

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4768597号  
(P4768597)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02

請求項の数 4 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-501920 (P2006-501920)	(73) 特許権者	505287391
(86) (22) 出願日	平成16年2月2日(2004.2.2)		エンステイテュ ナショナル ドウ ラ
(65) 公表番号	特表2006-516594 (P2006-516594A)		サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ
(43) 公表日	平成18年7月6日(2006.7.6)		ディカル (イ エヌ エス ウ エール
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/001743		エム)
(87) 国際公開番号	W02004/067034		フランス国, エフー75013 パリ, リ
(87) 国際公開日	平成16年8月12日(2004.8.12)		ュ ドウ トルビア, 101
審査請求日	平成18年11月20日(2006.11.20)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	03290247.0		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成15年1月31日(2003.1.31)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗-CD100抗体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

BD16及び/もしくはBB18抗-CD100抗体、又はそれらのキメラ型、ヒト型、それらの抗原結合断片、可溶性CD100とプレキシシンB1受容体との相互作用を妨害する抗体、又はそれらの抗原結合断片を含む、中枢神経系(CNS)又は抹消神経系(PNS)炎症性疾患の予防又は治療のための医薬組成物であって、該炎症性疾患が、多発性硬化症、HTLV-1関連脊髄症及び多発性神経根炎から成る群より選ばれる、医薬組成物。

【請求項2】

対照対象の生物試料中のCD100セマフォリンのレベルと比較して、試験対象の生物試料中のCD100セマフォリンを測定することを含むin vitro検定方法であって、

ここで、CD100の高レベルは、中枢神経系(CNS)又は抹消神経系(PNS)炎症性疾患、又は低予後の指標であり、当該検定がBD16及び/もしくはBB18抗-CD100抗体、それらのキメラ型、ヒト型、それらの抗原結合断片、可溶性CD100とプレキシシンB1受容体との相互作用を妨害する抗体、又はそれらの抗原結合断片を用いる免疫学的検定であり、該炎症性疾患は、多発性硬化症、HTLV-1関連脊髄症及び多発性神経根炎から成る群より選ばれる、方法。

【請求項3】

前記CD100セマフォリンが、ELISA法的手段によって検定される、請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記CD100セマフォリンが、CSF試料を使って検定される、請求項3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、神経炎症性疾患の治療又は診断のための抗-CD100抗体の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

CD100は、ほとんどの造血細胞の表面に発現するヒトの150-kDaホモダイマーであり、その遺伝子はIg及びデマフォリン遺伝子ファミリーに属する。セマフォリン遺伝子は、そのほとんどが成長円錐誘導に対して化学的避妊薬として作用することが判っている、可溶性及び膜結合性タンパク質をコードする。1998年にDelaireらは、CD100がTリンパ球の活性化に役立つことを示唆している。可溶性CD100は、免疫細胞移動を阻害することが更に判っている(Delaireら, 2001)。このヒト免疫性セマフォリンCD100(Hallら, 1996; Bismuth et al., 2002)は、金属プロテイナーゼによるタンパク質分解を経る活性化にTリンパ球によって高レベルで放出される(Elhabaziら, 2001)。髄鞘形成中に希突起膠細胞中に更に発現されることが明らかになった(Moreau-Fauvarque, 2002)。

10

## 【0003】

発明者は、CD100が炎症状態における神経免疫相互作用に重要な役割を演じると仮定した。

## 【0004】

多発性硬化症(MS)、主なCNS炎症性髄鞘形成疾患及びHTLV-1感染(HAM/TSP)に関連した脊髄症を含む神経炎症性疾患は、ミエリン破壊、希突起膠細胞及び脳及び脊髄における軸索消失によって特徴付けられる。炎症性サイトカイン及び金属プロテイナーゼの高発現を伴う活性化Tリンパ球の存在は、患者の中樞神経系(CNS)の活性病変とよく対応する。Tリンパ球の浸潤は、細胞毒性、炎症性分子合成、希突起膠細胞のホメオシタシス不全及び軸索損傷に関与していると推測されている。

20

## 【0005】

発明者らは、ヒト多発性神経前駆体及びラット希突起膠細胞に与える、sCD100を発現する慢性的な活性化T細胞及び組み換えsCD100の効果を用いてin vitroで研究した。これらの細胞性接触は、活性化Tリンパ球及び希突起膠細胞又は成人の脳において神経又は希突起膠細胞を生成することができる多発性神経前駆体間の神経炎症で生じる相互作用とよく似ている(Zhangら, 1999)。

30

## 【0006】

発明者らは、細胞生存及び希突起膠細胞の突起伸長(process extensions)を特に解析した。BD16及びBB18と言われる特定の抗-CD100モノクローナル抗体が活性化T細胞における可溶性CD100とその受容体との相互作用を妨害し、それによってモノクローナル抗体がHTLV-1関連疾患において希突起膠細胞のアポトーシスを抑制する、ことを発明者らは明らかにした。

## 【0007】

髄液(CSF)中のsCD100及びHAM/TSP患者由来の死後の脳中のCD100-発現活性化Tリンパ球の存在もまた、実験結果の機能的な関連性を支持するために検討した。

## 【0008】

このことに基づいて、発明者らは、神経炎症性疾患の治療又は診断において特定の抗-CD100抗体、特にBD16及びBB18と呼ばれるモノクローナル抗体の使用を提案する。

40

## 【0009】

本発明の治療又は診断方法は、任意の対象又は患者に有用である。「治療」とは、治療的処置及び予防又は抑制方法の双方を言う。治療の必要のある人は、既に障害を有している人及び障害を有する傾向のある人又は障害を予防する必要のある人を含む。患者は好ましくは人間であり、好ましくは成人であるが、本発明に従う方法は他の動物又は脊椎動物にも適用され得る。

## 【0010】

抗-CD100モノクローナル抗体

50

本発明に従って使用される好ましい抗-CD100抗体は、BD16及びBB18と言われるモノクローナル抗体である。

【0011】

BD16は、国際特許出願WO 93/14125号に記載のように、ECACC(寄託番号 92-01 0801)に寄託されたハイブリドーマによって産生されるマウスのモノクローナル抗体である。当該抗体の単離はHeroldら、1995により記載されている。当該抗体はBeckman-Coulterから更に購入することができる。この抗体はDelaireら、2001により免疫細胞移動で試験された。

【0012】

BB18は、国際特許出願WO 93/14125号に記載のように、ECACC(寄託番号 92-01 0802)に寄託されたハイブリドーマによって産生される別のマウスのモノクローナル抗体である。この抗体の単離はBougeretら、1992によって記載されている。

【発明の開示】

【0013】

Ig Aである両抗体は、立体的なエピトープによってヒト型CD100セマフォリンを認識する。BB18はCD100の内在化を誘導するが、BB16はその放出を促進する。BB18はキナーゼに関連してCD100を維持するが、BD16は当該複合体を解離する。BD16はCD2及びCD3と共細胞分裂誘起性であるが、BB18はPMA(ホルボールエステル)と共細胞分裂誘起性である。当該異なった特徴及び性質にもかかわらず、BD16及びBB18抗体はブロッキング抗体として有用である。

【0014】

これらの抗体のハイブリッド型及びリコンビナント型、及びそれらの断片(例えばFab, F(ab')<sub>2</sub>及びFv)もまた所望の生物活性を示す限り、本発明に従って有用である。

【0015】

これは、本発明に従う有用な抗体又はこれらの断片が、実質的にBD16又はBB18抗体と同一の親和性及びこれらの抗体よりも高い特異性でヒトCD100と結合することができ、CNS炎症性障害の予防又は治療の目的で用いられる場合には、実質的にBD16又はBB18抗体よりもヒトCD100の活性に関し同一のブロッキング性を示す、ことを意味する。

【0016】

抗-CD100キメラ型又はヒト型抗体

特に人の治療に関しては、BD16又はBB18抗体のキメラ型又はヒト型を用いることが有利である。

【0017】

ハイブリッド及びリコンビナント抗体は、以下のものが所望の生物活性を示す限りにおいて起源種又は免疫グロブリンのクラスもしくはサブクラスを無視して、抗-CD100抗体の可変(超可変を含む)ドメインを定常領域(例えば「ヒト化」抗体)で、又はL鎖をH鎖で、又はある種由来の鎖を別の種由来の鎖で、又は融合を異種タンパク質でスプライシングすることによって作製され得る(例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号明細書; Mage及びLamoyi, in Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 79-97 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)を参照されたい)。

【0018】

本発明の一つの態様は、その中のH鎖及び/又はL鎖部分は特定種から得られた抗体の対応配列と同一又は相同的であるかあるいは特定の抗体のクラス又はサブクラスに属するが、鎖(複数)の残りは別の種から得られた抗体の対応配列と同一又は相同的であるかあるいは別の抗体のクラス又はサブクラスに属する、「キメラ」抗体(イムノグロブリン)の使用を包含する。

【0019】

BD16又はBB18抗体の「ヒト」型は、マウスのイムノグロブリンから得られる最小配列を含む、特定のキメライムノグロブリン、イムノグロブリン鎖又はそれらの断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>又抗体の他の抗原-結合配列)である。おおむね、ヒト抗体は、受容

10

20

30

40

50

抗体の相補性-決定領域(CDR)由来の残基が所望の特異性、親和性及び能力を有する非-ヒト種(供与抗体)のCDR由来の残基によって置換されるヒトイムノグロブリン(受容抗体)である。ある例では、ヒトイムノグロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非-ヒト残基によって置換される。更に、ヒト型抗体は受容抗体中にも取り込まれたCDRもしくはフレームワーク配列中にも見られない残基を含むことができる。これらの変更は、抗体能を更に高めかつ最適化するためになされる。一般的に、ヒト型抗体は、少なくとも1種の典型的には2種の可変ドメインの全てを実質的に含み、その中の全ての又は実質的に全てのCDR領域は非-ヒトイムノグロブリン領域に対応し、全ての又は実質的に全てのFR領域はヒトイムノグロブリン・コンセンサス配列領域である。ヒト型抗体は好ましくは少なくともイムノグロブリン定常領域(Fc)の一部、典型的にはヒトイムノグロブリンの定常領域をも含む(利用可能な技術の総説としてBergerら, 2002を参照されたい)。

10

【0020】

#### 完全ヒト抗-CD100抗体

本発明の別の態様では、ヒト抗-CD100抗体すなわちBD16又はBB18に類似した又は密接に関連したエピトープ(複数)を認識するヒト抗-CD100抗体を使用してもよい。これらの抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子ライブラリーから入手できる。

【0021】

ヒト抗体を産生する種々の方法は、例えば国際特許出願WO 01/040306号に記載されている。

【0022】

これらの方法は、ファージディスプレイ法及びヒト免疫系の非ヒトトランスジェニックマウス発現遺伝子を含む。当該方法は、典型的にはヒトイムノグロブリン遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック動物を免疫することによって行われる。当該動物は抗原に結合する様々な範囲のヒト抗体を発現する。次いで、かかる抗体の抗体鎖成分をコードする核酸は当該動物から表示ベクターにクローニングされる。ベクターの任意の所与のコピーがH鎖及びL鎖の無作為な組み合わせを受けると、典型的には、H鎖及びL鎖をコードする核酸の別々の群がクローニングされた後、この別々の群がベクターに挿入されて組換えられる。ベクターは、抗体鎖を発現するように設計され、その結果、抗体鎖は組み立てられてかつベクターを含むディスプレイパッケージの外表面に表示され得る。例えば、抗体鎖はファージの外表面からファージコートタンパク質を有する融合タンパク質として発現され得る。従って、ディスプレイパッケージは標的に結合する抗体の表示のために選別され得る。

20

30

【0023】

ヒトイムノグロブリンH鎖及びL鎖可変領域のための有用なcDNAライブラリーは、種々の異なる宿主例えば細菌(例えばE. coli)又はウイルス例えばポックス・ウイルスSmith etら, 2001)又はファージで設計され、発現されることができる。

【0024】

ファージディスプレイ法では、ヒトイムノグロブリンH鎖及びL鎖可変領域は、線状ファージ、特にファージM13、Fd及びF1の表面上の抗原-結合ヒトFab又はscfv(「単一鎖可変領域」)断片として、クローニングされ、組換えられ、発現され及び表示される。See Raderら, (1997); Aujameら, (1997); Hoogenboom, (1997); de Kruifら, (1996); Barbasら, (1996); Winterら, (1994)を参照されたい。次いで、ファージ-ディスプレイヒト抗原-結合断片は、選択された抗原と結合する能力を選別される。

40

【0025】

#### 治療

本発明の第一の態様では、中枢神経系(CNS)炎症性障害の予防方法又は治療方法であって、BD16及び/又はBB18抗-CD 100抗体又はそれらのキメラ型もしくはヒト型の有効量をそのような治療を必要としている患者に投与することを含む方法を提供する。

【0026】

本発明の別の対象は、CNS炎症性障害の予防又は治療に有用な医薬の調製のための、BD1

50

6及び/又はBB18抗-CD100抗体又はそれらのキメラ型もしくはヒト型の使用である。

【0027】

活性化Tリンパ球によるCNS又はPNSの浸潤は、炎症性疾患の始まり及び進行を支持できる。発明者は、本明細書で、可溶性CD100として脱髄中の免疫セマフォリンの一次的役割を指摘している。可溶性CD100は、ウイルスによって-活性化されたTリンパ球によって産生され、(希突起膠細胞分化能を有する)ヒト神経前駆体のアポトーシス死及び突起伸長の漸減、次いで未発達の希突起膠細胞の死を誘導する。HAM/TSPのCSF患者におけるsCD100の特異的発現及び脊髄における(その他の神経事例と比べて)多数の浸潤CD100/CD45RO-陽性Tリンパ球の存在は、神経炎症性脱髄疾患におけるCD100の可能性のある悪影響を立証するものである。抗-CD100抗体は、希突起膠細胞障害又は他の末梢髄鞘形成細胞の障害、その結果としての神経障害の拡大を予防するために更に有用である。

10

【0028】

従って、本発明のCNS又はPNS炎症性障害は、好ましくはミエリン障害又は希突起膠細胞もしくは多の髄鞘形成細胞、例えば末梢髄鞘形成細胞に影響を与える疾患を目的としている。多発性硬化症又はHTLV-1関連脊髄症のより具体的予防又は治療が包含される。

【0029】

より一般的な神経炎症性障害及び乏突起膠腫並びに白質ジストロフィー、ギラン・バレー症候群、アレクサンダー病、カナバン病、クラッペ病、ペリツェウス・メルツバッハー病、ゼルウィガー病、レフサム病、CACH病、X-関連副腎性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、未知起源の副腎脊髄神経障害もしくは白質ジストロフィー、又は多発性神経根炎及び慢性多発性神経根炎を挙げることができる。

20

【0030】

本発明の別の態様では、障害は、例えば脊髄傷害又は卒中によって引き起こされる外傷後ミエリン障害及びCNS障害である。

【0031】

従って、本発明の別の対象は、軸索髄鞘形成を刺激する方法であって、BD16及び/又はBB18抗-CD100抗体の治療上活性量をそのような治療を必要としている患者に投与することを含む方法である。

【0032】

#### 医薬組成物

抗-CD100抗体は、局所、経口、非経口、鼻腔内、筋肉内、皮下投与等のための医薬組成物に製剤化され得る。

30

【0033】

好ましくは、医薬組成物は、注射可能、場合により神経系又は脳中に直接、例えば他の領域への分散のための脳室内注射による製剤のために薬学的に許容される媒体を含む。

【0034】

好適な医薬組成物は、特に等張で殺菌した生理食塩水(リン酸ナトリウム又はリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム又は塩化マグネシウム等あるいはかかる塩の混合物)又は添加すれば場合によっては注射可能溶液の構成を可能にする殺菌水又は生理食塩水の乾燥、特に凍結乾燥組成物でもよい。

40

【0035】

投与に用いられる抗-CD100抗体の用量は、種々のパラメーターの一機能として、特に関連した病状又は他の所望の治療期間に関して使用される投与方式の一機能として採用することができる。

【0036】

抗体療法のための医薬組成物調製のために、タンパク質の有効量は薬学的に許容される担体又は水性媒体中に溶解又は分散することができる。

【0037】

医薬製剤の具体例は下記に提供される。

【0038】

50

医薬組成物は、薬学的に許容される担体又は水性媒体中に抗-CD100抗体の有効量を含む。

【0039】

「薬学的に」又は「薬学的に許容される」とは、好適には動物又は人間に投与される場合に、逆のアレルギー性又は他の望ましくない反応を生じない分子全体及び組成物を言う。

【0040】

本明細書で用いる「薬学的に許容される担体」とは、任意の及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗生剤及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤等を含む。薬学的活性物質のためのかかる媒体及び薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の一般的な媒体又は薬剤は活性成分と適合しない範囲を除いて、治療組成物におけるその使用が考察される。補充的活性成分はまた当該組成物に取り込むことができる。

10

【0041】

注射使用に好適な医薬剤形は、殺菌水溶剤又は分散剤；ゴマ油、ピーナッツ油又は水性プロピレングリコールを含む製剤；及び殺菌注射可能溶液又は分散液の即時調製のための殺菌粉剤、を含む。全ての場合において、当該剤形は、殺菌性でなければならずそして簡便に注射針が通過する程度に流動性でなければならない。製造及び保存条件下で安定でなければならずそして微生物、例えば細菌及び菌類の汚染作用に対して保存されなければならない。

【0042】

遊離塩基又は薬理的に許容される塩等の活性化化合物の溶剤は、界面活性剤、例えばヒドロキシプロピルセルロースと好適に混合された水中で調製することができる。分散剤はまたグリセロール、液体ポリエチレングリコール及びその混合物中で及び油中で調製することができる。保存及び使用の通常の下では、これらの調製物は微生物の繁殖を抑制するための保存料を含む。

20

【0043】

担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコール等）、その好適な混合物及び植物油を含む溶媒又は分散媒体でもよい。好適な流動性は、例えばコーティング例えばレクチンの使用により、分散剤の場合には所望の粒子径の維持によって及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物作用の抑制は、種々の抗生剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされる。多くの場合には、等張剤、例えば糖類又は塩化ナトリウムを含むことが好ましいだろう。注射可能組成物の吸収遅延は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゲラチンの組成物の使用によってもたらされる。

30

【0044】

殺菌注射可能溶剤は、好適な溶媒中で所望の量で活性化化合物を、必要であれば上で列挙した種々のその他の成分と共に取り込み、次いで濾過滅菌によって調製される。一般的に、分散剤は、種々の殺菌活性成分を、基本的な分散媒体及び上で列挙したものからの所望の他の成分を含む殺菌媒体に取り込むことによって調製される。殺菌注射可能溶剤の調製のための殺菌粉剤の場合には、好ましい調製方法は、前のその滅菌-濾過溶液から活性成分の粉剤に加えて任意の追加の所望成分を与える、真空-乾燥及び凍結-乾燥技術である。

40

【0045】

溶媒としてDMSOの使用を想定して極度に迅速な浸透、活性剤の小腫瘍域への高濃度送達をもたらされる場合には、直接投与のためのより濃縮された溶液又は高濃縮溶液の調製もまた考慮される。

【0046】

製剤上、溶剤は投薬剤と適合した様式で及び治療上有効量で投与されるだろう。製剤は、種々の剤形、例えば上記の注射溶剤の種類で簡便には投与されるが、薬物徐放カプセル剤等も使用することができる。

50

## 【0047】

水溶液中での非経口投与のためには、例えば溶剤は、必要ならば好適に緩衝化すべきであり、液状希釈剤は十分な食塩水又はグルコースとまず等張でなければならない。これらの特定の溶剤は、静脈内、筋肉内、鞘内、脳室内、皮下及び腹腔内投与に特に好適である。これに関連して、使用され得る殺菌水性媒体は本開示の点から当業者に知られているだろう。例えば、1用量は1 mlの等張NaCl溶液に溶解することができ、及び1000 mlの皮下注入液に添加することができ又は輸液の提案部位に注射することができる(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、頁1035-1038及び1570-1580)。投薬のいくつかの変更は、治療される対象の症状に依拠して必然的に起こるだろう。投与に責任を負う人はとにかく個々の対象のための好適な用量を決定するだろう。

10

## 【0048】

抗-CD100抗体は、約0.0001~1.0 ミリグラム/用量、又は約0.001~0.1 ミリグラム/用量、又は約0.1~1.0又は約10 ミリグラム/用量くらいさえも含むように治療混合物内で製剤化し得る。多用量も投与することができる。

## 【0049】

非経口投与、例えば静脈内又は筋肉内投与のために製剤化された化合物に加えて、他の薬学的に許容される剤形は、例えば錠剤又は経口投与用の他の固形；リポソーム製剤；徐放カプセル剤；及びクリーム等の一般的に使用される任意の他の剤形を含む。

## 【0050】

点鼻液もしくはスプレー、エアゾールもしくは吸入剤、膣内もしくは直腸座薬及びペッサリーを含む他の投与方法も考慮される。

20

## 【0051】

ある実施態様では、リポソーム及び/又はナノ粒子の使用が、抗体の導入のために考慮される。リポソームの調合及び使用は一般的に当業者に知られており以下にも記載される。

## 【0052】

ナノカプセル剤は一般的に安定かつ再製可能な方法で化合物を包含する。細胞内ポリマーの過滞留に起因する副作用を避けるために、例えば(約0.1  $\mu\text{m}$ のサイズの)超微細粒子は、*in vivo*で分解することができるポリマーを使って設計されるべきである。これらの要求を満たす生分解性シアノアクリル酸ポリアルキルナノ粒子は本発明での使用が考慮され、かかる粒子は簡便に作製できる。

30

## 【0053】

リポソームは、水性媒体に分散されるリン脂質から形成され及び自然に多層同軸二分子層小胞(多層小胞(MLVs)とも言われる)を形成する。MLVsは一般的に25nm~4  $\mu\text{m}$ の直径を有する。MLVsの超音波処理により、核に水溶液を含む200~500 の範囲の直径の小単層小胞(SUVs)が形成される。

## 【0054】

以下の情報はリポソーム製剤に用いることもできる。リン脂質は、水に分散される場合には脂質の水に対するモル比によってリポソーム以外の種々の構造を形成し得る。低比ではリポソームは好ましい構造である。リポソームの物理的性質はpH、イオン強度及び二価のカチオンの存在に依拠する。リポソームは、イオン性で極性物質に対して低透過性を示すことができるが、高温ではその透過性を著しく変更する相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として知られるぎっしり詰まった規則的構造から流動状態として知られる大まかに詰まった低規則性構造への変化を含む。これは、特徴的な相-転移温度として生じ、イオン、糖類及び薬物に対する透過性を増加させる。

40

## 【0055】

リポソームは、4種のメカニズムによって相互作用する:マクロファージ及び好中球等の網内皮系の食細胞；非特異的な弱い疎水性もしくは静電気力によるか又は細胞-表面成分との特異的相互作用による細胞表面への吸着；リポソーム内容の細胞質への自然放出を伴う、リポソームの脂質二分子層の血漿膜への挿入による血漿細胞膜との融合；及び細胞

50

又は垂細胞膜へのリポソーム脂質の移動、あるいは逆にリポソーム内容とは関係なくリポソーム脂質の移動。リ同時に2種以上が作用してもよいが、リポソーム製剤の変化はメカニズムの作用を変化させることができる。

【0056】

#### 診断

発明者らは、脳脊髄液(CSF)中のsCD100及びHAM/TSP患者由来の死後脳中のCD100-発現活性化Tリンパ球の存在を証明した。

【0057】

このことに基いて、本発明は中枢神経系(CNS)炎症性障害の進行の診断又は決定のためのin vitroでの方法を提供する。この方法は、試験対象の生物試料中のCD100セマフォリンを、対照対象の生物試料中のCD100セマフォリンのレベルと比較して検定することを含み、ここでCD100の増加レベルは前記障害又は低予後の指標であり、当該検定はBD16及び/又はBB18抗-CD100抗体、それらのキメラ型もしくはヒト型、又はそれらの断片を用いる免疫学的検定である。

10

【0058】

「生物試料」は、血清、血液、髄液、脳脊髄液、尿、糞、腹水、胸水、羊水又は組織抽出物もしくは組織又は脳、髄液もしくは神経等の器官バイオプシーを含む、対象由来の液体である。

【0059】

「対象」又は「患者」は、脊椎動物、例えば哺乳動物、好ましくはヒトであり、その年齢、性別及び全体的特徴にかかわらない。子供及び幼児も包含される、試験対象は無症候性でもよく、障害又は症状を発症する可能性があると考えられる。ミエリン障害の疑いのある試験対象又は既に障害又は症状の兆候を示している対象も試験され得る。CNS又はPNS炎症性障害を生来発症しやすい対象も好ましい標的である。

20

【0060】

「対照対象」は、健康な対象又はミエリン障害のない対象でもよい。CNS又はPNS炎症性障害の進行を診断するために、CD100又はそれらの受容体発現のための対象を試験し、及び対象を二回目例えば数週間後に試験することによって薬物効果や症状の広がりを観察することは非常に有用である。そのような場合において、二度目の試験結果は一回目の試験結果及び一般的に「健康な」対象について得られた結果と対比される。次に、「対照対象」は同一の試験対象又は「健康な」対象のいずれかを言う。

30

【0061】

「CNS又はPNS炎症性障害」は、任意の神経炎症性障害、ミエリン障害、又は上記のような希突起膠細胞に影響を与える障害を含む。多発性硬化症又はHTLV-1関連脊髄症の進行の診断又は観察はより具体的に考慮される。本明細書に記載のin vitro法は、液状試料例えばCSF試料中のCD100を簡便かつ迅速に検定することを可能にする点で、その目的のためには特に有利である。

【0062】

好ましい実施態様では、本発明は、患者のHTLV-1関連脊髄症を診断又は観察するin vitro法を提供する。ここで、CD100セマフォリンは、BD16及び/又はBB18抗-CD100抗体、それらのキメラ型もしくはヒト型、又はそれらの断片を採用するELISA法の手段によって患者のCSF試料で検定される。

40

【0063】

「診断」の用語は、対象の障害又は症状の決定又は確認を言う。「低予後」の用語は症状が更に悪化していることを言う。

【0064】

CD100セマフォリンタンパク質又はそれらの受容体の免疫学的検定法は当業者に周知である。かかる検定は、競合、直接反応又はサンドウィッチ型検定を含む。ウェスタンブロットティング、酵素-標識及び仲介免疫学的検定、例えばELISAs;放射免疫学的検定;免疫電気泳動;免疫沈降等を含む種々の技術が採用できる。反応は一般的に暴露標識、例えば蛍

50

光、化学発光、放射活性、酵素標識又は色素分子、あるいは抗原とそれと反応する抗体もしくは抗体類との複合体の形成を検出する他の方法を含む。

【0065】

上記検定は一般的に、抗原-抗体複合体が結合されている固相支持体からの液相中の非結合CD100の分離を含む。本発明の実施に用いられる固体支持体は、ニトロセルロース(例えば膜又はマイクロタイターウェル型);塩化ポリビニル(例えば紙又はマイクロタイターウェル);ポリスチレンラテックス(例えばビーズ又はマイクロタイタープレート);フッ化ポリビニリデン;ジアゾ化紙;ナイロン膜;活性化ビーズ、磁性反応性ビーズ等の物質を含む。

【0066】

典型的には、固体支持体は、好適な結合条件下でまず固相成分(すなわち抗-CD100抗体)と反応し、その結果当該成分は当業者に周知の方法に従って支持体に十分に固定化される。固体支持体と固相成分との反応後、任意の非-固定化固体-相成分は洗浄によって支持体から除去され、次いで支持体-結合成分はリガンド成分(すなわち固定抗体のためのCD100分子)を含む懸濁生物試料と好適な結合条件下で接触される。任意の非-結合リガンドを除去するために洗浄した後、二次的結合剤成分が好適な結合条件下で添加される。ここで、二次的結合剤は結合リガンドと選択的に会合することができる。二次的結合剤の存在は、当該分野で周知の技術を用いて検出することができる。

【0067】

より具体的には、ELISA法を使用することができ、ここでマイクロタイタープレートのウェルは抗-CD100抗体で被覆されている。次いで、CD100分子を含む又はCD100分子を含む懸濁生物試料が被覆ウェルに添加される。十分なインキュベーション期間後、抗体-抗原複合体が形成され、プレート(複数)は非結合成分を除去するために洗浄され、そして検出可能な二次的結合分子が添加され得る。当該二次的結合分子は、任意の捕獲試料CD100分子と反応することができ、プレートは洗浄され、そして二次的結合分子の存在は当該分野で知られた方法を用いて検出される。

【0068】

従って、1つの具体的実施態様では、生物試料からの結合CD100分子の存在は、別の抗体を含む二次的結合剤を用いて直ちに検出することができ、そのCD100分子は、当業者に知られた方法を用いて、検出可能な酵素標識、例えばホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又はウレアーゼに直ちに結合させることができる。次いで、好適な酵素基質が検出可能なシグナルを生じさせるために使用される。他の関連実施態様では、競合-型ELISA技術は当業者に知られた方法を用いて実施される。

【0069】

検定は溶液中で実施することもでき、その結果、抗原性ポリペプチド及びこれらのタンパク質に特異的な抗体が沈殿条件下で複合体を形成する。1つの具体的実施態様では、抗体は、当該分野で知られたカップリング法、例えば直接化学的又は間接的カップリング法を用いて固相粒子(例えばアガロースビーズ等)に結合することができる。次いで、抗体-被覆粒子は、好適な結合条件下でCD100分子を含む懸濁生物試料と接触される。粒子-抗原-抗体複合体は凝集し、沈殿し更に洗浄及び/又は遠心を用いて試料から分離される。反応混合物は、任意の多数の標準的方法、例えば上記の免疫診断法を用いて、抗体-抗原複合体の存在又は非存在を測定するために分析することができる。

【0070】

上記のようにして試験を実施するために、抗-CD100抗体を含む上記検定試薬は、好適な指示書及び他の必要な試薬と共にキットとして提供することができる。キットは、用いる具体的免疫学的検定によって、好適な標識及び他の包装試薬及び材料(すなわち洗浄緩衝液等)を含むこともできる。標準的免疫学的検定例えば上記のような試験はこれらのキットを用いて実施できる。

【0071】

図及び実施例は本発明をその範囲を限定することなく例証する。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0072】

実施例1 : HTLV-1関連脊髄症におけるBD16抗-CD100抗体による神経先駆細胞閉塞及び希突起膠細胞ポトース

<方法>

神経細胞及び免疫細胞間のクロストークを模倣するために、発明者は、ヒト多能神経前駆体又はラットの一次希突起膠細胞で慢性的に活性化された(HTLV-1感染の、ウイルス生産性のない)Tリンパ球の一次的共培養物からなる実験的実例を用いた。かかる細胞接触は、活性化T細胞と、希突起膠細胞もしくは成人で希突起膠細胞に分化することができる多能神経前駆細胞との間の脳で起こる相互作用を模倣する。実験データの生理学的関連性は、神経炎症性疾患、HTLV-1脊髄症(HAM/TSP)に関連する脊髄症に罹患した患者由来の死後脊髄及びCSFを分析することによって試験した。

10

【0073】

T-神経細胞相互作用モデル:ヒト多能神経前駆体細胞株Devは、神経、星状細胞及び希突起膠細胞(Derringtonら, 1998;Buzanskaら, 2001)に分化する能力を有する。ラット膠細胞の一次培養物(Szymochaら, 2000)は、35~54%の希突起膠細胞を含み、残りの細胞は膠酸性繊維タンパク質(GFAP)-陽性星状細胞であった。希突起膠細胞(OL)は、細胞特異的抗体のパネル(免疫化学又はフローサイトメトリー、以下を参照されたい)によって特定される希突起膠細胞の明確な表現型局面を含んだ:プレ-OL(OL前駆体)発現NG2(10~15%)、未成熟-OL発現ガラクトセレブロシド(GalCer, 17~25%)及び環状ヌクレオホスホジエステラーゼ(CNPase)、成熟-OL(プレ有髄OL)発現ミエリン関連糖タンパク質(MAG, 3~15%)及びミエリン系タンパク質(MBP)。

20

【0074】

これらの神経細胞は以下を使用して一時的に共-培養した(Giraudonら, 2000):HTLV-1感染(Popovicら, 1983)によって活性化され、ELISA(Hallら, 1996)によって検出される可溶性CD100(sCD100)を放出する1-ヒトCD4+CD25+非ウイルス-産生T-細胞株C8166/45(1400ng/ml);2-非活性化CD4+T細胞株CEM。T細胞は、神経培養物の洗浄によって除去し、その除去はCD4抗原の存在によって変動した(フローサイトメトリー)。神経細胞は、トランフェクトされたジャーカット細胞(800ng/ml産生)由来のリコンビナント可溶性CD100(sCD100r)(0.6~10ng/μlの濃度)でも処理した。神経細胞は、そのように使用されるか又はCD100BB18-mAbカラムで精製される。実験を3回繰り返した。

30

【0075】

患者:3HAM/TSP患者及び2非-感染患者(パーキンソン病、自動車事故)由来のCNS組織試料をCD100-発現T細胞について試験した。パラフィン-埋め込み脊髄をミエリン検出用の通常の(ヘマトキシリン-エオシン-サフラン)及びラクソール・ファスト・ブルーを使用して試験した。これらの患者の脊髄は、Cartierら, 1997によって前に記載のように、軟髄膜の肥厚、免疫細胞の室周囲浸潤という、胸部レベルにおける顕著な萎縮に対し中程度を示した。側面皮質-脊髄及び脊髄小脳路の再生は、ミエリン及び軸索の消失を拡散し、星状細胞増加症が3例観察された。HAM/TSP患者の特徴:

40

	年齢/性別	疾患期間	死因	CNSニューロパシー		
				炎症	ミエリン/軸索喪失	萎縮
例1:	62/F	15年間	肺塞栓症	+++	+++	+++
例2:	35/F	4年間	腸管膜血栓症	++	+++	++
例3:	65/F	8年間	肺炎	+	+	+

【0076】

TSP/HAMに罹患した患者(9人)、髄脳膜炎に罹患した患者(4人)又は脳脊髄炎に罹患した患者(3人)のCSFを、Delaireら, 2001によって前に記載されたサンドウィッチによってsCD100の存在について試験した。試験した全てのHAM/TSP患者はHTLV-1プロウイルスについて陽性であった。

50

## 【 0 0 7 7 】

免疫的検出：モノクローナル抗体(抗-CNPase, Sigma;抗-GalCer, Chemicon Int.;抗-MAG, Boehringer Mannheim;抗-MBP, Serotec)又はウサギポリクローナル抗体(抗-GFAP, Dako)を用いてフローサイトメトリー中又は培養スライド上で(Bougeretら, 1992; Heroldら, 1995)、星状細胞及び希突起膠細胞を免疫蛍光によって同定した。セマフォリン受容体をモノクローナル抗-ヒトプレキシン-B1(N18-Tebu)及び抗-MAMニューロピリン-1ウサギポリクローナル抗体(Bagnardら, 2001)を用いて検出した。抗-CD45ROモノクローナル抗体(クローン UCHL1, Dako)及びタンパク質(AA799-813)の細胞内部分に対する抗-CD100ポリクローナル抗血清を用いる免疫蛍光によって、Tリンパ球をHAM/TSP患者由来の脊髄部分において検出した。トルエン及びエタノールで脱蠟した後、当該部分をブロッキング溶液(1%BSA, 0.3% トリトン, 1時間)中で、次いで特異的抗体でインキュベートした(4 / 終夜)。次に、抗-マウスAlexa546又は抗-ウサギ Alexa488標識抗体(Molecular Probes)を採用した。

10

## 【 0 0 7 8 】

RNA検出：前にSzymochaら, 2000によって記載されたように、mRNAを抽出後、逆転写及びポリメラーゼ-連鎖反応(RT-PCR)及び好適な[P] dATP-5'末端-標識内部オリゴヌクレオチドプローブを用いるサザンプロットングによって検出した。オリゴヌクレオチドプライマーをそのmRNA配列から選択した(GenBankアクセス番号は、CD100に関してHSU60800、プレキシン-B1に関してNM002663、プレキシン-B2に関してNM012401、プレキシン-B3に関してAF149019、Sema-3Aに関してL26081、対照として用いるベータ-アクチンに関してNM 01101)。1組のオリゴマーを3個のプレキシン-B mRNAに共通の300bpアンプリコンの増幅のために選択した。

20

## 【 0 0 7 9 】

アポトーシス解析：各実験では、アポトーシス死を、培養スライド(Promega)上で実施するTUNEL(ターミナルデオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ-介在dUTPニック-末端標識)-法、実行カスパーゼの免疫検出、活性-カスパーゼ-3 (ウサギ血清-Pharminen)及びDapi(4',6-ジアミジノ-2 フェニリンドール, Sigma, 1 µg/ml)核染色によるアポトーシス体の検出によって検出した。TUNEL、活性-カスパーゼ-3及びOL-マーカーの共-検出も実施した。

## 【 0 0 8 0 】

統計的解析：AnalySiS 3.2 ソフトウェアを用いて、総細胞(Dapi染色)、TUNEL及び活性-カスパーゼ-3-陽性細胞を神経前駆体及び一次膠細胞中で計数した(15~20の顕微鏡領域, 800~1000細胞, 3回)。希突起膠細胞の突起数及び長さの測定は同一のソフトウェアを用いて実施した。値を平均±SEMとして表した。群差はスチューデントのt-検定で計算した。

30

## 【 0 0 8 1 】

< 結果 >

高レベルのsCD100、C8166/45を産生する慢性活性化T細胞又は非-活性化及び非-CD100-産生T細胞、CEMと接触後の神経細胞形態及び生存を解析することによって、ヒト多能性神経前駆体及びラット一次的希突起膠細胞で可溶性CD100の効果を試験した。TUNEL陽性細胞中のアポトーシス体の存在、及び3個の独立した実験における免疫蛍光を用いる活性-カスパーゼ-3陽性細胞の増加数(25.5±8.8陽性細胞/領域対非処理細胞での11.3±3.7)の検出によってT細胞接触後48時間に証明されるように、ヒト神経前駆体のアポトーシス死はC8166/45 T細胞によって誘導された(図1, 代表的実験)。これは、総細胞数の減少(T細胞接触後48時間に24±4.4%の神経細胞消失、及び72時間後に58.5±9.2%の消失)を確認した。CEM T細胞はこれらの神経前駆体に何の影響も与えなかった。

40

## 【 0 0 8 2 】

CD100-産生T細胞もまた、ラット一次膠細胞培養物に障害を誘導した。進行性崩壊及び突起伸長消失がGalCer-陽性細胞(未熟-OL)で観察された。これらの未熟-OLの突起の長さ及び数は、その長さ(48時間での非処理膠細胞培養物では、1.1±0.1 µm対2.7±0.2 µm)及

50

び突起の計数(48時間での非処理膠細胞培養物では、 $1.3 \pm 0.2$ 突起/細胞対 $4.3 \pm 0.5$ /細胞)の相対的測定による3個の独立実験で明らかのように、接触後24時間及び48時間に飛躍的に減少した(図2)。更に、アポトーシス死をTUNEL-陽性細胞の検出及び活性-カスパーゼ-3陽性細胞の計数によって48時間後に観察した(非処理培養物で、 $19.7 \pm 8.1$ /領域対 $7.3 \pm 5$ , 3実験)。このことは、希突起膠細胞の減少数/領域(図3, 代表的実験)から明らかのように、希突起膠細胞群の一部分の消失及び膠細胞培養物中の総希突起膠細胞のパーセンテージの減少をもたらした(48時間後では $26.8 \pm 3.6\%$ 消失, 3実験)。興味深いことに、プレ-OL(NG2-陽性)及び成熟-OL(MBP-陽性, 図3-B)は、未熟-OL(GalCer-陽性)と比較してT細胞アポトーシス死に感受性でなかった。星状細胞の数及び形態は変化しなかった。CEM T細胞は神経前駆体及び膠細胞培養物に何の影響も与えなかった。

10

## 【 0 0 8 3 】

証拠となる数々の株はsCD100がこれらのT細胞-誘導障害に関連することを示した。共-培養に添加した場合には、抗-CD100 BD16 mAbは神経前駆体及び未熟-OLに拮抗することができた。事実、BD-16抗体は、T細胞と接触48時間後のアポトーシス神経前駆体の数を用量依存的に劇的に減少させ(図4-A)、そして細胞消失を減少させた(抗体-非処理共-培養中では72時間後に $41.5 \pm 0.7\%$ 対 $62 \pm 7.1\%$ )。同様に、ラット共-培養のBD16-抗体での処理は、TUNEL-陽性細胞数を減少させ、かつ未熟-OL(CNPase-陽性細胞)を救援した。このことは、T細胞-誘導希突起膠細胞消失(抗体-非処理共-培養で $15.5 \pm 4.9\%$ 対 $26.3 \pm 5.4\%$ )での減少をもたらした。

## 【 0 0 8 4 】

CD100の直接的効果は神経細胞をダイマーとしてトランスフェクトされたジャーカット細胞(Delairéら, 2001)から放出されるリコンビナントsCD100で処理することによって証明された(sCD100r,  $0.6 \sim 10\text{ng}/\mu\text{l}$ , 3実験)。同様にCD100-産生T細胞と接触させるためのsCD100rによる処理は、活性-カスパーゼ-3陽性細胞の増加数( $4.2\text{ng}/\mu\text{l}$  sCD100rで処理した培養物中の $25.3 \pm 3.6$ /領域対非処理培養物中の $11.1 \pm 2.3$ ) (図1, 代表的実験)及びこれらの前駆体の消失(72時間で $43.5 \pm 13.4\%$ 細胞消失)によって証明されるように、神経前駆体のアポトーシスを誘導した。sCD100rは、図4-Bに示されるように用量依存的に神経前駆体のアポトーシスを誘導した。膠細胞培養物のsCD100r(3実験)による処理もまた希突起膠細胞障害及びアポトーシスをもたらした(図2, 3, 4)。突起数(48時間に $1.4 \pm 0.2$ 突起/希突起膠細胞対非処理培養物の $5.3 \pm 0.4$ )及びそれらの相対的長さ(48時間に $1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 対非処理培養物の $2.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ )の減少は未熟-OLで検出した(GalCer-陽性, 図2)。これは、希突起膠細胞発現活性-カスパーゼ-3の増加数によって追跡された( $4.2\text{ng}/\mu\text{l}$  sCD100rで処理した培養物中の $15 \pm 2.3$ 陽性細胞/領域対非処理培養物の $6 \pm 1.9$ 陽性細胞)。事実、sCD100rは、図3(1つの代表的実験)から明らかのように希突起膠細胞数/領域を減少させ、総希突起膠細胞数を減少させた(処理48時間後に $29 \pm 4\%$ 消失)。より高用量のsCD100r( $10\text{pg}/\text{ml}$ )は、72時間後に総希突起膠細胞の37%の死及び神経前駆体の64%の死を誘導した。二重-標識(TUNEL及びOL-マーカー)は、未熟-OLがCD100-産生T細胞と同様にsCD100に感受性であることを示した。発明者らはまた、sCD100rが用量依存的に希突起膠細胞のアポトーシスを誘導することを観察した(Figure 4-C)。一方、星状細胞では全く検出可能な変化は認められなかった。これらのヒト及びラットの神経細胞を、非処理分子、CD27(sControl)で不可逆的にトランスフェクトされたジャーカット由来の上清で処理しても何ら変化を誘導しな

20

30

40

## 【 0 0 8 5 】

CD100は、免疫及び神経細胞に存在するニューロピリン及びプレキシンファミリー受容体によってその効果を仲介することができた。ニューロピリンはプレキシンと共-受容体として働くが、プレキシンは単独で、膜貫通型及び分泌型セマフォリンの十分に機能的シグナルトランス・ドューサとして働く(Tamagnoneら, 1999)。ニューロピリン-1はヒト神経前駆体に存在し、これらの細胞のSema 3A-誘導アポトーシス(Bagnardら, 2001)を仲介するので、ニューロピリン-1及びSema 3Aは、神経前駆体のT細胞-誘導アポトーシスと推測された。しかしながら、T-神経細胞共-培養物中に添加した場合に、Sema 3A-誘導神経

50

前駆体の死を妨害することが判明している(Bagnardら, 2001)抗-MAMニューロピリン-1抗体(抗-NPL-1)は、CD-100-産生T細胞によって誘導される死速度にほとんど影響を与えなかった(図5-A)。更に、Sema 3A活性に与える抗-CD100抗体BD16の効果の可能性(Delairら, 2001)は、T細胞中でのSema 3Aの非発現によって度外視された(RT-PCR, 図5-B)。これらの観察はT細胞-介在死におけるニューロピリン-1/Sema 3Aの関わり合いを排除した。プレキシン類、特に、sCD100の受容体として同定されたプレキシン-B1(Derringtonら, 1998)の関連を更に調べた。ヒト神経前駆体及びヒト胎児皮質(陽性対照として用いられる)中のプレキシン-B1、B2又はB3をコードするmRNAの存在をRT-PCRによって検査した。これら3種のプレキシン間のRNA配列の高相同性を考慮して、オリゴマーを、神経前駆体及びヒト胎児脳に共通の300bpアンプリコンを増幅させるその能力で選択した。アンプリコンは、制限酵素Pst1及びSau-3AIによって更に同定した。それらは、プレキシン-B1及びプレキシン-B3アンプリコン中に171bp及び129bp産物、及びプレキシン-B1及びプレキシン-B2アンプリコン中に205bp and 95bp産物をそれぞれ産生することができる。図5-Cから明らかのように、Pst1は、300bpアンプリコン由来の期待産物を産生した。これは、ヒト胎児上皮において明らかのように、ヒト神経前駆体中の低度のプレキシン-B1又は-B3 mRNA及び-B2の存在を証明するものである。細胞膜でのプレキシン-B1の存在は、生きた神経前駆体での免疫検出及び50~54%細胞でのフローサイトメトリーによって確認した(図5-D)。神経前駆体の抗-プレキシン-B1抗体-処理は、共-培養によってアポトーシス神経細胞数(図5-A)及び細胞消失(48時間後に非処理共-培養物中で5%対25.4%)を著しく減少させた。これは、このCD100産生T細胞介在-アポトーシスと関連する可能性を示している。T-介在希突起膠細胞アポトーシスに与える抗-プレキシン-B1効果の存在は(プレキシン-B1の発現にもかかわらず)、ラットプレキシン-B1を妨害する抗-ヒトプレキシン-B1の不能及び別のプレキシン受容体の関連に起因した。

【0086】

従って、これらの観察は、活性化Tリンパ球によって産生されるsCD100が未熟-OL及びヒト神経前駆体を著しく損ない、炎症のT-細胞神経細胞クロストーク分子としてセマフォリンが同定される、ことを証明した。これらの実験データの機能的関連を、他の神経疾患を有する患者と比較して神経炎症性疾患に罹患した患者で調査した。

【0087】

発明者らは、CD100がHTLV-1に慢性的に感染したTリンパ球によって高レベルで放出される、HAM/TSP患者を特に調査した。sCD100の発現をHAM/TSP患者(n=9)、髄膜炎患者(n=4)又は脳脊髄炎患者(n=3)の脳脊髄液(CSF)でELISAにより解析したところ、HAM/TSP' CSFで $97, 7 \pm 23, 1 \mu\text{g/ml}$ のレベルでsCD100の存在を示した(表1)。

【0088】

10

20

30

【表1】

ELISA (Hallら, 1966) によって検出されたHAM/TSP患者由来のCSF中の可溶性CD100。他の神経疾患患者はCSF中のCD100検出には陰性であった。

HAM/TSP 患者番号	CD100 (ng/ml)
1	132, 6±29, 9
2	66, 6±14, 2
3	158, 3±17, 2
4	79, 6±36, 3
5	123, 9±42, 7
6	60±9, 9
7	62, 9±14, 2
8	57, 9±16, 3
9	75±27, 6

10

## 【0089】

20

これは、CD100が検出不可能な髄膜炎及び脳脊髄炎のCSFと比較すると著しかった。興味深いことに、これらのsCD100レベルは、CD3架橋で活性化されたT細胞中に見られたレベルに匹敵した(40 ng/ml)。ウイルスタンパクTaxで慢性的に活性化され(Moritoyoら, 1999)、高レベルのMMPを産生するHAM/TSP患者のCSFに存在するT細胞は、そのような患者で検出可能であって非神経炎性疾患の患者では検出されないsCD100発現源の一つである。更に、CD100陽性浸潤細胞を3人のHAM/TSP患者由来の死後CNS中に検出した。これらの患者では、免疫細胞浸潤レベルはミエリン/軸索消失及び脊髄萎縮の程度と関連する(材料の項を参照されたい)。活性化T細胞のマーカーである抗-CD100及び抗-CD45ROを用いるこれらの患者の脊髄を浸潤する免疫細胞の解析は、これらの分子の共-発現を示した。最も高い密度の二重-標識Tリンパ球は、髄膜(meningia)中に及び血管周辺に見られた。二重-標識Tリンパ球は、灰白質及び白質の柔組織中にも観察された。興味深いことに、白質中及び血管周辺の星状細胞増加症は、GFAP免疫染色によって明らかとなり、発明者らは前研究でこれらのHAM/TSP患者の一人の星状細胞内に金属プロテイナーゼMMP-9を検出した。一方、非感染患者由来の脊髄中にはほとんどCD45RO-陽性は存在せず、全てCD100-陰性Tリンパ球であった。

30

## 【0090】

これらの結果は、sCD100産生Tリンパ球が、突起伸長の漸減後に神経前駆体及び未熟希突起膠細胞のアポトーシスを誘導した、ことを示した。活性化T細胞由来のsCD100の特異的抗体による閉塞は、この免疫性セマフォリンが、おそらくプレキシンファミリーの受容体によって希突起膠細胞突起の変動及び神経細胞アポトーシスを誘発することができる、ことを証明した。CSF中のsCD100の存在及びHAM/TSP患者の脊髄を浸潤するTリンパ球を発現するCD100の存在は、炎症中のCNSではsCD100の有害効果の可能性を指摘している。

40

## 【0091】

実施例2: BB18はCD100の内在化を誘導する。

膜CD100 (mCD100)はCD100 mAb BD16又はBB18を添加することによって残余T細胞表面からダウンレギュレーションされるので、発明者らはビオチンでCD100の表面を標識後の発運命を試験した。

## 【0092】

次いで、新たに単離されたヒトPBMCをビオチンで表面-標識した。細胞を指示した腹水mAb (1/100 最終希釈)又はPMA (1ng/ml)でインキュベートした。インキュベーション1時間

50

後、細胞上清を回収し、プロテアーゼ阻害剤を補い、濾過して細胞残骸を除去した後、BD 16及びBB18 mAbの混合物で免疫沈降した。平行して、細胞を氷-冷PBAで2回洗浄し、NP40-系溶解緩衝液及びプロテアーゼ阻害剤で溶解させた。CD100 ippをSDS-PAGE及びペルオキシダーゼ-複合ストレプトアビジン検出法を用いるウェスタンブロッティングに供した。試験したほとんどの個体から単離したPBMCについて同様な結果を得た。

【0093】

その結果、発明者らは、BD16又はホルボールエステルPMAでインキュベートした細胞の培養上清からCD100 (sCD100)の可溶化体を検出したが、BB18による残余T細胞のインキュベーションは分子内在化を誘発した。

【0094】

実施例3：神経炎症性疾患におけるsCD100の検出

発明者らは、45血清を更に試験し、(EDTAで採取した)健常人由来の22血漿について可溶性CD100の存在を検定(ELISA)した。血漿中のsCD100のレベルはそれらのほとんど(18/22)で検出不可能であったが、発明者らは、平均121ナノグラム/ml及び標準偏差26 ng/mlで、血清中のsCD100のレベルを測定することができた。これは、トランスフェクトされた細胞株由来のsCD100精製後に標準sCD100と比較することにより行った。BB18mAbアフィニティ・カラムで精製すると高レベルのsCD100が得られた。

【0095】

次に、発明者らは、国際単位(IU)/mlでCD100値を与える、異なった標準sCD100(凍結乾燥)を用いる試験を利用した。従って、多発性硬化症(MS)患者の血清中のsCD100レベルを測定することができた。MS血清中のsCD100レベル(21,66 IU/ml, SD 4,52)は、標準個体(5,60 IU/ml, SD 3,55)で観察されるレベルの少なくとも2倍であった。更に、発明者らは、危険な状態にある多発性神経根炎(PRN)の5患者の血漿を試験した。sCD100レベルは実が高かったが(33,84 IU/ml, SD 22,88)、健常人のsCD100のレベルは微々たるものであった(1,91 IU/ml, SD 1,38)。これらの実験の結果を図6に示す。

【0096】

これらのデータは、sCD100が神経系、特にHAM(HTLV1関連脊髄症)、MS及びPRN等の有髄細胞に関連する神経-炎症性疾患に有害な影響を与える、ことを確認するものである。

【0097】

これらのデータは、sCD100効果を抑制又は阻害するために、BD16又はBB18モノクローナル抗体等の抗-CD100抗体を中和する使用を更に支持するものである。

【0098】

上記ELISA法は、進化及び、例えば発生しているMS又はHAM等の危機を観察する簡便な方法を提供する。

【0099】

#### 参考文献

- Aujame et al., Human Antibodies 8: 155-168(1997)
- Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, et al. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. J Neurosci 2001; 21(10): 3332-41
- Barbas et al., Trends in Biotechnol. 14: 230-234 (1996)
- Berger M, Vidya S, Abbas V, Therapeutic applications of monoclonal antibodies. Am J Med Sci., 2002; 324(1): 14-30
- Bismuth G, Boumsell L. Controlling the immune system through semaphorins. Sci STKE 2002; 2002(128): RE4
- Bougeret C, Mansur IG, et al. Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. J. Immunol. 1992, 148(2): 318-23
- Buzanska L, Spassky N, Belin MF, et al. Human medulloblastoma cell line DEV is a potent tool to screen for factors influencing differentiation of neural stem

10

20

30

40

50

- cells. *J Neurosci Res* 2001; 65(1): 17-23
- Cartier LM, Cea JG, Vergara C, Araya F, Born P. Clinical and neuropathological study of six patients with spastic paraparesis associated with HTLV-I: an axomyelinic degeneration of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(4): 403-13
  - Delaire S, Elhabazi A, et al. CD100 is a leukocyte semaphorin, *Cell Mol. Life Sci.*, 1998; 54: 1265
  - Delaire S, Billard C, Tordjman R, et al. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 2001; 166(7): 4348-54 10
  - Derrington EA, Dufay N, Rudkin BB, Belin MF. Human primitive neuroectodermal tumour cells behave as multipotent neural precursors in response to FGF2. *Oncogene* 1998; 17(13): 1663-72
  - Elhabazi A, Delaire S, Bensussan A, Bousmell L, Bismuth G. Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. *J Immunol* 2001; 166(7): 4341-7
  - Giraudon P, Szymocha R, Buart S, et al. T lymphocytes activated by persistent viral infection differentially modify the expression of metalloproteinases and their endogenous inhibitors, TIMPs, in human astrocytes: relevance to HTLV-I-induced neurological disease. *J Immunol* 2000; 164(5): 2718-27 20
  - Hall KT, Bousmell L, Schultze JL, et al. Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(21): 11780-5
  - Herold C, et al, Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18mAb, *Int Immunol*, 1995, 7(1): 1-8
  - Hoogenboom, *Trends in Biotechnol.* 15: 62-70 (1997)
  - de Kruif et al, 17: 453-455 (1996)
  - Moreau-Fauvarque C, CD100/Sema4D is expressed in Oligodendrocytes during myelination, abstract submitted at the EMBO-FMI conference "Organizing the brain: genes, neurons, and circuits", February 2002 30
  - Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, et al. Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 1999; 5(3): 241-8
  - Ostberg et al. (1983), *Hybridoma* 2:361-367
  - Popovic M, Lange-Wantzin G, Sarin PS, Mann D, Gallo RC. Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(17): 5402-6
  - Rader et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8: 503-508 (1997) 40
  - Smith et al., *Nature Medicine*, 2001, 7: 967-972
  - Szymocha R, Akaoka H, Dutuit M, et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 2000; 74(14): 6433-41
  - Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, et al. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999; 99(1): 71-80
  - Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 433-455 (1994)
  - Zhang SC, Ge B, Duncan ID. Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity. *Proc Natl Acad Sci* 50

USA 1999; 96(7): 4089-94

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】ヒト神経前駆体におけるCD100-誘導死。この図は、CD100-産生Tリンパ球(TUNEL陽性細胞)での一時的接触又は可溶性CD100リコンビナントタンパク質(活性カスパーゼ-3陽性細胞)での処理(処理後48時間)した後のヒト神経前駆体でのアポトーシス死を示す。総(非斜線)及び活性カスパーゼ-3陽性細胞(斜線)の計数(AnalySIS™)を示す(平均±SEM, 代表的実験)。

【図2】希突起膠細胞突起のCD100-誘導変化。この図は、CD100-産生Tリンパ球での一時的接触又は可溶性CD100リコンビナントタンパク質での処理後(処理後24時間及び48時間)の未熟ラット希突起膠細胞(OL)での突起伸長の進行性消失を示す。OL突起の測定は、各処理後を意味する(平均±SEM, 10~20測定, 3実験)。

10

【図3】未熟-OLのCD100-誘導死。この図は、CD100-産生Tリンパ球での一時的接触又はOLの可溶性CD100リコンビナント誘導消失での処理(処理後48時間)を示す。各処理後の総OL消失を示す(平均±SEM OL/領域, 代表的実験)。

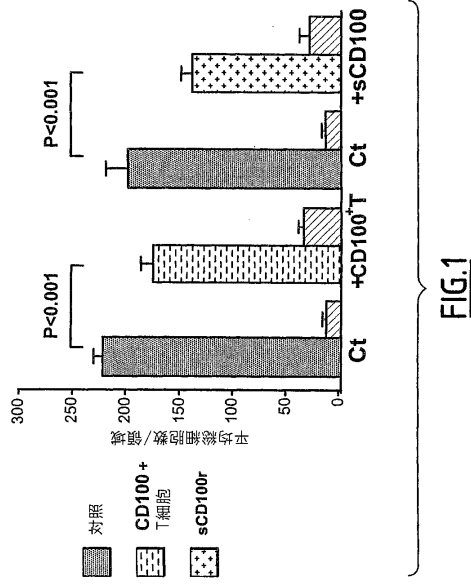
【図4】神経前駆体及び希突起膠細胞のT細胞-誘導死におけるCD100の関連。この図は、神経前駆体のT細胞-誘導死の減少(図4A)及びCD100-妨害抗体BD16の処理による希突起膠細胞のT細胞-誘導死の減少を示す。図4B及び4Cは、sCD100リコンビナントタンパク質での処理が神経前駆体(B)及び希突起膠細胞(C)のT細胞-誘導死を用量-依存的に模倣したことを示す。

20

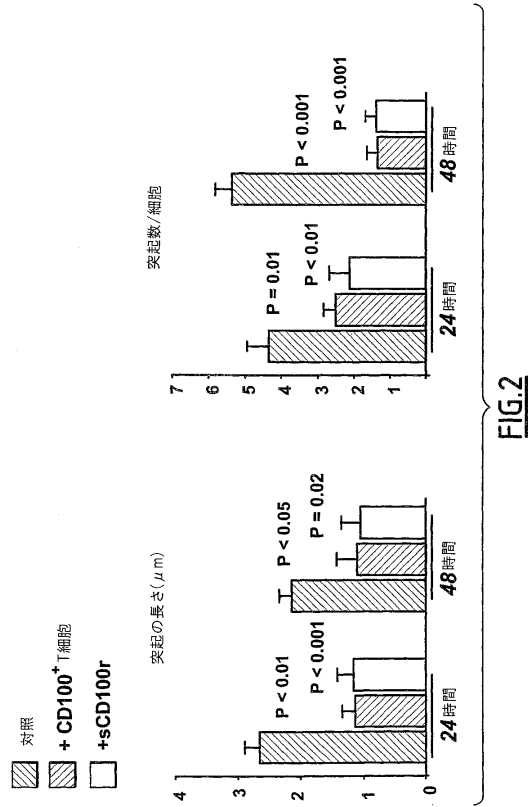
【図5】神経前駆体のT細胞-誘導死におけるプレキシシン-Bの関連。A - 抗-プレキシシン-B1抗体による神経細胞死の減少; 抗-ニューロピリニル抗体には影響なし(活性カスパーゼ-3陽性細胞の計数:平均±SEM/領域)。B - 神経細胞中ではなくT細胞中でのSema3A mRNAのRT-PCRによる検出。C - RT-PCRによる検出及びヒト神経細胞中のプレキシシンBファミリーmRNAの制限酵素消化:Pst1及びSau-3AIは、それぞれプレキシシン-B1、プレキシシン-B2及びプレキシシン-B3遺伝子に共通の300bp産物由来の171pb及び129bp又は205bp及び95bp産物を生成した。D - プレキシシン-B1はヒト神経前駆体で免疫検出した(FACS解析)。

【図6】健常対象者又は神経炎症性疾患の患者のsCD100 IU/mlのレベル(MS = 多発性硬化症; PRN = 多発性神経炎)。

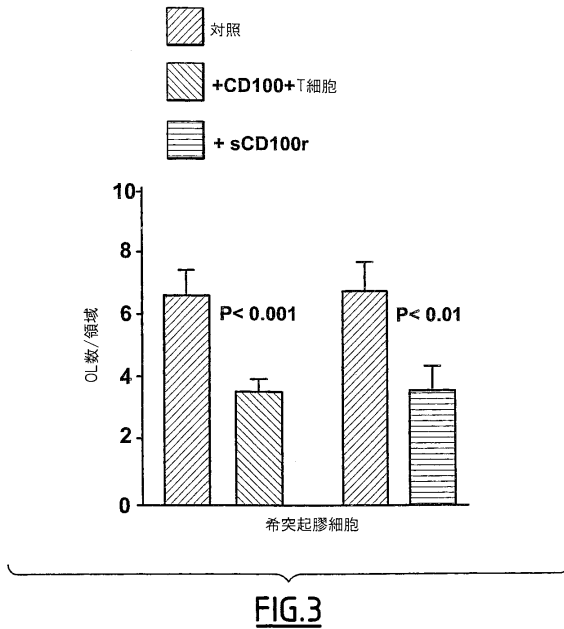
【 図 1 】



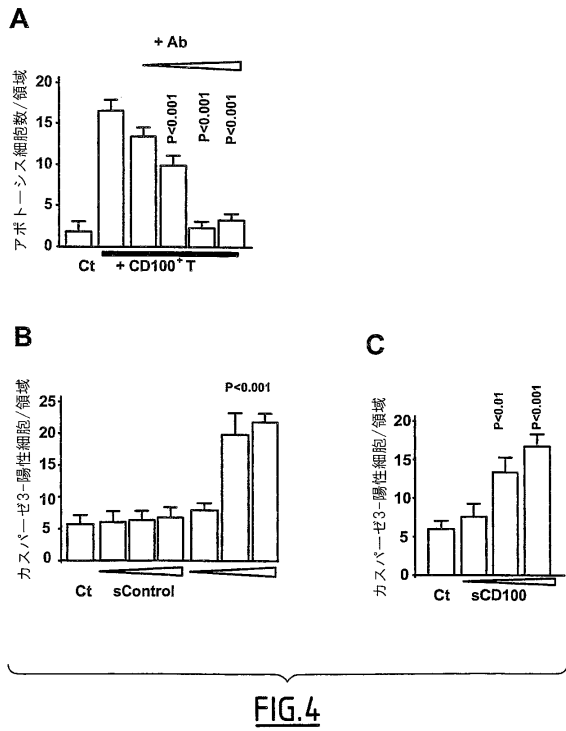
【 図 2 】



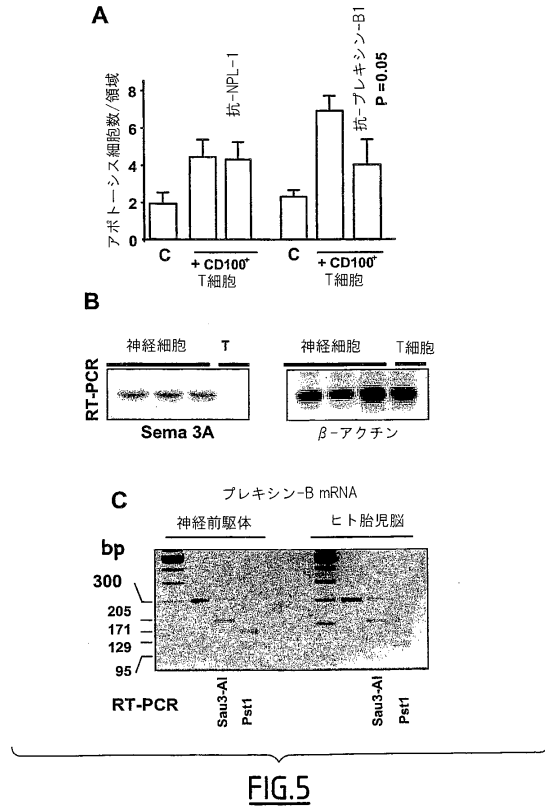
【 図 3 】



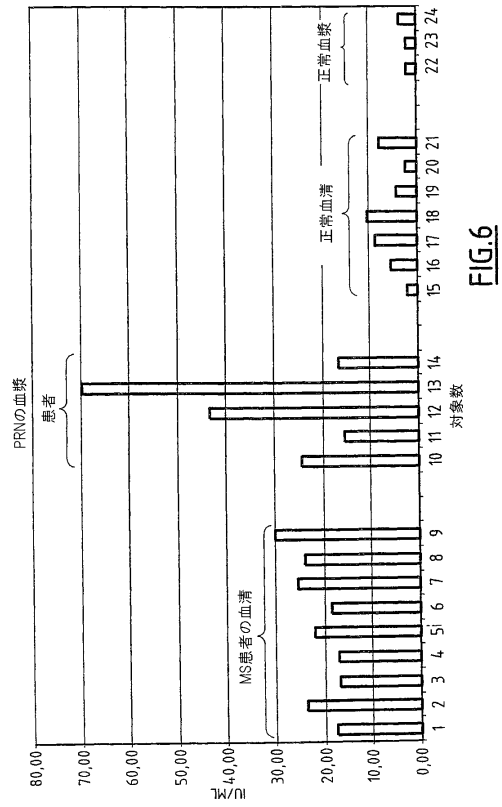
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ベリ, マリー - フランソワーズ

フランス国, エフ - 6 9 0 0 2 リヨン, プラス カルノ, 5

(72)発明者 ジロドン, パスカル

フランス国, エフ - 6 9 0 0 5 リヨン, リュ ドゥ ラ ファボリット, 5 5, パティマン セー, ビラ トリアノン

(72)発明者 プムスール, ローレンス

フランス国, エフ - 7 5 0 1 5 パリ, ケ ドゥ グレヌール, 3 5

(72)発明者 ベンスーサン, アルマン

フランス国, エフ - 7 5 0 1 3 パリ, リュ オーギュスト ランソン, 1 6

審査官 田村 聖子

(56)参考文献 国際公開第 9 3 / 0 1 4 1 2 5 ( W O , A 1 )

The Journal of Immunology, 2 0 0 2 年, Vol.169, P.1175-1181

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A61K 39/00-39/44

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	使用抗CD100抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP4768597B2</a>	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	JP2006501920	申请日	2004-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	恩留饱和度国家德比Rasante埃杜拉尔外壳格哈德·李医NSÇ强麦EM		
申请(专利权)人(译)	Ensutiteyu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (李NTT ESÇ强麦EM)		
当前申请(专利权)人(译)	Ensutiteyu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (李NTT ESÇ强麦EM)		
[标]发明人	ベリマリーフランソワーズ ジロドンパスカル ブムスールローレンス ベンスーサンアルマン		
发明人	ベリ,マリー-フランソワーズ ジロドン,パスカル ブムスール,ローレンス ベンスーサン,アルマン		
IPC分类号	A61K39/395 A61P25/00 A61P25/02 A61P29/00 A61P35/02 A61P31/14 A61P43/00 A61P25/28 G01N33/53 A61P37/06 C07K16/28 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/2803		
FI分类号	A61K39/395.N A61P25/00 A61P25/02 A61P29/00 A61P35/02 A61P31/14 A61P43/00.105 A61P25/28 G01N33/53.D		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 喀米·金加繆拉 西山雅也		
优先权	2003290247 2003-01-31 EP		
其他公开文献	JP2006516594A JP2006516594A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及BD16和/或BB18抗CD100抗体或其嵌合或人源化形式或其片段在治疗或诊断中枢神经系统疾病，更特别是髓磷脂疾病或疾病中的用途。会影响少突胶质细胞，例如多发性硬化症或HTLV-1相关性脊髓病。

HAM/TSP 患者番号	CD100 (ng/ml)
1	132.6 ± 29.9
2	66.6 ± 14.2
3	158.3 ± 17.2
4	79.6 ± 36.3
5	123.9 ± 42.7
6	60 ± 9.9
7	62.9 ± 14.2
8	57.9 ± 16.3
9	75 ± 27.6