使用した。 10

【0110】

結果を図1に示す。

【0111】

レーン1は精製された抗体15a4b2に対応し、レーン2は精製された抗体15a4b2e5に対応し、レーン3はハイブリドーマ15A4B2E5から得られた上清に対応する。

【0112】

ペプチド91～120についてのデータのみが示されている。図1に示されていないペプチドは、バックグラウンドシグナルのみを生じた。以下の表は、ペプチド91～120の配列を示す。 20

【0113】

【表 1】

91	YTAGFYRIPVLGLTT
92	GFYRIPVLGLTTRMS
93	RIPVLGLTTRMSIYS
94	VLGLTTRMSIYSDKS
95	LTTRMSIYSDKSIHL
96	RMSIYSDKSIHLSFL
97	IYSDKSIHLSFLRTV
98	DKSIHLSFLRTVPPY
99	IHLSFLRTVPPYSHQ
100	SFLRTVPPYSHQSSV
101	RTVPPYSHQSSVWFE
102	PPYSHQSSVWFEMMR
103	SHQSSVWFEMMRVYN
104	SSVWFEMMRVYNWNH
105	WFEMMRVYNWNHIL
106	MMRVYNWNHIILLVS
107	VYNWNHIILLVSDDH
108	WNHIILLVSDDHEGR
109	IILLVSDDHEGRAAQ
110	LVSDDEHGRAAQKRL
111	DDHEGRAAQKRLETL
112	EGRAAQKRLETLLEE
113	AAQKRLETLLEERES
114	KRLETLLEERESKAE
115	ETLLEERESKAEKVL
116	LEERESKAEKVLQFD
117	RESKAEKVLQFDPGT
118	KAEEKVLQFDPGTKNV
119	KVLQFDPGTKNVTAL
120	QFDPGTKNVTALLME

10

20

30

【0114】

図1に見られるスポットは、試験された抗体がペプチド110～113を認識し、一方ペプチド91～109及びペプチド114～120はバックグラウンドシグナルのみを生じたことを示す。

40

【0115】

2. 野生型としての又は代替的にはその各アミノ酸に1つの点突然変異を含有するかのいずれかである、1において同定された最も反応性の高いペプチドを含む、類似の実験を反復した。

【0116】

この実験は、上記の1. で得られた結果を確認した。

【0117】

上記の1. に記載のようなエピトープマッピング実験はまた、ハイブリドーマ6C9A3F4及び6C9A3からの上清を用いても実施した。結果は同等であった。

【0118】

50

実施例 5. モノクローナル抗体 15a4b2e5 による NMDA 神経毒性の抑制

雄スイスマウス (25~30 g; CURB, Caen, France) において興奮毒性病変をイソフルラン誘発麻酔下で実施した。10 nmol NMDA の線条体への注射 (座標: 十字縫合に対して 0.5 mm 後方、+2.0 mm 外側、-3.0 mm 腹部) を定位固定フレームの下に動物を配置した後に実施した。同時に、t-PA (10 mg/kg) を単独で又は抗体 15a4b2e5 (160 µg) と組み合わせてのいずれかで静脈内注射した。陰性クローンからの対照 IgG を対照として使用した。24 時間後、脳を回収し、イソペンタン中で凍結させ、クリオスタットで切断し (20 µm の切片)、チオニンで染色し、分析した。結果を図 2 に示す。

【0119】

病変の容積を、棒として示す (棒 1: NMDA のみ、棒 2: NMDA + t-PA、棒 3: NMDA + t-PA + モノクローナル抗体 15a4b2e5、棒 4: NMDA + モノクローナル抗体 15a4b2e5)。

【0120】

棒 1 は、NMDA により誘発される神経毒性を示す。棒 2 は、t-PA によってブーストされる NMDA により誘発される神経毒性を示す。棒 3 は、NMDA により誘発される神経毒性のブーストの抗体による抑制を示す。棒 4 は、NMDA により誘発された神経毒性の抗体による阻害を示す (内因性 t-PA の拮抗作用)。

【0121】

棒のサイズの比較は、以下を示す：

棒 1 対棒 2: t-PA は、NMDA の神経毒性を増強する。

棒 2 対棒 3: モノクローナル抗体 15a4b2e5 は、t-PA の有害な作用を遮断する。

棒 1 対棒 3、及び棒 1 対棒 4: 抗体の作用は、t-PA による障害の遮断を超える；それはまた、NMDA の有害な作用も低減させ、これは、内因性 t-PA の拮抗作用によって説明される。したがって、モノクローナル抗体 15a4b2e5 は、t-PA によって誘発された病変の増強を遮断し、また、外的 t-PA の非存在下においても有益である。このことは、例えば、本発明の抗体が、独立型の薬物としての可能性を有することを示す。

【0122】

ハイブリドーマの 6C9A3 のファミリーによって産生される抗体は、類似の作用を示した。

【0123】

実施例 6: 細胞培養液中のモノクローナル抗体 15a4b2e5 による t-PA 作用の遮断

結果を図 3 に示す。

【0124】

図 3 A (図 3 の上のパネル) は、興奮毒性の評価を示す。以前に記載されているように (Nicole et al., 2001) インビトロで 12~14 日間維持したマウス皮質ニューロンの初代培養液 (E16) を研究した。完全なニューロン死滅は、トリトン X100 への曝露を用いての全ニューロンの死滅によって定義された。全ての結果はトリトン X100 に規格化された。

【0125】

ニューロン死滅は、NMDA、t-PA 及びモノクローナル抗体 15a4b2e5 の記載の組合せでのインビトロでの投与後に測定された。使用された濃度は以下の通りであった: t-PA 300 nM、NMDA 12.5 µM、抗体 0.01 mg/ml。

【0126】

左から右に向かって、棒グラフは以下を示す: 対照 (細胞死は無し)、NMDA によって引き起こされた細胞死、t-PA の作用の欠如、NMDA により誘発された細胞死の t-PA によるブースト、抗体単独の作用の欠如、NMDA により誘発された細胞死のブー

10

20

30

40

50

ストの抗体による抑制、及び、NMDA（t-P Aは無し）により誘発された細胞死に対する抗体の影響の欠如。

【0127】

NMDAの非存在下では、t-P Aも抗体も、ニューロン死滅に対して全く影響を及ぼさなかった。NMDAの投与はニューロン死滅を引き起こした。この作用は、NMDAをt-P Aと組み合わせて投与した場合に増強された。抗体の追加の投与は、NMDA単独で見られるレベルまでニューロン死滅を低減させ、このことは、該抗体が、実際のNMDAの作用ではなく、t-P AとNMDA受容体との間の相互作用を遮断したことを示す。これは、t-P Aの非存在下で抗体と一緒にNMDAを投与すると、NMDA単独での投与と同じ程度までニューロンの死滅を引き起こしたという所見によって確認された。このことは、該抗体の作用はt-P Aに依存することを示す。要約すると、該抗体は、NMDAにより誘発される細胞死を増強するt-P Aの能力を抑制したが、NMDA単独の作用には影響を及ぼさなかったことを示す。

10

【0128】

図3B（図3の下のパネル）は、インビトロでのビデオカルシウムイメージングによって得られた結果を示す。t-P Aの濃度は300nMであった。各場合において、100～150個の細胞を調べた；カルシウム応答の曲線下面積を記録し、NMDA曝露（50μM）単独に対して規格化した。

【0129】

図は、4対の棒を示す。各対において、左の棒は、NMDA単独の添加に相当し（対照）、右の棒はt-P A及び／若しくは指定された抗体のさらなる添加（2番目、3番目及び4番目の対）、又はNMDA単独の反復測定（1番目の対）に相当する。

20

【0130】

したがって、4対の棒は左から右へ向かって以下を示す：NMDA対照、t-P AによるNMDAのブースト、効果的な抗体によるt-P Aブーストの遮断、及び、効果の無い抗体によるt-P Aブーストの遮断の欠如。

【0131】

t-P Aは、皮質ニューロンにおいてNMDAにより誘発されたCa²⁺流入を有意に増加させた。この効果は、効果的な抗体を共適用することによって防止された。1つの効果的なクローン及び1つの効果の無いクローンを図3Bに示す。

30

【0132】

ハイブリドーマの6C9A3ファミリーによって産生された抗体は類似の効果を示した。

【0133】

実施例7：EAEマウスモデルにおけるモノクローナル抗体15a4b2e5の効果

マウスに、結核菌（*M. tuberculosis*）4μg（H37Ra, Difco）を含有するCFA（Sigma）中のMOG35-55ペプチド200μgを用いて皮下免疫した。対照動物は、MOGペプチドの代わりにPBSを受けた。全ての動物が、免疫化時及び48時間後に尾静脈への注射によって静脈内に百日咳毒素（Sigma）250ngを受けた。

【0134】

40

動物に、症状の発症後にモノクローナル抗体15a4b2e5又は非関連対照IgGを160μg静脈内に投与した。この処置の効果を、以前に記載されているように（Liu et al., 1998）偽処置動物及び処置動物における臨床スコア曲線平均値によって評価し、MRIを様々な段階で実施した。全ての動物実験を、欧州の規制に従って実施した。

【0135】

マウスをEAEの臨床兆候について毎日検査し、次のようにスコアを付けた（「臨床スコア」）：0、疾病なし；1、ぐったりした尾；2、後肢の脱力；3、完全な後肢の麻痺；4、後肢の麻痺に加えて前肢の麻痺；及び5、瀕死及び死滅。

【0136】

結果を図4に示す。

50

【0137】

上の曲線の四角は、対照マウス（非関連対照 I g G の注射）の結果を示す。下の曲線の菱形は抗体 1 5 a 4 b 2 e 5 を用いて得られた結果を示す。

【0138】

モノクローナル抗体 1 5 a 4 b 2 e 5 は、その初回の注射時から臨床スコア平均値を劇的かつ持続的に低減したことが明らかである。

【0139】

対照群における臨床スコア平均値は、10 日後にそれが約 3.5 の数値に達するまで急勾配で上昇した。対照的に、1 5 a 4 b 2 e 5 処置群における臨床スコア平均値は軽度増加しただけであり、36 日後でさえ（3 回目の注射から 12 日後、モニタリング終了時）約 2 の数値（後肢の脱力）を超えなかった。

10

【0140】

マウスは、注射 1 回あたり、モノクローナル抗体 1 5 a 4 b 2 e 5 又は非関連対照 I g G のいずれか 160 µg を受けた。マウス 1 匹あたりの注射回数は、3 回であった。「1 回目」、「2 回目」及び「3 回目」は、注射を行なった時点を示す。

【0141】

脳炎の徴候は、抗体 1 5 a 4 b 2 e 5 処置群において全く見られなかった。

【0142】

観察された利点は、3 回の単回注射だけで達成され、顕著にはすでに 1 回目の注射でかなりの効果を有していた。3 回の注射は疾病の時間経過の途中に恣意的に行なわれたので、それらは必要以上であったかもしれない。

20

【0143】

異なる状況では、すなわち急性虚血性脳卒中モデルでは、利点のためにただ 1 回の注射が必要とされただけであった。

【0144】

実施例 8：抗体 1 5 a 4 b 2 e 5 は、t-P A により促進されたニューロンのシナプス外 N M D A 受容体の拡散を遮断する

自己免疫疾患である抗 N M D A 受容体抗体脳炎に見られる自己抗体は、シナプス N M D A 受容体の拡散の遮断をもたらすことが知られている (Mikasova et al., 2012)。

【0145】

この実施例では、本発明による抗体の投与後の N M D A 受容体の分布を、本質的に Mikasova et al., 2012 に記載のような単一粒子の追跡及び表面拡散の計算によって調べた。図 5 の右上のパネルは、以下の工程を示す：海馬一次ニューロンを、抗体と共に 37 °C で 10 分間インキュベートし（「A b 10'」）、洗浄し、量子ドットで標識された二次抗体と共に 37 °C で 10 分間インキュベートした（「Q D 10'」）。これにより、G l u N 1 サブユニットの表面が標識された。無作為に選択された樹状領域上の量子ドットを 20 ~ 30 分間モニタリングし（「イメージング 20 ~ 30'」）、その軌跡を分析した。

30

【0146】

図 5 の左上パネルは、1 つの抗 N R 1 抗体（「抗 G l u N 1 A b」）量子ドット（「Q D」）複合体を使用した、N M D A 受容体の N R 1 (= G l u N 1) サブユニットの表面の標識の概略図である。下のパネルは、対照抗体（「対照 A b」；抗 N t e r - N R 1、Alomone labs 製 (A G C - 0 0 1)）又は抗体 1 5 a 4 b 2 e 5（「A b」）のいずれかを用いて追跡された、標識 N M D A 受容体の代表的な軌跡を示す。対照抗体（これは N R 1 (G l u N 1) サブユニットの N 末端を標的化するが、その t-P A 結合部位には標的化しない）は、シナプス（緑の点線で円が描かれている）及びシナプス外の軌跡の両方を含み、N M D A 受容体の膜拡散に影響を及ぼさないことが分かる。これとは対照的に、抗体 1 5 a 4 b 2 e 5（「A b」）は、シナプス外軌跡の欠如によって示されるように、シナプス N M D A 受容体の拡散の選択的遮断をもたらす。理論によって束縛されるものではないが、本発明による抗体の神経保護作用は、神経毒作用を有することが知られている

40

50

、t-P Aにより促進されるシナプスNMD A受容体の拡散を防ぐその能力に関連していると推測される。

【0147】

実施例9：抗体15a4b2e5はミエリン障害を止める

E A Eモデルマウスを抗体15a4b2e5で処置し、脊髄におけるミエリン障害を調べた。

【0148】

図6～8は、E A Eマウスの脊髄の胸部部分の画像を示す。抗体15a4b2e5はミエリンの障害を止めることが分かる。詳細は以下の通りである：

【0149】

図6は、脱髄マーカーとして使用される、ミエリン層由来のタンパク質であるミエリン塩基性タンパク質（「MBP」）がE A E（「E A E」）において検出されるが、抗体15a4b2e5（「E A E + A b」）を用いるとはるかにより少ない程度であることを示す。対応する結果が、E A E（「E A E」）においては顕著であるTリンパ球（「TL」）について示されているが、抗体15a4b2e5（「E A E + A b」）を用いると実質的に存在しない。

【0150】

図7は、E A Eマウス（「E A E」）における、浸潤した小膠細胞（トマトレクチンを用いて検出される）、V C A M（マウスE A Eモデルにおける機能の漸減に関連する、炎症マーカーである血管細胞接着タンパク質）、及びフィブリノーゲン（炎症マーカー）を示す。炎症マーカーは、15a4b2e5により処置されたE A Eマウス（「E A E + A b」）において抑制された。

【0151】

図8は、E A E動物（「E A E」）における浸潤細胞（小膠細胞のマーカーであるトマトレクチン；茶色）及び脱髄（ミエリンマーカーであるエリオクロムシアニンを用いて検出；青色）を有するいくつかの領域を示す。抗体で処置されたE A Eマウス（「E A E + A b」）には脱髄領域又は浸潤物は全く存在しなかった。

【0152】

実施例10：抗体15a4b2e5は、血液脳関門を横断する単球の遊走及びT細胞の遊走を抑制する

抗体15a4b2e5を、インビトロの血液脳関門モデルにおいて（h C M E C / D 3を、コラーゲンで被覆されたCostar Transwellフィルター（孔径0.4 μm；Corning Incorporated）上の2.5 % F C Sを含有する増殖培地中に集密に播種し、4日間増殖させた）、T N F αにより刺激された単球及びT細胞の遊出に対するその影響について試験した。

【0153】

結果を図9（単球）及び図10（T細胞）に示す。抗体15a4b2e5は、血液脳関門を横断するT N F αにより刺激された単球及びT細胞の両方の遊出を抑制した（「T N F α + A b」）。これとは対照的に、対照の免疫グロブリン（「T N F α / I s o 1」、
「T N F α / I s o 2」）はT N F αにより刺激された遊出を抑制しなかった。

【0154】

10

20

30

40

【表 2】

本出願に引用された参考文献

- Benchenane et al., 2005a, *Circulation* 111(17): 2241-2249
- Benchenane et al., 2005b, *Stroke* 36(5): 1065-1070
- Benchenane et al., 2007, *J Cell Sci* 120(Pt 4): 578-585.
- Cammer et al., 1978, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(3): 1554-1558
- Correa et al., 2007, *Neuroimmunomodulation* 14(3-4): 182-187
- Cuzner and Opdenakker, 1999, *J Neuroimmunol* 94(1-2): 1-14
- East et al., 2005, *Am J Pathol* 167(2): 545-554
- Fernandez-Monreal et al., 2004, *J Biol Chem* 279: 50850-50856
- Gleichman et al., 2012, *J Neurosci* 32(32): 11082-11094
- Hardingham and Bading, 2010, *Nat Rev Neurosci* 11: 682-696
- Lu et al., 2002, *J Neurosci* 22(24): 10781-10789
- Manning et al., 2008, *J Neurosci* 28(26): 6670-6678
- Mikasova et al., 2012, *Brain* 135(5): 1606-1621
- Paterson et al., 1987, *Fed Proc* 46(1): 91-96
- Pitt et al., 2000, *Nat Med* 6(1): 67-70
- Reijerkerk et al., 2008, *J Immunol* 181(5): 3567-3574
- Samson et al., Werner et al., 2001, *Ann Neurol* 50(2): 169-180
- Yepes et al., 2009, *Trends Neurosci* 32(1): 48-55
- Zipp et al., 2006, *Neurology* 67(10): 1880-1883

10

20

【表 3】

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	55 326 K

10

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	22
1-2	line	38-41
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Date of deposit	29 May 2013 (29.05.2013)
1-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3203
1-4	Additional Indications	See attachment
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	22
2-2	line	38-41
2-3	Identification of deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Date of deposit	25 September 2013 (25.09.2013)
2-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3217
2-4	Additional Indications	See attachment
2-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

20

30

40

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

3	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:		
3-1	page	22	
3-2	line	38-41	
3-3	Identification of deposit		
3-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	10
3-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
3-3-3	Date of deposit	25 September 2013 (25.09.2013)	
3-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3216	
3-4	Additional Indications	See attachment	
3-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations	
4	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:		
4-1	page	22	20
4-2	line	38-41	
4-3	Identification of deposit		
4-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
4-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
4-3-3	Date of deposit	25 September 2013 (25.09.2013)	
4-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3214	
4-4	Additional Indications	See attachment	
4-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations	30
5	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:		
5-1	page	22	
5-2	line	38-41	
5-3	Identification of deposit		
5-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	40
5-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
5-3-3	Date of deposit	29 May 2013 (29.05.2013)	
5-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3200	
5-4	Additional Indications	See attachment	
5-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations	

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

6	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
6-1	page	22
6-2	line	38-41
6-3	Identification of deposit	
6-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
6-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany
6-3-3	Date of deposit	25 September 2013 (25.09.2013)
6-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3215
6-4	Additional Indications	See attachment
6-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

10

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	21.05.2014
0-4-1	Authorized officer	Todorova, Antoaneta

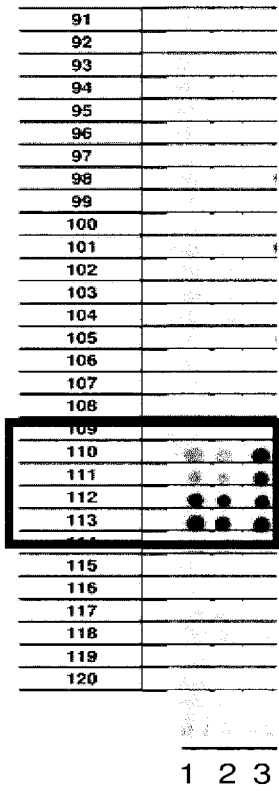
20

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

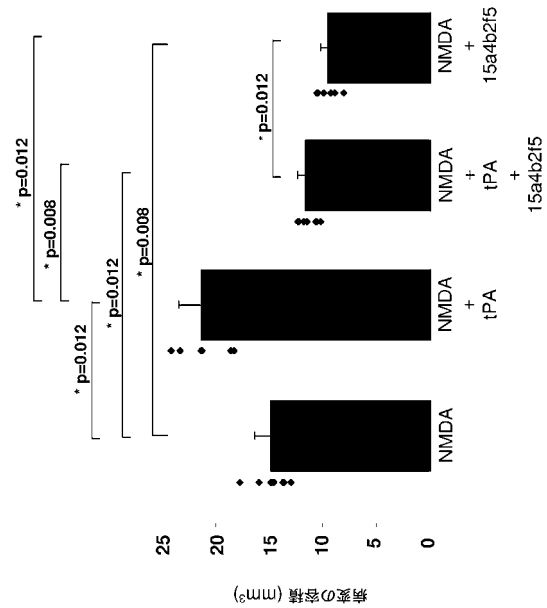
0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

30

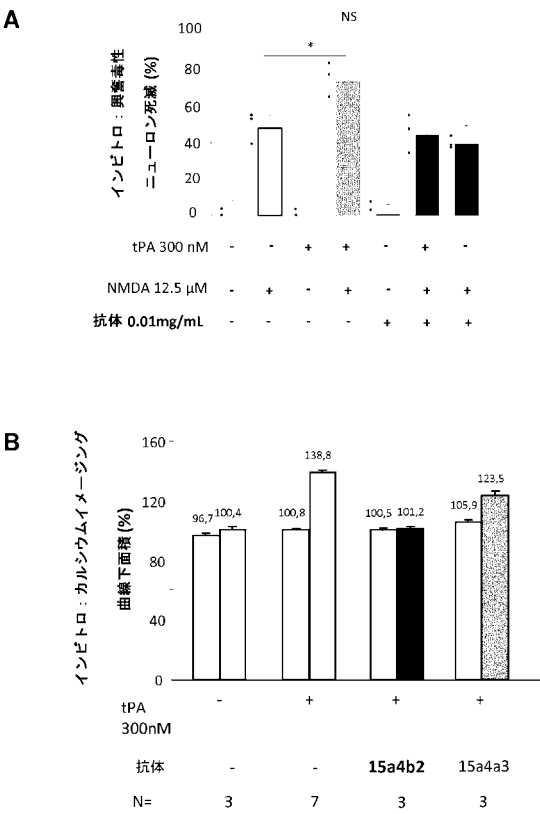
【図 1】



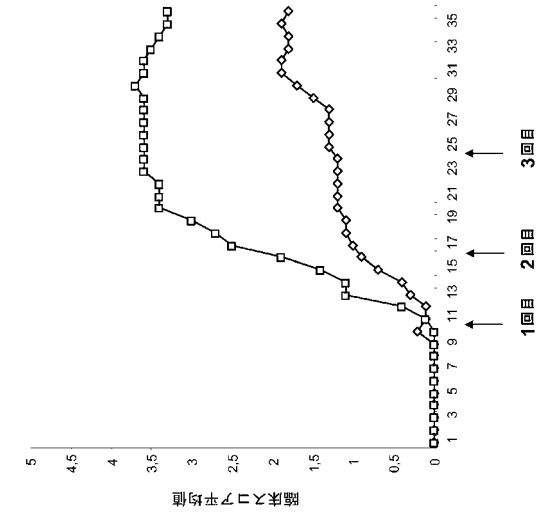
【図 2】



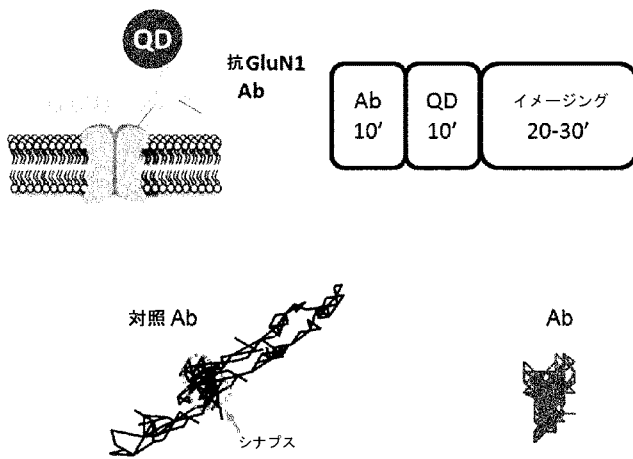
【図 3】



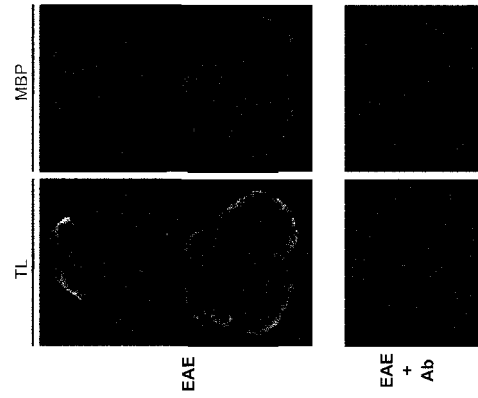
【図 4】



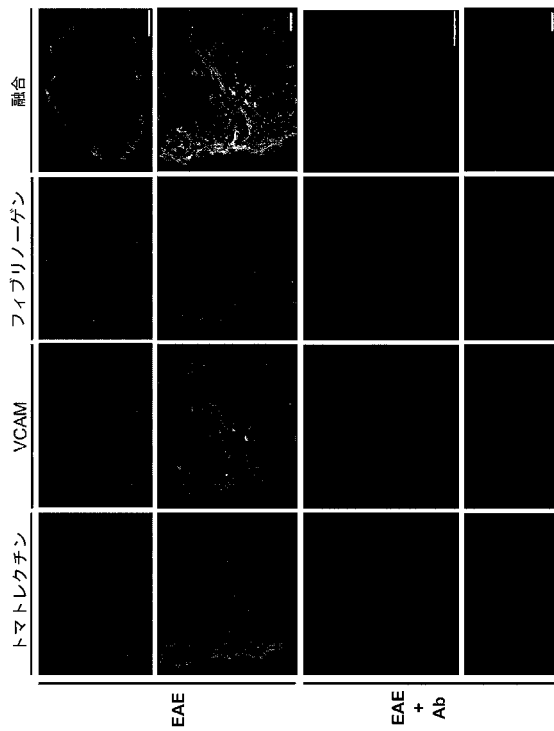
【図 5】



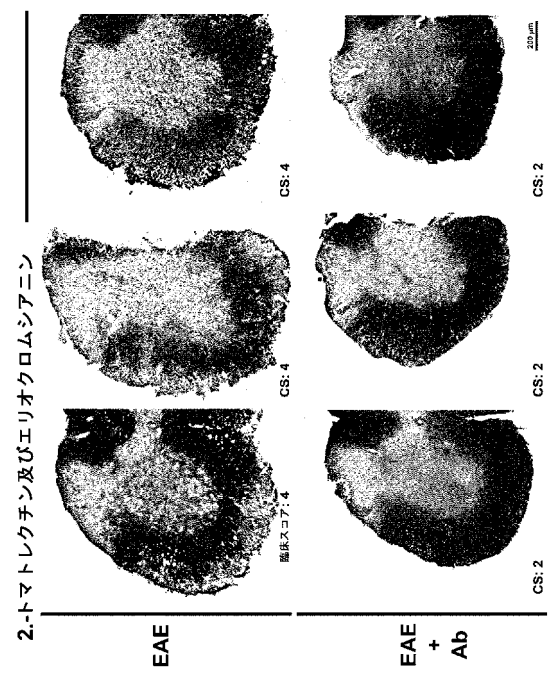
【図 6】



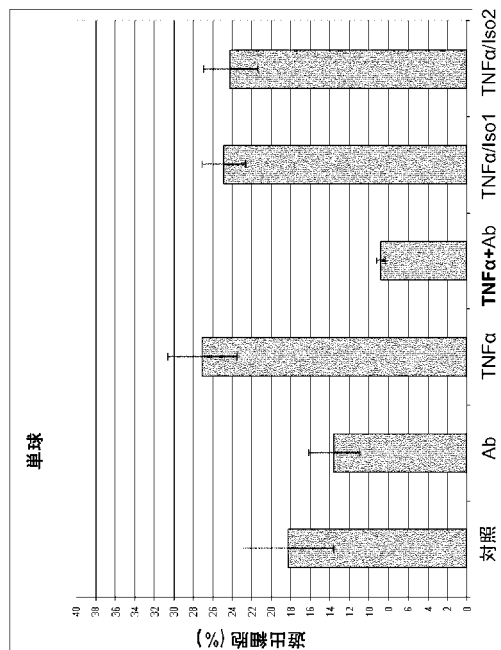
【図 7】



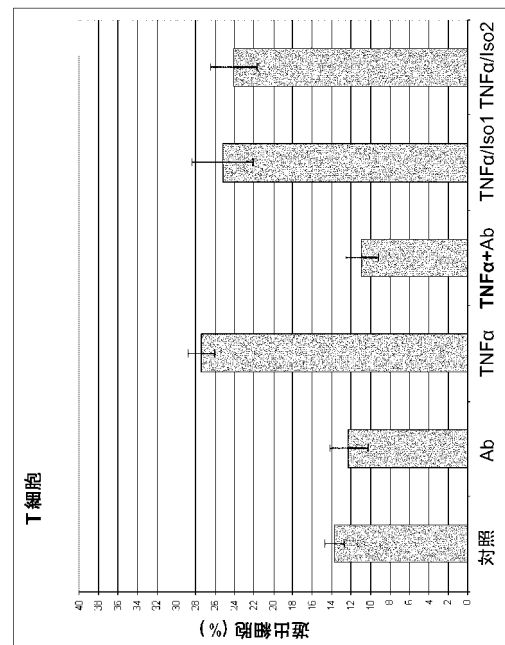
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2019201655000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和1年7月19日 (2019.7.19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	7/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

- (71)出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メディカル
 フランス国、エフー7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1
- (71)出願人 518334716
 ユニヴェルシテ・ドゥ・カーン・ノルマンディー
 UNIVERSITE DE CAEN NORMANDIE
 フランス国、1 4 0 0 0 カーン、エスプラナード・ドゥ・ラ・ペ
- (74)代理人 110001508
 特許業務法人 津国
- (72)発明者 ドカーニュ、ファビアン
 フランス国、エフー7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1、アンセルム
- (72)発明者 マクレス、リシャール
 フランス国、エフー7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1、アンセルム
- (72)発明者 ヴィヴィアン、ドゥニ
 フランス国、エフー7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1、アンセルム
- (72)発明者 ペーターゼン、カール・ウーヴェ
 ドイツ国、5 2 0 6 2 アーヘン、マルティンシュトラッセ 1 0、パイオン・ドイチュラン
 ト・ゲーエムペーハー

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA08
 4B065 AA91X AB01 AB02 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C084 AA13 NA14 ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162
 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA511 ZA512 ZA541 ZA542 ZA941 ZA942
 ZB321 ZB322 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372
 4C085 AA14 CC02 DD62 DD63 EE01 GG01 HH03 HH11 KA04

4C087	AA01	AA02	BC83	NA14	ZA02	ZA06	ZA15	ZA16	ZA33	ZA36
	ZA51	ZA54	ZA94	ZB32	ZB33	ZB35	ZB37			
4H045	AA11	AA30	BA10	DA76	EA21	FA74				

【外国語明細書】
2019201655000001.pdf