

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-535922

(P2018-535922A)

(43) 公表日 平成30年12月6日 (2018.12.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/42 (2006.01)	C O 7 K 16/42 Z N A	4 C O 7 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-509825 (P2018-509825)	(71) 出願人	518054995
(86) (22) 出願日	平成28年8月16日 (2016.8.16)		ドイチェス ツェントルム フュール ノ
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月11日 (2018.4.11)		イロデゲネラティフェ アークランクンゲ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/069451		ン エー. ファウ. (デーツェットエンエ
(87) 国際公開番号	W02017/029299		ー)
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		ドイツ連邦共和国, 5 3 1 2 7 ボン, ジ
(31) 優先権主張番号	15181290.6		ークムントーフロイトーシュトラーセ 2
(32) 優先日	平成27年8月17日 (2015.8.17)		7
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場

(57) 【要約】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場と、それを利用した治療または診断である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に特異的に結合する抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場であって、

前記抗 N M D A R 1 抗体の結合領域が、1以上の配列に含まれ、

前記1以上の配列は、以下の配列：

配列 I D 番号：1 (003-109-HC)

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGDSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHYDFDAFDIWGQGTMTVSS

10

配列 I D 番号：2 (003-109-LC)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVVFGTGTKVTVL

配列 I D 番号：3 (003-102-HC)

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEYHSGNTNYPNPSLKSRTVTVSVDKSKNQFSLKLTSTAAADTAVYYCARDVSGGVNWFDPWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号：4 (003-102-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSTVVFGGGTKLTVL

20

配列 I D 番号：5 (007-168-HC)

VQLVQSGAEAKKPGESLKISCKASGYSFTTFWIGWVRQMPGSGLEWIGIYPGDSDDTRYSPSFQGHVTISADRSTSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSAVFDYWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号：6 (007-168-LC)

EIVMTQSPATLSVSPGGRATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISLQSIEDFAVYYCQYNNWPTSWTFGQGTKVEIK

30

配列 I D 番号：7 (007-169-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDDTRYSPSFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYFDYWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号：8 (007-169-LC)

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTGVFGEETKLTVL

配列 I D 番号：9 (007-124-HC)

EVQLVESGGGVGRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQVPGKGLEWVSGINWSGADTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTALYHCAREVGIAVTGYWFDPWGQGTLLTV

40

配列 I D 番号：10 (007-124-LC)

SYELTQPPSVSVAPGQTARISCGGNHSESVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRVEGGDEAEYYCQVWDSSSDHPGVVFGGGTKLTVL

配列 I D 番号：11 (007-142-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDDTRYSPSFQGVVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYFDYWGQGTLLTVSS

50

配列 I D 番号：12 (007-142-LC)

LTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
DEADYYCCSYAGSYTGVFGGGTKLTVL

配列 I D 番号：13 (008-218-HC)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGKGLEWVSGISWSSSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTALYYCAKDRASSWYAYGMDVWGQGTLLTV

配列 I D 番号：14 (008-218-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYDDNQRPSGVPNRFSGSIDSSSNSASLIISG
LKTEDEADYYCQSTRVFGGGTKLTVL

10

からなる群から選択され、

前記抗体、抗体フラグメント又は非Ig骨格の前記結合領域は、以下の配列：

【表 1】

配列 I D 番号 : 1 5	GFTFSSYG
配列 I D 番号 : 1 6	IWYDGSNK
配列 I D 番号 : 1 7	ARRHYDFDAFDI
配列 I D 番号 : 1 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 1 9	EVS
配列 I D 番号 : 2 0	SSYTSSSTLYV
配列 I D 番号 : 2 1	GGSISSSNW
配列 I D 番号 : 2 2	IYHSGNT
配列 I D 番号 : 2 3	ARDVSGGVNWFD
配列 I D 番号 : 2 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 2 5	EDN
配列 I D 番号 : 2 6	QSYDSSSTV
配列 I D 番号 : 2 7	GYSFTTFW
配列 I D 番号 : 2 8	IYPGSDT
配列 I D 番号 : 2 9	ARSAVFDY
配列 I D 番号 : 3 0	QSVSSN
配列 I D 番号 : 3 1	GAS
配列 I D 番号 : 3 2	QQYNNWPTSWT
配列 I D 番号 : 3 3	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 3 4	IYPGSD
配列 I D 番号 : 3 5	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 3 6	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 3 7	DVS
配列 I D 番号 : 3 8	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 3 9	GFTFDDYG
配列 I D 番号 : 4 0	INWSGADT
配列 I D 番号 : 4 1	AREVGIAVTGYWFD
配列 I D 番号 : 4 2	HSES
配列 I D 番号 : 4 3	DDS
配列 I D 番号 : 4 4	QVWDSSSDHPGVV
配列 I D 番号 : 4 5	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 4 6	IYPGSDT
配列 I D 番号 : 4 7	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 4 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 4 9	DVS
配列 I D 番号 : 5 0	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 5 1	GFTFDDYA
配列 I D 番号 : 5 2	ISWSSGSI
配列 I D 番号 : 5 3	AKDRASSWYAYGMDV
配列 I D 番号 : 5 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 5 5	DDN
配列 I D 番号 : 5 6	QSTRV

10

20

30

40

の1以上を含むか又は1以上からなる、抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場。

【請求項 2】

非Ig足場である、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1に記載の抗体または抗体断片または非Ig足場。

【請求項 3】

50

前記非 I g 足場は、テトラネクチンに基づく非 I g 足場、フィブロネクチン足場、リポカリンに基づく足場、ユビキチン足場、トランスフェリン足場、プロテイン A 足場、アンキリン反復に基づく足場、ミクロプロテイン足場、好ましくはシステインノット（結び目）を形成するミクロプロテイン足場、F y n S H 3 ドメインに基づく足場、E G F R - A ードメインに基づく足場、クニツドメインに基づく足場、アプタマーを含む群から選択されることができる、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 または 2 に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【請求項 4】

前記非 I g 足場がオリゴヌクレオチドアプタマーである、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 3 に記載の非 I g 足場。

10

【請求項 5】

抗 N M D A R 1 抗体の前記結合領域に対する親和性を示し、抗 N M D A R 1 抗体のその結合領域に対する解離定数 K_D が 10^{-7} 未満、好ましくは 10^{-8} 未満であり、好ましい K_D は 10^{-9} 未満、最も好ましくは 10^{-10} 未満である、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【請求項 6】

抗 N M D A R 1 抗体を中和する、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【請求項 7】

単特異性の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場である、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

20

【請求項 8】

抗 N M D A R 1 抗体に関係する疾患または病気の治療を必要とする対象においてその疾患または病気の治療に用いるための、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【請求項 9】

抗 N M D A R 1 抗体に関係する疾患または病気の治療を必要とする対象においてその疾患または病気の治療に用いるための、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場であって、その対象が、体液中に抗 N M D A R 1 抗体の存在を示し、かつ、以下のリスト（括弧内の I C D 番号は、臨床状態を定義する W H O 国際疾病分類を表わしている）にある臨床症状／状態：

30

- うつ病（F 3 2）、精神病症状を伴う躁病（F 3 0. 2）、不安障害（F 0 6. 4）、恐怖症性不安障害（F 4 0）、妄想性障害（F 2 2. 0）、強迫性障害（F 4 2）、器質性気分障害（F 0 6. 3）、緊張病性障害（F 0 6. 1、F 2 0. 2）、急性多形性精神病性障害（F 2 3. 0、F 2 3. 1）、解離性障害（F 4 4）を含む精神異常
- ジスキネジア／ジストニー（G 2 4）、ミオクローヌス（G 2 5. 3）、振戦（G 2 5. 0、G 2 5-1、G 2 5-2）、チック（F 9 5、G 2 5. 6 9）を含む異常運動
- てんかん（G 4 0）
- 低換気（R 0 6. 8 9）
- 軽度認知障害（F 0 6. 7）
- アルツハイマー病型（F 0 0）、梗塞性（F 0 1）、他の疾患（F 0 2）の認知症
- 妊娠

40

を含むグループから選択された少なくとも 1 つの臨床症状または臨床状態を示す場合に、そのような治療を必要とする、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【請求項 10】

対象における抗 N M D A R 1 抗体に関係する請求項 8 または 9 に記載の疾患または病気

50

の治療に用いるため、その治療を必要とする前記対象に生体内投与される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【請求項11】

対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～10のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるため、その治療を必要とする前記対象に静脈内投与される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【請求項12】

対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～11のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるため、その治療を必要とする前記対象の生体外治療で用いられる、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【請求項13】

対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～12のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるための、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、前記対象が、実施例1. 2の方法で測定するとき抗NMDAR1抗体の存在を示す、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【請求項14】

対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～13のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるため、化学療法剤または免疫抑制剤と組み合わせて使用される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【請求項15】

抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～14のいずれか1項に記載の疾患または病気を治療または予防する方法であって、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

【請求項16】

抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～14のいずれか1項に記載の疾患または病気を治療または予防するための薬の製造における、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項17】

血漿交換またはCSF交換（CSF濾過）のための、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場で覆われた装置であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である装置。

【請求項18】

抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場で覆われたカラムである、請求項17に記載の、血漿交換またはCSF交換（CSF濾過）のための、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場で覆われた装置。

【請求項19】

抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を有する対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べるための、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の使用。

【請求項20】

抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を持つ対象が治療を必要とするかどうかを判断するため、その対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べる方法であって、この方法が、

10

20

30

40

50

- ・その対象から得られた体液サンプルを、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場と接触させ、
- ・その体液サンプル中で前記抗 NMDAR 1 抗体の存在を調べることを含んでいて、
- ・そのサンプル中に抗 NMDAR 1 抗体が存在する場合には、その対象が、抗 NMDAR 1 抗体に関係する疾患または病気を有する可能性があり、治療を必要とする可能性がある、方法。

【請求項 21】

治療を必要とする可能性がある対象のサンプル中で抗体の存在を調べるためのキットであって、

- 1) NMDAR 1 結合抗体または NMDAR 1 結合抗体フラグメントまたは NMDAR 1 結合非 I g 足場の混合物が固定化された固体支持体と、
- 2) 標準曲線を求めるための組み換えヒト NMDAR 1 抗体と、
- 3) 定量可能なマーカーと共役した抗ヒト免疫グロブリン抗体

を含むキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明の主題は、抗 N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体-1 抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I G 足場と、それを利用した治療および診断である。

【背景技術】**【0002】**

抗 N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体-1 (抗 NMDAR 1) 抗体脳炎を有する患者は、子どもと若い女性を中心であり、段階を追った特徴的な臨床症状を持つ重篤な形態の脳炎に苦しむ。この脳炎は、精神症状、記憶欠損、てんかん性発作から始まり、意識喪失、自律神経機能障害、ジスキネジア、低換気の状態に至る (DALMAU 他 2011 年 LANCET NEUROL 第 10 巻 (1) : 63~74 ページ; PRUSS 他 2010 年 NEUROLOGY 第 75 巻 (19) : 1735~1739 ページ; PRUSS 他 2013 年 NEUROLOGY 第 78 巻 (22) : 1743~1753 ページ)。この疾患の特徴は、NMDAR 1 の NR1 サブユニットに対する抗体である。それに加え、非典型認知症を有する一部の患者は抗 NMDAR 1 抗体を持っており、全抗体の非特異的除去によってそれを除去すると、選択されたケースで臨床的改善が見られた (PRUSS 他 2010 年 NEUROLOGY 第 75 巻 (19) : 1735~1739 ページ、DOSS 他 2014 年 ANN CLIN TRANSL NEUROL 第 1 巻 (10) : 822~832 ページ)。このことにより、これまで原因療法の選択肢がなかった疾患としての脳炎における治療の考え方が大きく変化した。抗体を媒介とした疾患は、現時点では、攻撃的かつ非特異的な免疫療法 (血漿交換など) を利用することによってのみ治療が可能である。これは、免疫系を広く抑制することで大きな副作用 (例えば、頻繁な感染症や敗血症、ワクチン接種に対する無反応、アレルギー反応、中心カテーテルからの心血管系合併症) が生じることを意味する。現在、NMDAR 1 に対する病原自己抗体だけを標的とする特異的な治療法が強く必要とされているが、利用できない。

【発明の概要】**【0003】**

したがって本アプローチの目的は、本質的に抗 NMDAR 1 抗体だけを激減させて、影響を受けない他のほぼあらゆるタイプの「有益な」抗体を残す新規な抗体特異的免疫療法を開発することである。

【0004】

本発明の主題は、抗 NMDA 1 抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場であり、その抗 NMDA 1 抗体の結合領域は、以下の配列：

配列 ID 番号：1 (003-109-HC)

10

20

30

40

50

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARRHYDFDAFDIWGQGTMTVSS

配列 I D 番号：2 (003-109-LC)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL

配列 I D 番号：3 (003-102-HC)

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEYHSGNTNYPNPSLKSRTVTVSDKSKNQFS
LKLTSTVTAADTAVYYCARDVSGGVNWFDPPWGQGTLLTVSS

10

配列 I D 番号：4 (003-102-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISG
LKTEDEADYYCQSYDSSSTVVFGGTKLTVL

配列 I D 番号：5 (007-168-HC)

VQLVQSGAEAKKPGESLKISCKASGYSFTTFWIGWVRQMPGSGLEWIGIYPGDSDTRYSPSFQGHVTISADRSTSTAYL
QWSSLKASDTAMYYCARSAVFYDWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号：6 (007-168-LC)

EIVMTQSPATLSVSPGGRATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISLQS
EDFAVYYCQQYNNWPTSWTFGQGTKVEIK

20

配列 I D 番号：7 (007-169-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDTRYSPSFQGVVTISADKSI STAY
LQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYFDYDWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号：8 (007-169-LC)

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCCSYAGSYTGVFGEGLTKLTVL

30

配列 I D 番号：9 (007-124-HC)

EVQLVESGGGVGRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWSVRQVPGKGLEWVSGINWSGADTGYADSVKGRFTISRDNKNSLY
LQMNSLRVEDTALYHCAREVGIAVTGYWFDPPWGQGTLLTV

配列 I D 番号：10 (007-124-LC)

SYELTQPPSVSVAPGQTARISCGGNHSESVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRVEGGDE
AEYYCQVWDSSSDHPGVVFGGGLTKLTVL

配列 I D 番号：11 (007-142-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDTRYSPSFQGVVTISADKSI STAY
LQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYFDYDWGQGTLLTVSS

40

配列 I D 番号：12 (007-142-LC)

LTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
DEADYYCCSYAGSYTGVFGGGLTKLTVL

配列 I D 番号：13 (008-218-HC)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGKGLEWVSGISWSSSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLY
LQMNSLRAEDTALYYCAKDRASSWYAYGMDVWGQGTLLTV

50

配列 I D 番号： 1 4 (0 0 8 - 2 1 8 - L C)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYDDNQRPSGVPNRFSGSIDSSSNSASLIISG
LKTEDEADYYCQSTRVFGGGTKLTVL

からなるグループから選択された配列に含まれる。

【 0 0 0 5 】

特別な一実施態様では、本発明の主題は、抗 N M D A 1 抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場であり、その抗 N M D A 1 抗体の結合領域は、以下の配列：

【表 1】

配列 I D 番号 : 1 5	GFTFSSYG
配列 I D 番号 : 1 6	IWYDGSNK
配列 I D 番号 : 1 7	ARRHYDFDAFDI
配列 I D 番号 : 1 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 1 9	EVS
配列 I D 番号 : 2 0	SSYTSSSTLYV
配列 I D 番号 : 2 1	GGSISSSNW
配列 I D 番号 : 2 2	IYHSGNT
配列 I D 番号 : 2 3	ARDVSGGVNWFD
配列 I D 番号 : 2 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 2 5	EDN
配列 I D 番号 : 2 6	QSYDSSTVV
配列 I D 番号 : 2 7	GYSFTTFW
配列 I D 番号 : 2 8	IYPGSDT
配列 I D 番号 : 2 9	ARSAVFDY
配列 I D 番号 : 3 0	QSVSSN
配列 I D 番号 : 3 1	GAS
配列 I D 番号 : 3 2	QQYNNWPTSWT
配列 I D 番号 : 3 3	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 3 4	IYPGDSD
配列 I D 番号 : 3 5	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 3 6	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 3 7	DVS
配列 I D 番号 : 3 8	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 3 9	GFTFDDYG
配列 I D 番号 : 4 0	INWSGADT
配列 I D 番号 : 4 1	AREVGIAVTGYWFDP
配列 I D 番号 : 4 2	HSES
配列 I D 番号 : 4 3	DDS
配列 I D 番号 : 4 4	QVWDSSSDHPGVV
配列 I D 番号 : 4 5	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 4 6	IYPGSDT
配列 I D 番号 : 4 7	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 4 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 4 9	DVS
配列 I D 番号 : 5 0	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 5 1	GFTFDDYA
配列 I D 番号 : 5 2	ISWSSGSI
配列 I D 番号 : 5 3	AKDRASSWYAYGMDV
配列 I D 番号 : 5 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 5 5	DDN
配列 I D 番号 : 5 6	QSTRV

10

20

30

40

50

からなるグループから選択された配列に含まれている。

【0006】

この抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場の結合領域は、上記配列を 1 または複数含むことができる。この抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場のこの結合領域は、上記配列を 1 または複数含むこと、または上記配列の 1 つ、または複数からなるこ

とができる。特別な一実施態様では、本発明の主題は、上に示したように抗NMDA1抗体の結合領域に特異的に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である。この文脈における「特異的に結合する」は、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、上記結合領域のうちの少なくとも1つを示す抗NMDA1抗体に結合するが、上記結合領域のうちの少なくとも1つを示さない抗体には結合しないことを意味する。

【0007】

この抗NMDAR1抗体は、折り畳まれることが理由で三次元構造を示すため、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、上記配列の2つ以上に結合することができる。タンパク質の三次元構造が理由で、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の結合領域は、上記配列のうちの少なくとも1つと少なくとも部分的に重複する非線形エピトープからなることができる。「部分的に重複する」は、上記配列のうちの少なくとも1つの少なくとも1個、または2個、または3個、または4個、または5個のアミノ酸が、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の結合領域に結合することを意味する。

【0008】

抗NMDA1抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、本明細書と請求項を通じ、それぞれ、NMDA1抗体抗体またはNMDA1抗体抗体フラグメントまたはNMDA1抗体非Ig足場という用語の同意語であり、NMDA1抗体に結合する抗体、またはNMDA1抗体に結合する抗体フラグメント、またはNMDA1抗体に結合する非Ig足場に等しく、抗NMDA1抗体-抗体、または抗NMDA1抗体-抗体フラグメント、または抗NMDA1抗体-非Ig足場を意味する。

【0009】

本発明の特別な一実施態様では、抗NMDA1抗体に結合する抗体、または抗NMDA1抗体に結合する抗体フラグメント、または抗NMDA1抗体に結合する非Ig足場の、前記抗体、または抗体フラグメント、または非Ig足場は、結合領域の配列内の好ましくは少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または好ましくは少なくとも4個、または少なくとも5個のアミノ酸の領域に結合する。

【0010】

本発明の特別な一実施態様では、抗NMDA1抗体に結合する抗体、または抗NMDA1抗体に結合する抗体フラグメント、または抗NMDA1抗体に結合する非Ig足場の、前記抗体、または抗体フラグメント、または非Ig足場は、配列ID番号1～56という上記配列内に含まれる少なくとも3個、好ましくは少なくとも4個、好ましくは少なくとも5個のアミノ酸と重複する領域、またはこれらアミノ酸を含む領域に結合する。上に大まかに記載したように、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場のための結合領域は、上記配列の1つ、または複数、または上記配列の1つ、または複数の一部を含むことができる。そのような一部は、少なくとも1個、または2個、または3個、または4個、または5個のアミノ酸を含んでいる。

【0011】

特別な一実施態様では、「抗NMDAR1抗体」という用語は、本明細書と請求項の全体を通じ、「抗N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体-1抗体」として理解される。したがってこの特別な実施態様では、「NMDAR」という用語は、「N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体-1」として理解される。したがってこの特別な実施態様では、「抗NMDAR抗体に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場」という用語は、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体-1に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場として理解される。当業者は、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体-1が、NMDR受容体のNR1サブユニットであると理解する。

【0012】

本発明の抗体またはフラグメントは、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされた1つ以上のポリペプチドを含むタンパク質である。認識され

10

20

30

40

50

る免疫グロブリン遺伝子に含まれるのは、 κ 、 λ 、 α (IgA)、 γ (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 μ (IgM) という定常領域遺伝子のほか、多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子である。完全長免疫グロブリン軽鎖は、一般に、約 25 kDa、すなわち長さが 214 個のアミノ酸である。完全長免疫グロブリン重鎖は、一般に、約 50 kDa、すなわち長さが 446 個のアミノ酸である。軽鎖は、NH₂ 末端の位置の可変領域遺伝子（長さが約 110 個のアミノ酸）と、COOH 末端の位置の κ または λ 定常領域遺伝子によってコードされている。重鎖は、同様に、可変領域遺伝子（長さが約 116 個のアミノ酸）と、他の定常領域遺伝子のうちの 1 つによってコードされている。

【0013】

抗体の基本構造単位は、一般に、免疫グロブリン鎖の同じペア 2 つからなる四量体であり、各ペアは、1 本の軽鎖と 1 本の重鎖を有する。各ペアの中で、軽鎖と重鎖の可変領域が抗原と結合し、定常領域がエフェクタ機能を媒介する。免疫グロブリンは、他の多彩な形態（その中には、例えば Fv、Fab、(Fab')₂ が含まれる）のほか、二機能性ハイブリッド抗体や一本鎖としても存在する。免疫グロブリンの軽鎖または重鎖の可変領域は、3 つの超可変領域（相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる）が介在するフレームワーク領域を含んでいる (E. Kabat 他、U. S. Department of Health and Human Services、1983 年を参照のこと)。上に指摘したように、CDR は主に抗原のエピトープへの結合を担っている。免疫複合体は、抗原に特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体など）または機能性抗体フラグメントである。

【0014】

キメラ抗体は、軽鎖遺伝子と重鎖遺伝子が、異なる種に属する免疫グロブリンの可変領域遺伝子と定常領域遺伝子から、典型的には遺伝子操作によって構成された抗体である。例えばマウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変領域をヒト定常領域 (κ と γ 1 または γ 3) に接合することができる。一例では、治療用キメラ抗体はしたがって、マウス抗体からの可変ドメインまたは抗原結合ドメインと、ヒト抗体からの定常ドメインまたはエフェクタドメインからなるハイブリッドタンパク質である。しかし他の哺乳動物種を利用することや、可変領域を分子技術によって作製することができる。キメラ抗体の作製方法は本分野で周知であり、例えばアメリカ合衆国特許第 5, 807, 715 号を参照をされたい。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（マウス、ラット、合成など）免疫グロブリンからの 1 つ以上の CDR とを含む免疫グロブリンである。CDR を提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプタ」と呼ばれる。一実施態様では、すべての CDR がヒト化免疫グロブリンの中のドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は存在していてもよいが、存在する場合には、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同じ、すなわち少なくとも約 85~90%（例えば約 95% 以上）が同じでなければならない。したがってヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、おそらく CDR を除き、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同じである。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖免疫グロブリンとヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDR を提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたは抗体のアクセプタフレームワークは、ドナーフレームワークから取られたアミノ酸による限られた数の置換を含んでいてもよい。ヒト化モノクローナル抗体または他のモノクローナル抗体は、抗原結合機能や他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさない追加の保存的アミノ酸置換を持つことができる。保存的置換の例は、gly、ala；val、ile、leu；asp、glu；asn、gln；ser、thr；lys、arg；phe、tyr である。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作によって構成することができる（例えばアメリカ合衆国特許第 5, 585, 089 号を参照のこと）。ヒト抗体は、軽鎖遺伝子と重鎖遺伝子がヒトに由来する抗体である。ヒト抗体は、本分野で知られている方法を利用して作製することができる。ヒト抗体は、興味の対象である抗体を分泌するヒト B 細胞を不死化

10

20

30

40

50

することによって作製できる。不死化は、例えばEBV感染によって、またはヒトB細胞を骨髓腫細胞またはハイブリドーマ細胞と融合させてトリオーマ細胞を生み出すことによって実現できる。ヒト抗体は、ファージ提示法によって作製すること（WO 91/17271；WO 92/001047）や、ヒトコンビナトリアルモノクローナル抗体ライブラリから選択することもできる（Morphosys社のウェブサイトを参照のこと）。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物を利用して調製することもできる（例えばWO 93/12227；WO 91/10741を参照のこと）。

【0015】

したがって本発明の抗体は、本分野で知られている形態を持つことができる。その例は、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体である。好ましい一実施態様では、本発明の抗体は、組み換えによって作製された抗体（例えば典型的な完全長免疫グロブリンであるIgG）、または重鎖および／または軽鎖の変領域を少なくとも含む抗体フラグメント（例えば化学的にカップルさせた抗体（フラグメント抗原結合））であり、その非限定的な例には、Fabフラグメント（その中には、Fabミニボディ、一本鎖Fab抗体、エピトープタグを有する1価Fab抗体（例えばFab-V5Sx2）が含まれる）；CH3ドメインと二量体化した2価Fab（ミニ抗体）抗体；例えば異種ドメインの助けを借りた多量体化（例えばdHLXドメインの二量体化）を通じて形成された2価Fabまたは多価Fab（例えばFab-dHLX-FSx2）；F(ab')₂フラグメント、scFvフラグメント、多量体化された多価または／および多特異性scFvフラグメント、2価および／または二特異性二重抗体、BITE（登録商標）（二特異性T細胞エンゲージャー（engager）））、例えばG以外のクラスからの三機能性抗体、多価抗体；単一ドメイン抗体（例えばラクダまたは魚の免疫グロブリンに由来するナノ抗体や、他の多数のもの）が含まれる。

【0016】

好ましい一実施態様では、抗体の形態の選択は、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、F(ab)₂フラグメント、scFv-Fc融合タンパク質を含むグループからなされる。別の好ましい一実施態様では、抗体の形態の選択は、scFabフラグメント、Fabフラグメント、scFvフラグメントと、その共役体で生物学的利用能が最適化されたもの（PEG化されたフラグメントなど）を含むグループからなされる。最も好ましい形態の1つは、scFab形態である。抗体の形態の図解に関しては、図1a、図1b、図1cを参照されたい。

【0017】

抗体に加えて他のバイオポリマー足場が標的分子と複合体を作ることが本分野で周知であり、高度に標的特異的なバイオポリマーを作製するのに使用されてきた。その例は、アプタマー、シュビーゲルマー、アンチカリン、コノトキシンである。

【0018】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、その非Ig足場としてタンパク質足場が可能なものであり、その非Ig足場はリガンドまたは抗原に結合することができるため、それを抗体模倣体として使用できる。非Ig足場の選択は、テトラネクチンに基づく非Ig足場（例えばUS 2010/0028995に記載されている）、フィブロネクチン足場（例えばEP 1 266 025に記載されている）；リボカリンに基づく足場（例えばWO 2011/154420に記載されている）；ユビキチン足場（例えばWO 2011/073214に記載されている）、トランスフェリン足場（例えばUS 2004/0023334に記載されている）、プロテインA足場（例えばEP 2 231 860に記載されている）、アンキリン反復に基づく足場（例えばWO 2010/060748に記載されている）、マイクロプロテイン足場、好ましくはシステインノット（結び目）を形成するマイクロプロテイン足場（例えばEP 2 314 308に記載されている）、Fyn SH3ドメインに基づく足場（例えばWO 2011/023685に記載

10

20

30

40

50

されている)、EGFR-Aドメインに基づく足場(例えばWO 2005/040229に記載されている)、クニツドメインに基づく足場(例えばEP 1 941 867に記載されている)、アビマー(US 20050053973 A1)、CTLA4に基づく足場(WO 00/60070)、アルマジロ反復タンパク質(US 20110224100 A1)を含むグループからなすことができる。

【0019】

本発明の主題は、抗NMDAR1サブユニット抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、その非Ig足場として非タンパク質足場が可能なものであり、その非Ig足場はリガンドまたは抗原に結合することができるため、それを抗体模倣体として使用できる。そのような非Ig足場の選択は、オリゴヌクレオチドアプタマー、すなわちRNAアプタマー、DNAアプタマー、L-RNAアプタマー(シュピーゲルマー)を含むグループからなすことができる。

10

【0020】

本発明の特別な一実施態様では、本発明の主題は、非IgG足場である。より特別な一実施態様では、その非IgG足場は、非ペプチドかつ非タンパク質の非IgG足場である。より特別な一実施態様では、その非IgG足場は、RNAアプタマー、DNAアプタマー、L-RNAアプタマー(シュピーゲルマー)を含むグループから選択されたオリゴヌクレオチドアプタマーである。

【0021】

SELEX系(アメリカ合衆国特許第5,270,163号)を用いたアプタマーを製作するため、標的構造(ヒトモノクローナルNMDAR1抗体)を、ほぼあらゆる三次元構造を含む 10^{15} 個超のランダムなアプタマーのライブラリとともにインキュベートする。何回か選択と増幅をすると、高度に特異的かつ親和性のあるアプタマーが得られる(図2)。ロボットの支援を受けた選択プロセスは高度に標準化されていて、以下の工程、すなわちアプタマーライブラリと抗体をインキュベートし、結合したアプタマーを増幅して精製し、SELEXを約9回繰り返し、選択プロセスの間にアプタマーの次世代シーケンシングを行ない、プラズモン共鳴を利用して親和性を制御することを含んでいる。

20

【0022】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、抗NMDAR1抗体のその結合領域に対して親和性を示し、抗NMDAR1抗体のその結合領域に対する解離定数(K_D)が 10^{-7} M未満、好ましくは 10^{-8} M未満、好ましい K_D が 10^{-9} M未満、最も好ましくは 10^{-10} M未満であるものである。結合親和性は、実施例4のアッセイで求めることができる。実施例4には、表面プラズモン共鳴分析(Biacore)が記載されている。

30

【0023】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、その抗NMDAR1抗体に特異的に結合するものである。

【0024】

抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、生体内で抗NMDAR1抗体を捕獲するか、生体外の溶液中で抗NMDAR1抗体を捕獲する、および/または体液から抗NMDAR1抗体を除去する、および/または激減させる。「生体内で抗NMDAR1抗体を捕獲する」という表現は、抗NMDAR1抗体によるNMDAR1の結合を抑制する、および/または阻止する、および/または邪魔する、および/または止めさせる、および/または抑えること、または抗NMDAR1抗体を中和する、および/または捕捉する、および/または遮断することと理解できる。特に、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、体液からの抗NMDAR1自己抗体を捕獲および/または除去することができる一方で、非NMDAR1特異的Ig分子の80%超、特に非NMDAR

40

50

1 特異的 I g 分子の 90 % 超、特に非 NMDAR1 特異的 I g 分子の 99 % 超を捕獲および／または除去しない。この割合は、下に例示した 450 nm での光度測定に係する。

【0025】

I g 分子の結合および／または除去は、ELISA を利用して、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場で処理する前と処理した後に採取した患者サンプルを比較することによって調べることができる。このアッセイでは、96 ウェルのプレートを覆ったヒト I g 特異的抗体を用いる。サンプルをピペットで採取してウェルに入れ、サンプル中に存在する I g を、固定化した抗体によってウェルに結合させる。ウェルを洗浄し、ビオチニル化抗ヒト I g 抗体を添加する。結合しなかったビオチニル化抗体を洗い流した後、HRP が共役したストレプトアビジンをピペットでウェルに入れる。ウェルを再度洗浄し、TMB 基質溶液をウェルに添加すると、結合した I g の量に比例した発色が起こる (450 nm での光度測定)。

【0026】

特に、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場は、体液からの抗 NMDAR1 自己抗体と結合し、および／または体液からの抗 NMDAR1 自己抗体を除去し、病原体や、腫瘍抗原や、生理学的保護機能を持つことが知られているものに特異的な他の I g 分子には結合しないか、ほぼ結合しない。

【0027】

ACHR ドメインを担持した「免疫吸着」カラムを構成することを通じて患者の血漿から抗 ACHR 自己抗体を生体外で選択的に激減させる方法が、Tzartos 他 2008 年 Ann N Y Acad Sci 第 1132 巻：291～299 ページに記載されている。同じ方法を本発明で利用して患者血漿から抗 NMDAR1 抗体を選択的に激減させることが可能である。患者として、ヒト対象または動物対象が可能である。

【0028】

特別な一実施態様では、体液は、血清、血漿、脳脊髄液 (CSF)、全血、尿、唾液、羊水からなるグループから選択することができる。

【0029】

本発明の主題は、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場が、抗 NMDAR1 抗体を中和するか、その抗 NMDAR1 抗体の生物学的効果を中和するものである。

【0030】

一実施態様では、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する、中和機能を持つ本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場は、精製した抗 NMDAR1 抗体または体液中の患者の自己抗体が、インビトロで組み換え発現させた NMDAR1 に結合することを抑制する。結合の抑制は、実施例 5.1 および／または実施例 5.2 の抑制細胞・組織アッセイで調べることができる：

- アプタマーが、NMDAR1 (GRIN1) を発現しているトランスフェクトされた HEK293 細胞に精製した抗 NMDAR1 抗体が結合するのを抑制する (例えば WO 2012076000 A2 の実施例である実施例 1；Euroimmune 社；Autoimmune-Encephalitis Mosaic 1 を参照のこと)；
- アプタマーが、NMDAR1 (GRIN1) を発現しているトランスフェクトされた HEK293 細胞に患者の血液／血清／CSF からの抗 NMDAR1 抗体が結合するのを抑制する (WO 2012076000 A2 の実施例)。

【0031】

一実施態様では、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する、中和機能を持つ本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場は、実施例 5.2 によれば、精製した抗 NMDAR1 抗体が NMDAR1 発現組織に結合するのを抑制する：

- 免疫組織化学：アプタマーが、NMDAR1 発現組織に抗 NMDAR1 抗体が結合す

るのを抑制する。

【0032】

一実施態様では、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する、中和機能を持つ本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、実施例5. 4と図7に示してあるように、抗NMDAR1抗体を媒介としたNMDAR陽性シナプスクラスターの下方向調節を抑制する：

一 アプタマーが、抗NMDAR1自己抗体を媒介とした下方向調節を抑制する。

【0033】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、単特異性の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であるものである。

【0034】

単特異性抗体または単特異性抗体フラグメントまたは単特異性非Ig足場は、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、結合領域の配列中の好ましくは少なくとも1個、または好ましくは少なくとも2個、または好ましくは少なくとも3個、または好ましくは少なくとも4個、または少なくとも5個のアミノ酸からなる1つの特定の領域に結合することを意味する。本発明の特別な一実施態様では、その単特異性抗体または単特異性抗体フラグメントまたは単特異性非Ig足場は、配列ID番号1～56を持つ上記配列中の少なくとも1個、または好ましくは少なくとも2個、または好ましくは少なくとも3個、または好ましくは少なくとも4個、または好ましくは少なくとも5個のアミノ酸と重複する領域、またはそのアミノ酸を含む領域に結合する。上に大まかに示したように、この抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の結合領域は、上記配列の1つ、またはいくつかを含むことができる。

【0035】

単特異性抗体または単特異性抗体フラグメントまたは単特異性非Ig足場は、すべてが同じ抗原に対する親和性を有する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である。

【0036】

本発明による単特異性の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、すべてが同じ抗原に対する親和性を有する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である。モノクローナル抗体は単特異性だが、単特異性抗体は、共通の生殖細胞から産生させる以外の方法でも作製することができる。

【0037】

抗体は、以下の手順に従う能動免疫化によって作製することができる。

【0038】

（組み換えモノクローナルNMDAR1抗体の上記NMDAR1結合配列に従って）合成したペプチド配列または（Fc部分が開裂した後の）ヒトモノクローナルNMDAR1抗体を能動免疫化のために使用する。マウス1匹につき20μgのタンパク質を完全フロイントアジュバント（CFA）で乳化し、200μlのエマルジョンを皮下注射する。マウス1匹につき20μgのタンパク質を含む不完全フロイントアジュバント（IFA）を4週間後と8週間後に腹腔内注射することでブースター免疫化を繰り返す。抗体産生B細胞を脾臓から回収し、十分な親和性を持つ望ましいエピトープと反応する細胞クローンをスクリーニングし、産生されたモノクローナル抗体を、酵母表面提示と高スループット蛍光活性化細胞ソーティングの組み合わせを含む標準的なプロトコルに従って単離する（例えばDoerner他2014年 F E B S L e t t . 第21巻；588（2）：278～287ページ）。

【0039】

マウス抗体のヒト化は、以下の手順に従って行なうことができる。

【0040】

マウス由来の抗体をヒト化するため、抗体の配列を分析して、フレームワーク領域（FR）と相補性決定領域（CDR）および抗原の間の構造相互作用を調べる。構造モデリン

グに基づいてヒト由来の適切なFRを選択し、マウスCDR配列をヒトFRに移植する。CDRまたはFRのアミノ酸配列を変化させることで、FR配列の種切り換えによって消えた構造相互作用を回復させることができる。構造相互作用のこの回復は、ファージ提示ライブラリを用いたランダムアプローチによって、または分子モデリングによって導かれる誘導アプローチを通じて実現できる。(Almagro他 2008年 Front Biosci. 第13巻: 1619~1633ページ)。

【0041】

好ましい一実施態様では、本発明の抗体の形態の選択は、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、F(ab)₂フラグメント、scFv-Fc融合タンパク質を含むグループからなされる。別の好ましい一実施態様では、抗体の形態の選択は、scFabフラグメント、Fabフラグメント、scFvフラグメントと、生物学的利用能が最適化されたこれらのものの共役体(PEG化されたフラグメントなど)を含むグループからなされる。最も好ましい形態の1つはscFab形態である。

【0042】

別の一実施態様では、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、完全長の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である。

【0043】

より好ましい一実施態様では、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、結合領域に含まれる、長さが少なくとも1個、好ましくは少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、または4個、または5個のアミノ酸からなるエピトープに向かい、そのエピトープに結合することができる。

【0044】

NMDAR1抗体抗体またはNMDAR1抗体抗体フラグメントまたはNMDAR1抗体非Ig足場という用語は、本明細書と請求項を通じ、NMDAR1抗体に結合する抗体、またはNMDAR1抗体に結合する抗体フラグメント、またはNMDAR1抗体に結合する非Ig足場に等しく、抗NMDAR1抗体-抗体、または抗NMDAR1抗体-抗体フラグメント、または抗NMDAR1抗体-非Ig足場を意味する。

【0045】

本発明の主題は、対象において抗NMDAR1サブユニット抗体に関係する疾患または病気の治療に用いるための、抗NMDAR1サブユニット抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であり、特別な一実施態様では、その対象は、それに加えて、以下のリスト(括弧内のICD番号は、臨床状態を定義するWHO国際疾病分類を表わしている)にある臨床症状/状態:

- うつ病(F32)、精神病症状を伴う躁病(F30.2)、不安障害(F06.4)、恐怖症性不安障害(F40)、妄想性障害(F22.0)、強迫性障害(F42)、器質性気分障害(F06.3)、緊張病性障害(F06.1、F20.2)、急性多形性精神病性障害(F23.0、F23.1)、解離性障害(F44)を含む精神異常
- ジスキネジア/ジストニー(G24)、ミオクローヌス(G25.3)、振戦(G25.0、G25-1、G25-2)、チック(F95、G25.69)を含む異常運動
- てんかん(G40)
- 低換気(R06.89)
- 軽度認知障害(F06.7)
- アルツハイマー病型(F00)、梗塞性(F01)、他の疾患(F02)の認知症
- 妊娠

を含むグループから選択された少なくとも1つの臨床症状または臨床状態を有する。

【0046】

本発明の主題は、対象において抗NMDAR1サブユニット抗体に関係する上記の疾患または病気の治療に用いるための、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であり、治療効果は、本発明によるNMDA

10

20

30

40

50

R 1 抗体の結合および／または阻止および／または患者の体液からの除去に基づいている。

【0047】

以前の治療法（例えば静脈内免疫グロブリン（IVIg）または非選択的血漿交換を伴う治療）による自己免疫疾患の治療とは異なり、本発明の治療法は、NMDAR 1 抗体に対する特異的な効果に基づいている。NMDAR 抗体に関係する自己免疫脳炎での臨床上の改善が、治療後の抗体力価の低下と強く関連していることは周知であり、したがって神経学における定型的なガイドラインの基礎を形成している（Gresa-Arribas 他 2014 年、Lancet Neurol 第13巻（2）：167～177 ページ；Dogan Onugoren 他 2016 年、Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 第26巻；3（2）：e207 ページ）。

10

【0048】

自己免疫疾患におけるIVIgの有利な効果は、抗イデオタイプ抗体を通じた病原性抗体の結合および／または中和および／または阻止によるのではない。IVIg療法のメカニズムに関して解決されていない多くの問題がある中で、IVIgは、むしろ、主にネガティブフィードバックにより、すなわち、T細胞活性化の変化、末梢性免疫寛容の調節、Fc部分を通じた化学誘引物質の放出により、Fc-γ受容体FcγRIIBを通じて抗体産生細胞に作用するということがよく受け入れられている（NimmerjahnとRavetch 2008 年、Nature Review Immunology 第8巻（1）：34～47 ページ）。ヒト臨床試験からのデータは、Fcフラグメントが抗炎症活性の大半を担っていることを示していた（Schwab、Lux、Nimmerjahn 2015 年、Cell Rep 第20巻；13（3）：610～620 ページ）。この経路に沿ってIVIgは、疾患特異的な病原性抗体を下方調節するだけでなく、人体内のあらゆる有益な抗体も下方調節する（これは望ましくないことであり、本発明のアプローチで克服することができる）。したがって本発明の治療法は、従来の方法と比べたときに副作用がより少ないだけでなく、効果が同じかより優れた治療法を提供する。

20

【0049】

本発明の驚くべき知見は、抗NMDAR 1サブユニット抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、抗NMDAR 1サブユニット抗体に関係する疾患または病気を持つ、および／またはそれに加えて少なくとも1つの上記の臨床的症狀または臨床状態を持つ患者の自己抗体の大半と結合できることである。実際、異なる患者から単離された自己抗体の結合領域は、驚くほどの類似性を示す。例えば単離されたすべての自己抗体の軽鎖のCDR 2は、3個のアミノ酸だけからなり、5／6の配列において酸性アミノ酸（D／E）が優勢である。さらに、重鎖のCDR 1とCDR 3も驚くべき類似性を示す：

30

	CDR 1	CDR 2	CDR 3
003-109-HC	GFTFSSYG	IWYDGSNK	ARRHYDFDAFDI
003-102-HC	GGSISSSNW	IYHSGNT	ARDVSGGVNWFDP
007-168-HC	GYSFTTFW	IYPGDSDT	ARSAVFDY
007-169-HC	GYSFTSYW	IYPGDS	ARDYGDYYFDY
007-124-HC	GFTFDDYG	INWSGADT	AREVGIAVTGYWFDP
008-218-HC	GFTFDDYA	ISWSSGSI	AKDRASSWYAYGMDV
003-109-LC	SSDVGGYNY	EVS	SSYTSSSTLYV
003-102-LC	SGSIASNY	EDN	QSYDSSTVV
007-168-LC	QSVSSN	GAS	QQYNNWPTSWT
007-169-LC	SSDVGGYNY	DVS	CSYAGSYTGV
007-124-LC	HSES	DDS	QVWDSSSDHPGVV
008-218-LC	SGSIASNY	DDN	QSTRV

40

【0050】

50

多数の異なる患者からの抗NMDAR1サブユニット自己抗体には、抗体の結合領域に結合する本発明の同じ抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場がやはり結合することができる。これは、異なる患者からのモノクローナル抗体がすべてNMDA受容体のアミノ末端ドメインの非常に小さいエピトープに結合するという実験的知見に基づいている。実際、アミノ酸が1個だけ変異すると抗体がNMDA受容体にまったく結合しなくなるため、このアミノ酸変化（NからQへ）により、受容体の三次元構造の変化というよりは、非常に局所的な構造変化が起こっていることが予想される。したがって抗NMDAR1サブユニット抗体の結合領域に結合する本発明の1つの、または比較的小さなプールの抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場は、異なる患者からの自己抗体を潜在的に阻止することができる。別の証拠は、われわれが、NMDARに対する変異していないヒト抗体を同定できたという事実である（Kreye他 2016年、Brain）。これらの抗体は、いわゆる生殖系列の配置を含んでいる（「天然の抗体」とも呼ばれる）。すなわちこれらの抗体は、患者だけでなく、あらゆる人の身体によって連続的に産生されるため、以前に健康であった人にも確率的に存在するであろう。これらの天然抗体は、主に、ホメオスタシスや、死んだ細胞の除去に積極的に関与すると考えられるが、NMDAR抗体の場合には、最近示されたように、神経細胞にとって有害である可能性がある（Kreye他 2016年、Brain）。正常（健康）な遺伝子レパートリーに含まれる天然のNMDAR抗体の配列コードが理由で、データは、配列の数は限定されるという進化上の制限が存在することを示唆している。これは、異なる患者に由来するこれまでに同定されたあらゆるモノクローナルNMDAR抗体が、受容体のアミノ末端ドメインにあるそのような小さなエピトープに依存しているという上記の事実と完全に一致している。

10

20

【0051】

特別な一実施態様では、抗NMDAR1サブユニット抗体に関係する疾患または病気を持ち、特別な一実施態様ではそれに加えて少なくとも1つの上記の臨床的症状または臨床状態を持つ患者または対象は、体液中に結合領域を有する抗NMDAR1抗体を持つことに関して階層化され、その抗NMDAR1抗体の結合領域は、以下の配列：

【表 2】

配列 I D 番号 : 1 5	GFTFSSYG
配列 I D 番号 : 1 6	IWYDGSNK
配列 I D 番号 : 1 7	ARRHYDFDAFDI
配列 I D 番号 : 1 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 1 9	EVS
配列 I D 番号 : 2 0	SSYTSSSTLYV
配列 I D 番号 : 2 1	GGSISSSNW
配列 I D 番号 : 2 2	IYHSGNT
配列 I D 番号 : 2 3	ARDVSGGVNWFD
配列 I D 番号 : 2 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 2 5	EDN
配列 I D 番号 : 2 6	QSYDSSTVV
配列 I D 番号 : 2 7	GYSFTTFW
配列 I D 番号 : 2 8	IYPGSDT
配列 I D 番号 : 2 9	ARSAVFDY
配列 I D 番号 : 3 0	QSVSSN
配列 I D 番号 : 3 1	GAS
配列 I D 番号 : 3 2	QQYNNWPTSWT
配列 I D 番号 : 3 3	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 3 4	IYPGSD
配列 I D 番号 : 3 5	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 3 6	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 3 7	DVS
配列 I D 番号 : 3 8	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 3 9	GFTFDDYG
配列 I D 番号 : 4 0	INWSGADT
配列 I D 番号 : 4 1	AREVGIAVTGYWFD
配列 I D 番号 : 4 2	HSES
配列 I D 番号 : 4 3	DDS
配列 I D 番号 : 4 4	QVWDSSSDHPGVV
配列 I D 番号 : 4 5	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 4 6	IYPGSDT
配列 I D 番号 : 4 7	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 4 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 4 9	DVS
配列 I D 番号 : 5 0	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 5 1	GFTFDDYA
配列 I D 番号 : 5 2	ISWSSGSI
配列 I D 番号 : 5 3	AKDRASSWYAYGMDV
配列 I D 番号 : 5 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 5 5	DDN
配列 I D 番号 : 5 6	QSTRV

10

20

30

40

からなるグループから選択される配列に含まれるか、その配列からなる。

【0052】

したがって、抗NMDAR1サブユニット抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場を用いた治療を必要とする患者の選択は、上記のようにして対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べ、抗NMDAR1抗体

50

に關係する上記の疾患または病気を有するその対象がそのような治療を必要とするかどうかを判断することによって可能になる。

【0053】

1つの典型例は、主に若い女性が罹患するだけでなく、子どもとあらゆる年齢の男性も罹患する重篤な脳炎である抗NMDAR脳炎であろう（Dalmau他 2008年Lancet Neurol 第7巻（12）：1091～1098ページ）。高力価のNMDAR1抗体が、この異常の目印である。典型的な症状には、上記リストのいくつか（例えば、精神異常、異常運動、てんかん、低換気、集中ケアユニットでの治療が必要なもの）だけでなく、独立した痙攣、認知障害を伴う形態も含まれ、精神病が発生する可能性もある。

10

【0054】

上記の対象は、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場を投与する治療を必要とする可能性がある。その対象として、本明細書の全体を通じ、ヒト対象または動物対象が可能である。

【0055】

したがって本発明の治療を必要とする可能性のある対象は、体液中にNMDAR1抗体が存在する対象である。別の一実施態様では、本発明の治療を必要とする可能性のある対象は、体液中にNMDAR1抗体が存在し、それに加えて以下のリスト（括弧内のICD番号は、臨床状態を定義するWHO国際疾病分類を表わしている）にある臨床症状／状態：

20

- うつ病（F32）、精神病症状を伴う躁病（F30.2）、不安障害（F06.4）、恐怖症性不安障害（F40）、妄想性障害（F22.0）、強迫性障害（F42）、器質性気分障害（F06.3）、緊張病性障害（F06.1、F20.2）、急性多形性精神病性障害（F23.0、F23.1）、解離性障害（F44）を含む精神異常
- ジスキネジア／ジストニー（G24）、ミオクロヌス（G25.3）、振戦（G25.0、G25-1、G25-2）、チック（F95、G25.69）を含む異常運動
- てんかん（G40）
- 低換気（R06.89）
- 軽度認知障害（F06.7）
- アルツハイマー病型（F00）、梗塞性（F01）、他の疾患（F02）の認知症
- 妊娠

30

を含むグループから選択された少なくとも1つの臨床症状または臨床状態を有する対象である。

【0056】

本発明の主題は、対象において抗NMDAR1抗体に關係する疾患または病気の本発明による治療に用いるため、そのような治療を必要とする対象に生体内投与される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である。

【0057】

本発明の主題は、対象において抗NMDAR1抗体に關係する疾患または病気の本発明による治療に用いるため、静脈内投与されるか、CSFに直接投与されてそのような治療を必要とする対象に達する、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である。

40

【0058】

その治療を必要とする対象は、本発明による別の一実施態様の生体外治療法で治療することができる。

【0059】

したがって本発明の主題は、抗NMDAR1抗体に關係する疾患または病気の治療を必要とする対象においてそのような治療に用いるため、その対象の生体外治療で使用される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは

50

非 I g 足場である。その対象として、ヒト対象または動物対象が可能である。

【0060】

したがって本発明の主題は、抗 NMDAR1 抗体に関係する疾患または病気の治療を必要とする対象においてそのような治療に用いるための、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場であって、対象が、下に記載する方法で測定するときに抗 NMDAR1 抗体の存在を示す、抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場である。具体的には、抗 NMDAR1 抗体の存在は、実施例 1.2 のアッセイを利用して調べることができる。

【0061】

本発明の主題はさらに、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは足場を含む医薬製剤である。この医薬製剤は、本発明の 1 つ以上の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場を含むことができる。

【0062】

本発明の主題はさらに、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g G 足場を含んでいて、溶液、好ましくはそのまま使用できる溶液になった医薬製剤である。

【0063】

この医薬製剤は、血管内に投与することができる。この医薬製剤は、輸液を通じて投与することができる。

【0064】

別の一実施態様では、本発明の主題はさらに、乾燥状態または凍結乾燥状態になっていて使用前に再構成される本発明の医薬製剤である。

【0065】

本発明の医薬製剤は、好ましくは輸液または血管内投与を通じて患者に全身投与できることを強調しておく必要がある。患者として、本明細書全体を通じてヒト対象または動物対象が可能である。

【0066】

本発明の主題は、患者の抗 NMDAR1 抗体に関係する疾患の治療に用いるため、別の薬剤（例えば化学療法剤や免疫抑制剤）と組み合わせて使用される、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場である。その薬剤は、アザチオプリン、シクロホスファミド、リツキシマブ、メトトレキサート、ボルテゾミブ、コルチコステロイド、ミコフェノール酸モフェチルを含むグループから選択することができる。

【0067】

本発明の主題は、血漿交換（血漿濾過）または CSF 交換（CSF 濾過）のための、抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場で覆った装置であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場が、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場である装置である。

【0068】

アフレスシス（すなわち個人から血液を取り出し、その血液から諸成分を除去し、その血液、すなわち 1 つ以上の成分が激減した血液を個人に戻す方法）のための方法と体外システムが、本分野で知られている（例えばアメリカ合衆国特許第 4,708,713 号；5,258,503 号；5,386,734 号；6,409,696 号；Hendrickson 他 2015 年 J Clin Apher. doi: 10.1002/jca.21407 [印刷前の電子出版]を参照のこと）。

【0069】

本発明の主題は、血漿交換または CSF 交換（CSF 濾過）のための、抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場で覆った本発明の装置であって、抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場で覆ったその装置が、抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場で覆ったカラムである装置である。そのような装置は、例えば Fresenius Medical Care 社；「Protein-A-Adsorber Immunos

10

20

30

40

50

o r b a（登録商標）」に記載されている。I g E特異的アフェレシスのための装置に関しては、E P 2 6 9 6 8 9 5 A 1に記載されている。

【0070】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体に関係する疾患を有する患者の体液サンプル中の抗NMDAR1抗体の存在、または妊娠した女性対象の体液サンプル中の抗NMDAR1抗体の存在を調べるための、本発明の抗体または抗体フラグメントまたは非I g足場の利用である。

【0071】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を有する対象が本発明の治療を必要とするかどうかを判断するため、その対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べる方法であり、この方法は、

- その対象から得られた体液サンプルを、本発明の少なくとも1つの抗体または抗体フラグメントまたは非I g足場と接触させ、
- その体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べることを含んでいて、
- そのサンプル中に抗NMDAR1抗体が存在する場合には、その対象が、抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を有する可能性があり、本発明の治療を必要とする可能性がある。

【0072】

本発明の主題は、抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を有する対象が本発明の治療を必要とするかどうかを判断するため、その対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べる方法であり、この方法は、

- その対象から得られた体液サンプルを、本発明の少なくとも2つの抗体または抗体フラグメントまたは非I g足場と接触させ、
- その体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べることを含んでいて、
- そのサンプル中に抗NMDAR1抗体が存在する場合には、その対象が、抗NMDAR1抗体に関係する疾患または状態を有する可能性があり、本発明の治療を必要とする可能性がある。

【0073】

特に、体液中のNMDAR1抗体は、1つ以上の配列に含まれる結合領域を持つことを特徴としていて、その1つ以上の配列の選択は、以下の配列：

配列I D番号：1 (003-109-HC)

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARRHYDFDAFDIWGQTMVTVSS

配列I D番号：2 (003-109-LC)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL

配列I D番号：3 (003-102-HC)

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWVWRQPPGKGLEWIGEIIYHSGNTNYPNPSLKS RVTVSVDKSKNQFS LKLTSTVTAADTAVYYCARDVSGGVNWFDPWGQGTLLTVSS

配列I D番号：4 (003-102-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRP SGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSTVVFGGGTKLTVL

配列I D番号：5 (007-168-HC)

VQLVQSGAEAKKPGESLKI SCASGYSTTFWIGWVRQMPGSGLEWIGIIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADRSTSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSAVFDYWGQGTLLTVSS

10

20

30

40

50

配列 I D 番号： 6 (007-168-LC)

EIVMTQSPATLSVSPGGRATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISLQS
EDFAVYYCQQYNWPTSWTFGQGTKVEIK

配列 I D 番号： 7 (007-169-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGGVTISADKSI STAY
LQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYYFDYWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号： 8 (007-169-LC)

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCCSYAGSYTGVFGEGTKLTVL

10

配列 I D 番号： 9 (007-124-HC)

EVQLVESGGGVGRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQVPGKGLEWVSGINWSGADTGADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRVEDTALYHCAREVGIAVTGYWFDPPWGQGTLLTV

配列 I D 番号： 10 (007-124-LC)

SYELTQPPSVSVAPGQTARISCGGNHSESVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRVEGGDE
AEYYCQVWDSSSDHPGVVFGGGTKLTVL

20

配列 I D 番号： 11 (007-142-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGGVTISADKSI STAY
LQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYYFDYWGQGTLLTVSS

配列 I D 番号： 12 (007-142-LC)

LTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
DEADYYCCSYAGSYTGVFGGGTKLTVL

配列 I D 番号： 13 (008-218-HC)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGKGLEWVSGISWSSSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTALYYCAKDRASSWYAYGMDVWGQGTLLTV

30

配列 I D 番号： 14 (008-218-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYDDNQRPSGVPNRFSGSIDSSSNSASLIISG
LKTEDEADYYCQSTRVFGGGTKLTVL

からなるグループからなされ、抗体または抗体フラグメントまたは非IgG足場の結合領域は、以下の配列：

【表 3】

配列 I D 番号 : 1 5	GFTFSSYG
配列 I D 番号 : 1 6	IWYDGSNK
配列 I D 番号 : 1 7	ARRHYDFDAFDI
配列 I D 番号 : 1 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 1 9	EVS
配列 I D 番号 : 2 0	SSYTSSSTLYV
配列 I D 番号 : 2 1	GGSISSSNW
配列 I D 番号 : 2 2	IYHSGNT
配列 I D 番号 : 2 3	ARDVSGGVNWFD
配列 I D 番号 : 2 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 2 5	EDN
配列 I D 番号 : 2 6	QSYDSSTVV
配列 I D 番号 : 2 7	GYSFTTFW
配列 I D 番号 : 2 8	IYPGDSDT
配列 I D 番号 : 2 9	ARSAVFDY
配列 I D 番号 : 3 0	QSVSSN
配列 I D 番号 : 3 1	GAS
配列 I D 番号 : 3 2	QQYNNWPTSWT
配列 I D 番号 : 3 3	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 3 4	IYPGDSD
配列 I D 番号 : 3 5	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 3 6	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 3 7	DVS
配列 I D 番号 : 3 8	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 3 9	GFTFDDYG
配列 I D 番号 : 4 0	INWSGADT
配列 I D 番号 : 4 1	AREVGIAVTGYWFD
配列 I D 番号 : 4 2	HSES
配列 I D 番号 : 4 3	DDS
配列 I D 番号 : 4 4	QVWDSSSDHPGVV
配列 I D 番号 : 4 5	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 4 6	IYPGDSDT
配列 I D 番号 : 4 7	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 4 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 4 9	DVS
配列 I D 番号 : 5 0	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 5 1	GFTFDDYA
配列 I D 番号 : 5 2	ISWSSGSI
配列 I D 番号 : 5 3	AKDRASSWYAYGMDV
配列 I D 番号 : 5 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 5 5	DDN
配列 I D 番号 : 5 6	QSTRV

の 1 つ、またはいくつかを含むか、その配列の 1 つ、またはいくつかからなる。

【0074】

アッセイとして ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）を利用して体液中のヒト NMDAR1 自己抗体の定量測定をすることができる。このアッセイでは、96 ウェルのプレートに覆った、ヒト NMDAR1 自己抗体に特異的な抗体または抗体フラグメントまたは

10

20

30

40

50

非 I g 足場を使用する。サンプルに由来するタンパク質のプレートへの非特異的結合は、被覆された 96 ウェルのプレートをブロッキング溶液（例えばウシ血清アルブミンと低濃度の洗浄剤（例えば Tween 20）を含む洗浄緩衝液）とともにあらかじめインキュベートすることによって阻止される。100 μ l の標準とサンプルをピペットでウェルに入れ、インキュベーション（室温で 2.5 時間、または 4 $^{\circ}$ C で一晚）中に、サンプル中に存在する NMDAR1 抗体を、固定化された抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場を通じてウェルに結合させる。ウェルを洗浄緩衝液（例えばリン酸緩衝化生理食塩水溶液）で洗浄し、希釈したビオチニル化抗ヒト I g G 抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートする。結合しなかったビオチニル化抗体を洗浄緩衝液で洗い流した後、希釈した HRP 共役ストレプトアビジンをピペットでウェルに入れ、室温で 1 時間インキュベートする。ウェルを再度洗浄緩衝液で洗浄し、基質溶液（例えばテトラメチルーベンジジン）をウェルに添加すると、抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場に結合した NMDAR1-I g G の量に比例して発色する。発色を、直接に、または化学的発色反応を停止させる停止溶液を添加した後に、適切な波長で光度測定によって測定する。

【0075】

体液サンプルは、血清、血漿、脳脊髄液（CSF）、全血、尿、唾液、羊水を含むグループから選択することができる。

【0076】

特別な一実施態様では、体液サンプルは、血清と CSF を含むグループから選択することができる。

【0077】

本発明の主題は、本発明の治療を必要とする可能性のある対象のサンプル中で抗 NMDAR1 抗体の存在を調べるためのキットであり、このキットは、

- 1) NMDAR1 結合抗体または NMDAR-1 結合抗体フラグメントまたは NMDAR1 結合非 I g 足場の混合物が固定化された固体支持体と、
 - 2) 洗浄緩衝液（調製のための瓶または粉末）および希釈緩衝液と、
 - 3) 標準曲線を求めるための組み換えヒト NMDAR1 抗体と、
 - 4) 定量可能なマーカーに共役した抗ヒト免疫グロブリン抗体と、
 - 5) 酵素マーカーの場合には、染色溶液および停止溶液
- を含んでいる。

【0078】

固体支持体は、測定に使用する装置に応じて選択することができる。ELISA プレート（96 ウェルの NUNC 免疫吸着プレートなど）が一般に使用される。代替物は、粒子（ビーズなど）、ミニチュア化したプレート形態（微小流体チップなど）から選択することができる。

【0079】

ELISA のための洗浄緩衝液とブロッキング溶液は本分野で知られている。ブロッキング溶液は、ELISA プレートの非特異的部位をブロックする低濃度の洗浄剤および／または飽和タンパク質を含む緩衝化生理食塩水溶液からなる。緩衝液は、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水を含むグループから選択することができる。一般に用いられる洗浄剤は、0.5%~10% の範囲の Tween 20 である。飽和タンパク質は、スキムミルク、ウシ血清アルブミン、血清、ゼラチンのグループから選択することができる。

【0080】

希釈緩衝液は、洗浄緩衝液と同じでも、緩衝化生理食塩水溶液だけでもよい。

【0081】

抗ヒト免疫グロブリン抗体の選択は、抗免疫グロブリン G、抗免疫グロブリン A、抗免疫グロブリン M、抗免疫グロブリン D、抗免疫グロブリン E を含むグループ、例えばポリクローナルヤギ抗ヒト I g G、I g M、I g A（H+L）二次抗体（Life Technologies 社、カタログ番号 31128）からなすことができる。

【0082】

マーカーとして、定量を可能にするレポータ、またはレポータに連結した高親和性パートナーを有する小分子が可能である。一例は、ビオチン-ストレプトアビジン系である。本分野で知られているレポータは、酵素（例えばセイヨウワサビのペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ）、蛍光体、放射性同位体である。

【0083】

マーカーとして酵素を用いた標準的なELISAキットは、発色基質を含有する染色溶液も含むことになる。酵素のため、HRP基質は、TMB、DAB、ABTSを含むグループから選択することができる。標準とサンプルの光学密度を測定する前に酸性停止溶液を用いて酵素活性を停止させ、興味の対象であるタンパク質または抗体の濃度を求めることができる。

10

【0084】

本発明の範囲に入るさらに別の実施態様を以下に示す。

【0085】

1) 抗NMDAR1抗体の結合領域に特異的に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、その抗NMDAR1抗体の結合領域が1つ以上の配列に含まれ、1つ以上のその配列が、以下の配列：

配列ID番号：1 (003-109-HC)

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARRHYDFDAFDIWGQGMVTVSS

20

配列ID番号：2 (003-109-LC)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGKVTVL

配列ID番号：3 (003-102-HC)

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSVRQPPGKGLEWIGEIYHSGNTNYPNPSLKSRVTVSVDKSKNQFS
LKLTSVTAADTAVYYCARDVSGGVNWFDPWGQGTLLTVSS

配列ID番号：4 (003-102-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRP SGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISG
LKTEDEADYYCQSYDSSSTVVFGGGTKLTVL

30

配列ID番号：5 (007-168-HC)

VQLVQSGAEAKKPGESLKI SCKASGYSTFTFWIGWVRQMPGSGLEWIGI IYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADRSTSTAYL
QWSSLKASDTAMYYCARSAVF DYWGQGTLLTVSS

配列ID番号：6 (007-168-LC)

EIVMTQSPATLSVSPGGRATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQS
EDFAVYYCQYNNWPTSWTFGQGTKVEIK

40

配列ID番号：7 (007-169-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGVVTISADKSI STAY
LQWSSLKASDTAMYYCARDYGDYFDYWGQGTLLTVSS

配列ID番号：8 (007-169-LC)

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIIDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCCSYAGSYTG VFGEGTKLTVL

配列ID番号：9 (007-124-HC)

50

EVQLVESGGGVGRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQVPGKGLEWVSGINWSGADTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRVEDTALYHCAREVGIAVTGYWFDPPWGQGTTLVTV

配列 I D 番号：10 (007-124-LC)

SYELTQPPSVSVAPGQTARISCGGNHSESVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRVEGGDE
AEYYCQVWDSSSDHPGVVFGGGTKLTVL

配列 I D 番号：11 (007-142-HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDTRYSPSFQGGVTTISADKSI STAY
LQWSSLKASDTAMYICARDYGDYYFDYWGQGTTLVTVSS

10

配列 I D 番号：12 (007-142-LC)

LTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
DEADYYCCSYAGSYTGVFGGGTKLTVL

配列 I D 番号：13 (008-218-HC)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGKGLEWVSGISWSSSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTALYYCAKDRASSWYAYGMDVWGQGTTLVTV

配列 I D 番号：14 (008-218-LC)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYDDNQRPSPGVPNRFSGSIDSSSNSASLIISG
LKTEDEADYYCQSTRVFGGGTKLTVL

20

からなるグループから選択され、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の前記結合領域が、以下の配列：

【表 4】

配列 I D 番号 : 1 5	GFTFSSYG
配列 I D 番号 : 1 6	IWYDGSNK
配列 I D 番号 : 1 7	ARRHYDFDAFDI
配列 I D 番号 : 1 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 1 9	EVS
配列 I D 番号 : 2 0	SSYTSSTLYV
配列 I D 番号 : 2 1	GGSISSNW
配列 I D 番号 : 2 2	IYHSGNT
配列 I D 番号 : 2 3	ARDVSGGVNWFD
配列 I D 番号 : 2 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 2 5	EDN
配列 I D 番号 : 2 6	QSYDSSTVV
配列 I D 番号 : 2 7	GYSFTTFW
配列 I D 番号 : 2 8	IYPGDSDT
配列 I D 番号 : 2 9	ARSAVFDY
配列 I D 番号 : 3 0	QSVSSN
配列 I D 番号 : 3 1	GAS
配列 I D 番号 : 3 2	QQYNNWPTSWT
配列 I D 番号 : 3 3	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 3 4	IYPGDSD
配列 I D 番号 : 3 5	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 3 6	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 3 7	DVS
配列 I D 番号 : 3 8	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 3 9	GFTFDDYG
配列 I D 番号 : 4 0	INWSGADT
配列 I D 番号 : 4 1	AREVGIAVTGYWFDP
配列 I D 番号 : 4 2	HSES
配列 I D 番号 : 4 3	DDS
配列 I D 番号 : 4 4	QVWDSSSDHPGVV
配列 I D 番号 : 4 5	GYSFTSYW
配列 I D 番号 : 4 6	IYPGDSDT
配列 I D 番号 : 4 7	ARDYGDYYFDY
配列 I D 番号 : 4 8	SSDVGGYNY
配列 I D 番号 : 4 9	DVS
配列 I D 番号 : 5 0	CSYAGSYTGV
配列 I D 番号 : 5 1	GFTFDDYA
配列 I D 番号 : 5 2	ISWSSGSI
配列 I D 番号 : 5 3	AKDRASSWYAYGMDV
配列 I D 番号 : 5 4	SGSIASNY
配列 I D 番号 : 5 5	DDN
配列 I D 番号 : 5 6	QSTRV

の 1 つ、またはいくつかを含むか、その配列の 1 つ、またはいくつかからなる、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に特異的に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 Ig 足場。

【0086】

2) 非 Ig G 足場である、抗 NMDAR1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 に記載の

10

20

30

40

50

抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【0087】

3) 前記非 I g 足場は、テトラネクチンに基づく非 I g 足場、フィブロネクチン足場、リポカリンに基づく足場、ユビキチン足場、トランスフェリン足場、プロテイン A 足場、アンキリン反復に基づく足場、ミクロプロテイン足場、好ましくはシステインノット（結び目）を形成するミクロプロテイン足場、F y n S H 3 ドメインに基づく足場、E G F R - A ドメインに基づく足場、クニツドメインに基づく足場、アプタマーを含むグループから選択されることができる、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 または 2 に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【0088】

4) 前記非 I g 足場がオリゴヌクレオチドアプタマーである、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 3 に記載の非 I g 足場。

【0089】

5) 抗 N M D A R 1 抗体の前記結合領域に対する親和性を示し、抗 N M D A R 1 抗体のその結合領域に対する解離定数 K_D が 10^{-7} 未満、好ましくは 10^{-8} 未満であり、好ましい K_D は 10^{-9} 未満、最も好ましくは 10^{-10} 未満である、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【0090】

6) 抗 N M D A R 1 抗体を中和する、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【0091】

7) 単特異性の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場である、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【0092】

8) 抗 N M D A R 1 抗体に関係する疾患または病気の治療を必要とする対象においてその疾患または病気の治療に用いるための、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

【0093】

9) 抗 N M D A R 1 抗体に関係する疾患または病気、または抗 N M D A R 1 抗体によって起こる疾患または病気の治療を必要とする対象においてその疾患または病気の治療に用いるための、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場であって、その対象が、体液中に抗 N M D A R 1 抗体の存在を示し、かつ、以下のリスト（括弧内の I C D 番号は、臨床状態を定義する W H O 国際疾病分類を表わしている）にある臨床症状／状態：

- うつ病（F 3 2）、精神病症状を伴う躁病（F 3 0 . 2）、不安障害（F 0 6 . 4）、恐怖症性不安障害（F 4 0）、妄想性障害（F 2 2 . 0）、強迫性障害（F 4 2）、器質性気分障害（F 0 6 . 3）、緊張病性障害（F 0 6 . 1、F 2 0 . 2）、急性多形性精神病性障害（F 2 3 . 0、F 2 3 . 1）、解離性障害（F 4 4）を含む精神異常
- ジスキネジア／ジストニー（G 2 4）、ミオクロヌス（G 2 5 . 3）、振戦（G 2 5 . 0、G 2 5 - 1、G 2 5 - 2）、チック（F 9 5、G 2 5 . 6 9）を含む異常運動
- てんかん（G 4 0）
- 低換気（R 0 6 . 8 9）
- 軽度認知障害（F 0 6 . 7）
- アルツハイマー病型（F 0 0）、梗塞性（F 0 1）、他の疾患（F 0 2）の認知症
- 妊娠

を含むグループから選択された少なくとも 1 つの臨床症状または臨床状態を示す場合に、そのような治療を必要とする、抗 N M D A R 1 抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非 I g 足場。

10

20

30

40

50

【0094】

10) 対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8または9に記載の疾患または病気の治療に用いるため、その治療を必要とする前記対象に生体内投与される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【0095】

11) 対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～10のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるため、その治療を必要とする前記対象に静脈内投与される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

10

【0096】

12) 対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～11のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるため、その治療を必要とする前記対象の生体外治療で用いられる、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【0097】

13) 対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～12のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるための、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場であって、前記対象が、実施例1.2の方法で測定するとき抗NMDAR1抗体の存在を示す、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

20

【0098】

14) 対象における抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～13のいずれか1項に記載の疾患または病気の治療に用いるため、化学療法剤または免疫抑制剤と組み合わせて使用される、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場。

【0099】

15) 抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～14のいずれか1項に記載の疾患または病気を治療または予防する方法であって、抗NMDAR1抗体の結合領域に結合する請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

30

【0100】

16) 抗NMDAR1抗体に関係する請求項8～14のいずれか1項に記載の疾患または病気を治療または予防するための薬の製造における、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【0101】

17) 血漿交換またはCSF交換(CSF濾過)のための、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場で覆われた装置であって、その抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場が、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場である装置。

40

【0102】

18) 抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場で覆われたカラムである、請求項17に記載の、血漿交換またはCSF交換(CSF濾過)のための、抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場で覆われた装置。

【0103】

19) 抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を有する対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べるための、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場の使用。

【0104】

50

20) 抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を持つ対象が治療を必要とするかどうかを判断するため、その対象の体液サンプル中で抗NMDAR1抗体の存在を調べる方法であって、この方法が、

- ・その対象から得られた体液サンプルを、請求項1～7のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場と接触させ、
- ・その体液サンプル中で前記抗NMDAR1抗体の存在を調べることを含んでいて、
- ・そのサンプル中に抗NMDAR1抗体が存在する場合には、その対象が、抗NMDAR1抗体に関係する疾患または病気を有する可能性があり、治療を必要とする可能性がある、方法。

【0105】

21) 治療を必要とする可能性がある対象のサンプル中で抗体の存在を調べるためのキットであって、

- 1) NMDAR1結合抗体またはNMDAR1結合抗体フラグメントまたはNMDAR1結合非Ig足場の混合物が固定化された固体支持体と、
- 2) 標準曲線を求めるための組み換えヒトNMDAR1抗体と、
- 3) 定量可能なマーカーに共役した抗ヒト免疫グロブリン抗体を含むキット。

【0106】

実施例

【0107】

実施例1

【0108】

1. 1 ヒト組み換えモノクローナルNMDAR1抗体の作製
(Tiller他 2009年、J Immunol Methods 第350巻(1～2):183～193ページに基づく技術的手順)

【0109】

脳脊髄液サンプルからの単一ヒト形質細胞とメモリーB細胞の単離(図3～図4)

【0110】

愛徳倫理委員会の承認を得た署名付きのインフォームドコンセントの後、一般的な定型的検査の文脈で脳脊髄液(CSF)を回収した。CSFサンプルを400×gで10分間遠心分離した。次に上清をデカントし、細胞を500μlの凍結培地(45%RPMI、45%FCS、10%DMSO)に懸濁させ、あとで使用するまで-80℃で保管した。蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)のため、図3～図4に示したように、凍結させた細胞を解凍し、希釈し、氷の上で抗体を用いて染色した。細胞ソーティングをFACS Aria II(BD Biosciences社)で実施し、4μl/ウエルの0.5×リン酸緩衝化食塩水(PBS)の氷冷溶解溶液を10mMのDTT(Invitrogen社)および8UのRNasin(Promega社)とともに含む96ウエルのPCRプレート(VWR社)に入れた。ソーティングの後、プレートをSealing Foil(VWR社)で直接密封し、ドライアイス上でただちに凍結させた後、-80℃で保管した。

【0111】

単一細胞逆転写PCRとIg遺伝子の増幅

【0112】

元の96ウエルのソーティングプレートにおいて、サンプル1つにつき全体積14μlの中で逆転写(RT)を実施した。各ウエルの各単一細胞からの全RNAに、ランダム六量体プライマーp(dN)₆(Roche社)を150ng、各ヌクレオチドdNTP-Mix(Invitrogen社)からの25mMを0.5μl、0.1M DTT(Invitrogen社)を1μl、10%Igepal CA-630(Sigma社)を0.5μl、RNasin(Promega社)を14U、Superscript(登録商標)III逆転写酵素(Invitrogen社)を50U添加した。

サーマルサイクリング条件は、42℃で10分間、25℃で10分間、50℃で60分間、94℃で5分間であった。cDNAを-20℃で保管した。

【0113】

Ig V遺伝子を増幅するため、IgH、Igκ、Igλについて別々の各単一細胞cDNAで2工程のネステッドPCR戦略を利用した。すべてのPCR反応を、96ウエルのプレート（VWR社）において、320 nMの全プライマーまたはプライマー混合物、250 nMの各dNTP（Invitrogen社）、0.9 UのHotStar（登録商標）Taq DNAポリメラーゼ（Qiagen社）を含む全体積40μl／ウエルの中で実施した。1回目のPCRのための鋳型として2.0μlのcDNAを使用し、ネステッド反応には3.5μlの精製していない最初のPCR産物を使用した。各回のPCRを、最初は94℃で15分間、94℃で30秒間を50サイクル、58℃（IgH／Igκ）または60℃（Igλ）で30秒間、72℃で55秒間（1回目のPCR）または45秒間（2回目のPCR）、最後に72℃で10分間にて実施した。

【0114】

Ig遺伝子配列の分析

【0115】

Tiller他2009年 J Immunol Methods 第350巻（1～2）：183～193ページに記載されているようにして、第2のPCR産物を、IgH、Igκ、Igλのためのそれぞれの逆プライマーを用いてシーケンシングした。IgBLASTでGenBankと比較することによって配列を分析し（Ye J他 2013年 Nucleic Acids Res. 第41巻）、一致度が最大の生殖系列V（D）J遺伝子断片を同定した。IgBLASTに示されているようにして、フレームワーク領域（FWR）3の後のアミノ酸残基を、全JHセグメント内の保存されているトリプトファングリシンモチーフまで、またはJLセグメント内の保存されているフェニルアラニングリシンモチーフまで数えることにより、IgH相補性決定領域（CDR）3の長さを求めた。クローニングされたIg遺伝子からの配列とは異なり、2回目のPCR産物の配列は、Taqポリメラーゼによって導入された変異を示さない可能性が大きく、PCRの初期に変異が導入された場合にだけそうなると考えられる。体細胞変異がないナイーブB細胞からのIg遺伝子の配列を公開されている生殖系列配列と比較して分析することにより、Taqを媒介として間違っ

【0116】

発現ベクターのクローニング

【0117】

クローニングの前に、Qia-Quick 96 PCR精製キット（Qiagen社）とQIAvac 96を用いて全PCR産物を精製した。サンプルを50μlの無ヌクレアーゼ水（Eppendorf社）で溶離させて96ウエルのプレートに入れた。同じプレートにおいて、全体積35～40μlの中で各制限酵素AgeI、SalI、XhoI（すべてNEB社）を用いて消化させ、消化されたPCR産物を精製した後、Ig遺伝子シグナルペプチド配列（GenBank登録番号DQ407610）と、ヒトIgγ1定常領域、ヒトIgκ定常領域、ヒトIgλ定常領域いずれかの上流にある多重クローニング部位を含むヒトIgγ1発現ベクター、ヒトIgκ発現ベクター、ヒトIgλ発現ベクターに連結した。ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）プロモータの影響下で転写を実施すると、クローンをアンピシリンに対する耐性に基づいて選択することができる。1 UのT4リガーゼ（Invitrogen社）、消化され精製された7.5μlのPCR産物、25 ngの線状にしたベクターを含む全体積10μlの中で連結を実施した。96ウエルのプレートの中でその連結産物を3μl用い、コンピテント大腸菌DH10B（Clontech社）を42℃で形質転換した。順プライマーとして5' Absenseを、逆プライマーとして3' IgGinternal、3' Cκ494、3' Cλのいずれかをそれぞれ用い、PCRによってコロニーをスクリーニングした。予想

されたサイズのPCR産物 (I g γ 1については650 bp、I g κ については700 bp、I g λ については590 bp) をシーケンシングし、元のPCR産物と一致することを確認した。(T i l l e 他2009年 J I m m u n o l M e t h o d s 第350巻(1~2):183~193ページ)。エラーを起こしやすいT a q ポリメラーゼを使用しているため、Q I A p r e p スピンカラム (Q i a g e n 社) を用い、75 μ g/ml のアンピシリンを含むT e r r i f i c B r o t h (D i f c o L a b o r a t o r i e s 社) の中で37℃にて16時間増殖させた3 ml の細菌培養物からプラスミドDNAが大まかに単離された。75 μ l のEB溶離緩衝液 (Q i a g e n 社) を用いた溶離の後、1.5 ml の細菌培養物から平均で35 μ g のプラスミドDNAが回収された。

10

【0118】

組み換え抗体の産生

【0119】

150 mmのプレート (F a l c o n , B e c t o n D i c k i n s o n 社) において、10%熱不活化超低I g Gウシ胎仔血清 (F C S) (I n v i t r o g e n 社)、1 mMのピルビン酸ナトリウム (G i b c o B R L 社)、100 μ g/ml のストレプトマイシン (G i b c o B R L 社)、100 U/ml のペニシリンG (G i b c o B R L 社)、0.25 μ gのアムホテリシン (G i b c o B R L 社) を補足したダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M ; G i b c o B R L 社) の中で、標準条件下にて、ヒト胎児由来腎臓 (H E K) 293細胞 (A T C C、番号C R L - 1 5 7 3) または293T細胞 (A T C C、番号C R L - 1 1 2 6 8) を培養した。

20

【0120】

細胞集密度が80%のとき、リン酸カルシウム沈降により、指数関数的に増殖しているH E K 2 9 3 細胞の一過性トランスフェクションを実施した。同量 (それぞれ12.5~20 μ g) のI g Hとそれに対応するI g L鎖発現ベクターのDNA、0.7 mMのクロキシン (S i g m a 社) を1 ml の殺菌水の中で混合し、2.5 M C a C l ₂を一滴ずつ添加して濃度を250 mMにした。同体積の2×H E P E S緩衝化生理食塩水 (50 mM H E P E S、10 mM K C l、12 mMデキストロース、280 mM N a C l、1.5 mM N a ₂H P O ₄-7 H ₂O、pH 7.05) とカルシウム-DNA溶液をゆっくりと回転させながら混合し、室温で10分間インキュベートすることで、沈殿物が形成されるようにした。沈殿混合物は、培養皿に均等に分布していた。8~12時間後に細胞を10 ml の無血清D M E Mで洗浄し、1%N u t r i d o m a - S P (R o c h e 社) を補足した25 ml のD M E Mの中で6日間培養した後、上清を回収し、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) によって分析して組み換え抗体の産生を調べた。

30

【0121】

組み換え抗体の精製

【0122】

800×gで10分間遠心分離することによって細胞の残骸を除去し、培養物の上清に0.05%アジ化ナトリウムを添加して4℃で保管した。プロテインGビーズ (G E H e a l t h c a r e 社) を製造者の指示に従って用い、組み換え抗体を精製した。簡単に述べると、細胞培養物の上清25 ml を25 μ l のプロテインGビーズとともに回転下で4℃にて少なくとも14時間インキュベートした。800×gで10分間遠心分離した後に上清を除去し、ビーズを、P B Sで平衡させたクロマトグラフィスピンカラム (B i o R a d 社) に移した。1 ml のP B Sを用いて2回洗浄した後、0.1 Mグリシン (pH 3.0) を用いて抗体を溶離させて3~4つの分画 (それぞれ200 μ l) にした。20 μ l の1 Mトリス (pH 8.0) と0.5%アジ化ナトリウムを入れた試験管に溶離液を回収した。組み換え抗体の濃度をE L I S Aによって求めた。すべての工程を周囲温度で実施した。

40

【0123】

50

1. 2 ヒトNMDAR1タンパク質に結合する抗体の確認と病原効果

【0124】

トランスフェクトされたHEK293細胞（図5）

【0125】

ヒトイオンチャネル型グルタミン酸N-メチル-D-アスパラギン酸1受容体（GRIN1）のcDNAは、Wanker（博士）教授（MDC、ベルリン）の好意により提供され、それをクローニングしてpBudCE4.1（Life Technologies社）に組み込んだ。NR1のDNA（1μg）を3μgのPEIおよび100μlの150 mM NaClと混合し、ボルテックスし、10分間インキュベートし、HEK293細胞に一過性にトランスフェクトした。2日後、-20℃のメタノールを用いてHEK293細胞をカバースリップの上に4分間固定した。それに加え、異なるNMDARクローン、ロイシンリッチなグリオーマ不活化1（LGI1）、コンタクチン関連タンパク質2（Casp2）、α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸（AMPA）受容体、γ-アミノブチル酸b（GABA_b）受容体をトランスフェクトしたHEK293細胞を使用した（Autoimmune-Encephalitis-Mosaic 1、Euroimmun社、リューベック、ドイツ国）。モノクローナル抗体と対照抗体を用いた染色のため、細胞をPBSの中で洗浄し、2%ウシ血清アルブミンと0.1%トリトンX-100を含む5%正常ヤギ血清とともにあらかじめインキュベートした後、1:2の希釈から開始した細胞培養物の上清を抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。可視化するため、二次蛍光標識した抗ヒトIgG抗体を用いた。切片をPBSの中で洗浄し、Immu-Mount（ThermoScientific社）を用いてカバースリップをマウントした。トランスフェクトされた細胞に市販の抗体（モノクローナルマウス抗NR1抗体とポリクローナルウサギ抗NR1抗体（1:100、Synaptic Systems社）（図5））を二重標識し、反応性クローンを同定した。

【0126】

以下の反応性クローンが同定された（HC＝重鎖；LC＝軽鎖；太字＝それぞれの鎖の抗原結合領域（CDR1～3））：配列ID番号1～14。

【0127】

脳切片（図6）

【0128】

パラホルムアルデヒドで固定したマウスとラットの脳切片を使用した。組織を、0.1%トリトンX-100を含むPBSの中で20分間かけて透明にした後、10%正常ヤギ血清の中で30分間ブロックした。ヒト組み換えモノクローナル抗体または対照抗体を含む、トランスフェクトされたHEK293細胞の培養物の上清を1:2～1:200に希釈し、切片を4℃で一晩インキュベートした。可視化するため、二次蛍光標識した抗ヒトIgG抗体を用いた。切片をPBSの中で洗浄し、Immu-Mount（ThermoScientific社）を用いてカバースリップをマウントした。NR1反応性クローンの染色パターンは、マウス海馬におけるNMDARの既知の解剖学的分布と同じであった（図6）。

【0129】

NMDAR陽性シナプスクラスターの下方調節

【0130】

海馬一次ニューロンをマウス脳から切り出した後に培養した。胎生16日目の海馬を、10%ウシ胎仔血清、100 IEのインスリン/1、0.5 mMのグルタミン、100 U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン、44 mMのグルコース、10 mMのHEPESを補足したMEMの中で解離させた。遠心分離の後、細胞を、B27、0.5 mMのグルタミン、100 U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン、25 μMのグルタミン酸を補足した無血清Neurobasal培地の中に再度懸濁させた後、ポリ-L-リシン/コラーゲンであらかじめ覆ったカバースリップの上に8×10⁴細胞/

ウエルの割合で載せた（すべての成分をGibco／BRL社から入手）。機能するシナプスが完全に成熟できるようにするため、14日目にインビトロで細胞を用いて免疫細胞化学を実施した。

【0131】

NMDAR陽性のシナプスクラスターを定量するため、一次ニューロンをヒト組み換えモノクローナル抗NMDAR1抗体または対照抗体で18時間処理した（図7）。細胞を病原性抗体および対照抗体とともにインキュベートした後、固定し、市販のNMDAR抗体（Synaptic Systems社）を用いてNMDAR1の内部化されていない分画を染色した。個々の実験において、条件ごとに、長さ100μmの近位樹状突起を40倍の倍率にした画像40枚を用いてクラスターを調べた。画像はグレースケールに変換した。色彩を変換して閾値を決めた画像を、Scion Imageソフトウェア（Scion社、現在は<http://en.bio-soft.net/>）により、強度とサイズの基準に従って分析した。細胞数が似た領域に関して処理群間の比較が正確になるようにするため、細胞をカウントした。ヒトモノクローナルNMDAR抗体を用いたNMDARの下方調節（図7）は、文献にあるNMDAR脳炎患者の全CSFを用いたデータと同等である。

【0132】

エピトープの分析

【0133】

Stratagene QuikChange Mutagenesisキットを製造者の指示に従って用いて点変異N368QをNR1コンストラクトに導入した後、以前に報告されているようにして（Doss他、2014年）その変異体をHEK293細胞に一過性にトランスフェクトした。天然のNR1コンストラクトを発現しているHEK293細胞と変異したNR1コンストラクトを発現しているHEK293細胞を上記のようにして染色した。すべてのヒトモノクローナルNMDAR1抗体で変異体への結合が排除された（図8）。

【0134】

実施例2

【0135】

ヒト組み換えモノクローナルNMDAR1抗体に対する抗体の作製

【0136】

Frenzel他2014年Methods Mol Biol 第1060巻：215～243ページが記載しているようにして、患者のPMMCからscFvライブラリを構成した。Hust他2014年Methods Mol Biol 第1101巻：305～320ページが記載しているようにして、固定化されたヒトモノクローナル抗NMDAR1抗体に関して3回以上パンニングを実施し、固定化された抗原とmycタグ検出に関してELISAによるスクリーニングを実施した。

【0137】

実施例3

【0138】

ヒト組み換えモノクローナルNMDAR1抗体に対するアプタマーの作製

【0139】

Jones他2006年Antimicrob. Agents Chemother 第50巻（9）：3019～3027ページに従ってアプタマーを作製した。SELEX（EllingtonとSzostak 1990年Nature 第346巻（6287）：818～822ページ；TuerkとGold 1990年Science 第249巻（4968）：505～510ページ）を利用し、臭化シアン（CNBr）で活性化したSephacroseにプロテイン-A-Sephacroseを通じてN末端リンカーORによって付着したヒト組み換えモノクローナル抗NMDAR1抗体を認識するアプタマーを選択した。2つのプライマー結合部位が隣接した40-ntのランダム

10

20

30

40

50

領域を含む 10^{14} 通りの多様性がある DNA ライブラリをインビトロで転写すると、それぞれの RNA ライブラリが得られた。RNA を選択マトリックスとともにインキュベートし、結合しなかった配列を結合緩衝液で洗浄して除去した後、残った種を溶離させ、逆転写して、次の転写と新たな選択サイクルのための入力 DNA として用いた。結合した種を 6 サイクルの選択の後にリッチにし、逆転写し、クローニングし、シーケンシングした。カラムアッセイにおいて抗 NMDAR1 抗体-Sepharose に対する結合特性がサイクル 6 からのプールをリッチにしたものよりも優れていた単クローンを選択して親和性を求めた。

【0140】

実施例 4

【0141】

ヒト組み換えモノクローナル NMDAR1 抗体に対する抗体とアプタマーの結合親和性を求めるためのアッセイ

【0142】

選択された抗体またはアプタマーの親和性を表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析 (Jones 他 2006 年 Antimicrob. Agents Chemother 第 50 巻 (9) : 3019~3027 ページ) によって測定した。

【0143】

より詳細には、Biacore™ X プラットフォーム (GE Healthcare 社) を用い、選択されたアプタマーの結合を分析した。したがって、報告されているように (Schutze T 他、2011 年、PLoS ONE 第 6 巻 (12) : e29604 ページ) アミンカップリングを利用して、モノクローナル NMDAR 抗体をプロテイン A センサーチップ (GE Healthcare 社) に固定化した。25℃ の結合緩衝液を流速 30 μ l / 分で用いて結合を分析した。注入前に、合成オリゴヌクレオチドを 94℃ で 3 分間変性させ、結合緩衝液の中で再度折り畳ませた。30 μ l のアプタマー溶液を 0.1~2.0 μ M の範囲でフローセルに注入する。各アプタマーを注入した後、2 $\times$ 10 μ l の 0.5 mM NaCl / 0.5 mM MgCl₂ を注入してチップの表面を再生させた。BIAevaluation ソフトウェア (Biacore 社) を用いてアプタマー-ストレプトアビジン複合体の会合速度、解離速度、会合定数、解離定数を求めた。

【0144】

実施例 5

【0145】

5.1 NMDAR1 を発現している HEK293 細胞へのヒト組み換えモノクローナル NMDAR1 抗体の結合の抑制 (「中和」)

【0146】

上記のように免疫細胞化学を目的として、HEK293 細胞にヒトイオンチャネル型グルタミン酸 N-メチル-D-アスパラギン酸 1 受容体 (遺伝子名: GRIN1) の cDNA を一過性にトランスフェクトし、カバースリップ上で増殖させた。特異的アプタマーまたは Ig または非 Ig 足場をモノクローナル抗 NMDAR1 抗体とともに、抗 NMDAR1 抗体に対してアプタマーのモル数を 2~20 倍過剰にして、室温で 30 分間あらかじめインキュベートした。対照は、モノクローナル抗体、非抗 NMDAR1 対照抗体、アプタマーのいずれかだけを含んでいた。細胞を PBS の中で洗浄し、2% ウシ血清アルブミンと 0.1% トリトン X-100 を含む 5% 正常ヤギ血清とともにあらかじめインキュベートした後、アプタマー-抗体混合物または対照抗体とともに 4℃ で一晩インキュベートした。可視化するため、二次蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を用いた。カバースリップを PBS の中で洗浄し、Immu-Mount (ThermoScientific 社) を用いてマウントした。抗体の結合の中和は、蛍光信号が、ベースラインまで低下すること、すなわち非 NMDAR 結合対照抗体とともにインキュベートした細胞の蛍光強度まで低下することによって判断する。

10

20

30

40

50

【0147】

5. 2 NMDAR1を発現している脳切片へのヒト組み換えモノクローナルNMDAR1抗体の結合の抑制

【0148】

パラホルムアルデヒドで固定したマウスとラットの脳切片を使用した。組織を、0.1%トリトンX-100を含むPBSの中で20分間かけて透明にした後、10%正常ヤギ血清の中で30分間ブロックした。特異的アプタマーまたはブロッキングIgまたは非Ig足場を抗NMDAR1モノクローナル抗体とともに、抗NMDAR1抗体に対してアプタマーのモル数を2~20倍過剰にして、室温で30分間あらかじめインキュベートした。対照は、モノクローナル抗体、非抗NMDAR1対照抗体、アプタマーのいずれかだけを含まれていた。切片を4℃で一晩インキュベートした。可視化するため、二次蛍光標識した抗ヒトIgG抗体を用いた。切片をPBSの中で洗浄し、Immu-Mount (ThermoScientific社)を用いてカバースリップをマウントした。染色パターンをマウス海馬におけるNMDARの既知の解剖学的分布と比較した。抗体の結合の中和は、蛍光信号が、ベースラインまで低下すること、すなわち非NMDAR結合対照抗体とともにインキュベートした切片の蛍光強度まで低下することによって判断する(図11)。抗NMDARモノクローナル抗体をアプタマーとともにあらかじめインキュベートすると、海馬の歯状回においてNMDARへの抗NMDARモノクローナル抗体の結合が顕著に減少する。

10

【0149】

5. 3 NMDAR陽性シナプス後クラスターの自己抗体を媒介とした下方調節の抑制

20

【0150】

上記のようにして一次海馬ニューロンを培養し、免疫細胞化学の準備をした。機能するシナプスが完全に成熟できるようにするため、細胞を14日目にインビトロで使用した。一次ニューロンに関するNMDAR陽性シナプスクラスターを上記のようにして定量し、ヒト組み換えモノクローナル抗NMDAR1抗体による染色を、あらかじめインキュベートしたアプタマー-抗体混合物(モル比20:1)と比較した。

【0151】

5. 4 NMDAR1を発現しているHEK293細胞へのNMDAR1陽性患者の血清抗体の結合の抑制

30

【0152】

上記のように免疫細胞化学を目的として、HEK293細胞にヒトイオンチャネル型グルタミン酸N-メチル-D-アスパラギン酸1受容体(遺伝子名:GRIN1)のcDNAを一過性にトランスフェクトし、カバースリップ上で増殖させた。特異的アプタマーを患者の血清とともに室温で30分間あらかじめインキュベートした。対照は、対照抗体または患者の血清だけを含まれていた。細胞をPBSの中で洗浄し、2%ウシ血清アルブミンと0.1%トリトンX-100を含む5%正常ヤギ血清とともにあらかじめインキュベートした後、サンプル混合物または対照抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。可視化するため、二次蛍光標識した抗ヒトIgG抗体または抗ヒトIgA抗体を用いた。カバースリップをPBSの中で洗浄し、Immu-Mount (ThermoScientific社)を用いてマウントした。細胞の蛍光強度を記録した。抑制は、アプタマーを含むサンプルにおいて、患者の血清だけを含まれるサンプルと比較して信号が顕著に低下することによって判断した。

40

【0153】

実施例6:患者に由来するNMDAR自己抗体の配列分析

【0154】

患者に由来するNMDAR自己抗体を実施例1に記載したようにして単離した。IgBLASTによって配列をGenBankと比較して分析した(Ye J他 2013年 Nucleic Acids Res 第41巻)。CDRを同定し、アラインメントし

50

、CDRの長さ、CDR残基の特性、配列の相同性を分析した（図9）。CDR配列のアラインメントにより、異なる患者に由来する機能性相同ヒトNMDAR抗体が明らかになった。

【0155】

実施例7：変異していないヒトNMDAR自己抗体の同定（Kreye他、2016年、Brain）

【0156】

各IgG配列について、免疫グロブリン遺伝子の中の体細胞高頻度変異の数をカウントし、注釈がつけられた生殖系列配列と比較するとともに、相補性決定領域の長さと比較した（KabattとWu、1991年；Kabatt他 1983年）。NMDARに対する変異していないヒト抗体が同定された（図10）。これら抗体は、いわゆる生殖系列の配置を含んでいる（「天然の抗体」とも呼ばれる）。すなわちこれらの抗体は、患者だけでなくあらゆる人の身体が連続的に産生しているため、以前に健康であった人にも確率的に存在するであろう。正常（健康）な遺伝子レパートリーに含まれる天然のNMDAR抗体の配列コードが理由で、データは、より多くの人に関係する可能性がある配列の数は限定されるという進化上の制限が存在することを示唆している。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1a】抗体の形態の図解 — FvとscFvのバリエーション

【0158】

【図1b】抗体の形態の図解 — 異種融合体と二機能性抗体

【0159】

【図1c】抗体の形態の図解 — 2価抗体と二重特異性抗体

【0160】

【図2】数回の選択と増幅で高度に特異的かつ親和性のあるアプタマーが得られる

【0161】

【図3】第1の組み換えモノクローナルNMDAR1自己抗体技術の概略

【0162】

【図4】第1の組み換えモノクローナルNMDAR1自己抗体FACSソーティング戦略

【0163】

【図5】第1の組み換えモノクローナルNMDAR1自己抗体NR1をトランスフェクトされたHEK293細胞の染色（診断用定型的アッセイ）によるNMDAR特異的結合の確認。（A）hNR1＝ヒトモノクローナル抗NR1抗体、（B）msNR1＝市販のマウス抗NR1抗体、（C）染色が完全に重なっていることを示すマージ画像。

【0164】

【図6】第1の組み換えモノクローナルNMDAR自己抗体マウス脳切片での海馬の特異的染色

【0165】

【図7】第1の組み換えモノクローナルNMDAR自己抗体海馬一次ニューロンにおけるNMDARクラスターの下方向調節

【0166】

【図8】ヒトモノクローナルNMDAR1抗体のエピトープ分析HEK293細胞に、野生型NR1をトランスフェクトするか、変異N368Qを有するコンストラクトをトランスフェクトした。クローン007-168について例示してあるように、すべてのヒトモノクローナルNMDAR1抗体が野生型NR1を強く認識した（A）が、変異体は染色されなかった（B）。

【0167】

【図9】ヒトモノクローナルNMDAR1抗体のCDR配列の比較異なる患者に由来するヒトNMDAR1抗体のCDR配列のアラインメントから、機能の相同性が明らかになる。配列の注釈：＊ 6／6の配列で一致；＋ 5／6の配列で一致または機能の類似（A

10

20

30

40

50

）。交差配列類似性。L CDR 2（右）：わずか3個の残基と短い＝（6／6で）低い立体的自由度；（5／6で）酸性残基が優位（太字で示す（D、E））。H CDR 1（左）：似た長さ＝（6／6で）8個または9個の残基；（5／6で）芳香族残基が優位（太字で示す（F、Y、W））；相同性に従ってグループ化（B）。異なる患者に由来するNMDAR抗体が大きな相同性を示している。003-109と007-169のCDR配列の比較。L CDR 1が一致；L CDR 2、L CDR 3、H CDR 1が相同；H CDR 2とH CDR 3が、似た酸性の性質（C）。

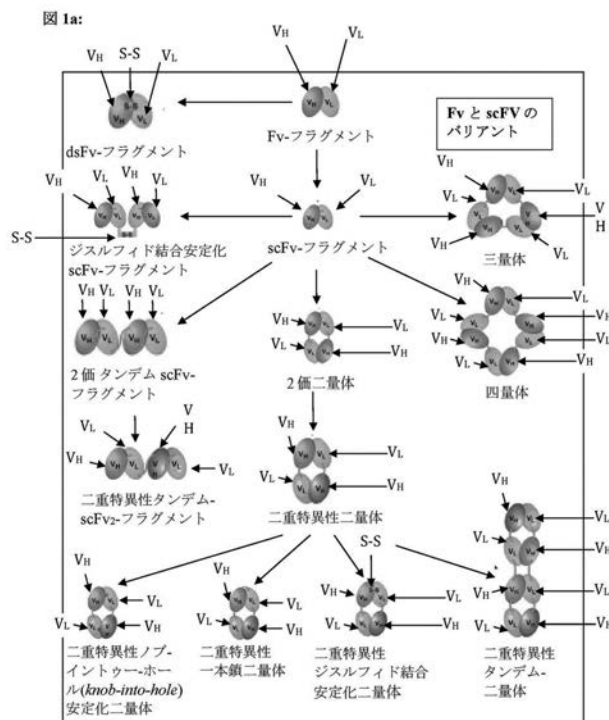
【0168】

【図10】ヒト組み換えモノクローナルNMDAR抗体における体細胞高頻度変異の数脳炎患者の脳脊髄液に含まれる抗体分泌細胞から産生された各抗体で、Ig重鎖（IGH）のV遺伝子断片と、それに対応するIgκ（IGK）軽鎖またはIgλ（IGL）軽鎖に関して体細胞高頻度変異（SHM）の数をプロットした。NR1反応性抗体（黒い点）は、平均で、IGHV遺伝子断片において4.9 SHMを、IGKV／IGLV遺伝子断片において4.1 SHMを示す。これは、他の（非NR1）抗体よりもはるかに小さい。重要なことだが、いくつかのNR1抗体は、単一の高頻度変異を持たないため、天然の抗体を反映している。

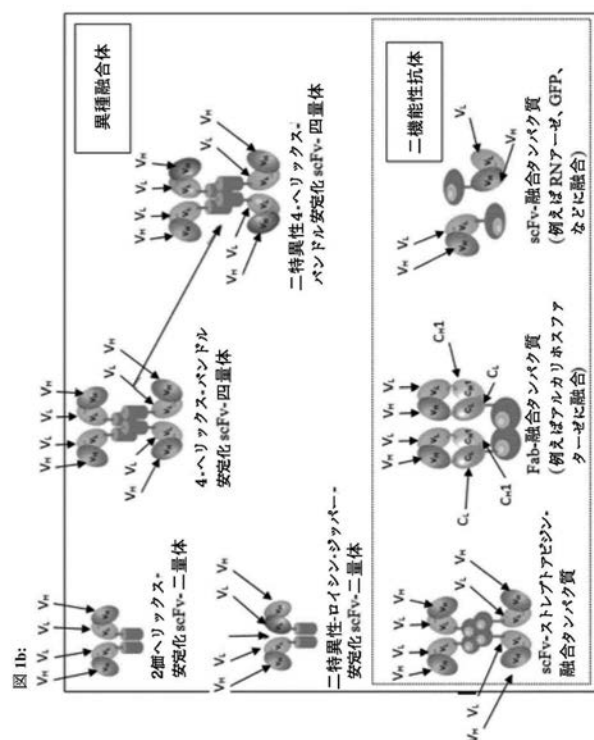
【0169】

【図11】アプタマーは、マウス脳切片へのヒトモノクローナルNMDAR抗体の結合を減らす。モノクローナルNMDAR抗体は、マウス海馬内でNMDARを発現している領域に強く結合する（星印は、NMDARタンパク質の発現が最大である海馬の歯状回を示している）（A）。同じ抗体を、リッチにしたアプタマープールとともにあらかじめインキュベートすると、マウス脳への抗体の結合が顕著に減少した（B）。

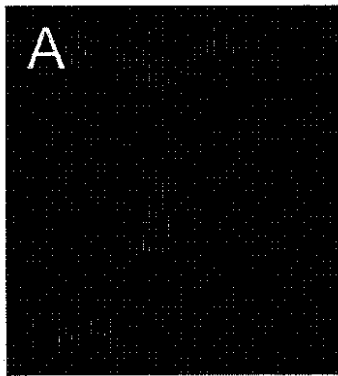
【図1a】



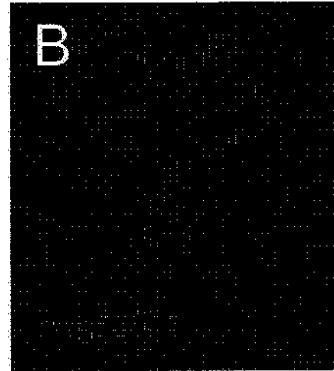
【図1b】



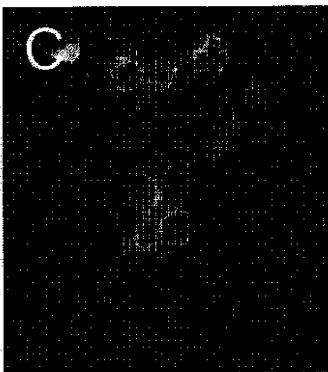
【図 5 A】



【図 5 B】

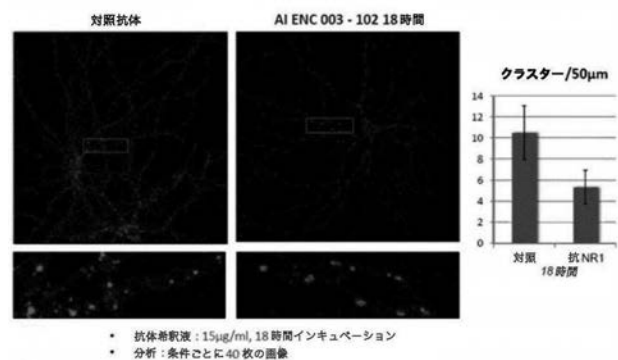


【図 5 C】



【図 7】

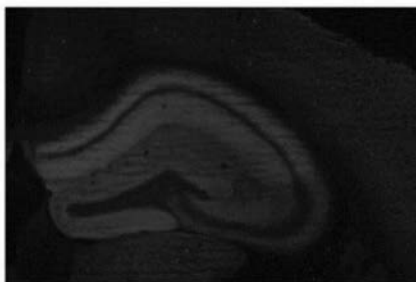
図 7:



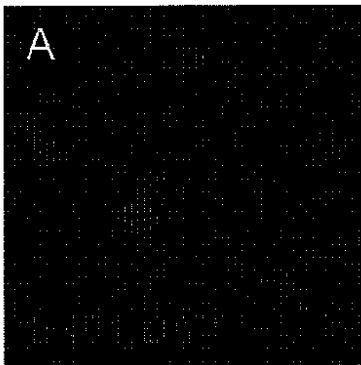
【図 6】

図 6:

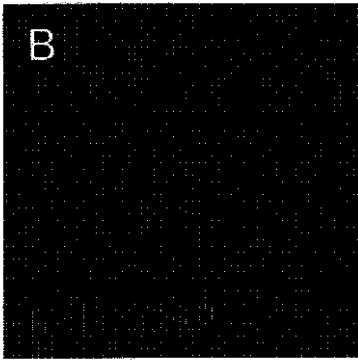
AI003: クローン102



【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9 A】

A	CDR1	CDR2	CDR3
	* ++ + + +	+ +	+ + + + + *
003-109-LC	S S D V G G Y N Y	E V S	S S Y T S S T L Y V
003-102-LC	S G S I A S N Y	E D N	Q S Y D S S T V V
007-169-LC	Q S V S S N	G A S	Q Q Y N N W P T S W T
007-169-LC	S S D V G G Y N Y	D V S	C S Y A G S Y T G V
007-124-LC	H S E S	D D S	Q V W D S S S D H P G V V
008-218-LC	S G S I A S N Y	D D N	Q S T R V

	* + + + + + +	* + +	+ +	* + + + + +	* +
003-109-HC	G F T F S S Y G	I W Y D G S N K		A R R H Y D F D A	F D I
003-102-HC	G G S I S S S N W	I Y H S N T		A R D V S G G V N	W F D P
007-169-HC	G Y S F T T F W	I Y P G D S D T		A R S A V	F D Y
007-169-HC	G Y S F T S Y W	I Y P G D S D		A R D V G D	Y Y F D Y
007-124-HC	G F T F D D Y G	I N W S S G A D T		A R E V G I A V T G Y W F D P	
008-218-HC	G F T F D D Y A	I S W S S G S I		A K D R A S S W Y A Y G M D V	

【図 9 B】

B	CDR2	CDR1
003-102-LC	E D N	007-124-HC G F T F D D Y G
008-218-LC	D D N	008-218-HC G F T F D D Y A
007-124-LC	D D S	
		003-109-HC G F T F S S Y G
003-109-LC	E V S	007-169-HC G Y S F T S Y W
007-169-LC	D V S	007-168-HC G Y S F T T F W
		003-102-HC G G S I S S S N W
007-168-LC	G A S	

【図 9 C】

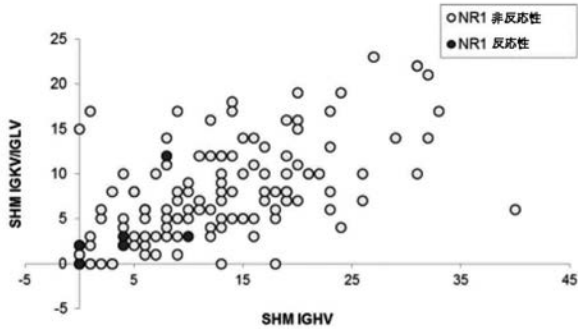
C	CDR1	CDR2	CDR3
003-109-LC	S S D V G G Y N Y	E V S	S S Y T S S S T L Y V
007-169-LC	S S D V G G Y N Y	D V S	C S Y A G S Y T G V
003-109-HC	G F T F S S Y G	I W Y D G S N K	A R R H Y D F D A F D I
007-169-HC	G Y S F T S Y W	I Y P G D S D	A R D Y G D Y Y F D Y

【図 1 1 A】

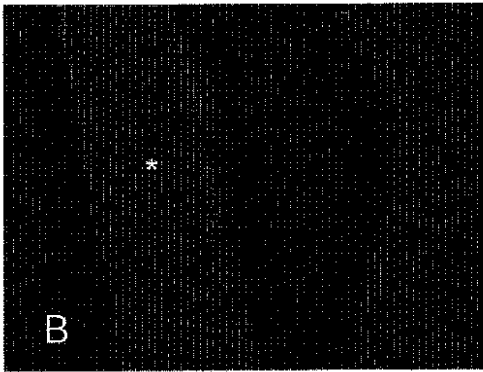


【図 1 0】

図 10:



【図 1 1 B】



【配列表】

2018535922000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/069451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/42 C12Q1/68 G01N33/48 A61K31/00
ADD.

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)

C07K A61K C12Q G01N

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOCKRIDGE JENNIFER L ET AL: "Mice Engrafted with Human Fetal Thymic Tissue and Hematopoietic Stem Cells Develop Pathology Resembling Chronic Graft-versus-Host Disease", BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, vol. 19, no. 9, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 1310-1322, XP028696884, ISSN: 1083-8791, DOI: 10.1016/J.BBMT.2013.06.007 page 1312, column 1, paragraph 1 ----- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 2016

Date of mailing of the international search report

21/12/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chapman, Rob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/069451

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	"Purified anti-human Ig light chain k Product data Sheet", Biolegend, 22 March 2016 (2016-03-22), XP055260480, Retrieved from the Internet: URL: http://www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=3295 [retrieved on 2016-03-22] the whole document	1
X	----- WO 2007/027805 A2 (CENTOCOR INC [US]; GILES-KOMAR JILL M [US]; RYCYZYN MICHAEL A [US]; ST) 8 March 2007 (2007-03-08)	1
Y	the whole document	2-7
X	----- STAQUET K ET AL: "A rapid method for generating and characterizing anti-variable region monoclonal antibodies", HUMAN ANTIBODIES, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 4, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 155-162, XP002508744, ISSN: 1093-2607	1
Y	the whole document	2-7
X	----- STAQUET KIMBERLY ET AL: "A rapid and efficient method for generating anti-variable region monoclonal antibodies using type-1 interferons as immune modulators", HUMAN ANTIBODIES, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 3, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 61-69, XP008099786, ISSN: 1093-2607	1
Y	the whole document	2-7
Y	----- DALMAU J ET AL: "Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis", LANCET NEUROLOGY, LANCET PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 63-74, XP027599021, ISSN: 1474-4422, DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70253-2 [retrieved on 2011-01-01] The whole document, in particular Fig.7 ----- -/--	2-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/069451

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANTHONY D. KEEFE ET AL: "Aptamers as therapeutics", NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, vol. 9, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 537-550, XP055260503, GB ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd3141 The whole document, in particular Table 1 -----	2-21
X	DARVAS M ET AL: "Specific contributions of N-methyl-d-aspartate receptors in the dorsal striatum to cognitive flexibility", NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 284, 15 November 2014 (2014-11-15), pages 934-942, XP029113493, ISSN: 0306-4522, DOI: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.11.011 The whole document, in particular, experimental procedures -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/069451**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-21(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2016/ 069451

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-21(partially)

Antibody or antibody fragment or non-Ig scaffold binding specifically to a binding region of an anti-NMDAR1 antibody wherein the binding region of said anti-NMDAR1 antibody is comprised in one ore more sequences wherein said one or more sequence is selected from a group consisting of the following sequences:and wherein said binding region for the antibody or antibody fragment or non-Ig scaffold comprises or consists of SEQ ID NO:1

2-15. claims: 1-21(partially)

Antibody or antibody fragment or non-Ig scaffold binding specifically to a binding region of an anti-NMDAR1 antibody wherein the binding region of said anti-NMDAR1 antibody is comprised in one ore more sequences wherein said one or more sequence is selected from a group consisting of the following sequences:and wherein said binding region for the antibody or antibody fragment or non-Ig scaffold comprises or consists of one or more sequences selected from the group SEQ ID NO:2-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/069451

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007027805 A2	08-03-2007	CA 2620624 A1	08-03-2007
		EP 1940864 A2	09-07-2008
		US 2007048306 A1	01-03-2007
		WO 2007027805 A2	08-03-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
C 1 2 N	15/115	(2010.01)	C 1 2 N	15/115 Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 N
A 6 1 M	1/36	(2006.01)	A 6 1 M	1/36 1 9 0
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100192201

弁理士 岡部 佐知子

(72)発明者 ハーラルト プリュース

ドイツ連邦共和国, 1 0 5 5 1 ベルリン, ブレードーシュトラッセ 1 7

Fターム(参考) 4C077 AA12 BB02 CC03 KK13 NN03

4C084 AA19 MA66 NA05 ZB082 ZB262

4C085 AA14 AA16 CC23 DD62 EE01 GG02

4H045 AA11 AA30 DA76 GA26

專利名称(译)	与抗N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体抗体结合区结合的抗体或抗体片段或非Ig支架		
公开(公告)号	JP2018535922A	公开(公告)日	2018-12-06
申请号	JP2018509825	申请日	2016-08-16
[标]发明人	ハーラルトプリュース		
发明人	ハーラルト プリュース		
IPC分类号	C07K16/42 A61K39/395 A61K45/00 A61P43/00 A61P25/24 A61P25/18 A61P25/14 A61P25/08 A61P25/28 A61P9/10 C12N15/115 G01N33/53 A61M1/36 C07K1/22		
CPC分类号	A61K45/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 C07K16/286 C07K16/4208 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/6872 C07K2317/24 C07K2317/92 C12N15/115 C12N2310/16 G01N33/5308 G01N33/6854 G01N2333/70571		
FI分类号	C07K16/42.ZNA A61K39/395.N A61K45/00 A61P43/00.111 A61P25/24 A61P25/18 A61P25/14 A61P25/08 A61P25/28 A61P9/10 C12N15/115.Z G01N33/53.N A61M1/36.190 C07K1/22		
F-TERM分类号	4C077/AA12 4C077/BB02 4C077/CC03 4C077/KK13 4C077/NN03 4C084/AA19 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/GA26		
代理人(译)	青木 笃 渡辺洋一 中島勝 武井良太郎		
優先権	2015181290 2015-08-17 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本発明の主題は与抗NMDAR1抗体の結合区結合の抗体或抗体片段或非Ig支架，并使用其进行治疗或诊断。

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2018-535922
(P2018-535922A)

(43) 公表日
平成30年12月6日 (2018. 12. 6)

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 16/42 ZNA

4C077

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/395 N

4C084

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 45/00

4C085

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 43/00 111

4H045

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/24

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

(全 51 頁)

最終頁に続く

(21) 出願番号
(86) (22) 出願日
(85) 翻訳文提出日
(86) 国際出願番号
(87) 国際公開番号
(87) 国際公開日
(31) 優先権主張番号
(32) 優先日
(33) 優先権主張国

特願2018-509825 (P2018-509825)
平成28年8月16日 (2016. 8. 16)
平成30年4月11日 (2018. 4. 11)
PCT/EP2016/069451
W02017/029299
平成29年2月23日 (2017. 2. 23)
15181290.6
平成27年8月17日 (2015. 8. 17)
欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人
(74) 代理人
(74) 代理人
(74) 代理人

518054995
ドイチェス ツェントルム フュール ノイロデグネラティブェ アークランクンゲン エー. ファウ. (ゲーツェットエンエー)
ドイツ連邦共和国, 53127 ボン, ジュクムントーフロイトーシュトラッセ 27
弁理士 青木 篤
100123582
弁理士 三橋 真二
100117019
弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体抗体の結合領域に結合する抗体または抗体フラグメントまたは非Ig足場