

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A01N 37/18 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580026572.6

[43] 公开日 2007年8月8日

[11] 公开号 CN 101014245A

[22] 申请日 2005.8.3

[21] 申请号 200580026572.6

[30] 优先权

[32] 2004.8.3 [33] US [31] 60/598,247

[86] 国际申请 PCT/US2005/027773 2005.8.3

[87] 国际公布 WO2006/017673 英 2006.2.16

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.5

[71] 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 米 莎 杰弗里·L·布朗宁

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任
公司

代理人 章社杲 李丙林

权利要求书 7 页 说明书 117 页 序列表 16 页
附图 10 页

[54] 发明名称

神经元功能中的 TAJ

[57] 摘要

本发明提供了通过给予 TAJ 拮抗剂来治疗涉及调节神经突长出和/或存活 的疾病、失调、损伤、或病症，包括 CNS 失调、中风、或脊髓损伤的方法。

1. 一种增加神经突长出的方法,所述方法包括将神经元与有效量的减少在所述神经元中的 TAJ 信号传导的试剂进行接触,其中,所述试剂选自由(a)可溶性 TAJ 多肽;(b)抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段;(c)编码可溶性 TAJ 多肽的核酸;(d) TAJ 反义核酸;以及(e) TAJ 特异性 RNAi 核酸组成的组。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述神经元是 CNS 神经元。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述试剂是可溶性 TAJ 多肽。
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法,其中,所述可溶性 TAJ 多肽选自由(a)包含至少 95%和 SEQ ID NO:2 的胞外结构域相同的氨基酸序列的多肽;以及(b)包含具有多达 15 个氨基酸缺失、取代、或插入的 SEQ ID NO:2 的胞外结构域的多肽组成的组。
5. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法,其中,所述可溶性 TAJ 多肽包含具有在 SEQ ID NO:2 的氨基酸 20-50 之间的 N-末端至 SEQ ID NO:2 的氨基酸 130-176 之间的 C-末端的多肽。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述可溶性 TAJ 多肽进一步包含异源氨基酸序列。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,所述异源氨基酸序列包含免疫球蛋白的 Fc 区。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述试剂是抑制性抗-TAJ抗体或其抗原结合片段。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述抗体是单克隆抗体(mAb)。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述mAb选自由人源化抗体、嵌合抗体、以及人抗体组成的组。
11. 根据权利要求8、9或10所述的方法,其中,所述mAb特异性结合在SEQ ID NO:2中的表位。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述试剂是编码可溶性TAJ多肽的核酸。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述核酸编码人可溶性TAJ多肽。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述试剂是TAJ特异性反义核酸或RNAi核酸。
15. 根据权利要求2所述的方法,其中,CNS神经元是人CNS神经元。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述人CNS神经元选自由CG神经元、DRG神经元、星形胶质细胞、以及少突胶质细胞组成的组。
17. 一种降低或抑制神经元生长的方法,所述方法包括将神经元与有效量的增加TAJ信号传导或复合物形成的试剂进行接触,其中,所述试剂选自由(a)全长TAJ多肽或其功能性变体;

- (b) 活化 TAJ 的抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段; 以及 (c) 编码全长 TAJ 多肽或其功能性片段的核酸组成的组。
18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中, 所述试剂是人全长 TAJ 多肽。
19. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中, 所述试剂是编码人全长 TAJ 多肽的核酸。
20. 一种治疗受治疗者的方法, 所述方法包括:
 鉴定需要增加神经突长出的受治疗者, 以及
 给予所述受治疗者以足以增加神经突长出的量的试剂, 所述试剂降低神经元中的 TAJ 信号传导或复合物形成, 其中所述试剂选自由 (a) 可溶性 TAJ 多肽; (b) 抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段; (c) TAJ 反义核酸; (e) 经遗传改造以表达可溶性 TAJ 多肽的自体同源或异源细胞; 以及 (f) TAJ 特异性 RNAi 核酸。
21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中, 所述神经元是 CNS 神经元。
22. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中, 所述试剂是可溶性 TAJ 多肽。
23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中, 所述可溶性 TAJ 多肽选自由 (a) 包含至少 95% 和 SEQ ID NO:2 的胞外结构域相同的氨基酸序列的多肽; 以及 (b) 包含具有多达 15 个氨基酸缺失、取代、或插入的 SEQ ID NO:2 的胞外结构域的多肽组成的组。

24. 根据权利要求 22 所述的方法，其中，所述可溶性 TAJ 多肽包含具有在 SEQ ID NO:2 的氨基酸 20-50 之间的 N-末端至在 SEQ ID NO:2 的氨基酸 130-176 之间的 C-末端的多肽。
25. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法，其中，所述可溶性 TAJ 多肽进一步包含异源氨基酸序列。
26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中，所述异源氨基酸序列包含免疫球蛋白的 Fc 区。
27. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述试剂是抗-TAJ 抗体。
28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中，所述抗-TAJ 抗体是单克隆抗体 (mAb)。
29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中，所述 mAb 选自由人源化抗体、嵌合抗体、人抗体、以及前述中任何一个的抗原结合片段组成的组。
30. 根据权利要求 27、28 或 29 所述的方法，其中，所述 mAb 特异性地结合在 SEQ ID NO:2 中的表位。
31. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述试剂是编码 TAJ 的核酸。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中，所述核酸编码人 TAJ。
33. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述试剂是经遗传改造以表达 TAJ 的自体同源或异源细胞。

34. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述试剂是 TAJ 特异性反义核酸或 RNAi 核酸。
35. 根据权利要求 21 所述的方法，其中，所述 CNS 神经元是人 CNS 神经元。
36. 根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述人 CNS 神经元选自 CG 神经元、DRG 神经元、星形胶质细胞、以及少突胶质细胞组成的组。
37. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述受治疗者是人。
38. 根据权利要求 20 或 37 所述的方法，其中，所述受治疗者具有 CNS 神经变性病症。
39. 根据权利要求 38 所述的方法，其中，所述神经变性病症是多发性硬化、ALS、亨廷顿氏病、阿耳茨海默氏病、帕金森氏病、糖尿病神经病变。
40. 根据权利要求 20 或 37 所述的方法，其中，所述受治疗者具有与神经元损伤或横切有关的 CNS 损伤。
41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中，所述 CNS 损伤是创伤性脑损伤、中风、脊髓损伤、或视神经损伤。
42. 根据权利要求 40 所述的方法，其中，所述试剂是在损伤 72 小时内给予的。
43. 根据权利要求 40 所述的方法，其中，所述试剂是在所述损伤部位处或附近局部给予的。

44. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述试剂是结合第二个预防或治疗剂加以给予的。
45. 根据权利要求 44 所述的方法，其中，所述第二个预防或治疗剂是止痛剂、抗生素或皮质类固醇。
46. 根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述方法进一步包括对所述受治疗者的神经元功能进行评价。
47. 一种鉴定调节 CNS 神经突长出的试剂的方法，所述方法包括：
鉴定调节 TAJ 的表达、活性或水平的试剂；以及
将所述鉴定试剂的调节 TAJ 的表达、活性或水平的能力与
所述鉴定试剂的调节神经元生长的能力关联起来。
48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述鉴定步骤包括：
(a) 提供携带外源性核酸的细胞、组织或非人动物，其中所述核酸包括可操作地连接至编码报道多肽的核酸序列的 TAJ 启动子；
(b) 评价试验试剂在所述细胞、组织或非人动物中调节所述报道多肽的活性的能力；
(c) 选择增加或降低所述报道多肽的活性的试验试剂作为抑制或促进 CNS 神经元生长的试剂。
49. 根据权利要求 48 所述的方法，其中，所述方法进一步包括评价增加或降低所述报道分子的活性的所述试验试剂在非人实验动物中的体外或体内调节神经突长出的能力。

-
50. 一种转基因小鼠，其基因组包含破坏 TAJ 基因的转基因，其中，所述 TAJ 基因的破坏导致缺少可检测的 TAJ 产生，并且其中所述小鼠表现出在髓磷脂调节的神经突长出中的变化。

神经元功能中的 TAJ

技术领域

本发明涉及神经生物学、神经病学和药理学。更具体地，涉及通过给予 TAJ 拮抗剂来调节例如在 CNS 中的神经元功能，例如调节神经元生长和/或存活，例如轴突再生和/或神经突长出的方法。

背景技术

神经细胞功能受神经元和在其直接环境中的其它细胞之间的接触所影响 (Rutishauser, *et al.*, 1988, *Physiol. Rev.* 68:819)。这些细胞包括在中枢神经系统 (CNS) 中的特化神经胶质细胞、少突胶质细胞，以及在周围神经系统 (PNS) 中的施万细胞 (Schwann cell)，其用髓磷脂覆盖神经元轴突 (Lemke, 1992, in *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer)。

CNS 神经元具有损伤后的内在再生能力，但是存在于髓磷脂中的抑制性蛋白抑制它们这样做 (Brittis *et al.*, 2001, *Neuron* 30:11-14; Jones *et al.*, 2002, *J. Neurosci.* 22:2792-2803; Grimpe *et al.*, 2002, *J. Neurosci.*:22:3144-3160)。已经表征了若干种在少突胶质细胞上发现的髓磷脂抑制性蛋白。髓磷脂抑制性蛋白的实例包括 NogoA (Chen *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 434-439; Grandpre *et al.*, *Nature* 2000, 403, 439-444)、髓磷脂相关糖蛋白 (MAG) (McKerracher *et al.*, 1994, *Neuron* 13:805-811; Mukhopadhyay *et al.*, 1994, *Neuron* 13:757-767) 和少突胶质细胞糖蛋白 (OMgp) (Mikol *et al.*, 1988, *J. Cell. Biol.* 106:1273-1279)。这些蛋白中的每一种已分别被证实为神经元 NgR1 的配体 (Wang *et al.*, *Nature* 2002, 417,

941-944; Grandpre *et al.*, *Nature* 2000, 403, 439-444; Chen *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 434-439; Domeniconi *et al.*, *Neuron* 2002, published online June 28, 2002).

发明内容

本发明（部分地）基于如下发现，即在例如 CNS 中调节神经元功能，例如调节神经元生长和/或存活，例如轴突再生和/或神经突长出中涉及 TNFR 总科成员 TAJ（也被称为 TRAIN、TROY、TRADE 或 TNFRSF19，参见 EBY *et al.*, 2000, *J. Biolog. Chem.* 275:15336-15342; Kojima *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem* 275:20742-20747)。虽然不局限于理论，但是认为 TAJ 与 Nogo 受体（NgR1）/LINGO-1 复合物有关以影响 Rho 活化，其调节髓磷脂对神经突长出的抑制作用。因此，本发明的特征尤其在于利用调节 TAJ 以调节神经生长（例如用于在例如 CNS 损伤或发炎后促进神经元再生）的试剂（例如，蛋白质或多核苷酸试剂）的方法和组合物。

因此，在一方面，本发明的特征在于调节神经元生长和/或存活，例如调节轴突再生和/或神经突长出的方法。该方法涉及将神经元（如 CNS 神经元）与有效量的调节 TAJ 复合物形成和/或信号传导（signaling）的试剂进行接触。在一优选具体实施方式中，神经元是 CNS 神经元。所述接触可在体外、来自体内、或体内地进行。

在一个具体实施方式中，所述试剂减少例如阻断 TAJ 信号传导和/或复合物形成（例如减少 TAJ/NgR1 和/或 TAJ/LINGO-1 复合物形成），从而促进神经元的长出和/或存活，例如增加神经元存活、神经突长出、轴突再生、和/或减少髓磷脂诱导的神经突生长的抑制。这样的试剂在本文被称为“TAJ 拮抗剂”。示例性 TAJ 拮抗剂包括某些 TAJ 多肽和融合蛋白（例如，可溶性 TAJ-Fc 融合蛋白或显性失活（例如非信号传导）TAJ 多肽突变体）、抑制性抗-TAJ 抗体（包括其抗原结合片段和同系物）、以及抑制性 TAJ 核酸例如反义寡核

昔酸和 RNAi 核酸（例如，TAJ 特异性 siRNA）。TAJ 信号传导和/或复合物形成还可通过降低内源性 TAJ 基因的表达水平，例如通过降低 TAJ 基因的转录来减少。在一个具体实施方式中，TAJ 基因的转录可通过以下方式降低：改变内源性 TAJ 基因的调节序列，例如通过插入负调节序列（如用于转录阻遏物的 DNA 结合位点）、或通过去除正调节序列（如增强子或用于转录激活物的 DNA 结合位点）。

在一优选具体实施方式中，相比于基准值例如对照，神经元存活、神经突长出、和/或轴突再生增加至少 10%，优选至少 15%、20%、25%、30%、40%、50% 或更多。

在另一具体实施方式中，所述试剂增加 TAJ 信号传导和/或 TAJ 复合物形成，从而降低神经元存活、轴突再生、或神经突长出。这样的试剂在本文被称为“TAJ 激动剂”。这样的试剂的实例包括全长 TAJ 多肽或其功能等同物，以及编码 TAJ 的核酸。编码 TAJ 的核酸可以是基因组序列或 cDNA 序列。除了 TAJ 编码区（例如，全长编码区）外，核苷酸序列可包括启动子序列，例如来自 TAJ 基因或第二个基因的启动子序列；增强子序列；未翻译的调节序列，例如 5' 未翻译区（UTR），例如来自 TAJ 基因或第二个基因的 5'UTR，3'UTR，例如来自 TAJ 基因或第二个基因的 3'UTR；聚腺苷酸化位点；隔离序列（insulator sequence）。在另一具体实施方式中，TAJ 蛋白的水平通过增加内源性 TAJ 基因的表达水平，例如通过增加 TAJ 基因的转录而得以增加。在这样的具体实施方式中，TAJ 基因的转录可通过以下方式增加：改变内源性 TAJ 基因的调节序列，例如通过插入正调节因子（如增强子或用于转录激活物的 DNA 结合位点）；缺失负调节因子（如用于转录阻遏物的 DNA 结合位点）和/或用另一基因的调节序列或因子替代内源性调节序列或其中的因子，从而使得 TAJ 基因的编码区可以更有效地进行转录。

本文所描述的方法对于例如抑制 CNS 神经元的生长圆锥萎陷 (growth cone collapse)、促进神经元 (例如, 处于死亡危险的神经元) 的存活、促进神经突长出、促进轴突再生、促进在 CNS 失调或损伤位点处的髓鞘化、通过髓磷脂抑制性蛋白来降低轴突生长的抑制、以及治疗哺乳动物中的 CNS 病症 (例如, 治疗 CNS 损伤或失调, 例如治疗与轴突损伤或横切 (横纤维切断, transection) 相关的 CNS 病症, 如创伤性脑损伤和脊髓损伤), 或治疗神经变性疾病如多发性硬化 (以及其它髓鞘化失调, 例如, 进行性多发性脑白质病 (PML)、桥脑中央髓鞘溶解症 (CPM)、以及脑白质肾上腺萎缩症)、ALS、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、阿耳茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、糖尿病神经病变、以及中风。

在另一方面, 本发明的特征在于治疗需要调节神经元生长的受治疗者 (患者, subject) (例如, 哺乳动物, 优选人), 例如需要增加神经元存活、神经突长出、和/或轴突再生 (优选在 CNS 中) 的受治疗者的方法。该方法包括向受治疗者以足以增加神经元存活、神经突长出、和/或轴突再生 (例如减少髓磷脂或 MAIF 诱导的神经突长出的抑制) 的量给予减少 TAJ 信号传导和/或减少 TAJ 复合物形成 (例如减少 TAJ/NgR1/LINGO-1 复合物形成) 的试剂。该试剂可以是例如抗 TAJ 抑制性抗体 (或其抗原结合片段或同系物)、可溶性 TAJ 多肽例如可溶性 TAJ 融合蛋白 (优选 TAJ-Fc 融合蛋白)、TAJ 反义核酸或 RNAi 分子。优选的试剂是蛋白质, 例如可溶性 TAJ-Fc 融合蛋白, 例如包括融合至人 Ig Fc 区的人 TAJ 的可溶性胞外结构域的融合蛋白、或抑制性抗-TAJ 抗体, 优选人源化或全人抗-TAJ 抗体。

在一个具体实施方式中, 受治疗者具有 CNS 神经变性疾病如多发性硬化 (或其它髓鞘化失调, 例如进行性多发性脑白质病

(PML)、桥脑中央髓鞘溶解症(CPM)、以及脑白质肾上腺萎缩症)、ALS、亨廷顿氏症、阿耳茨海默氏病、帕金森氏病、糖尿病神经病变。在另一具体实施方式中,受治疗者具有与轴突损伤或横切相关的CNS损伤,如创伤性脑损伤、中风、脊髓损伤、或视神经损伤。在一些具体实施方式中,所述试剂可在初始损伤后的短时间期内,例如在损伤的72小时内,优选在48小时内,更优选在24小时内加以给予。在这样的具体实施方式中,所述试剂可系统给予,但优选在损伤部位处或附近局部给予。

在一个具体实施方式中,所述方法可包括将所述试剂系统地给予至受治疗者,例如通过静脉内、或肌内途径给予。在其它具体实施方式中,所述试剂在损伤或失调部位处或附近局部地给予,例如鞘内或硬膜外给予。

对于局部给药,治疗有效量的多肽通常为 $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$,例如为 $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 5\text{mg}/\text{kg}$ 。对于系统给药,治疗有效量的多肽通常为 $1\text{mg}/\text{kg}\sim 20\text{mg}/\text{kg}$ 。

在一些具体实施方式中,所述方法包括(a)提供经遗传改造以表达TAJ多肽的培养宿主细胞;和(b)在CNS疾病、失调或损伤例如脊髓损伤位点处或附近将宿主细胞引入受治疗者。培养的宿主细胞可以是自体同源或异源性的。在一个具体实施方式中,该细胞已用编码TAJ多肽的核酸加以转染。该TAJ多肽可以是全长TAJ多肽。

在一些具体实施方式中,所述方法包括在疾病、失调、或损伤部位处或附近给予受治疗者足以减少由在损伤位点处或附近的神经元轴突伸展的抑制的量的载体(例如病毒载体)的步骤,其中所述载体包含引起TAJ多肽表达的序列(例如编码TAJ多肽的核苷酸序列),以使TAJ多肽在受治疗者体内由该核苷酸序列表达。该载

体可以是例如腺病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、EB 病毒载体 (Epstein Barr viral vector)、乳多空病毒载体、牛痘病毒载体、单纯疱疹病毒载体、或质粒载体。该载体可以通过诸如局部给药、眼内给药、非肠道给药、胸内给药、硬膜下给药或皮下给药的路径加以给予。

在以下具体实施方式中，结合第二个（另一个，second）预防或治疗试剂给予所述试剂，其中所述第二个预防或治疗试剂例如为皮质类固醇（皮质甾类，corticosteroid），例如甲泼尼龙（methylprednisolone）；止痛剂；抗生素；第二个生物治疗剂，例如 LINGO-1 活性、p75 活性、或 Nogo 受体 (NgR) 活性的调节物。在以下情况下，所述试剂可以结合至该第二个试剂。

在典型具体实施方式中，所述试剂的给予是重复的，例如重复至少 1、2、3、5、10、20 次或更多次。在一个具体实施方式中，该试剂在治疗期间给予，包括至少每周一次地给予达至少 8 周。在其它具体实施方式（例如，其中的受治疗者已具有急性 CNS 损伤）中，所述试剂在治疗期间进行给予，包括在单个星期内多次给予。

在一个具体实施方式中，所述方法包括对受治疗者或来自受治疗者的生物样品的参数进行评价，该参数涉及神经元功能，例如神经元 Rho 活化、神经元长出、脊髓功能和/或认知功能。所述评价可在给药之前和/或之后进行。

在一些具体实施方式中，所述试剂利用例如控释装置如生物相容性聚合物、微粒、或筛网通过控释递送至受治疗者。所述装置可减少降解并控制试剂的释放。这样的生物相容性控释系统可在 CNS 伤口部位处或附近例如通过肌肉、皮下、静脉注射或植入而给予至受治疗者。

在另一方面，本发明的特征在于一种筛选试剂的方法，其中所述试剂调节例如增加或降低神经元存活，例如调节神经突长出和/或轴突再生。该方法包括鉴定试剂，该试剂可减少 TAJ 的表达或水平和/或降低 TAJ 信号传导或复合物形成(例如, TAJ/LINGO-1/NgR1 复合物)的能力。该方法还可包括将试验试剂对 TAJ 的作用与该试验试剂促进或增加神经突长出的能力相关联起来(例如, 提供与所鉴定试剂或其应用相关的打印材料或计算机可读媒质)。相关联意味着将降低 TAJ 的表达、活性或水平的试验试剂鉴定为能够促进或增加神经突长出(例如促进轴突再生)的试剂。相关联步骤可包括例如形成或提供降低 TAJ 的表达、活性或水平的试验试剂鉴定为能够促进或增加神经突长出的试剂的记录(例如, 打印或计算机可读记录, 如实验记录或数据组或电子邮件)。该记录可包括其它信息, 如特异性试验试剂鉴定器、日期、方法的操作者、或关于试验试剂纯化或生物活性的来源、结构、方法。来源于该记录的记录或信息可用来例如将试验试剂鉴定为用于药学或医疗用途的化合物或备选试剂(例如, 铅化合物)。所鉴定的试剂可被鉴定为用于治疗 CNS 病症例如本文中所描述的 CNS 病症的试剂或潜在试剂。通过这个方法鉴定的试剂例如化合物可用于例如调节神经元生长的治疗(或治疗开发)中。

在一个具体实施方式中, 所述方法包括提供试验试剂以及评价该试验试剂是否结合 TAJ 或 TAJ 配体。在一个具体实施方式中, 该方法包括提供试验试剂以及评价该试验试剂是否影响 TAJ 结合 LINGO-1 和 NgR1 中的一种或两种的能力。

在一个具体实施方式中, 所述方法包括提供试验试剂以及评价该试验试剂是否影响 TAJ 信号传导例如调节神经元中的 Rho 活化的能力。例如, 可以利用 Rho 驱动报道分子系统来筛选影响 TAJ 信号传导的试剂。

在另一具体实施方式中，所述方法包括：(a) 提供细胞（例如本文所述的 CNS 细胞）、组织或携带外源性核酸的非人动物，该外源核酸包括 TAJ 的调节区（例如启动子），其可操作地连接至编码报道多肽（reporter polypeptide）（例如基于光的，例如比色或荧光可检测标记物，例如荧光报道多肽，例如 GFP、EGFP、BFP、RFP）的核苷酸序列；(b) 评价试验试剂调节该细胞、组织或非人动物中的报道多肽的活性的能力；以及 (c) 选择增加或降低报道多肽的活性的试验试剂分别作为抑制或促进 CNS 神经元生长的试剂。在一个具体实施方式中，所述细胞或组织是神经元。在另一具体实施方式中，所述非人动物是携带核酸的转基因动物，例如转基因啮齿动物，例如小鼠、大鼠或豚鼠。在另一具体实施方式中，所述非人动物是斑马鱼（参见，例如，Hjorth, 2002, *Int J Dev Biol.* 46(4): 609-19, 用于在斑马鱼中的轴突生长试验）、果蝇、秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 或其它携带该核酸的低级生物。在一个具体实施方式中，所述细胞是 CNS 细胞，例如 CG 神经元、DRG 神经元、星形胶质细胞、或少突胶质细胞。

在一些具体实施方式中，所述评价包括将用于评价的值例如用于试验试剂对 TAJ 的作用的值输入到数据库或其它记录中。

在一个具体实施方式中，所述方法包括两个评价步骤，例如该方法包括在第一系统例如无细胞、细胞、或组织系统中评价试验试剂的第一步骤，以及在第二系统例如第二细胞或组织系统中或在非人动物中评价试验试剂的第二步骤。在其它具体实施方式中，该方法包括在相同类型的系统中的两个评价步骤，例如，在相同或不同的非人动物中的第一评价之后，在非人动物中再次评价该试剂。两次评价可通过间隔任意长的时间例如数天、数周、数月或数年。在一个具体实施方式中，试验试剂首先对其与 TAJ 相互作用例如结合

至 TAJ 的能力进行评价，然后对其调节 Rho 活化和/或神经突长出的能力进行评价。

所述试验试剂可以是粗产物或半纯化提取物（例如有机提取物，例如动物或植物提取物）或分离的化合物，例如小分子、蛋白质、脂或核酸。

在另一方面，本发明的特征在于转基因的非人动物，例如转基因非人啮齿类动物，例如小鼠、大鼠或豚鼠，其基因组包含破坏 TAJ 基因的转基因。在一个具体实施方式中，非人动物（或来自该动物的细胞）表现出以下中的一种或多种：减少的响应于神经突长出的抑制剂（例如髓磷脂和 MAIF）的神经突长出抑制；以及减少的响应于神经突长出的抑制剂的 Rho 激活。

尽管类似或等同于本文所述的方法和物质可用于本发明的实施或测试，但是以下描述了优选的方法和物质。这些物质、方法以及实施例仅仅是说明性的，而不用于限制。本发明的其它特征和优点根据详细描述和权利要求书将会更明显。

附图说明

图 1A-C 示出了各种结合测定的结果。（A）为条形图，示出了用于各种蛋白质与可溶性 NgR1(10 μ g/ml)结合的 ELISA 测定结果。（B）为一组柱状图，示出了 AP-TAJ 与表达指定蛋白质的转染 CHO 细胞的结合。（C）为曲线图，示出了用于 AP-TAJ 与 NgR1 表达的 CHO 细胞结合的 ELISA 测定结果。

图 2 是一系列免疫沉淀实验的蛋白质印迹（Western blot）。各种指定蛋白的结合被共表达并且将细胞提取物与指定抗体（上图：抗-TAJ；下图：抗-LINGO-1）免疫沉淀。

图 3 是曲线图，示出了用于 AP-TAJ 与全长 (sNgR1-432) 和截短 (sNgR1-344 和 sNgR1-310) NgR1 结合的 ELISA 测定结果。

图 4 是 TAJ 剔除的构建体的图解。

图 5A-D 是一组示出了 TAJ 对神经突长出的作用的柱状图和示意图。(A) 置于髓磷脂涂布的载波片上的来自 TAJ 剔除和野生型小鼠的 P8 小脑颗粒神经元 (CGN)。(B) 放置后 1 天，在缺少和存在 TAJ 的情况下，野生型 CGN 中的神经突长出的检测值。(C) 在各自髓磷脂剂量响应曲线中的来自 TAJ 野生型和剔除 CGN 的神经突长度的检测值。(D) 在来源于聚-D-赖氨酸 (PDL) 和 AP-Nogo66 的基质 (如所指定的，在具有和没有 TAJ-Fc 的情况下) 中生长的出生后 7 天的大鼠的解离 DRG 神经元中的神经突长出 (在体外 24 小时后) 的检测值。

图 6 为示出了在取自跨越 E14、E18、P0、P4、P8、P11、P23、以及成熟 (E=胚胎发育时间而 P=出生后的时间) 的发育时间期的全大鼠脑均浆的 TAJ 表达的相对水平。

具体实施方式

在轴突损伤或横切后，在周围神经系统 (PNS) 中的神经元能够再生长并修复其轴突达到重新建立功能性连接的程度。相反，中枢神经系统 (CNS) 的神经元缺少这种恢复能力，并且负责抑制 CNS 再生的机制保留强烈研究的问题。重要地，CNS 神经元在 PNS 环境中再生长其轴突的所述能力表明，不存在 CNS 神经元在损伤后再生的内在无能。相反，看起来 CNS 轴突修复的抑制是神经元过程和其局部 CNS 环境之间相互作用的结果。研究表明，对这些负相互作用的重要贡献者是一组抑制性分子，其与髓磷脂有关，即髓磷脂相关糖蛋白 (MAG)、Nogo 以及少突胶质细胞-髓磷脂糖蛋白

(OMgp)。这些蛋白质中的每一种已被证实为负影响生长锥体细胞伸展和轴突长出。

对 Nogo、MAG、以及 OMgp（集中地称为髓磷脂相关抑制因子或 MAIF）的进一步研究表明，这些蛋白质的长出抑制性信号通过普通多因子受体复合物转导。至少三种不同的亚单位可参与 MAIF 受体复合物：Nogo 受体 1 (NgR1)、p75、以及 LINGO-1。参见 Fournier, A.E., *et al. Nature* 409:341-346 (2001); Mi, S., *et al. Nat. Neurosci.* 7:221-228 (2004); 和 Wang, K.C., *et al., Nature* 420:74-78 (2002)。虽然这三个分子结合可形成功能性 MAIF 受体，但是它们在其各自物理特性方面相互之间的高度不同。NgR1 是富亮氨酸重复 (LRR) 总科分子的成员并且 GPI 连接至细胞表面。参见 Fournier, A.E., *et al. Nature* 409:341-346 (2001)。P75 是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 总科的成员，而最初鉴定为低亲和力神经营养蛋白受体，这是由于发现也在细胞死亡信号传导方面起重要作用。参见 Rabizadeh, S. and Bredesen, D.E. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:225-239 (2003)。最新描述的 MAIF 受体复合物成员的 LINGO-1 也是 LRR 家族成员，但含有跨膜和能够酪氨酸磷酸化和下游信号传导的胞质结构域。参见 Mi, S., *et al. Nat. Neurosci.* 7:221-228 (2004)。

大量体外分析表明，这三个受体组分 NgR1、p75 以及 LINGO-1 中的每一个都有助于全部功能的 MAIF 受体复合物。然而，其它方面的证据表明，p75 在更多生理条件下可能不会在轴突长出抑制中起那么重要的作用。在大脑皮层和脊髓神经纤维束中，轴突对 MAIF 高度响应，而大脑皮层和脊髓神经元一般不表达显著的 p75 水平。P75 通过上行感觉神经元来表达，而在这些神经元中由基因剔除的 P75 丧失不能促进这些轴突在脊髓损伤后再生。最后，将 LINGO-1/NgR1 结合（本文）与 p75/NgR1 相比，结合至 NgR1 的 p75 有相对较弱的亲和力，其通过配体存在而显著地被增加。参见，

例如 Copray, S., et al., *J. Neuroimmunol.* 148:41-53 (2004); Giehl, K.M., et al., *J. Neurosci.* 21:3492-3502 (2001); Mi, S., et al. *Nat. Neurosci.* 7:221-228 (2004); Shao, Z., et al., *Neuron* 45:353-359 (2004); and Song, X.Y., et al., *J. Neurosci.* 24:542-546 (2004)。

本文所述的方法和组合物涉及 TAJ (TNF 受体总科成员) 在神经元存活和/或生长例如在 CNS 中的神经突长出中的作用。如本文所述, TAJ 结合 NgR1 并且在多脑区的各种细胞类型中进行表达。TAJ 与 NgR1 和 LINGO-1 形成功能性 MAIF 受体复合物。培养自缺失 TAJ 表达的小鼠的神经元, 表现出减少的响应于髓磷脂和 MAIF 的长出抑制。因此, TAJ 参与 MAIF 受体复合物并且在介导 MAIF 抑制影响中起作用。因而, TAJ 试剂如 TAJ 多肽(例如, 可溶性 TAJ 多肽和融合蛋白)、抗-TAJ 抗体、以及 TAJ 核酸(例如, 编码 TAJ 的核酸或反义 TAJ 核酸) 可用来调节神经突长出, 例如用来治疗各种 CNS 病症, 例如创伤性脊髓损伤、中风、以及多发性硬化(MS)。

定义

除非有其它定义, 本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的普通技术人员所通常理解的含义。在相冲突的情况下, 包括该定义的本申请受控。除非上下文另有要求, 单数术语包括复数而复数术语包括单数。本文提及的所有出版物、专利以及其它参考文献通过引用方式将其全部内容结合于此作为参考, 如同将每一个单个出版物或专利申请具体和单个地引入一样。

尽管类似或等同于本文所述的方法和物质可用于本发明的实施或试验, 但是以下描述了合适的方法和物质。这些物质、方法以及实施例仅仅是说明性的, 而不用于限制。本发明的其它特征和优点根据详细描述和权利要求书将会更明显。

为了进一步详细说明本发明，使用了下面的术语和定义。

应当注意“一个”实体指的是一个或多个这样的实体；例如“一个免疫球蛋白分子”应理解为表示一个或多个免疫球蛋白分子。同样地，术语“一个”、“一个或多个”以及“至少一个”在本文中可互换使用。

在整个本说明书和权利要求书中，词语“包括”或其变形“包含”表示在所描述说明的方法、结构、或组合物中含有任何所述整体或整体的组，但不排除任何其它整体或整体的组。

如本文所使用的，如在整个说明书和权利要求书中使用的术语“由……组成”或其变形表示含有任何所述整体或整体的组，但没有其它整体或整体的组可以加入到所描述说明的方法、结构或组合物中。

如本文所使用的，如在整个说明书和权利要求书中使用的术语“基本上由……组成”或“大致由……组成”表示含有任何所述整体或整体的组，并且可选地含有非实质上改变所描述说明的方法、结构或组合物的基本形状或新的性质的任何所述整体或整体的组。

如本文所使用的，术语“多肽”用来涵盖单数的“多肽”以及复数的“多肽”，并且指由通过酰胺键（也被称为肽键）线性连接的单体（氨基酸）构成的分子。术语“多肽”指两个或多个氨基酸的任何一个链或多个链，而不是指产物的具体长度。因此，肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或任何其它用来指两个或多个氨基酸链或多个链的术语都包括在“多肽”的定义范围中，并且术语“多肽”可用这些术语中的任一个替换或互换使用。术语“多肽”也用来指在肽表达后的修饰产物，包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团的衍生化、蛋

白水解切割、或通过非天然存在的氨基酸的修饰。多肽可以衍生自天然生物源或通过重组技术形成，但不必需翻译自指定的核酸序列。其可以以任何方式形成，包括通过化学合成。

在本发明中，多肽可由通过肽键或经修饰的肽键（即，肽同构体）相互结合的氨基酸构成，并且可以含有不同于 20 个基因编码的氨基酸（例如，非天然存在的氨基酸）的氨基酸。本发明的多肽可以通过天然过程如翻译后加工或通过本领域熟知的化学修饰技术进行改性。这样的修饰在基础教科书中以及在更详尽的专著以及大量研究文献中都很好地描述了。修饰可发生在多肽中的任何地方，包括肽主链、氨基酸侧链、以及氨基或羧基末端。应当理解，相同类型的修饰可以以相同或不同程度地在给定多肽的若干位点处存在。同样，给定多肽可以包含许多类型的修饰。多肽可以是例如由泛素化（遍在蛋白化）导致的支链化，并且它们可以是环状的，同时具有或没有支链化。环状、支链化、以及支链化环状多肽可由翻译后天然过程产生或通过合成方法形成。修饰包括乙酰化、酰化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂或脂衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸酯（盐）的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI 锚形体形成、羟基化、碘化、甲基化、十四烷基化、氧化、PEG 化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊二烯化、外消旋、硒化、硫化、转运 RNA 介导的氨基酸插入蛋白质如精氨酰化、以及泛素化。（参见，例如，*Proteins - Structure And Molecular Properties*, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992).)

本发明的多肽的大小可以为约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1000个或更多个、或2000个或更多个氨基酸。多肽可以具有确定的三维结构，尽管它们不必具有这样的结构。具有确定的三维结构的多肽称为折叠的，并将不具有确定的三维结构而是具有可采用大量不同构造的多肽称为未折叠的。如本文所使用的，术语糖蛋白指的是结合至少一个糖部分的蛋白质，该糖部分通过氨基酸残基例如丝氨酸残基或天冬酰胺残基的含氧或含氮侧链连接至该蛋白质。

用“分离的”多肽或其片段、变形体、或衍生物来表示不在其天然环境中的多肽。不要求具体纯化水平。例如，分离的肽可获取自其本身或天然环境。认为重组形成的多肽和在宿主细胞中表达的蛋白质对于本发明来说是分离的，作为天然或重组多肽，其已被分离、分开、或部分地或基本上通过任何合适技术纯化了。

在本发明中，“多肽片段”指的是较大多肽的短氨基酸序列。蛋白质片段可以是“独立的”，或包括在其片段形成一部分区的较大多肽内。本发明的多肽片段的代表性实例包括在长度上例如包含约5个氨基酸、约10个氨基酸、约15个氨基酸、约20个氨基酸、约30个氨基酸、约40个氨基酸、约50个氨基酸、约60个氨基酸、约70个氨基酸、约80个氨基酸、约90个氨基酸、以及约100个氨基酸或更多个氨基酸。

当提及本发明的多肽时，术语“片段”、“变形体”、“衍生物”以及“类似物”包括任何保持至少部分生物活性的多肽。如本文所述的多肽可以没有限制地包括其中的片段、变形体、或衍生物分子，只要该多肽仍发挥其功能。本发明的NgR1多肽和多肽片段可以包括蛋白水解片段、缺失片段，尤其是当递送给动物时更易于到达作

用位点的片段。多肽片段进一步包括包含天然多肽的抗原或免疫原表位(包括线性以及三维表位)的多肽的任何部分。本发明的 NgR1 多肽和多肽片段可以包含变异区(包括上述的片段),以及同样具有由于氨基酸取代、缺失、或插入而改变的氨基酸序列的多肽。变异可以自然发生,如等位变异(allelic variant)。用“等位变异”来表示占据在生物体基因组上给出的座位的基因的可替换形式。*Genes II*, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)。非自然发生的变异可利用已知的基因突变技术来产生。本发明的 NgR1 多肽和多肽片段可以包含保守或非保守性氨基酸取代、缺失或插入。本发明的 NgR1 多肽和多肽片段还可包括衍生分子。变异多肽在本文中还可称为“多肽类似物”。如本文所使用的,多肽或多肽片段的“衍生物”指的是具有通过功能性侧基的反应而化学衍生的一个或多个残基的主题多肽。同样作为“衍生物”包括的是含有二十个标准氨基酸的一个或多个天然存在的氨基酸衍生物的那些多肽。例如,4-羟基脯氨酸可以是脯氨酸取代的;5-羟基赖氨酸可以是赖氨酸取代的;3-甲基组氨酸可以是组氨酸取代的;高丝氨酸可以是丝氨酸取代的;以及鸟氨酸可以是赖氨酸取代的。

如本文所使用的,术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可与第二个硫醇基团形成二硫键或桥的硫醇基团。

如本文所使用的,“融合蛋白”意思是指包含通过肽键线性连接至第二个多肽的第一个多肽。该第一个多肽和第二个多肽可以是相同或不同的,并且它们可以是直接连接的或通过肽接头(参见下文)进行连接的。

术语“多核苷酸”用来涵盖单数核酸以及复数核酸,并且指分离的核酸分子或构建体,例如信使 RNA (mRNA) 或质粒 DNA

(pDNA)。多核苷酸可以包括传统磷酸二酯键或非传统键(例如,如在肽核酸(PNA)中发现的酰胺键)。多核苷酸可含有全长cDNA序列的核苷酸序列,包括未翻译的5'和3'序列、编码序列、以及核酸序列的片段、表位、结构域、和变异体。多核苷酸可由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸(其可以是未修饰的RNA或DNA或经修饰的RNA或DNA)组成。例如,多核苷酸可以由单链和双链DNA、单链和双链区的混合物的DNA、单链和双链RNA、以及单链和双链区的混合物的RNA、包含DNA和RNA(其可以是单链或更通常是双链的,或单链和双链区的混合物)的杂合分子所组成。另外,多核苷酸可以由包含RNA或DNA或RNA和DNA二者的三链区构成。多核苷酸还可以含有一个或多个经修饰的碱基或由于稳定性或其它原因而修饰的DNA或RNA主链。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和诸如肌苷的非常见碱基。可以对DNA和RNA进行各种修饰;因此,“多核苷酸”包括化学、酶促或代谢地修饰的形式。

术语“核酸”指的是存在于多核苷酸的任何一个或多个核酸区段,例如DNA或RNA片段。用“分离的”核酸或多核苷酸来表示核酸分子DNA或RNA,其已从其天然环境中取出。例如,包含于载体的编码本发明的TAJ多肽或多肽片段的重组多核苷酸被认为对于本发明用途来说是分离的。分离的多核苷酸的其它实例包括保留在异源性宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中(部分或基本上)纯化的多核苷酸。分离的RNA分子包括本发明的多核苷酸的体内或体外RNA转录体。根据本发明的分离多核苷酸或核酸进一步包括通过合成产生的这样的分子。另外,多核苷酸或核酸可以是或可以包括调节因子,如启动子、核糖体结合位点、或转录终止子。

如本文所使用的,“编码区”是一部分核酸,其由翻译成氨基酸的密码子组成。尽管“中止密码子”(TAG、TGA、或TAA)没

有被翻译成氨基酸，但是其可以被认为是编码区的部分，而任何侧翼序列（侧面序列）例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等不是编码区的部分。本发明的两个或更多个编码区可以存在于单个多核苷酸构建体，例如在单个载体上，或存在于分开的多核苷酸构建体，例如在分开（不同）的载体上。此外，任何载体可以包含单个编码区，或可以包括两个或更多个编码区，例如单个载体可以单独地编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。另外，本发明的载体、多核苷酸、和核酸可以编码异源编码区，或者融合或者未融合至编码本发明的 TAJ 多肽或多肽片段的核酸。异源编码区包括但不限于特化因子或基序，如分泌信号肽或异源功能结构域。

在某些具体实施方式中，多核苷酸或核酸是 DNA。在 DNA 的情况下，包含通常编码多肽的核酸的多肽可以包括启动子和/或其它转录或可操作地联合一个或多个编码区的翻译控制因子。可操作联合是用于基因产物例如多肽的编码区以为了将基因产物的表达置于调节序列的影响或控制之下的方式联合一个或多个调节序列。如果启动子功能的诱导导致编码希望基因产物的 mRNA 的转录并且如果在两个 DNA 片段之间的键接的特性不会干扰表达调节序列指导基因产物表达的能力或干扰 DNA 模板被转录的能力，则两个 DNA 片段（如多肽编码区和与其相关的启动子）是“可操作地联合的”。因此，如果启动子能够影响核酸的转录则启动子区将是可操作地联合该编码多肽的核酸。启动子可以是实质上指导仅在预定细胞中的 DNA 转录的细胞特定启动子。除了启动子之外，其它转录控制因子例如增强子、操作子、阻遏物、以及转录终止信号能够可操作地联合多核苷酸以指导细胞特定转录。本文披露了合适的启动子和其它转录控制区。

本领域技术人员已知各种转录控制区。这包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区，如但不限于来源于细胞巨化病毒（立即早期启动子，连接有内含子-A）、猿猴病毒（早期启动子）、以及逆转录酶病毒（如劳氏肉瘤病毒）。其它转录控制区包括来源于脊椎动物基因如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长素和兔 β -球蛋白、以及能够控制真核细胞中的基因表达的其它序列。其它合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导的启动子（例如，可通过干扰素或白介素诱导的启动子）。

类似地，各种翻译控制因子对本领域普通技术人员来说是已知的。这包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子、以及来源于小核糖核酸病毒（具体地，内部核糖体进入位点或 IRES，也称为 CITE 序列）。

在其它具体实施方式中，本发明的多核苷酸例如是信使 RNA（mRNA）形式的 RNA。

本发明的多核苷酸和核酸编码区可以联合分泌或信号肽的其它编码区，其指导由本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假设，由哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列，其是在已启动跨过天然内质网的成长蛋白链的排出时从成熟蛋白质切割的。本领域的普通技术人员注意到，由脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有融合至该多肽的 N-末端的信号肽，其为从完全或“全长”多肽切割以产生多肽的分泌或“成熟”形式。在某些具体实施方式中，使用了天然信号肽例如免疫重链或轻链信号肽，或保持指导可操作地联合它的多肽分泌的能力的序列的功能衍生物。可替换地，可以使用异源哺乳动物信号肽、或其功能衍生物。例如，可以用人组织血纤维蛋白溶酶原活化剂（TPA）或小鼠 β -葡糖苷酶的前导序列取代野生型前导序列。

在某些具体实施方式中，用于本文所披露方法中的试剂是“抗体”或“免疫球蛋白”分子，或其免疫特异性片段，例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或经改造的抗体分子或以类似于抗体分子的方式结合抗原的片段。如本文所使用的，术语“抗体”以其最宽含义使用，并涵盖多克隆抗体以及单克隆抗体，包括全长抗体、多特异性抗体（例如，双特异性抗体）、嵌合抗体、人源化抗体和全人抗体、以及这样的抗体的片段，包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、和 Fv 片段、双功能抗体、线性抗体、单链抗体分子、以及从抗体片段形成的多特异性抗体，只要它们表现出所希望的抗原结合活性。单克隆抗体表示抗原的特征实质上与同族抗体一样，并且不被解释为需要通过任何具体方法生产的抗体。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文可互换地使用。抗体或免疫球蛋白至少包含重链的可变结构域，并且通常至少包含重链和轻链的可变结构域。在脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构相对较好被理解了。参见例如 Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)。

如以下即将更详尽讨论的，术语“免疫球蛋白”包含各个大类的可生化地区分的多肽。本领域技术人员将理解，重链分为其中具有部分亚类例如 ($\gamma 1$ - $\gamma 4$) 的 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 类。正是这种链的特性将抗体的“类”分别确定为 IgG、IgM、IgA、IgG、或 IgE。免疫球蛋白亚类（同种型）例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 被很好地表征并已知赋予功能特化。根据这里的披露内容，本领域技术人员可区分这些类和同种型中每一种的修饰型，因此属于本发明的范围。所有免疫球蛋白类清楚地属于本发明的范围，后面的讨论一般针对免疫球蛋白分子的 IgG 类。关于 IgG，其是标准免疫球蛋白分子，包括两个相同的分子量约为 23,000 道尔顿的轻链多肽，以及两个相同的分子量约为 53,000-70,000 道尔顿的重链多肽。这四个

链通常通过二硫键结合成“Y”型，其中轻链托住在“Y”开口处开始并连续通过可变区的重链。

轻链和重链被划分成结构和功能同源区。术语“恒定”和“可变”是功能性使用的。在这方面，应理解，轻链(V_L)和重链(V_H)部分的可变结构域都决定抗原识别和特异性。相反地，轻链(C_L)和重链的恒定结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 、或 C_{H3})赋予重要的生物学性质如分泌、经胎盘的活动性、Fc受体结合、互补结合等性质。按照惯例，恒定区结构域的数量随着它们变得更远离抗原结合位点或抗体的氨基末端而增加。N-末端部是可变区并且在C-末端部处是恒定区； C_{H3} 和 C_L 结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基末端。

轻链分为 κ 或 λ 。每个重链类可以与 κ 轻链或 λ 轻链进行结合。通常，轻链和重链相互共价连接，并且当免疫球蛋白是通过杂种细胞、B细胞或经遗传改造的宿主细胞生成时，两个重链的“尾部”通过共价二硫键或非共价键相互键接。在重链中，氨基酸序列从在Y构型叉端处的N-末端延伸至在每个链底部处的C-末端。本领域的技术人员应理解，重链分为其中具有部分亚类例如($\gamma 1$ - $\gamma 4$)的 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 类。正是这种链的特性将抗体的“类”分别确定为IgG、IgM、IgA、IgG、或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁被很好地表征并已知赋予功能特化。根据这里的披露内容，本领域技术人员可辨别这些类和同种型中每一种的修饰型，因此属于本发明的范围。

如上所述，可变区允许抗体选择性地识别并特异性地结合在抗原上的表位。即，抗体的 V_L 结构域和 V_H 结构域结合而形成确定三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成在Y的每个臂端处存在的抗原结合位点。更具体地，抗原结合位点是由在 V_H 和 V_L 链中每一个上的三个互补决定区(CDR)确定。在一些情形中，例如某些来源于羊驼(camelid)种或给予羊驼免疫球蛋白改造的免疫

球蛋白分子（完全免疫球蛋白分子），可以仅由重链而没有轻链组成。参见例如 Hamers Casterman *et al.*, *Nature* 363:446 448 (1993)。

在一个具体实施方式中，本发明的抗原结合分子包含抗体分子的至少一个重链或轻链 CDR。在另一具体实施方式中，本发明的抗原结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少两个 CDR。在另一具体实施方式中，本发明的抗原结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少三个 CDR。在另一具体实施方式中，本发明的抗原结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少四个 CDR。在另一具体实施方式中，本发明的抗原结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少五个 CDR。在另一具体实施方式中，本发明的抗原结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少六个 CDR。包含至少一个可被包含于受治疗者抗原结合分子的 CDR 的示例性抗体分子在本领域是已知的并且在本文描述了示例性分子。

用于本发明方法中的抗体或其免疫特异性片段包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长源化抗体、或嵌合抗体，单链抗体、表位结合片段例如 Fab、Fab'和 F(ab')₂、Fd、Fv，单链 Fv (scFv)、单链抗体、二硫键接的 FV (sdFv)，包含 V_L 或 V_H 结构域的片段，由 Fab 表达库产生的片段，以及抗个体基因型（抗-Id）抗体（包括例如对于本文所披露的结合分子的抗-Id 抗体）。ScFv 分子在本领域是已知的并描述于例如在美国专利 5,892,019 中。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何型（例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、和 IgY）、类（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）或亚类。

包括单链抗体的抗体片段可以单独包含可变区或结合有下列全体或其一部分：铰链区、C_H1、C_H2、和 C_H3 结构域。同样包括在

本发明中的是也包含可变区与铰链区、 C_{H1} 、 C_{H2} 、以及 C_{H3} 结构域的任何组合的抗原结合片段。用于本文披露的诊断和治疗方法中的抗体或其免疫特异性片段可以来自包括鸟类和哺乳动物类的任何动物源。优选地，该抗体是人、鼠、驴、兔、羊、豚鼠、骆驼、无峰驼、马、或鸡抗体。在另一具体实施方式中，可变区可以是在源（例如鲨鱼）中的 *condricthoid*。如本文所使用的，“人”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体并且包括分离自人免疫球蛋白文库或分离自对于一种或多种人免疫球蛋白并且不表达内源性免疫球蛋白的转基因动物，如下文以及例如 Kucherlapati 等的美国专利第 5,939,598 号所述。

如本文所使用的，术语“重链部分”包括来源于免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含下列中的至少一个： C_{H1} 结构域、铰链（例如上、中和/或下铰链区）结构域、 C_{H2} 结构域、 C_{H3} 结构域、或其变体或片段。例如，用于本发明的结合多肽可以包括包含 C_{H1} 结构域的多肽链；包含 C_{H1} 结构域、至少一部分铰链结构域和 C_{H2} 结构域的多肽链；包含 C_{H1} 结构域和 C_{H3} 结构域的多肽链；包含 C_{H1} 结构域、至少一部分铰链结构域和 C_{H3} 结构域的多肽链；或包含 C_{H1} 结构域、至少一部分铰链结构域、 C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域的多肽链。在另一具体实施方式中，本发明的多肽包括包含 C_{H3} 结构域的多肽链。此外，用于本发明的结合多肽可以缺少至少一部分的 C_{H2} 结构域（例如 C_{H2} 结构域的全部或部分）。如上所述，本领域技术人员应当理解，这些结构域（例如重链部分）可以被修饰以使它们在来自天然存在的免疫球蛋白分子的氨基酸序列中发生变化。

在某些用于本文披露的治疗方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其免疫特异性片段中，多聚体的一个多肽链的重链部分与在多聚体的另一多肽链上的重链部分相同。可替换地，用于本发明方法中的含有

单体的重链部分是不同的。例如，每个单体可以包括不同的靶结合位点，例如形成双特异性抗体。

用于本文披露的方法中的结合多肽的重链部分可以来源于不相同的免疫球蛋白分子。例如，多肽的重链部分可以包含来源于 IgG1 分子的 C_{H1} 结构域和来源于 IgG3 分子的铰链区。在另一实施例中，重链部分可包括部分来源于 IgG1 分子和部分来源于 IgG3 分子的铰链区。在另一实施例中，重链部分可包括部分来源于 IgG1 分子和部分来源于 IgG4 分子的嵌合铰链。

如本文所使用的，术语“轻链部分”包括来源于免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。优选地，轻链部分包含 V_L 或 C_L 结构域中的至少一个。

用于本文所披露的治疗方法中的抗体或其免疫特异性片段可用作本文所述的 TAJ 的拮抗剂。例如，用于本发明方法中抗体可以用作拮抗剂，阻断或抑制 TAJ 多肽的抑制活性。

编码来源于免疫球蛋白（例如免疫球蛋白重链部分或轻链部分）的多肽的非天然变异体的分离核酸分子可通过将一种或多种核苷酸取代、插入或缺失引入到免疫球蛋白的核苷酸序列中，以使在所编码的蛋白质中引入一种或多种氨基酸取代、插入或缺失。可以通过标准技术如定位诱变和 PCR 介导诱变来引入突变。优选地，在一个或多个非基本氨基酸残基处形成保守性氨基酸取代。

本文披露的抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段、变异体、或衍生物可以根据抗原的表位例如它们识别或特异性结合的靶多肽（TAJ）进行描述或说明。特异性地与抗体的抗原结合结构域相互作用的靶多肽的部分是“表位”或“抗原决定基”。靶多肽可以包含单一表位，但通常包含至少两个表位，并且取决于抗原的大小、构造、和

类型可包括任何数量的表位。此外，应当注意，在靶多肽上的“表位”可以是或包括非多肽因子，例如“表位”可以包括糖侧链。

认为用于抗体的肽或多肽表位的最小大小是约 4 或 5 个氨基酸。肽或多肽表位优选含有至少 7 个、更优选至少 9 个并且最优选在至少约 15 至约 30 个之间的氨基酸。由于 CDR 可识别抗原表位或呈其三级形式的多肽，所以包含表位的氨基酸不需要是邻接的，并且在一些情形中，甚至可以不在相同的肽链上。在本发明中，由本发明的抗-TAJ 抗体识别的肽或多肽表位含有 TAJ 的至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、更优选至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、或在约 15 至约 30 个之间的邻接或非邻接氨基酸，例如 SEQ ID NO:2。

用“特异性地结合”通常是指抗体通过其抗原结合结构域结合至表位，并且该结合在抗原结合结构域和表位之间必需是部分互补的。根据这个定义，当通过其抗原结合结构域臂结合至该表位比其随机结合至不相关表位更容易时，就说抗体“特异性地结合”至表位。在本文中使用的术语“特异性”来定性通过其特定抗体结合至特定表位的相对亲和力。例如，抗体“A”可以认为对于给定表位比抗体“B”具有更高特异性，或者抗体“A”可以说成是结合至表位“C”比其对于相关表位“D”具有更高特异性。

用“优先结合”是指抗体特异性结合至表位比其结合至相关、类似、同源、或类似表位更容易。因此，“优先结合”至给定表位的抗体会比结合至相关表位更可能地结合至该给定表位，即使这样的抗体与该相关表位交叉作用。

通过非限定性实施例，如果其结合所述第一表位具有的离解常数 (K_D) 小于该抗体对于第二表位的 K_D ，则可以认为抗体优先结合第一表位。在另一非限制性实施例中如果其结合第一表位具有的

亲和力比该抗体对于第二表位的 K_D 要低至少一个数量级，则可以认为抗体优先结合第一抗原。在另一非限制性实施例中，如果其结合第一表位具有的亲和力比该抗体对于第二表位的 K_D 要低至少两个数量级，则可以认为抗体优先结合第一表位。

在另一非限制性实施例中，如果其结合第一表位具有的解离速率 (off rate) ($k(\text{off})$) 低于抗体对于第二表位的 $k(\text{off})$ ，则可以认为抗体优先结合第一表位。在另一非限制性实施例中，如果其结合第一表位具有的亲和力低于该抗体对于第二表位的 $K(\text{off})$ 至少一个数量级，则可以认为抗体优先结合第一表位。在另一非限制性实施例中，如果其结合第一表位具有的亲和力比该抗体对于第二抗体的 $k(\text{off})$ 要低至少两个数量级，则可以认为抗体优先结合第一表位。

如果具有的解离速率 ($k(\text{off})$) 低于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-3}sec^{-1} ，则可以说本文所披露的抗体或其抗原结合片段、变异体、或衍生物结合了本文披露的靶多肽或其片段或变异体。更优选地，如果具有的解离速率 ($k(\text{off})$) 低于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-7}sec^{-1} ，则可以说本发明的抗体结合了本文披露的靶多肽或其片段或变异体。

如果具有的结合速率 (on rate) ($k(\text{on})$) 高于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ，则可以说本文所披露的抗体或其抗原结合片段、变异体、或衍生物结合了本文披露的靶多肽或其片段或变异体。更优选地，如果具有的结合速率 ($k(\text{on})$) 高于或等于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ，则可以说本发明的抗体结合了本文披露的靶多肽或其片段或变异体。

如果其优先结合至该表位达到在某种程度上阻断基准抗体（参考抗体，reference antibody）结合至该表位，则可以说抗体竞争性抑制基准抗体结合至给定表位。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法例如竞争 ELISA 测定来确定。可以说抗体竞争性抑制至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、或至少 50% 的基准抗体结合至给定表位。

如本文所使用的，术语“亲和力”指的是单个表位与免疫球蛋白分子的结合强度。参见例如 Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) at pages 27-28。如本文所使用的，术语“亲和强度 (avidity)”指的是在免疫球蛋白和抗原的种群之间的复合物的总体稳定性，即，免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见例如 Harlow at pages 29-34。亲和力强度与在该种群中的单个免疫球蛋白分子与特异性表位的亲和力有关，也与免疫球蛋白和抗原的化合价有关。例如，具有高度重复的表位结构如聚合物的二价单克隆抗体和抗原之间的相互作用就是一种较高的亲和强度。

本发明的抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物还可根据其交叉反应性进行描述或说明。如本文所使用的，术语“交叉反应性”指的是对于一个抗原是特异性的抗体与第二个抗原反应的能力、两种不同抗原物质之间的关联性的检测值。因此，如果抗体结合不同于诱导其形成的表位，则该抗体是交叉反应性的。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征，并且在一些情形下，实际上可以比原始的表位更适合。

例如，某些抗体具有一定程度的交叉反应性，因为它们结合相关但不相同的表位，例如与基准表位具有至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少

60%、至少 55%、至少 50% 的同一性（如利用本领域已知和本文所述的方法计算的）的表位。如果抗体不结合与基准表位具有低于 95%、低于 90%、低于 85%、低于 80%、低于 75%、低于 70%、低于 65%、低于 60%、低于 55%、低于 50% 的同一性（如利用本领域已知和本文所述的方法计算的）的表位，则可以说抗体具有很小或没有交叉反应性。如果抗体不结合该表位的任何其它类似物、直系同源物、或同系物，则可以认为抗体对于某种表位是“高度特异性的”。

用于本文所披露治疗方法中的抗体或其免疫特异性片段还可根据其结合至本发明多肽的亲和力进行描述或说明。优选的结合亲和力包括具有离解常数或 K_d 低于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 、或 $10^{-15}M$ 的那些亲和力。

本发明的抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以是“多特异性的”，例如双特异性、三特异性或更多的多肽特异性，意思是其识别并同时结合至两个或多个在一个或多个不同抗原（例如蛋白质）上存在的不同抗原。因此，抗-TAJ 抗体是否是“单特异性”或“多特异性”的例如“双特异性”的，指的是结合多肽与其反应的不同表位的数目。多特异性抗体可以是对本文所述的靶多肽的不同表位是特异性的，或者是对靶多肽以及异源表位如异源性多肽或固体支撑材料是特异性的。

如本文所使用的，术语“化合价”指的是存在于抗-TAJ 抗体、结合多肽或抗体中的可能结合结构域，例如抗原结合结构域的数量。每个结合结构域特异性地结合一个表位。当抗-TAJ 抗体或结合多肽包含多余一个结合结构域时，每个结合结构域可以特异性地结

合相同表位，对于具有两个结合结构域的抗体，称为“二价单特异性”，或对于不同表位来说，对于具有两个结合结构域的抗体，称为“二价双特异性的”。对于每个特异性，抗体也可以是双特异性和二价的（称为“双特异性四价抗体”）。在另一具体实施方式中，可制备四价微型抗体或结构域缺失的抗体。

双特异性二价抗体及其制备方法描述在例如美国专利第 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 以及美国专利公开第 2003/020734 和 200/0155537 中，其全部内容通过引用结合于此作为参考。通常参见，PCT 公开 WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); U.S. Pat. Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)。

如前所述，各种免疫球蛋白类的恒定区的亚单位和三维构型是熟知的。如本文所使用的，术语“V_H 结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域，而术语“C_{H1} 结构域”包括免疫球蛋白重链的第一（大多数为氨基末端）恒定区结构域。C_{H1} 结构域邻近 V_H 结构域并且是免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端。

如本文所使用的，术语“C_{H2} 结构域”包括例如利用传统编码方案（残基 244 至 360，Kabat 编码系统；和残基 231-340，EU 编码系统；参见 Kabat EA *et al.* *op. cit.*）从抗体的约残基 244 延伸至残基 360 的重链分子的部分。C_{H2} 结构域是唯一的，因为其不是闭合地与另一结构域进行配对。而且，两个 N-连接的支链化糖链插入在完整的天然 IgG 分子的两个 C_{H2} 结构域之间。也已有良好的文献记载，C_{H3} 结构域从 C_{H2} 结构域延伸至 IgG 分子的 C-末端，并且包括大约 108 个残基。

如本文所使用的，术语“铰链区”包括结合 C_{H1} 结构域和 C_{H2} 结构域的重链分子的部分。这种铰链区包含大约 25 个残基并且是柔性的，因此允许两个 N-末端抗原结合区可以独立地移动。铰链区可被细分成单独不同的结构域：上、中、和下铰链结构域 (Roux et al., *J. Immunol.* 161: 4083 (1998))。

如本文所使用的，术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可与另一个硫醇基形成二硫键或桥的硫醇基。在大多数天然存在的 IgG 分子中，C_{H1} 和 C_L 区通过二硫键连接并且两个重链通过在对应于利用 Kabat 编码系统 (位 226 或 229, EU 编码系统) 的 239 和 242 位置处的两个二硫键连接。

如本文所使用的，术语“嵌合抗体”意思是任何如下抗体，在该抗体中，免疫反应性区或位点获自或来源于第一物种，而恒定区 (其可以是完整的、部分的或根据本发明修饰的) 获自第二物种。在优选具体实施方式中，靶结合区或位点来自非人源 (例如小鼠或灵长类动物)，并且恒定区是人。

如本文所使用的，术语“经改造的抗体”指的是这样的抗体，在该抗体中，由一种或多种来自已知特异性的抗体的 CDR 至少部分取代，并且如有必要，通过部分构架区取代或序列变化来改变其重链或轻链或二者中的可变区。尽管 CDR 可以是来源于相同类或甚至亚类的抗体，如构架区来源于其的抗体，但是可以设想，CDR 来源于不同类的抗体，并且优选来源于来自不同物种的抗体。其中来自已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR 被嫁接到人重链或轻链构架区的经改造的抗体，在本文称为“人源化抗体”。可以不必用来自供体可变区的完全 CDR 替换全部 CDR 以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一个。而且，仅有必要转移这些必需用来保持靶结合位点活性的残基。在美国专利第 5,585,089、5,693,761、5,693,762、以及 6,180,370 号中给出了解释说明，这很

好地属于本领域技术人员的能力范围，或者通过实施常规实验或通过试错法试验而可获得功能性改造或人源化抗体。

如本文所使用的，术语“连接的”“融合的”或“融合”可相互使用。这些术语指的是两个或多个因子或组分通过任何方法包括化学结合或重组方法结合在一起。“符合读框的融合”指的是两个或更多个开放读框(ORF)的结合而以保持初始 ORF 的准确阅读框的方式形成连续更长的 ORF。因此，所得到的重组融合蛋白是含有两个或更多个对应于由初始 ORF 编码的多肽的区段(这些区段不是如通常天然结合的那样)的单个蛋白。尽管该读框在整个融合区段是这样连续形成的，但是这些区段可以是物理或空间地由例如符合读框的接头序列所分开。

“接头(连接物, linker)”序列是一系列的一个或多个分隔开在融合蛋白中的两个多肽编码区的氨基酸。通常的接头包含至少 5 个氨基酸。其它的接头包含至少 10 个或至少 15 个氨基酸。在某些具体实施方式中，对肽接头的氨基酸加以选择以使接头是亲水性的。接头(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO: 7) 是优选的接头，其广泛用于许多抗体，因其提供足够的柔性。其它接头包括 Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO: 8), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr (SEQ ID NO: 9), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln (SEQ ID NO: 10), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp (SEQ ID NO: 11), Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12), Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp (SEQ ID NO: 13), and Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp (SEQ ID NO: 14)。较短接头的实例包括以上接头的片段，并且较长接头的实例包括以上接头的组合、以上接头的片段的组合、以及以上接头与以上接头的片段的组合。

如本文所使用的，术语“正确折叠的多肽”包括这样的多肽（例如抗-TAJ 抗体），在其中，包含该多肽的所有功能性结构域是不同活性的。如本文所使用的，术语“不正确折叠的多肽”包括这样的多肽，在其中，多肽的功能性结构域中的至少一个不是活性的。在一个具体实施方式中，正确折叠的多肽包含通过至少一个二硫键连接的多肽链，而相反地，不正确折叠的多肽包含不是由至少一个二硫键连接的多肽链。

如本文所使用的，术语“经改造的”包括通过合成方法（例如通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学连接，或这些技术的部分组合）的核酸或多肽分子的操作。

如本文所使用的，术语“表达”指的是基因通过其产生生化产品例如 RNA 和多肽的方法。该方法包括在细胞内的基因的功能性存在的任何表现，包括但不限于基因剔除以及瞬间表达和稳定表达。其包括但不限于将基因转录到信使 RNA (mRNA)、转运 RNA (tRNA)、小发夹 RNA (shRNA)、小干扰 RNA (siRNA) 或任何其它 RNA 产物中，并将这样的 mRNA 翻译成多肽。如果最终希望的产物是生化产品，则表达包括该生化产品和任何前体的形成。

术语“RNA 干扰”或“RNAi”指的是通过 siRNA 来抑制或降低基因表达。其是序列特异性、抑制动物和植物中转录后基因、通过 siRNA 起动的过程，该 siRNA 在其双链区中与该抑制基因的序列是同源性的。该基因可以与微生物是内源性或外源性的，存在于整合到染色体或存在于未整合到基因组的转染载体中。该基因的表达完全或部分地被抑制。也可以认为 RNAi 抑制靶 RNA 的功能；靶 RNA 的功能可以是完全或部分的。

如本文所使用的，术语“治疗”指的是治疗性和预防性或防止措施，其目的是防止或减缓（减轻）不希望的生理变化或失调，如

多发性硬化的进展。有用或希望的临床结果包括但不限于不管是可检测或不可检测的病证的减轻、疾病程度的减小、疾病的稳定（即，没有恶化）状态、疾病进展的延缓或减慢、疾病状态的减轻或缓和、以及好转（不管是部分或全部）。“治疗”也可指当相比于如果没有接受治疗的希望存活时的存活延长。需要治疗的患者包括已患有该病症或失调以及易于患病症或失调或待防止病症或失调的患者。

用“受治疗者（受试者或患者，subject）”或“个体”或“动物”或“病人”或“哺乳动物”来指任何受治疗者，尤其是哺乳动物受治疗者，其需要预防、预后、或治疗。哺乳动物受治疗者包括但不限于人、家畜、农畜、动物园动物、体育动物、宠物如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛；灵长类动物如猿、猴、猩猩和黑猩猩；犬科动物如狗、狐狸；猫科动物如猫、狮和虎；马科动物如马、驴、和斑马；食品动物如奶牛、猪和绵羊；有蹄动物如鹿和长颈鹿；啮齿动物如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠等。在某些具体实施方式中，哺乳动物是人患者。

如本文所使用的，短语如“受益于给予本发明的 TAJ 多肽或多肽片段的受治疗者”和“需要治疗的动物”包括受益于给予用于例如检测（例如用于诊断程序）和/或用于治疗，即利用本发明的 TAJ 多肽或多肽片段来减轻或防止疾病如 MS 的本发明的 TAJ 多肽或多肽片段的受治疗者如哺乳动物受治疗者。如本文更详细描述，多肽或多肽片段可以以未结合形式或可以结合例如药物、前药或同位素使用。

如本文所使用的，“治疗有效量”指的是在剂量上和必要时间内有效用来获得希望治疗结果的量。治疗结果可以是例如病症减轻、延长存活、改进活动性等。治疗结果不必是“治愈性的”。

如本文所使用的，“预防有效量”指的是剂量在剂量上和必要时间期内有效用来获得希望预防结果的量。通常，由于预防剂量是在疾病前或疾病早期阶段在受治疗者中使用，所以预防有效量低于治疗有效量。

TAJ (TROY)

本发明基于以下发现：在 CNS 中，TAJ 信号传导活性的某些调节剂可以影响神经元存活和/或长出。

如本文所使用的，“TAJ 多肽”是包括全长 TAJ 氨基酸序列或其功能片段或结构域的多肽。TAJ 多肽也可以可选地包括异源性(非 TAJ)氨基酸序列。

天然存在的全长人 TAJ 多肽的长度为 423 个氨基酸、具有 46kDa 的计算摩尔质量。下面示出了该人 TAJ 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。这个人 TAJ 多肽是由 SEQ ID NO:1 的 cDNA 编码的。

```

1      MALKVLEQE KTFETLLVLL GYLSCKVTCE SGDCRQQEFR DRSGNCVPCN QCGPGMELSK
61     ECGFGYGEDA QCVACRLHRF KEDWGFQKCK PCLDCAVVNR FQKANCATS DAICGDCLPG
121    FYRKTKLVGF QDMECVPCGD PPPPYEPHCA SKVNLVKIAS TASSPRDTAL AAVICSALAT
181    VLLALLLLCV IYCKRQFMK KPSWSLRSQD IQYNETELSC FDRPOLHEYA HRACCQCRD
241    SVQTCGPVRL LPSMCCEEAC SPNPATLGCG VHSAASLQAR NAGPAGEMVP TFFGSLTQSI
301    CGEFSDAWPL MQNPMGGDNI SFCDYPELT GEDIHSLNPE LESSTSLDSN SSQDLVGGAV
361    PVQSHSENFY AATDLSRYNN TLVESASTQD ALTMRSQLDQ ESGAVIHPAT QTSLQVRQRL
421    GSL

```

参见例如 Eby, M.T., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:15336-15342 (2000)。

人 TAJ 的天然存在变异体是已知的例如由具有 GenBank 登录号 AB040434 (SEQ ID NO:3) 的 cDNA 编码的 GenBank 登录号 BAB03269

(SEQ ID NO:4)、由具有 GenBank 登录号 AF246999 (SEQ ID NO:5) 的 cDNA 编码的 GenBank 登录号 AAK28396 (SEQ ID NO:6)。

其它天然存在的人 TAJ 多肽包括可替换的剪接形式。天然存在的 TAJ 多肽包括相同基因的可替换剪接形式。一种可替换剪接形式类似于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 417。编码这个剪接变异体的信使 RNA 具有唯一的 5'UTR, 而相比于 SEQ ID NO:2, 不同之处在于 3'末端区, 其包括一部分编码序列。相比于 SEQ ID NO:2, 所得变异体具有不同的并且较短的 C-末端。参见例如由具有 GenBank 登录号 BC047321 (SEQ ID NO:15) 的 cDNA 编码的 GenBank 登录号 AAH47321 (SEQ ID NO:16)。

其它相关序列包括在其它物种例如小鼠 TRADE (GenBank 登录号: AAK28397 (SEQ ID NO:18), 由 GenBank 登录号:AF247000 (SEQ ID NO:17) 的 cDNA 编码) 中同系物。

SEQ ID NO:2 的人 TAJ 多肽包括信号肽序列、胞外结构域、跨膜结构域、以及胞质结构域。TAJ 多肽的信号肽序列横跨 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至约氨基酸 25, 胞外结构域横跨 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 173。跨膜结构域横跨 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 174 至 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 190, 并且胞质结构域横跨 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 191 至氨基酸 423。当然, 本领域的技术人员知道预测的结构域的末端是大约的。例如, 信号肽序列可以包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 20、1 至 21、1 至 22、1 至 23、1 至 24、1 至 25、1 至 26、1 至 27、1 至 28、1 至 29、1 至 30。因此, 人 TAJ 的胞外结构域的 N-末端将分别为在 SEQ ID NO:2 的氨基酸 21 至氨基酸 31 处。表 2 列出了 SEQ ID NO:2 的人 TAJ 多肽的近似结构域和其它区。对于其它 TAJ 多肽的类似结构域片段如本文所披露的那些片段可以由本领域技术人员很容易地推导出。

与 TNF 受体总科的其它成员一样, TAJ 的胞外结构域的特征在于存在富半胱氨酸结构域 (“CRD”)。CRD 是通常含有 6 个半胱氨酸残基的假重复子。尽管不受限于理论, 但是认为 CRD 参与形成对于配体结合很重要的 3 个结构域内的二硫键。CRD 还可含有少于 6 个半胱氨酸, 形成不完全的富半胱氨酸基序。在给定受体中的 CRD 的数量从 1 至 4 变化。参见 Banner et al., Cell, 1993, 73:431-445。

TNF 家族受体具有功能性结构域的结构, 使得一个受体胞外结构域由 TNF 受体结构域 (即, CRD) 构成 (作为参考, 参见 Bodmer et al., 2002, *TRENDS in Biochem. Sci.* 27:19-26)。在一个具体实施方式中, 可溶性 TAJ 多肽包含一个或多个 (例如 1 或 2 个) 但不是所有的全长 TAJ 多肽的 TNF 受体结构域。这样的截短可溶性 TAJ 多肽包含足以形成用于 NgR1 和/或 LINGO-1 的相互作用位点的其 TNF 受体结构域的亚组。

认为 SEQ ID NO:2 的 TAJ 多肽含有 3 个富半胱氨酸结构域。两个 CRD 结构域在该区中具有 6 个半胱氨酸, 而一个 CRD 仅具有 4 个半胱氨酸。因此, TAJ 多肽含有两个完整的 TNF 受体基序, 本文中的 CRD1 和 CRD2, 以及一个不完整基序 CRD3, 其中 C2 和 C6 不存在。

这些结构域的大约坐标适于表 2 中。

表 2

结构域或区	起始残基	终端残基
信号序列	1	25
N-末端 EC 区	26	32
CRD1	33	73
CRD2	74	115
CRD3	116	160
C-末端 EC 区	161	173
跨膜结构域	174	190
胞质结构域	191	423

本发明的 TAJ 多肽可以进一步包含下列多肽片段、基序、或结构域中的一个或多个:富丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸结构域(例如 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 137 至约氨基酸 168)、TAJ 相关死亡因子结构域(例如 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 218 至约氨基酸 423)、N-连接糖基化位点(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 105-108)、cAMP/cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 200 至 203 或 SEQ ID NO:2 的残基 238 至 241)、蛋白激酶 C 磷酸化位点(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 205 至 207)、干酪素激酶 II 磷酸化位点(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 219 至 222 和/或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 325 至 328)、酪氨酸激酶磷酸化位点(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 207 至 213)、N-十四烷基化位点(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 215-220)、TRAF 结合结构域(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-328, 或可替换地, SEQ ID NO:2 的氨基酸 218-328)、或 NFkB 激活信号传导结构域(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-368, 或可替换地, 在 TAJ 多肽的胞质结构域中的氨基酸), 参见 Wood 等的美国专利申请公开第 2002/0068696A1 号; 还参见 WO 01/058954A3, 通过引用将二者的全部内容结合于此作为参考。

如本文其它地方详细描述, “可溶性 TAJ 多肽”是这样的多肽, 其包括缺少跨膜结构域并且可选地缺少胞质结构域的全长 TAJ 多肽的片段。典型的可溶性 TAJ 多肽包括至少一部分的 TAJ 多肽的胞外结构域。(人 TAJ 多肽的胞外结构域包括 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 173, 参见表 2)。术语“约”用来表示本文所述的多肽结构域或片段可以在大小上变化一个或多个氨基酸, 取决于例如多肽的准确序列或用来确定特定结构域或片段的标准, 例如可以是 1、2、3、4、5、6 个或更多个氨基酸。这样的变体对于本发明技术领域的技术人员来说已经很好地理解。因此, 在某些具体实施方式中, 可溶性的人 TAJ 多肽包括例如具有在 SEQ ID NO:2 的氨基酸 20 和 32 之间的 N-末端延伸至 SEQ ID NO:2 的氨基酸

160 和 200 之间的 C-末端的多肽。在一个具体实施方式中，可溶性的人 TAJ 多肽包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸 26-173。“可溶性 TAJ 多肽”还包括融合蛋白，其中 TAJ 的可溶性片段融合至异源氨基酸序列如肽标记物、AP、或免疫球蛋白例如 IgG 的 Fc 区。

人 TAJ 多肽不限于 SEQ ID NO:2。人 TAJ 多肽可包括至少 90 %、或至少 95 %、96 %、98 %、或 99 % 和 SEQ ID NO:2 或其胞外结构域相同的序列。还包括的是包含 SEQ ID NO:2 的 TAJ 多肽或其胞外结构域具有多达 15 个氨基酸缺失、取代、或插入的 TAJ 多肽。这样的多肽可易于对 TAJ 生物活性例如对影响神经突长出或神经元存活的能力进行分析。

对于技术人员来说也是明显的，SEQ ID NO:2 的功能性变体（即具有相同功能）可通过例如形成残基或序列的取代（例如形成保守性取代）或缺失末端或内部残基、或对生物活性是不需要的序列加以构建。大量关于什么残基对于活性是关键或非关键的指导在人 TAJ 的残基相比于鼠 TAJ 和其它 TNFR 家族成员是高度保守的知识中提供了（参见例如 Eby *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275:15336-15342）。技术人员无需过度实验在不影响生物功能的情况下可在 SEQ ID NO:2 中形成保守性取代。在另一实施例中，技术人员无需过度实验可在对于破坏 TAJ 功能例如对于产生显性负性 TAJ 多肽是关键的残基中形成非保守性区段，例如跨膜结构域可通过通常疏水性氨基酸残基（其包含具有亲水性氨基酸残基的功能性跨膜结构域）的取代而失活。在另一实施例中，半胱氨酸残基可缺失或用其它氨基酸替代以阻止通过复性的非必要分子内二硫键形成。其它方法可以涉及氨基酸修饰以例如增强所选表达系统中的表达。

利用拮抗剂 TAJ 的治疗方法

本发明的一个具体实施方式提供了治疗与缺少神经突长出或神经元细胞死亡有关的疾病、失调或损伤，如患有这样的疾病的动物中的多发性硬化的方法，该方法包括、基本上由或由给予该动物有效量的 TAJ 拮抗剂组成，其中 TAJ 拮抗剂选自由可溶性 TAJ 多肽、抗-TAJ 抗体和 TAJ 拮抗剂多肽组成的组。这样 TAJ 拮抗剂进一步包括任何以上拮抗剂分子的功能性片段、变异体或衍生物。

另外，本发明涉及用于促进哺乳动物神经突长出的方法，其包括、基本上由或由给予治疗有效量的 TAJ 拮抗剂组成，其中 TAJ 拮抗剂选自由可溶性 TAJ 多肽、抗-TAJ 抗体和 TAJ 拮抗剂多肽组成的组。这样的 TAJ 拮抗剂进一步包括任何上述拮抗剂分子的功能性片段、变异体、或衍生物。

也包含在本发明中的是促进神经突长出的方法，其包括、基本上由或由将神经元与上述有效量的 TAJ 拮抗剂进行接触组成。另外，本发明提供了促进神经元存活的方法，包括、基本上由或由将神经元与上述有效量的 TAJ 拮抗剂进行接触组成。

待用于本文披露的治疗方法中的 TAJ 拮抗剂，例如可溶性 TAJ 多肽、抗-TAJ 抗体和 TAJ 拮抗剂多肽或这样的分子的片段、变异体或衍生物可加以制备并用作中止、减少、防止、或抑制 TAJ 负调节神经元生长或再生能力的治疗剂。

在本发明的方法中，TAJ 拮抗剂可通过直接将可溶性 TAJ 多肽、抗-TAJ 抗体和 TAJ 拮抗剂多肽给予至患者。可替换地，TAJ 拮抗剂可通过在体内或体外表达特异性 TAJ 拮抗剂的表达载体进行给予。

可通过本发明方法治疗或减轻的疾病或失调包括与神经元再生死亡或缺少有关的疾病、失调或损伤。这样的疾病包括但不限于多发性硬化(MS)、进行性多发性脑白质病(PML)、脑脊髓炎(EPL)、

桥脑中央髓鞘溶解症(CPM)、以及脑白质肾上腺萎缩症、亚历山大病、Pelizaeus Merzbacher 病 (PMZ)、球状细胞脑白质营养不良病(克腊比氏病)以及 Wallerian 变性。

可通过本发明方法治疗或减轻的疾病或失调包括神经变性疾病或失调。这样疾病包括但不限于肌萎缩侧索硬化、亨廷顿氏病、阿耳茨海默氏病、糖尿病神经病变、帕金森氏病。

可通过本发明方法治疗或减轻的其它疾病、失调或损伤的实例包括但不限于脊髓损伤、慢性骨髓病或颈椎病、创伤性脑损伤、运动神经元病、轴突损伤、挫伤、瘫痪、放射后损伤或化疗的其它神经系统并发症、中风、大陷窝、大脉管堵塞的介质、白细胞组织增生(leukoariaosis)、急性缺血性视神经病变、维生素 E 缺乏(单独的缺乏综合症、AR、Bassen-Kornzweig 综合症)、B12、B6(维生素 B6 糙皮病)、维生素 B1、叶酸、烟酸缺乏、Marchiafava-Bignami 综合症、异染性脑白质病变、三叉神经痛、颜面神经麻痹、或需要神经元再生、再髓鞘化或少突胶质细胞存活或分化/增生的任何神经系统损伤。

TAJ 拮抗剂

TAJ 拮抗剂是阻断或抑制 TAJ 信号传导路径从而抑制 TAJ 负调节神经元生长的能力的试剂。因此, TAJ 拮抗剂增加、诱导、或促进神经元存活和/或神经突长出。用于本文所披露方法中的 TAJ 拮抗剂包括但不限于可溶性 TAJ 多肽或其片段、变形体、或衍生物; 抗-TAJ 抗体或其抗原结合片段、变形体、或衍生物; 以及 TAJ 拮抗剂多肽例如反义或 RNAi 多核苷酸。TAJ 拮抗剂进一步包括编码任何以上列出的 TAJ 拮抗剂的多核苷酸。TAJ 拮抗剂可单独给予或结合本文列出的另一 TAJ 拮抗剂给予, 或结合调节 MAIF 诱导的神经突长出的任何其它治疗剂, 例如 LINGO-1 拮抗剂和/或 Nogo 受体

拮抗剂给予。LINGO-1 拮抗剂和 Nogo 受体拮抗剂描述于例如 PCT 公开号 WO 2004/085648、WO 2005/016955、WO 03/031462、WO 2004/014311 以及 WO 01/51520 中，以引用方式将其全部内容结合于此作为参考。

可溶性 TAJ 多肽

用作拮抗剂的可溶性多肽或其片段、变异体或衍生物可阻断、抑制或干扰天然存在的 TAJ 多肽的生物功能。

可溶性 TAJ 多肽或其片段、变异体或衍生物缺少 TAJ 多肽的跨膜结构域并且可选地缺少胞质结构域。某些可溶性 TAJ 多肽包含一种或多种 TAJ CRD，例如 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 73、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 116 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 116 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 73、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 160、和/或胞外结构域（对应于 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 173）的片段。如上所述，TAJ 多肽的 CRD 或整个胞外结构域在片段的 C-末端或 N-末端上可以包括其它或较少的几个氨基酸，如利用术语“约”所注释的。此外，如本文所述的可溶性 TAJ 多肽可以具有各种改变如取代、插入或缺失。

可溶性 TAJ 多肽可包含至少 6 个例如 10、15、20、25、30、40、50、60、70、100 个或更多个 SEQ ID NO:2 的氨基酸的片段。另外，可溶性 TAJ 多肽可以包括至少 1 个例如 5、10、15 或 20 个

保守性氨基酸取代。还涵盖了至少 70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 和本文所述的 SEQ ID NO:2 的基准 TAJ 多肽相同的可溶性 TAJ 多肽的相应片段。

如本领域所已知的，两个多肽之间的“序列同一性”是通过将一个多肽的氨基酸序列与另一个多肽的序列进行比对来确定的。当在本文进行论述时，任何特定多肽是否是至少约 70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 和另一多肽相同，可利用本领域已知的方法和计算机程序/软件诸如但不限于 BESTFIT 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) 来确定。BESTFIT 利用 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 (Advances in Applied Mathematics 2:482-489(1981)) 来寻找两个序列之间同源性最好的区段。当利用 BESTFIT 或任何其它序列校准程序来确定特定序列是否是例如 95% 和根据本发明的基准序列相同时，当然可设置参数以使同一性的百分数基于全长的基准多肽序列进行计算，并且高达基准序列中的氨基酸总数的 5% 的同源性差异是允许的。

用于本发明方法中的可溶性 TAJ 多肽可以包括两个或多个可溶性 TAJ 多肽的任何组合。因此，涵盖可溶性 TAJ 多肽二聚体，其可以是同型二聚体或异质二聚体。如本文所述的两种或多种可溶性 TAJ 多肽可以直接进行连接，或者可以通过合适肽接头进行连接。这样的肽接头在本文其它地方进行描述。

因此，本文所述的利用 TAJ 多肽，尤其是人 TAJ 的方法不限于利用 SEQ ID NO:2。还包括的是包括至少 90%，优选至少 95%、96%、98% 或 99% 和 SEQ ID NO:2 或其胞外结构域相同的序列的 TAJ 多肽。还包括的是包含具有多达 15 个氨基酸缺失、取代、或插

入的 SEQ ID NO:2 或其胞外结构域的 TAJ 多肽。这样的多肽可易于分析其生物活性，例如影响神经突长出的能力。

用于本文所述的本发明方法中的可溶性 TAJ 多肽可以是环状的。可溶性 TAJ 多肽的环化减少线性肽的构造自由度并导致产生更大结构上受限制的分子。许多肽环化的方法在本领域是已知的。例如，通过在肽的 N-末端和 C-末端氨基酸残基之间形成酰胺键的“主链-主链”环化。“主链-主链”环化方法包括在两个 ω -硫代氨基酸残基（例如半胱氨酸、高半胱氨酸）之间形成二硫桥。本发明的某些可溶性 TAJ 肽包括在该肽的 N-和 C-末端上的修饰以形成环状 TAJ 多肽。这样的修饰包括但不限于半胱氨酸残基、乙酰化半胱氨酸残基、具有 NH_2 部分和生物素的半胱氨酸残基。肽环化的其它方法描述在 Li & Roller. *Curr. Top. Med. Chem.* 3:325-341 (2002) 中，其全部内容结合于此作为参考。

融合蛋白和结合物（缀合物，conjugate）

本发明的一些具体实施方式涉及 TAJ 多肽的应用，其中 TAJ 多肽部分融合至在 N-和 C-末端处的异源性多肽部分而形成融合蛋白。这样的融合蛋白可用来实现各种目的，例如增加的血清半衰期、改进的生物可利用性、体内靶向特定器官或组织类型、有效提高的重组表达、改进的宿主细胞分泌、易于纯化、以及更高的亲和力强度。取决于待实现的目的，异源性部分可以是惰性或生物活性的。同样，对其可以加以选择以在体外或体内稳定地融合至 TAJ 部分或者是可切割的。用来实现不同目的的异源性部分在本领域是已知的。

Fc 融合蛋白

在一个具体实施方式中，可溶性 TAJ 多肽融合至铰链和 Fc 区，即 Ig 中链恒定区的 C-末端部。TAJ-Fc 融合的可能优点包括溶解性、体内稳定性、以及多化合价，例如二聚化。使用的 Fc 区可以是 IgA、IgD、或 IgG Fc 区（铰链- C_H2- C_H3）。可替换地，其可以是 IgE 或 IgM Fc 区（铰链- C_H2- C_H3- C_H4）。通常使用 IgG Fc 区，例如 IgG1 Fc 区或 IgG4 Fc 区。在一个具体实施方式中，融合中使用的是在化学地限定 IgG Fc（即，残基 216，其中将重链恒定区的第一个残基定为根据 Kabat 系统的 114）的木瓜蛋白酶切割位点的上游、或其它免疫球蛋白的类似位点的铰链区中开始的序列。形成融合的精确定位点不是关键；具体位点是熟知的并且可以加以选择以优化分子的生物活性、分泌、或结合特性。用于构建和表达编码 Fc 融合 DNA 的材料和方法在本领域是已知的，并且可用来在无需多度实验的情况下获得可溶性 TAJ 融合。本发明的一些具体实施方式采用 TAJ 融合蛋白如在 Capon 等的美国专利第 5,428,130 和 5,565,335 号中描述的那些 TAJ 融合蛋白。

融合蛋白的 TAJ 部分优选包括至少一部分的 TAJ 的胞外区，并且优选缺少跨膜结构域以使 TAJ 部分可溶。可溶性融合蛋白的 TAJ 部分的 N-末端通常是 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 20 至 50 之间的残基，而 C-末端通常是 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 130 至 185 之间的残基。因此，可溶性 Fc 融合蛋白的 TAJ 部分的实例包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸 20 至氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的氨基酸 26 至 180、以及 SEQ ID NO:2 的氨基酸 40 至 185。

信号序列是编码启动蛋白转移通过内质网的膜的氨基酸序列的多核苷酸。用于构建融合蛋白的信号序列包括抗体轻链信号序列例如抗体 14.18 (Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Meth.*, 125:191-202)，抗体重链信号序列例如 MOPC141 抗体重链信号序列 (Sakano *et al.*, 1980, *Nature* 286:5774)。可替换地，可使用其它信号序列。

参见例如 (Watson, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:5145)。信号序列通常通过信号肽酶在内质网的腔中进行切割。这导致产生含有 Fc 区和 TAJ 部分的融合蛋白的分泌。

在一些具体实施方式中, DNA 序列编码在分泌盒子和 TAJ 部分之间的蛋白水解切割位点。切割位点提供编码的融合蛋白的蛋白水解切割, 从而将 Fc 结构域与靶蛋白分开。有用的蛋白水解切割位点包括由蛋白水解酶如胰蛋白酶、血纤维蛋白溶酶、凝血酶、因子 Xa、或肠激酶 K 识别的氨基酸序列。

分泌盒子可组合到可复制表达载体中。有用的载体包括线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒等。示例性表达载体是 pdC, 其中将免疫融合 DNA 的转录置于人细胞巨化病毒的增强子和启动子的控制之下。参见例如 Lo *et al.*, 1991, *Biochim. Biophys. Acta* 1088:712; and Lo *et al.*, 1998, *Protein Engineering* 11:495-500。适当的宿主细胞可以用编码 TAJ 多肽的 DNA 来转化或转染, 并用于 TAJ 多肽的表达和分泌。优选的宿主细胞包括无限生长分化的杂交瘤细胞、骨髓瘤细胞、293 细胞、中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、海拉细胞 (Hela cell)、以及 COS 细胞。

某些位点优选在分泌盒子构建期间从 Fc 区缺失。例如, 由于用轻链的共表达是不必要的, 用于重链结合蛋白的结合位点 Bip (Hendershot *et al.*, 1987, *Immunol. Today* 8:111-114) 可从 IgE 的 Fc 区的 CH2 结构域缺失, 以使这个位点不会干扰免疫融合的有效分泌。跨膜结构域序列如存在于 IgM 中的那些可缺失。

优选 IgG1 Fc 区。可替换地, 免疫球蛋白 γ 的其它亚类 (γ -2、 γ -3 和 γ -4) 的 Fc 区可用于分泌盒子。优选用于分泌盒子的免疫球蛋白 γ -1 的 IgG1 Fc 区包括铰链区 (至少部分)、C_H2 区、以及所有或部分的 C_H3 区。在一些具体实施方式中, 免疫球蛋白 γ -1 的 Fc

区是 C_{H2} 缺失的 Fc，其包括部分铰链区和 C_{H3} 区，但不包括 C_{H2} 区。 C_{H2} 缺失的 Fc 已经由 Gillies *et al.*, 1990, *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1:47 所描述。在一些具体实施方式中，使用 IgA、IgD、IgE、或 IgM 的 Fc 区。

TAJ 融合蛋白可被构建为若干不同构型。在一种构型中，TAJ 部分的 C-末端直接融合至 Fc 部分的 N-末端。在稍微不同的构型中，较短的肽例如 2-10 个氨基酸组合到在 TAJ 部分的 N-末端和 Fc 部分的 C-末端之间的融合体中。这样的接头可提供构造柔性，这可以提高在一些环境中的生物活性。如果铰链区的足够部分保留在 Fc 部分中，则 TAJ-Fc 融合将二聚化，从而形成二价分子。同源种群的单体 Fc 融合将生成单特异性的二价二聚体。两个各自具有不同特异性的单体 Fc 融合将生成双特异性的二价二聚体。

其它融合蛋白

TAJ 多肽也可融合至异源肽，以有利于 TAJ 部分的纯化或鉴定。例如，组氨酸标记物可融合至 TAJ 多肽，以有利于利用可商购获得的层析介质进行纯化。

在本发明的一些具体实施方式中，TAJ 融合构建体用来增强细菌中 TAJ 部分的生成。在这样的构建体中，通常以高水平表达和/或分泌的细菌蛋白用作 TAJ 多肽的 N-末端融合分子伴侣。参见例如 Smith *et al.*, 1988 *Gene* 67:31; Hopp *et al.*, 1988 *Biotechnology* 6:1204; La Vallie *et al.*, 1993, *Biotechnology* 11:187。

通过融合在合适融合分子伴侣的氨基和羧基末端处的 TAJ 部分，可获得 TAJ 多肽的二价或四价形式。例如，TAJ 部分可融合至 Ig 部分的氨基和羧基末端，以生成含有两个 TAJ 部分的二价单体多肽。通过这些单体中的两个的二聚化，借助于 Ig 部分，获得 TAJ

蛋白的四价形式。这样的多价形式可用来实现对于靶增加的结合亲和力和力。TAJ的多价形式也可通过一前一后放置TAJ部分以形成多联体来获得，这可单独采用或融合至融合分子伴侣，如Ig或HSA。

结合聚合物

包含相应氨基反应性基团和硫醇反应性基团的大量交联物中的任何一个可用来将TAJ连接至第二蛋白如血清白蛋白。合适接头的实例包括插入硫醇反应性马来酰亚胺的胺反应性交联物，例如SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、以及GMBS。其它的合适接头插入硫醇反应性卤代乙酸酯基团中，例如SBAP、SIA、SIAB。提供用于与巯基基团反应而产生可还原键接的保护或非保护硫醇的接头包括SPDP、SMPT、SATA、以及SATP。这样的试剂可商购获得（例如Pierce Chemicals）。

结合不必须涉及TAJ多肽的N-末端或在血清白蛋白上的硫醇部分。例如，TAJ白蛋白融合可利用遗传工程技术来获得，其中TAJ部分融合至血清白蛋白基因的N-末端、C-末端处或这两处。

作为TAJ融合蛋白表达的替换，可选择异源部分并化学地结合至TAJ部分。在大多数情况下，所选异源部分将类似地起作用，而不管是否融合或结合至TAJ部分。因此，在异源氨基酸序列的以下讨论中，除非另有注释，则应当理解，异源序列可以以融合蛋白的形式或作为化学缀合物结合至TAJ部分。

药理学活性多肽如TAJ经常表现出快速体内清除，所以需要较大剂量以在体内达到治疗有效浓度。另外，小于约60kDa的多肽可能经过肾小球滤过，这有时导致中毒性肾损害。可采用相对较小的多肽如TAJ片段的融合或结合体以减少或避免这样的中毒性肾损害

的危险。用于增大治疗用多肽的体内稳定性即血清半衰期的各种异源性氨基酸序列，即多肽部分或“载体”是已知的。

由于其较长半衰期、较宽的体内分布、以及缺少酶促或免疫功能，所以基本上全长的人血清白蛋白（HAS）或 HAS 片段是优选异源性部分。尽管诸如在 Yeh *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1904-1908 and Sved *et al.*, 1997, *Blood* 89:3243-3252 中教导的那些方法和材料的应用，但 HAS 可用来形成 TAJ 融合蛋白或通过 TAJ 部分显示药理活性，同时显示显著增加的例如 10 倍至 100 倍的更高体内稳定性的结合物。优选地，HAS 的 C-末端融合至 TAJ 部分的 N-末端。当融合蛋白在真核细胞例如哺乳动物的表达系统中形成时，由于 HAS 是天然分泌的蛋白质，所以可以使用 HAS 信号序列以获得分泌到细胞培养基中的 TAJ 融合蛋白。

本发明的一些具体实施方式涉及 TAJ 多肽，其中一个或多个聚合物结合（共价连接）至该 TAJ 多肽。适用于这样的结合的聚合物的实例包括（上述的）多肽、糖聚合物和聚亚烷基二醇链。通常但不必要，聚合物结合至用于改进以下性质中的一个或多个的 TAJ 多肽：溶解性、稳定性、或生物可利用性。例如，TAJ 拮抗剂多肽或抗体可以重组地融合或结合至在检测测定中用作标记物的分子或效应物分子，如异源性多肽、药物、放射性核素或毒素。参见例如 PCT 公开 WO 92/08495；WO 91/14438；WO 89/12624；美国专利第 5,314,995 号；以及 EP 396,387。

优选用于结合至 TAJ 多肽的一类聚合物是聚亚烷基二醇。聚乙二醇（PEG）是尤其优选的。PEG 部分例如 1、2、3、4 或 5 个 PEG 聚合物可结合至每一个 TAJ 多肽，以相比于单独的 TAJ 多肽而增大血清半衰期。PEG 部分是非抗原性的并且基本上是生物惰性的。用于本发明实施中的 PEG 部分可以是支链化或未支链化的。

连接至 TAJ 多肽的 PEG 部分的数量和单个 PEG 链的分子量可以变化。通常，聚合物的分子量越高，连接至多肽的聚合物链越少。PEG 部分可通过在多肽上的任何合适暴露反应性基团连接至 TAJ 多肽。该暴露反应性接头可以是例如内部赖氨酸残基的 N-末端氨基基团或 ϵ -氨基基团或这二者。活化的聚合物可在 TAJ 多肽上的任何游离（自由）氨基基团处反应并共价连接。TAJ（如果可利用）的游离羧基、适当活化的羧基、羟基、胍基、咪唑、氧化糖部分以及巯基也可用于聚合物连接的反应性基团。

优选地，在结合反应中，根据多肽浓度，每摩尔的多肽采用约 1.0 至约 10 摩尔的活化聚合物。通常，所选比率表示最大化反应同时最小化可能损害 TAJ 部分的希望药理活性的副反应（常为非特异性的）之间的平衡。优选地，至少保留 TAJ 多肽 50% 的生物活性（如证实的，例如在任何本文所述或本领域已知的测定中证实的），并且最优选保留接近 100% 的生物活性。

聚合物可利用传统化学结合至 TAJ 多肽。例如，聚亚烷基二醇部分可连接至 TAJ 多肽的赖氨酸 ϵ -氨基基团。连接赖氨酸侧链的键接可利用 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）活性酯，如 PEG 琥珀酰亚胺琥珀酸酯（SS-PEG）和琥珀酰亚胺丙酸酯（SPA-PEG）来完成。合适的聚亚烷基二醇部分包括例如羧甲基-NHS、正亮氨酸-NHS、SC-PEG、三氟乙基磺酸酯（tresylate）、醛、环氧树脂、羰基咪唑、以及 PNP 碳酸酯。这些试剂可商购获得。其它胺反应性 PEG 连接物可代替琥珀酰亚胺基部分。这包括异硫氰酸酯、硝基苯基碳酸酯、环氧树脂、苯并三唑碳酸酯。优选对条件进行选择以最大化反应的选择性和反应程度。这样的反应条件优化属于本领域技术人员的能力范围。

PEG 化可通过本领域已知的任何 PEG 化反应来实现。参见例如 Focus on Growth Factors, 3: 4-10, 1992; 公开的欧洲专利申请 EP0 154 316 和 EP 0 401 384。PEG 化可以利用与反应性聚乙二醇分子(或类似反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来实现。

通过酰化的 PEG 化通常涉及反应聚乙二醇的活性酯衍生物。任何反应性 PEG 分子在 PEG 化中可采用。优选的活化 PEG 酯是 PEG 酯化反应至 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。如本文所使用的,“酰化”包括但不限于以下类型的在治疗用蛋白质和水溶性聚合物如 PEG 之间的键接: 酰胺、氨基甲酸酯、聚氨酯等。参见 Bioconjugate Chem. 5: 133-140, 1994。应对反应参数进行选择以避免损害或使 TAJ 多肽失活的温度、溶剂、以及 pH 条件。

优选地,连接性键接是酰胺。优选地,至少 95% 的所得产物是单、二或三 PEG 化的。然而,一些具有更高程度 PEG 化的产物可能形成,其量取决于所使用的特定反应条件。可选地,通过传统纯化方法包括例如透析、盐析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤层析、以及电泳将纯化的 PEG 化产物从混合物分离出来,尤其是从未反应物中分离出来。

通过烷基化的 PEG 化通常包括存在诱导剂下,将 PEG 的端醛衍生物与 TAJ 反应。另外,可操控反应条件以有利于基本上只在 TAJ 的 N-末端氨基基团的 PEG 化(即单-PEG 化的蛋白质)。在单 PEG 化或多 PEG 化的情况下,PEG 基团优选通过 $-C_{H2}-NH-$ 基团连接至该蛋白质。尤其优选 $-C_{H2}-$ 基团,这种类型的键接称为“烷基”键接。

通过还原性烷基化以产生单 PEG 化的产物的衍生化利用不同类型的伯氨基基团(赖氨酸相对的 N-末端)的差异反应性。该反应在允许利用赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团和蛋白质的 N-末端氨基基团

之间的 pKa 差异的 pH 下完成。通过这样的选择性衍生化，可对含有诸如醛的反应性基团的水溶性聚合物连接至蛋白质进行控制：与聚合物的结合主要发生在蛋白质的 N-末端处并且没有发生其它反应性基团如赖氨酸侧链氨基基团的显著修饰。

用于酰化和烷基化方法中的聚合物分子选自水溶性聚合物。所选聚合物应加以修饰以具有单个反应性基团，如用于酰化的活性酯或用于烷基化的醛，优选地，可以将聚合的程度进行控制以提供用于本方法。示例性反应性 PEG 醛是聚乙二醇丙醛，其是水稳定的，或其单 C1-C10 烷氧基或芳氧基衍生物（参见美国专利 5,252,714）。聚合物可以是支链化或未支链化的。对于酰基化反应，所选聚合物应具有单个反应性酯基团。对于还原性烷基化，所选聚合物应具有单个反应性醛基基团。通常，水溶性聚合物不选自天然存在的糖基残基，这是因为这些残基通常通过哺乳动物重组表达系统更方便地形成。

用于制备 PEG 化 TAJ 的方法通常包括步骤（a）在分子可连接至一个或多个 PEG 基团的条件下，将 TAJ 蛋白质或多肽与聚乙二醇（如 PEG 的反应性酯或醛衍生物）进行反应，以及（b）获得反应产物。通常，用于酰基化反应的最佳条件要基于已知参数和希望结果的一次次实验来确定。例如，PEG:蛋白质的比率越大，聚 PEG 化的产品的百分数越大。

用来生成基本上同源性种群的单聚合物/TAJ 的还原性烷基化通常包括步骤：（a）在还原性烷基化条件下，在适于允许选择性修饰 TAJ 的 N-末端氨基基团的 pH 下，将 TAJ 蛋白质或多肽与反应性 PEG 分子进行反应；以及（b）获得反应产物。

对于基本上是同源性种类的单聚合物/TAJ，还原性烷基化反应条件是允许水溶性聚合物部分选择性地连接至 TAJ 的 N-末端的条

件。这样的反应条件通常提供在赖氨酸侧链氨基基团和 N-末端氨基基团之间的 pKa 差异。对于本发明的目的来说,优选的 pH 是在 3-9, 优选在 3-6 的范围内。

TAJ 多肽可包括标记物,例如可随后由蛋白水解释放的部分。因此,赖氨酸部分可选择性地通过首先反应用低分子量接头如 Traut 试剂(将与赖氨酸和 N-末端二者发生反应)(Pierce)修饰的 His-标记物加以修饰,然后释放这个标记物。然后多肽将含有游离 SH 基团,其可选择性地用含有硫醇反应性头部基团,如马来酰亚胺基团、乙烯基砜基团、卤代乙酸酯基团、或游离或经保护的 SH 的 PEG 加以修饰。

Traut 试剂可用构建用于 PEG 连接的特异性位点的任何接头所代替。例如, Traut 试剂可用 SPDP、SMPT、SATA、或 SATP(Pierce)所代替。类似地,可将蛋白质与插入了马来酰亚胺(例如 SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、或 GMBB)、卤代乙酸酯基团(SBAP、SIA、SIAB)、或乙烯基砜基团的胺反应性接头反应,并将所得产物与含有游离 SH 的 PEG 进行反应。

在一些具体实施方式中,聚亚烷基二醇部分连接至 TAJ 多肽的赖氨酸基团。连接可利用例如马来酰亚胺基团、乙烯基砜基团、卤代乙酸酯基团、或硫醇基团来实现。

可选地,TAJ 多肽通过不稳定键结合至聚乙二醇部分。该不稳定键可在例如生物化学水解、蛋白水解、或巯基分解中被解开。例如,该键可在体内(生理)条件下被解开。

该反应可通过任何合适的用于生物活性物质与惰性聚合物起反应的方法来进行,如果反应性基团是在 N-末端处的 α -氨基基团上,则优选在约 pH5-8,例如 pH5、6、7 或 8 下进行反应。通常该

过程包含形成活化聚合物，然后将蛋白质与活化的聚合物反应以生成适用于制剂的可溶性蛋白。

抗体及其免疫特异性片段

用于本发明方法中的拮抗剂也包括 TAJ 特异性抗体或是 TAJ 活性的拮抗剂的抗原结合片段、变异体、或衍生物。例如，某些 TAJ 抗体结合至 TAJ，当在成熟神经系统上表达时，会阻断神经元生长的抑制，从而促进神经元存活、神经突长出、和/或轴突再生。

用于本文所述方法中的某些拮抗剂抗体特异性或优先结合至特定 TAJ 多肽片段或结构域。这样的 TAJ 多肽片段包括但不限于包含、基本上由或由以下氨基酸片段组成的 TAJ 多肽：SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 73、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 116 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 116 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 73、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 160、和/或整个胞外结构域（对应于 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 173）的氨基酸片段，或至少 70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 和 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 73、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 33 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 74 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 116 至约氨基酸 160、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 116 至约氨基酸 173、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基

酸 73、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 115、SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 160、和/或整个胞外结构域(对应于 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 26 至约氨基酸 173) 的氨基酸片段相同的 TAJ 变异体多肽。

在其它具体实施方式中, 本发明包括特异性或优先结合至 TAJ 的至少一个表位的抗体或其抗原结合片段、变异体、或衍生物, 其中所述表位包括、基本上由或由 SEQ ID NO:2 的至少约 4 至 5 个氨基酸、至少 7 个、至少 9 个氨基酸、或在 SEQ ID NO:2 的至少约 15 至约 30 个之间的氨基酸组成。所述 SEQ ID NO:2 的给定表位的氨基酸可以是但不必需是邻接或线性的。在某些具体实施方式中, 当在细胞表面上表达或作为可溶性片段例如融合至 IgG Fc 区时, TAJ 的至少一个表位包括、基本上由或由通过 TAJ 的胞外结构域形成的非线性表位组成。因此, 在某些具体实施方式中, TAJ 的至少一个表位包括、基本上由或由 SEQ ID NO:2 的至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个氨基酸、或在 SEQ ID NO:2 的至少约 15 至约 30 个之间, 或至少 10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 个邻接或非邻接氨基酸组成, 其中非邻接氨基酸通过蛋白质折叠形成表位。

在其它具体实施方式中, 本发明包括特异性或优先结合 TAJ 的至少一个表位的抗体或其抗原结合片段、变异体、或衍生物, 其中所述表位除了包括、基本上由或由上述的 SEQ ID NO:2 的 1、2、3、4、5、6 个或更多个邻接氨基酸或非邻接氨基酸组成外, 可以包含修饰蛋白质的其它部分例如糖部分, 以使 TAJ 抗体以比其结合至完全未修饰的靶蛋白形式更高的亲和力结合至修饰的靶蛋白。

在某些具体实施方式中, 本发明的抗体或其抗原结合片段、变异体、或衍生物特异性地结合至 TAJ 或上述片段或变异体的至少一

个表位，即比其结合至不相关或随机的表位更易于结合至这样的表位；优先结合至 TAJ 或上述片段、变异体或衍生物的至少一个表位，即比其结合至相关、类似、同型、或类似的表位更易于结合至这样的表位；竞争性抑制本身特异性或优先结合至 TAJ 或上述片段或变异体的某个表位的基准抗体的结合；或以一亲和力结合至 TAJ 或上述片段或变异体，该亲和力的特征在于离解常数 K_D 低于约 $5 \times 10^{-2}M$ 、约 $10^{-2}M$ 、约 $5 \times 10^{-3}M$ 、约 $10^{-3}M$ 、约 $5 \times 10^{-4}M$ 、约 $10^{-4}M$ 、约 $5 \times 10^{-5}M$ 、约 $10^{-6}M$ 、约 $5 \times 10^{-7}M$ 、约 $10^{-7}M$ 、约 $5 \times 10^{-8}M$ 、约 $10^{-8}M$ 、约 $5 \times 10^{-9}M$ 、约 $10^{-9}M$ 、约 $5 \times 10^{-10}M$ 、约 $10^{-10}M$ 、约 $5 \times 10^{-11}M$ 、约 $10^{-11}M$ 、约 $5 \times 10^{-12}M$ 、约 $10^{-12}M$ 、约 $5 \times 10^{-13}M$ 、约 $10^{-13}M$ 、约 $5 \times 10^{-14}M$ 、约 $10^{-14}M$ 、约 $5 \times 10^{-15}M$ 、或约 $10^{-15}M$ 。在一特别方面，相对于结合至鼠 TAJ 多肽或其片段，该抗体或其片段优先结合至人 TAJ 多肽或其片段。

如在抗体结合离解常数的内容中所使用的，术语“约”允许对于在用于测量抗体亲和力的方法中的本身的变化程度。例如，根据所使用的仪器的精确程度，基于检测的样品数量的标准误差和舍入误差，术语“约 $10^{-2}M$ ”可以包括例如 $0.05M$ 至 $0.005M$ 。

在特定具体实施方式中，本发明的抗体或其抗原结合片段、变异体或衍生物以低于或等于 $5 \times 10^{-2}sec^{-1}$ 、 $10^{-2}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 、或 $10^{-3}sec^{-1}$ 的解离速率 ($k(off)$) 结合 TAJ 多肽或其片段或变异体。可替换地，本发明的抗体或其抗原结合片段、变异体或衍生物以低于或等于 $5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 、 $10^{-4}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5}sec^{-1}$ 、 $10^{-5}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6}sec^{-1}$ 、 $10^{-6}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7}sec^{-1}$ 、或 $10^{-7}sec^{-1}$ 的解离速率 ($k(off)$) 结合 TAJ 多肽或其片段、变异体或衍生物。

在其它具体实施方式中，本发明的抗体或其抗原结合片段、变异体或衍生物以高于或等于 $10^3M^{-1}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^3M^{-1}sec^{-1}$ 、 $10^4M^{-1}sec^{-1}$ 、或 $5 \times 10^4M^{-1}sec^{-1}$ 的结合速率 ($k(on)$) 结合 TAJ 多肽或其片段或变异

体。可替换地，本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以高于或等于 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、或 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的结合速率($k(\text{on})$)结合 TAJ 抗体或其片段或变体。

在一个具体实施方式中，用于本发明方法中的 TAJ 拮抗剂时抗体分子、或其免疫特异性片段。除非特别指明，如本文所使用的，关于抗体的“其片段”指的是免疫特异性片段，即抗原特异性片段。在一个具体实施方式中，本发明的抗体是双特异性结合分子、结合多肽、或抗体，例如双特异性抗体、微型抗体、结构域缺失抗体、或具有用于多于一个表位，即多于一个抗原或在相同抗原上多于一个表位的结合特异性的融合蛋白。在一个具体实施方式中，双特异性抗体具有至少一个对于在 TAJ 上的至少一个表位是特异性的结合结构域。双特异性抗体可以是具有两个对于 TAJ 的表位是特异性的靶结合结构域和两个对于第二个靶是特异性的靶结合结构域的四价抗体。因此，四价双特异性抗体对于每个特异性可以是二价的。

在本发明的某些具体实施方式中，包括给予 TAJ 拮抗剂抗体、或其免疫特异性片段，其中至少一部分的一个或多个恒定区结构域已缺失或另外改变以提供希望的生化特性，如减少的效应物功能。非共价二聚的能力、增加的在神经元位点定位的能力、减少的血清半衰期、或当与大致相同免疫原性的整体未变化的抗体相比增加的血清半衰期。例如，用于本文所述治疗方法中的某些抗体是结构域缺失的抗体，其包括类似于免疫球蛋白重链的多肽链，但其缺少至少一部分的一个或多个重链结构域。例如，在某些抗体中，修饰抗体恒定区的一个完全结构域缺失，例如所有或部分的 $\text{C}_{\text{H}2}$ 结构域缺失。

在某些用于本文所述的治疗方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其免疫特异性片段中，Fc 部分可以利用本领域已知技术来发生突变以降低效应物功能。例如恒定区结构域的缺失或失活（通过点突变或其

它方式)可以减少循环修饰的抗体的 Fc 受体结合,从而增加 CNS 定位,尤其在神经元中。在其它情况下,可以是与本发明一致的恒定区修饰减轻补体结合,因而减少血清半衰期和结合的细胞毒素的非特异性结合。而恒定区的其它修饰可以用来修饰二硫键或由于增加的抗原特异性或抗体柔性而允许增强定位的寡糖部分。所得的修饰的生理外形、生物可利用性以及其它生化作用如 CNS 定位。生物分配以及血清半衰期可易于在无需过度实验的情况下利用熟知免疫技术加以测量和量化。

用于本文披露的诊断和治疗方法中的抗体或其免疫特异性片段的修饰形式可利用本领域已知技术从整个前体或亲代抗体形成。示例性技术在本文中详细论述。

在某些具体实施方式中,用于本文披露的治疗方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其免疫特异性片段的可变区和恒定区全部是人。全人抗体可利用本领域已知以及如本文所述的技术来形成。例如,对于特定抗体的全人抗体可通过将抗原给予至转基因动物来制备,该转基因动物已被修饰以产生响应于攻击的这样的抗体,但其内源性座位已失效。可用来形成这样的抗体的示例性技术描述于美国专利 6,150,584、6,458,592、6,420,140 中。其它技术在本领域是已知的。全人抗体可同样地通过各种显示技术例如噬菌体显示和其它病毒显示系统(如本文其它地方详细描述)来产生。

用于本文所披露的方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其免疫特异性片段可利用本领域已知的技术来形成或制备。在某些具体实施方式中,抗体分子或其片段是“重组产生的”,即利用重组 DNA 技术来制备。用于形成抗体分子或其片段的示例性技术是在本文其它地方详细讨论的。

在优选具体实施方式中,用于本文所披露方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或免疫特异性片段不会在待治疗动物例如人中引起有害的免疫响应。在一个具体实施方式中,用于本文所披露治疗方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其免疫特异性片段利用工艺识别技术来修饰以减少其免疫原性。例如,抗体可被人源化、灵长源化、去免疫化、或可形成嵌合抗体。这些类型的抗体来源于非人抗体,通常是鼠或灵长类动物抗体,其保留或基本上保留亲代抗体的抗原结合特性,但其在人中是较低免疫原性的。这可以通过各种方法来实现,包括(a)将整个非人可变结构域嫁接到人恒定区上以生成嵌合抗体;(b)将至少一部分的一个或多个非人互补性决定区(CDR)嫁接到人构架和具有或没有保留关键构架残基的恒定区中;或(c)转移整个非人可变结构域,但通过替代表面残基而用类似人的部分“掩盖”它们。这样的方法披露于 Morrison et al., *proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994), 以及美国专利第 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, and 6,190,370号中,通过引用的方式将其全部内容结合于此作为参考。

去免疫化也可用来降低抗体的免疫原性。如本文所使用的,术语“去免疫化”包括抗体的改变以修饰 T 细胞表位(参见例如 WO9852976A1、WO0034317A2)。例如,对来自起始抗体的 V_H和 V_L序列进行分析,并且来自每个 V 区的人 T 细胞表位“帽”表现出有关于互补性决定区(CDR)和序列中的其它关键残基的表位的定位。对来自 T 细胞表位帽的单个 T 细胞表位进行分析以便鉴定具有低危险性改变最终抗体活性的可替换的氨基酸替代。可替换 V_H和 V_L序列的范围指定包含氨基酸替代的组合,并且这些序列随后组合到结合多肽的范围内,例如用于本文所披露方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其免疫特异性片段,然后对其功能进行测试。通常,形成

和试验在 12 和 24 个之间的变异体抗体。包含修饰的 V 和人 C 区的完整重链和轻链基因接着被克隆到表达载体中，得到的质粒引入到用于形成全抗体的细胞系中。接着该抗体在适当生化和生物分析中进行比较，并鉴定最优变异体。

用于本发明方法中的 TAJ 拮抗剂抗体或其片段可通过本领域已知的任何合适方法来产生。多克隆抗体可通过本领域熟知的各种工序来制备。例如，TAJ 免疫特异性片段可给予至各种宿主动物，包括但不限于兔、小鼠、大鼠等，以诱导含有对于抗原是特异性的多克隆抗体的血清产生。各种佐剂可以用来增加免疫应答，取决于宿主种类，包括但不限于弗氏（完全和不完全）佐剂、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、聚醚多元醇、聚阴离子、肽、油性乳液、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚、以及可能有用的人佐剂如 BCG（卡介苗，*bacille Calmette-Guerin*）和小棒杆菌。这样的佐剂在本领域也是已知的。

单克隆抗体可利用大量本领域已知的各种技术来制备，包括利用杂交瘤细胞、重组体、以及噬菌体显示技术或其结合。例如，单克隆抗体可利用杂交细胞技术来制备，包括本领域已知和例如在 Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)（其全部内容结合于此作为参考）中教导的技术。如本文所使用的，术语“单克隆抗体”不限于通过杂交细胞技术来制备的抗体。术语“单克隆抗体”指的是来源于单个克隆体的抗体，包括任何真核、原核、或噬菌体克隆体，而不是通过其制备的方法。因此，术语“单克隆抗体”不限于通过杂交细胞技术来制备的抗体。单克隆抗体可利用大量本领域已知的各种技术来制备，包括利用杂交瘤细胞和重组体以及噬菌体显示技术。

利用工艺识别方案，在一个实施例中，抗体通过多次皮下或腹膜内注射相关抗原（例如，纯化的 TAJ 抗原或包含这样的抗原的细胞或细胞提取物）和佐剂而在哺乳动物中出现。这种免疫化通常引起免疫响应，其包括来自活化脾细胞或淋巴细胞的抗原反应性抗体的产生。虽然所得抗体可以从动物的血清获得以提供多克隆制剂，但是经常希望从脾、淋巴节或周围血分离出单个淋巴细胞以提供单克隆抗体（MAb）的同源性制剂。优选地，淋巴细胞获自脾。

在这个熟知的工艺(Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975))中，相对较短存活或必死的来自已注射抗原的哺乳动物的淋巴细胞与必死肿瘤细胞系（例如骨髓瘤细胞系）进行融合，因此，产生是必死的并且能够产生 B 细胞的遗传编码的抗体的杂合细胞或“杂种瘤细胞”。通过筛选、洗脱、和与每个单个菌株（包含对于单个抗体形成是特异性的基因）的再生长，将所得杂合细胞分离到单个遗传菌株中。它们产生与抗希望的抗原是同源性抗体，并且相于其纯的遗传来源，称为“单克隆”。

将如此制备的杂种瘤细胞接种并在合适培养基中进行生长，该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活物质。本领域的技术人员应理解，用于杂种细胞形成、筛选和生长的试剂、细胞系和介质可商购获自大量来源，并且已很好建立标准化方案。通常，杂种细胞生长于其中的培养基对于抗希望的抗原的单克隆抗体的形成进行分析。优选地，由杂种瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过体外测定如免疫沉淀、放射免疫测定（RIA）或酶联免疫吸附测定（ELISA）来确定。在鉴定杂种瘤细胞产生希望特异性、亲和力和/或活性的抗体后，该克隆体可通过限制性稀释步骤进行亚克隆并通过标准方法（Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)）。应进一步理解，通过亚克隆体分泌的单克隆抗体可通过传统纯化步

骤例如蛋白质-A、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水液体或血清中分离出来。

识别特异性表位的抗体片段可通过已知技术形成。例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段可利用酶如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(产生 F(ab')₂ 片段)通过免疫球蛋白分子的蛋白水解切割来制备。F(ab')₂ 片段含有可变区、轻链恒定区和重链的 C_{H1} 结构域。

本领域的技术人员还可理解, 编码抗体和抗体片段(例如抗原结合位点)的 DNA 也可以来源于抗体噬菌体文库。更具体地, 这样的噬菌体可用来显示由所有组成成分或组合抗体文库(例如人或鼠)表达的抗原结合结构域。表达结合感兴趣的抗原的抗原结合结构域的噬菌体可用抗原加以选择或鉴定, 例如利用标记的抗原或结合或捕获至固体表面或珠子的抗原。用于这些方法中的噬菌体通常是丝状噬菌体, 包括由具有 Fab、Fv 的噬菌体表达的 fd 和 M13 结合结构域或二硫化物稳定的重组融合至噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白的抗体结构域示例性方法在例如 EP 368 684B1、美国专利 5,969,108、Hoogenboom, H.R. and Chames, *Immunol. Today* 21:371 (2000); Nagy *et al. Nat. Med.* 8:801 (2002); Huie *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2682 (2001); Lui *et al., J. Mol. Biol.* 315:1063 (2002)中提出, 其每一个以引用的方式结合于此作为参考。若干出版物(e.g., Marks *et al., Bio/Technology* 10:779-783 (1992))已经描述过通过链平移、以及作为用于构建较大噬菌体文库的方案 的组合感染和体内重组来生产高亲和力的人抗体。在另一具体实施方式中, 核糖体显示可用来代替噬菌体作为显示平台(参见, 例如 Hanes *et al., Nat. Biotechnol.* 18:1287 (2000); Wilson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750 (2001); or Irving *et al., J. Immunol. Methods* 248:31 (2001))。在又一个具体实施方式中, 细胞表面文库可用于筛选抗体(Boder *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10701 (2000); Daugherty *et al., J. Immunol. Methods* 243:211 (2000))。这样的工艺提供

对于用于分离的传统杂种细胞技术的替换方案以及随后的单克隆抗体的克隆。

在噬菌体显示方法中，功能性抗体结构域显示在噬菌体颗粒的表面上，该噬菌体颗粒携带编码它们的多核苷酸序列。具体地，编码 V_H 和 V_L 区的 DNA 序列从动物 cDNA 文库（例如人或鼠的淋巴组织的 cDNA 文库）或合成 cDNA 文库进行扩增。在某些具体实施方式中，编码 V_H 和 V_L 区的 DNA 通过 PCR 由 scFv 接头结合在一起并克隆到噬菌粒载体（例如，pCANTAB6 或 pComb3 HSS）中。该载体在大肠杆菌中电穿孔，并且大肠杆菌用辅助噬菌体进行转染。用于这些方法中的噬菌体通常是包括 fd 和 M13 的丝状噬菌体，并且 V_H 或 V_L 区通常重组融合至噬菌体基因 III 或基因 VIII。表达结合至感兴趣的抗原（即，TAJ 多肽或其片段）的抗原结合结构域的噬菌体可用抗原例如利用标记的抗原或结合或捕获至固体表面或珠子的抗原进行选择或鉴定。

可用来形成抗体的噬菌体显示方法的其它实例包括在 Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 132:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT Application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Pat. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 and 5,969,108; 中披露的那些抗体。将其每一个的全部内容通过引用方式结合于此作为参考。

如在上述参考文献中所描述的，在噬菌体选取之后，编码来自该噬菌体的区的抗体可加以分离并用来形成全抗体，包括人抗体、或任何其它希望的抗原结合片段，并在任何希望的宿主中表达，所

述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母以及细菌。例如，用于利用本领域已知方法如在 PCT 公开 WO92/22324、Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); and Sawai *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); and Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988) (将所述参考文献的全部内容结合于此作为参考) 中披露的那些方法来重组产生 Fab、Fab' 以及 F(ab')₂ 片段的技术也可采用。

可用来生产单链 Fv 的技术和抗体的实例包括在美国专利第 4,946,778 和 5,258,498 号、Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999 (1993); and Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988) 中描述的那些。对于某些应用，包括抗体在人体内的应用和体外检测测定，可以优选使用嵌合、人源化或人抗体。嵌合抗体是这样的分子，其中该抗体的不同部分来源于不同动物种类，如具有可变区的抗体来源于鼠单克隆抗体和人免疫球蛋白恒定区。用于生产嵌合抗体的方法在本领域是已知的。参见例如 Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); 美国专利第 5,807,715、4,816,567 以及 4,816,397 号，其全部内容结合于此作为参考。人源化抗体是来自非人种抗体的抗体分子，其结合希望的具有一个或多个来自非人种的互补性决定区 (CDR) 和来自人免疫球蛋白分子的构架区。经常，在人构架区中的构架残基将被来自 CDR 供体抗体的对应残基所替代以改变、优选改进抗原结合。这些构架替代通过本领域熟知的方法来鉴定，例如通过 CDR 和构架残基的相互作用的模型化以鉴定对于抗原结合很重要的构架残基以及序列比对以鉴定在特殊位置处的非常见构架残基。(参见，例如 Queen 等的美国专利 5,585,089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988)，其全部内容结合于此作为参考)。抗体可利用各种本领域已知技术加以人源化，包括例如 CDR 嫁接 (EP 239,400、PCT 公开 WO 91/09967、美国专利 5,225,539、5,530,101、

以及 5,585,089)、镶面术或再涂层 (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973 (1994))、以及链平移 (美国专利第 5,565,332 号)。

完全人抗体对于人患者的治疗是尤其希望的。人抗体可通过本领域已知的各种方法来制备,其中包括上述的噬菌体显示方法并利用来源于人免疫球蛋白序列的抗体文库。也参见美国专利 4,444,887 和 4,716,111; 以及 PCT 公开 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, and WO 91/10741; 其每一个全部内容结合于此作为参考。

人抗体也可利用不能表达功能内源性免疫球蛋白但能表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行制备。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机地或通过同源重组到小鼠胚胎干细胞中来引入。可替换地,除了人重链和轻链基因外,人可变区、恒定区、和多样性区可以引入到鼠胚胎干细胞中。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以单独或同时通过同源性重组利用引入人免疫球蛋白座位使其变为非功能性的。具体地, JH 区的同型缺失阻止内源性抗体产生。修饰的胚胎干细胞被扩展并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后培育该嵌合小鼠以形成表达人抗体的同型后代。该转基因小鼠以常规方式利用所选抗原,例如所有或部分希望的靶多肽加免疫化。用于该抗原的单克隆抗体可从免疫化的转基因小鼠利用传统杂合细胞技术来获得。由转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化期间重排,接着进行类别转换和体细胞突变。因此,利用这样的技术,就有可能制备治疗有用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。对于这种用于制备人抗体的技术的综述,参见 Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。对于这种用于制备人抗体和人单克隆抗体的技术以及用于制备这样的抗体的方案的

详细论述, 参见例如 PCT 公开 WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; 美国专利 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; and 5,939,598, 其全部内容结合于此作为参考。另外, 诸如 Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和 GenPharm (San Jose, Calif.) 的公司可能致力于提供用于所选抗原并利用类似于上述技术的人抗体。

识别所选表位的完全人抗体可利用称为“指导选择”的技术来生成。在这种方法中, 所选非人单克隆抗体例如小鼠抗体被用来指定选择识别相同表位的完全人抗体 (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 12:899-903 (1988))。还参见美国专利 5,565,332。

在另一具体实施方式中, 编码希望的单克隆抗体的 DNA 可以利用传统方法 (例如, 通过利用能够特异性地结合至编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针) 易于进行分离和序列测定。分离和亚克隆的杂化细胞用作这样的 DNA 的优选来源。一旦分离, 则 DNA 可置入表达载体中, 然后转染到原核或真核宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不会另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中。更具体地, 分离的 DNA (其可以是如本文所述合成的) 可用来克隆用于制备如 1995 年 2 月 25 提交的 Newman 等的美国专利 5,658,570 (其全部内容结合于此作为参考) 所述的抗体的恒定和可变序列。实质上, 这需要提取来自所选细胞的 RNA, 转化为 cDNA, 以及利用 Ig 特异性引物通过 PCR 扩增。用于此目的合适引物也描述于美国专利 5,658,570 中。如以下详细讨论的, 表达希望抗体的转化细胞可相对更大量地生长以提供免疫球蛋白的临床和商业供应。

在特定具体实施方式中, 重链和/或轻链可变结构域的氨基酸序列可进行检查以通过本领域熟知的方法来鉴定互补性决定区

(CDR)的序列,例如通过与其它重链和轻链可变区的已知氨基酸序列来确定序列超变性的区域。利用常规重组DNA技术,一个或多个CDR可以插入构架区中,例如插入人构架区中以人源化非人抗体。构架区可以是天然存在或一致认定的构架区,并且优选人构架区(参见例如Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998),列出了人构架区)。优选地,由构架区和CDR组合产生的多核苷酸编码特异性结合至希望多肽例如TAJ的至少一个表位的抗体。优选地,一个或多个氨基酸取代可在构架区中形成,并且优选地,该氨基酸取代改进抗体结合至其抗原。另外,这样的方法可用来形成一个或多个参与链内二硫键以产生缺少一个或多个链内二硫键的抗体分子的可变区半胱氨酸的氨基酸取代或缺失。该多核苷酸的其它改变也包括在本发明中并属于本领域技术人员的范畴。

另外,可使用通过剪接来自合适抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自合适生物活性的人抗体分子的基因而开发的用于制备“嵌合抗体”的技术(Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314:452-454 (1985))。如本文所使用的,嵌合抗体是这样的分子,其中不同部分来源于不同动物种类,如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些分子,例如人源化抗体。

可替换地,所述用于制备单链抗体的技术(U.S. Pat. No. 4,694,778; Bird, *Science* 242:423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); and Ward *et al.*, *Nature* 334:544-554 (1989))可适用于制备单链抗体。单链抗体借助于氨基酸桥通过连接Fv区的重链和轻链片段而形成,得到单链抗体。用于在大肠杆菌中装配功能性Fv片段的技术也可以使用(Skerra *et al.*, *Science* 242:1038-1041 (1988))。

TAJ 拮抗剂抗体也可以是在不能进行内源性免疫球蛋白生产的转基因动物（例如小鼠）中形成的人抗体或基本上是人抗体（参见例如美国专利 6,075,181, 5,939,598, 5,591,669 和 5,589,369，其每一个的全部内容结合于此作为参考）。例如，已描述过，在嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链结合区的同型缺失会导致内源性抗体产生的完全抑制。人免疫球蛋白基因阵列转移至这样的种系变异小鼠将导致由于抗原攻击的人抗体的产生。利用 SCID 小鼠来产生人抗体的另一优选方式披露在美国专利 5,811,524 中，其全部内容结合于此作为参考。应当理解，与这些人抗体相关的遗传物质也可如本文所述进行分离和操作。

而另一高度有效的用于产生重组抗体的方式由 Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992) 所披露。具体地，这种技术导致产生含有猴可变区和人恒定序列的灵长源化抗体。这个参考文献的全部内容通过引用方式结合于此作为参考。此外，这种技术也描述于通常已转让的美国专利 5,658,570, 5,693,780 和 5,756,096 中，其每一个的全部内容结合于此作为参考。

在另一具体实施方式中，可以通过显微操作和分离的可变基因选择淋巴细胞。例如，外周血单核细胞可以从免疫的哺乳动物分离并在体外培养约 7 天。可以从培养物筛选出符合筛选标准的特异性 IgG。来自阳性孔的细胞可以被分离。单独产生 Ig 的 B 细胞可以通过 FACS 分离或通过补体介导的溶血蚀斑试验鉴定它们来分离。产生 Ig 的 B 细胞可以通过显微操作置入试管中，并且 V_H 和 V_L 可以利用例如 RT-PCR 进行扩增。 V_H 和 V_L 基因可以被克隆到抗体表达载体并被转染到用于表达的细胞（例如真核或原核细胞）中。

可选替换地，可以利用本领域技术人员熟知的技术选择并培养产生抗体的细胞系。这样的技术在各种实验室手册和原始出版物中

均有描述。在这方面，适用于下面描述的本发明的技术描述在 *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), 其全部内容（包括附录）以引用方式结合于此作为参考。

用于本文披露的治疗方法中的抗体可以通过本领域已知的用于合成抗体的任何方法产生，特别是，通过化学合成或优选地，通过本文所述的重组表达技术。

应当进一步认识到本发明的范围还包括抗原结合 DNA 序列的全部等位基因、变异体和突变体。

众所周知，RNA 可以通过标准技术（如，异硫氰酸胍盐（guanidinium isothiocyanate）提取和沉淀，随后离心或层析）从原始的杂交瘤细胞或从其它转化的细胞中分离。如果需要，mRNA 可以通过标准技术（如在少数 dT 纤维素（oligo dT cellulose）上进行层析）从总 RNA 中分离。合适的技术在本领域是熟知的。

在一种实施方式中，编码抗体的轻链和重链的 cDNA 可以按照熟知的方法利用反转录酶和 DNA 聚合酶同时或分别制备。PCR 可以通过公认恒定区引物或通过基于公开的重链和轻链 DNA 的更多特异性引物和氨基酸序列启动。如上所述，PCR 还可以用于分离编码抗体轻链和重链的 DNA 克隆。因此，在这种情况下，可以通过公认引物（consensus primer）或较大的同源探针（如小鼠恒定区探针）筛选文库。

DNA，通常为质粒 DNA，可以利用本领域已知的技术从细胞中分离，按照如在前述关于重组 DNA 技术的参考文献中详细描述

的标准的、熟知的技术严格绘图并测序。当然，该 DNA 可以在分离过程中或随后分析中的任何时间点按照本发明合成。

抗体、或其片段、衍生物或类似物（例如，为 TAJ 拮抗剂的抗体的重链或轻链）的重组表达需要构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得了本发明的编码抗体分子或抗体的重链或轻链的多核苷酸或其部分（优选含有重链或轻链的可变结构域），就可以利用本领域熟知的技术通过重组 DNA 技术产生用于产生抗体分子的载体。因此，用于通过表达包含编码抗体的核苷酸序列的多核苷酸制备蛋白质的方法描述在本文中。本领域技术人员熟知的方法可以用于构建包含编码抗体的序列和合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括，例如，体外重组 DNA 技术、合成技术、和体内遗传重组。因此本发明提供了包括编码本发明的抗体分子、或其重链或轻链、或重链或轻链的可变结构域（可操作地连接至启动子）的核苷酸序列的可复制载体。这样的载体可以包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列（参见，例如，PCT 公开 WO 86/05807、PCT 公开 WO 89/01036、以及美国专利 5122464），并且该抗体的可变结构域可以被克隆到用于表达完整重链或轻链的这样的载体中。

通过常规技术将该表达载体转移入宿主细胞，随后通过常规技术培养该转染的细胞以产生用于本文所述方法中的抗体。因此，本发明包括含有编码本发明抗体或其重链或轻链的多核苷酸（可操作地连接至异源启动子）的宿主细胞。在用于表达双链抗体的优选具体实施方式中，编码重链和轻链的载体可以在用于表达完整免疫球蛋白分子的宿主细胞中共表达，如下所述。

各种宿主表达载体系统可以被用于表达用于本文所述方法中的抗体分子。这样的宿主表达系统既代表媒介物，感兴趣的编码序列通过该媒介物可以被产生并随后纯化；还代表细胞，该细胞在用

合适的核苷酸编码序列转化或转染时原位表达本发明的抗体分子。这些包括但不限于微生物，如用含有抗体编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌（例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌）；用含抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母（如 *Saccharomyces*, *Pichia*）；用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体（如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；植物细胞系统，用重组病毒表达载体（如花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体（如 Ti 质粒）转化；或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（如 COS, CHO, BLK, 293, 3T3 细胞），该构建体含有由哺乳动物细胞的基因组获得的启动子（如金属硫蛋白启动子）或由哺乳动物病毒获得的启动子（如腺病毒晚期启动子；牛痘病毒 7.5K 启动子）。优选地，细菌细胞例如大肠杆菌，更优选地，真核细胞（尤其用于表达整个重组抗体分子）被用于表达重组抗体分子。例如，哺乳动物细胞，如中国仓鼠卵巢细胞（CHO），联合载体（如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子因子）是抗体的有效表达系统（Foecking *et al.*, *Gene* 45:101(1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)）。

在细菌系统中，可以根据要表达的抗体分子所希望的用途，有利地选择大量的表达载体。例如，当要生产大量用于产生抗体分子的药物组合物的这样的蛋白质时，可以指导容易纯化的高水平融合蛋白产物表达的载体会是理想的。这样的载体包括但不限于大肠杆菌表达载体 pUR278（Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2:1791(1983)），其中该抗体编码序列可以被单独地连接至具有 lacZ 编码区的符合读框的载体以便产生融合蛋白；pIN 载体（Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109(1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509(1989)）等等。pGEX 载体还可以借助谷胱甘肽 S-转移酶（GST）表达作为融合蛋白的外来多肽。通常，这样的融合蛋白是可溶的并且可以容易地从溶解的细胞进行纯化，该纯化通过吸附并

结合至基质谷胱甘肽-琼脂糖小珠,随后在游离谷胱甘肽存在的情况下洗脱。pGEX 载体被设计为包括凝血酶或因子 Xa 蛋白酶切割位点以便该克隆的靶基因产物可以从 GST 部分释放。

在昆虫系统中,苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核多角体病病毒 (AcNPV) 通常用作载体表达外来基因。该病毒在草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中生长。抗体编码序列可以被单独克隆至该病毒的非基本区 (例如多角体蛋白基因) 并置于 AcNPV 启动子 (如多角体蛋白启动子) 的控制下。

在哺乳动物宿主细胞中,可以使用大量基于病毒的表达系统。在将腺病毒用作表达载体的情况中,感兴趣的抗体编码序列可以被连接至腺病毒转录/翻译控制复合体,如晚期启动子 (late promoter) 和三联前导序列。随后通过体外或体内重组,这种嵌合基因可以被插入腺病毒基因组。在病毒基因组的非基本区 (如 E1 或 E3 区) 的插入将导致重组病毒能够存活并且能够在感染的宿主中表达该抗体分子 (例如,参见, Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359(1984))。对于插入的抗体编码序列的有效翻译还需要特异性的起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和相邻序列。此外,该起始密码子必须与希望的编码序列的读框同相以确保完整插入体的翻译。这些外源性翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源的,包括天然和合成的。通过包括合适的转录增强子因子、转录终止子等可以提高表达的效率 (参见 Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987))。

另外,可以选择宿主细胞菌株,其调节插入序列的表达、或以希望的特异性方式修饰和加工基因产物。这样的修饰 (如糖基化) 和加工 (如切割) 蛋白产物对于该蛋白的功能是重要的。不同的宿主细胞对于蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰有特性和特异性

的机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外来蛋白的正确修饰和加工。为此，可以使用真核宿主细胞，其具有用于正确加工基因产物的初始转录、糖基化和磷酸化的细胞工具。这样的哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, 并且特别是, 乳腺癌细胞系, 如 BT483、Hs578T、HTB2、BT20、和 T47D, 以及正常乳腺细胞系, 如, 例如, CRL7030 和 Hs578Bst。

为了长期、高产量地生产重组蛋白, 优选稳定表达。例如, 可以改造稳定表达抗体分子的细胞系。不是利用含有复制的病毒源的表达载体, 宿主细胞可以用受合适表达控制因子(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的 DNA 和可选择标记物进行转化。在引入外来 DNA 后, 经改造的细胞可以允许在丰富培养基上生长 1-2 天, 随后转到选择性培养基。重组质粒中的可选标记物提供了对选择物的抗性, 并允许细胞稳定地将该质粒整合入它们的染色体中并生长以形成转化灶, 其又可以被克隆并扩展为细胞系。可以有利地使用该方法以改造可稳定表达抗体分子的细胞系。

可以使用大量的选择系统, 包括但不限于可以分别用在 tk-、hgp^rt-、或 ap^rt- 细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223 (1977)), 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202 (1992)), 以及腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Lowy *et al.*, *Cell* 22:817 (1980)) 基因。并且, 抗代谢物抗性可以用作下列基因的选择基础: dhfr, 其提供了对氨基喋呤的抗性 (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, 其提供了对霉酚酸的抗性 (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, 其提供了对氨基糖苷 G-418 的抗性 (*Clinical Pharmacy* 12:488-

505; Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993);, *TIB TECH* 11(5):155-215 (May, 1993);) 以及 hygro, 其提供了对潮霉素的抗性 (Santerre *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)。在本领域通常已知的可以使用的重组 DNA 技术的方法描述在下列文献中: Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli *et al.* (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), 其以引用方式全部合并入本文中作为参考。

抗体分子的表达水平可以通过载体扩增来提高 (综述参见, Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987))。当表达抗体的载体系统中的标记物可扩增时, 宿主细胞培养物中存在的抑制剂的水平的增加将提高标记物基因的拷贝的数量。由于该扩增区与该抗体基因相关, 所以抗体的产生也将增加 (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983))。

该宿主细胞可以与本发明的两种表达载体共转染, 第一种载体编码源自多肽的重链, 而第二种载体编码源自多肽的轻链。这两种载体可以含有同样的可选标记物, 其可以同等地表达重链和轻链多肽。可替换地, 可以使用单独的载体, 其编码重链和轻链多肽。在这样的情况下, 轻链有利地被置于重链之前以避免过多有毒游离重链 (Proudfoot, *Nature* 322:52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980))。用于重链和轻链的编码序列可以包括 cDNA 或基因组 DNA。

一旦本发明的抗体分子被重组表达, 则它可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白的任何方法进行纯化, 例如, 通过层析法 (如

离子交换, 亲和力, 尤其通过对蛋白 A 后的特异性抗原的亲和力, 以及分级柱层析法)、离心、差异溶解、或通过用于纯化蛋白的任何其它标准技术。可替换地, 用于提高本发明抗体的亲和力的优选方法披露在 US 2002 0123057 A1 中。

在一个具体实施方式中, 用于本发明方法中的结合分子或抗原结合分子包括合成的恒定区, 其中一个或多个结构域被部分或完全缺失 (“结构域缺失抗体”)。在一些具体实施方式中, 相容的修饰抗体将包括结构域缺失的构建体或变异体, 其中全部 C_{H2} 结构域被去除 (Δ C_{H2}构建体)。对于其它具体实施方式, 短连接肽可以取代缺失的结构域以便为可变区提供柔性和移动自由度。本领域技术人员将会认识到这样的构建体是特别优选的, 因为 C_{H2} 结构域在抗体的分解代谢速率上的调节性质。

在某些具体实施方式中, 用于本文披露方法中的修饰抗体为微型抗体。微型抗体可以利用本领域中所描述的方法制备 (参见, 如, US 专利 5837821 或 WO94/09817A1)。

在另一具体实施方式中, 用于本文披露方法中的修饰抗体是本领域已知的 C_{H2} 结构域缺失的抗体。结构域缺失的构建体可以利用编码 IgG1 人恒定结构域的载体 (如, 来自 Biogen IDEC Incorporated) 获得 (参见, 如, WO 02/060955A2 和 WO02/096948A2)。这种示例性载体被改造以缺失 C_{H2} 结构域并提供表达缺失 IgG1 恒定区的结构域的合成载体。

在一个具体实施方式中, 本文披露的治疗方法中所用的 TAJ 拮抗剂抗体或其片段包括具有一些或甚至单个氨基酸的缺失或取代的免疫球蛋白重链, 只要它允许单体亚单位之间的结合。例如, C_{H2} 结构域的所选区域中的单个氨基酸的突变对于减少 Fc 结合可以是足够的并由此增加瘤定位。类似地, 可以希望仅仅缺失控制要被调

节的效应物功能(如补体结合)的一个或多个恒定区结构域的部分。这样的恒定区的部分缺失可以提高抗体的选择性质(血清半衰期),同时使主体恒定区结构域相关的其它希望功能保持完整。此外,如上所述,所披露的抗体的恒定区可以通过一个或多个氨基酸的突变或取代合成,其提高了所得到的构建体的性质。在这方面,有可能破坏由保守结合位点提供的活性(如Fc结合),同时基本上保持所修饰抗体的构型和免疫原外形。而其它具体实施方式包括一个或多个氨基酸插入恒定区以增强希望的特性,如效应物功能,或提供更多的细胞毒素或糖连接。在这样的具体实施方式中,可以希望插入或复制来源于所选恒定区结构域的特异性序列。

本发明还提供了抗体的应用,该抗体包括、基本上由或由本文所述的抗体分子(如 V_H 区和/或 V_L 区)的变体(包括衍生物)组成,抗体或其片段免疫特异性地结合至TAJ多肽。本领域技术人员已知的标准技术可以用来将突变引入编码结合分子的核苷酸序列,包括但不限于,位点定向诱变和PCR介导的诱变,其导致氨基酸取代。优选地,相对于基准 V_H 区、 V_H CDR1、 V_H CDR2、 V_H CDR3、 V_L 区、 V_L CDR1、 V_L CDR2、或 V_L CDR3,该变体(包括衍生物)编码少于50个氨基酸取代、少于40个氨基酸取代、少于30个氨基酸取代、少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代、或少于2个氨基酸取代。

“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似电荷的侧链的氨基酸残基置换。具有类似电荷的侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经定义。这些家族包括:具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、

蛋氨酸、色氨酸)、具有 β -支链化的侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及具有芳香族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。可替换地,突变可以沿着全部或部分编码序列随机引入,如通过饱和诱变,并且生成的突变体可以筛选生物活性以鉴定保持活性的突变体。

例如,可以将突变仅引入抗体分子的构架区或 CDR 区。引入的突变可以是沉默的或中性的错义突变,即,对于抗体结合抗原的能力没有或几乎没有影响。这些类型的突变对于优化密码子选择或提高杂交瘤细胞的抗体生成是有用的。可替换地,非中性错义突变可以改变抗体结合抗原的能力。大多数沉默和中性错义突变的位置可能位于构架区中,而大多数非中性错义突变的位置可能位于 CDR 中,虽然这不是绝对的要求。本领域的技术人员能够设计并试验具有希望性能,如没有改变抗原结合活性或改变结合活性(如提高抗原结合活性或改变抗体特异性)的突变分子。诱变后,编码的蛋白可以常规表达并且该编码的蛋白的功能和/或生物活性可以利用本文描述的技术或通过本领域已知的常规修饰技术确定。

用于本文描述的方法中的抗体包括多克隆和单克隆抗体,包括全长抗体、以及抗体同源物,如多特异性抗体(如双特异性抗体)、嵌合的、人源化和完全人抗体,以及前述中任何一个的片段,包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、以及 Fv 片段、二抗、线性抗体、单链抗体分子、以及由抗体片段形成的多特异性抗体,只要它们表现出希望的生物活性。单克隆抗体表现出作为基本上同源的抗体群的抗体的性质,并且不被视为需要通过任何特别的方法产生的抗体。

例如,单克隆抗体包括这样的抗体,其可以通过由 Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975)首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组 DNA 方法制备(参见,如, U.S. Pat. No. 4,816,567)。单克隆抗体还可以利用如 Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) 和

Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 中描述的技术从噬菌体抗体分离。单克隆抗体还包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的部分与从特定物种获得的抗体中的相应序列相同或同源,或者属于特定的抗体类或亚类,而链的其余部分与从另一物种获得的抗体中的相应序列相同或同源或者属于另一抗体类或亚类,以及这样的抗体的片段,只要它们表现出希望的生物活性(美国专利 4816567; 以及 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

还包括人源化单克隆抗体。在最大程度上,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区的具有希望特异性、亲和力和能力的残基取代。在一些情况中,人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基被相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包括在受体抗体或供体抗体中不存在的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体将基本上包括至少一个、并通常两个可变结构域的全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白序列的那些(高变环),并且全部或基本上全部的 FR 区是人免疫球蛋白序列的那些(FR 区)。该人源化抗体还可选地包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的恒定区。更多详情参见 Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); 以及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593- 596 (1992)。

“单链 Fv”或“sFv”抗体片段包括抗体的 V_H和 V_L结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv 多肽进一步包括 V_H和 V_L结构域之间的多肽接头,其能够使 sFv 形成用于抗原结合希望的结构。sFv 的综述参见 Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

术语“二抗体 (diabody)”指的是具有两个抗原结合位点的小抗体片段, 其片段包括连接至同一多肽链 (V_H-V_L) 中的轻链可变结构域 (V_L) 的重链可变结构域 (V_H)。通过利用接头 (其太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对), 这些结构域被迫与另一链上的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点。二抗体在如 EP 404097;WO93/11161 ; 以及 Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)中更充分地描述。

在整个本申请中所用的表达“线性抗体”指的是在 Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)中描述的抗体。简单地说, 这些抗体包括成对的串联 Fd 片段 ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$), 其形成成对的抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

为了表达抗体或抗体片段, 编码部分或全长轻链和重链的 DNA 被插入表达载体, 如质粒、逆转录病毒、粘粒、YAC、EBV 衍生的游离基因等。选择该表达载体和表达控制序列以便与所用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和抗体重链基因可以被插入分离的载体。在一些具体实施方式中, 两种基因被插入同一表达载体。

方便的载体是编码功能性完全的人 C_H 或 C_L 免疫球蛋白序列的载体。优选地, 改造限制性位点以便可以容易地插入和表达任何 V_H 或 V_L 序列。在这样的载体中, 剪接通常发生在插入的 J 区中的剪接供体位点和人 C 区前的剪接受体位点之间, 并且还在剪接区, 其发生在人 C_H 外显子内。多腺苷酸化和转录终止发生在编码区的天然染色体位点下游。该重组表达载体还可以编码信号肽, 其促进从宿主细胞分泌抗体链。

在一些具体实施方式中, TAJ 抗体 (或抗原结合抗体片段) 可以作为预形成的多肽直接给予, 或者通过核酸载体间接给予以阻断 TAJ 信号传导或复合物形成并允许有利的轴突长出。

用于制备和利用抗体、抗体片段以及同源物的技术在如 Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives (Basics: From Background to Bench), 1st edition, 2000, BIOS Scientific Publishers ; 以及 Osbourn (2003) *Drug Discov Today* 8(18):845-51 可以找到。

TAJ 多核苷酸拮抗剂

特定的具体实施方式包括提高神经突长出的方法，包括给予有效量的 TAJ 多核苷酸拮抗剂（其包括特异性结合至编码 TAJ 的多核苷酸的核酸分子）。TAJ 多核苷酸拮抗剂阻止 TAJ 的表达（剔除）。TAJ 多核苷酸拮抗剂包括但不限于反义分子、核酶、siRNA、shRNA 和 RNAi。通常，这样的结合分子单独地给予动物（参见，如 O'Connor, *J. Neurochem.* 56:560 (1991)），但是这样的结合分子还可以由多核苷酸在体内表达，该多核苷酸被宿主细胞摄取并在体内表达。还参 见 *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)。

RNAi 指的是 RNA 的表达，其干扰靶向的 mRNA 的表达。特别地，RNAi 通过与特异性 mRNA（如 TAJ）相互作用借助 siRNA（短干扰 RNA）沉默靶向基因。随后靶向 dsRNA 复合体用于通过细胞的降解。另外的 RNAi 分子包括短发夹 RNA（shRNA）；也称为短干扰发夹。该 shRNA 分子含有来自通过环连接的靶基因的有义和反义序列。shRNA 从细胞核运送至细胞质，它与 mRNA 一起被降解。Pol III 或 U6 启动子可以用于表达用于 RNAi 的 RNA。

RNAi 被双链 RNA（dsRNA）分子介导，其与它们的“靶标” mRNA 具有序列特异性的同源性 (Caplen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9742-9747, 2001)。在果蝇无细胞溶解

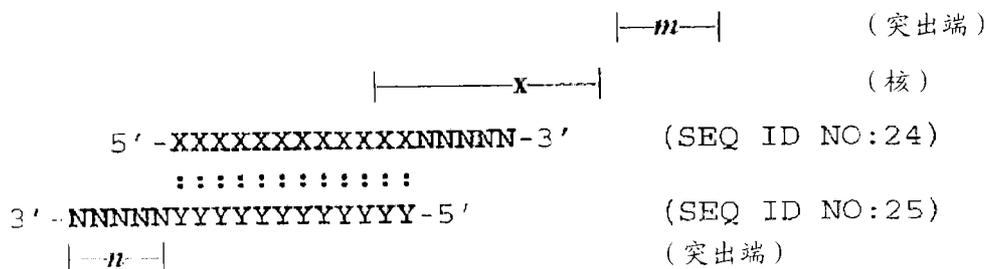
的产物中进行的生化研究表明，RNA 依赖性基因沉默的介质是 21-25 核苷酸“小干扰”RNA 双链体 (siRNA)。因此，siRNA 分子有利地用于本发明的方法中。siRNA 通过称作 DICER 的 RNA 酶从 dsRNA 的加工中获得(Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001)。看起来 siRNA 双链体产物被组装入称为 RISC(RNA 导致的沉默复合体)的多蛋白 siRNA 复合体。不希望被任何特定理论束缚，认为 RISC 被引导至靶标 mRNA，其中 siRNA 双链体特异性地与序列相互作用并以催化方式介导切割(Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001; Boutla *et al.*, *Curr Biol* 11:1776-1780, 2001)。

RNAi 已经用于分析基因功能以及鉴定哺乳动物细胞中重要的基因 (Elbashir *et al.*, *Methods* 26:199-213, 2002; Harborth *et al.*, *J Cell Sci* 114:4557-4565, 2001)，包括作为非限制性实例的神经元 (Krichevsky *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11926-11929, 2002)。还对 RNAi 的治疗形式进行评价，如抑制或阻断病毒的感染、复制和/或生长，包括但不限于脊髓灰质炎病毒 (Gitlin *et al.*, *Nature* 418:379-380, 2002) 和 HIV (Capodici *et al.*, *J Immunol* 169:5196-5201, 2002)，以及减少致癌基因的表达 (如，bcr-abl 基因；Scherr *et al.*, *Blood* Sep 26 epub ahead of print, 2002)。RNAi 已经被用于调节哺乳动物(小鼠)和两栖动物(异爪蛙)晶胚中的基因表达 (分别是 Calegari *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14236-14240, 2002; 和 Zhou, *et al.*, *Nucleic Acids Res* 30:1664-1669, 2002)，以及在出生后小鼠中的基因表达 (Lewis *et al.*, *Nat Genet* 32:107-108, 2002)，并且用于减少成年转基因小鼠中的转基因表达 (McCaffrey *et al.*, *Nature* 418:38-39, 2002)。用于决定细胞培养物中和体内的 siRNA 的效能和特异性的方法已经有描述 (参见，如 Bertrand *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 296:1000-1004,

2002; Lassus *et al.*, *Sci STKE* 2002(147):PL13, 2002; 和
Leirdal *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 295:744-748, 2002)。

介导 RNAi 的分子 (包括但不限于 siRNA) 可以通过以下方式在体外产生: 通过化学合成 (Hohjoh, *FEBS Lett* 521:195-199, 2002), dsRNA 的水解 (Yang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9942-9947, 2002), 通过借助 T7 RNA 聚合酶的体外转录 (Donzect *et al.*, *Nucleic Acids Res* 30:e46, 2002; Yu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6047-6052, 2002), 以及通过利用核酸酶 (如大肠杆菌 RNA 酶 III) 的双链 RNA 的水解 (Yang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9942-9947, 2002)。

siRNA 分子还可以通过两条寡核苷酸相互退火形成, 通常具有下面的通式结构, 其包括双链部分和单链部分:



其中 N、X、和 Y 为核苷酸; X 通过氢键连接至 Y; “:” 表示两个碱基之间的氢键; x 为具有 1 和约 100 之间的值的自然整数; 以及 m 和 n 是独立地具有 0 和约 100 之间的值的整数。在一些具体实施方式中, N、X、Y 独立地为 A、G、C 和 T 或 U。非天然存在的碱基和核苷酸可以存在, 尤其在合成 siRNA (即, 使两个寡核苷酸退火的产物) 的情况下。双链中心部分被称为“核”并且具有作为测量单位的碱基对 (bp); 单链部分为突出端, 具有作为测量单位的核苷酸 (nt)。所示突出端为 3' 突出端 (overhang), 但具有 5'

突出端的分子也在本发明的范围内。没有突出端的 siRNA 分子(即, $m = 0$, $n = 0$), 以及在核心的一侧具有突出物而在另一侧没有突出物的那些 (siRNA 分子)(如, $m = 0$, $n > 1$, 或反之亦然)也在本发明的范围内。

最初, RNAi 技术显得不容易应用于哺乳动物系统。原因是, 在哺乳动物中, dsRNA 激活 dsRNA-活化的蛋白激酶 (PKR), 导致调 亡 级 联 反 应 和 细 胞 死 亡 (Der *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3279-3283, 1997)。此外, 长期以来已知 dsRNA 激活哺乳动物细胞中的干扰素级联, 其也可以导致改变的细 胞 生 理 学 (Colby *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* 25:333, 1971; Kleinschmidt *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 41:517, 1972; Lampson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58L782, 1967; Lomniczi *et al.*, *J. Gen. Virol.* 8:55, 1970; and Younger *et al.*, *J. Bacteriol.* 92:862, 1966)。然而, dsRNA 介导的 PKR 和干扰素级联的激活需要长于约 30 个碱基对的 dsRNA。反之, 已显示长度少于 30 个碱基对的 dsRNA 会在 哺 乳 动 物 细 胞 中 产 生 RNAi (Caplen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9742-9747, 2001)。因此, 可以预期通过基本上没有较长的 dsRNA 的短 RNA 来避免与较长 dsRNA 分子相关的不希望的、非特异性作用。

关 于 siRNA 的 参 考 文 献 :

Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001; Boutla *et al.*, *Curr Biol* 11:1776-1780, 2001; Cullen, *Nat Immunol.* 3:597-599, 2002; Caplen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9742-9747, 2001; Hamilton *et al.*, *Science* 286:950-952, 1999; Nagase *et al.*, *DNA Res.* 6:63-70, 1999; Napoli *et al.*, *Plant Cell* 2:279-289, 1990; Nicholson *et al.*, *Mamm. Genome* 13:67-73, 2002; Parrish *et al.*, *Mol Cell* 6:1077-1087, 2000; Romano *et al.*, *Mol Microbiol* 6:3343-3353, 1992; Tabara *et al.*, *Cell* 99:123-132, 1999; and Tuschl, *ChemBiochem.* 2:239-245, 2001。

Paddison 等 (*Genes & Dev.* 16:948-958, 2002) 已经使用了折叠成发夹的小 RNA 分子作为实现 RNAi 的工具。因此, 这样的短发夹 RNA (shRNA) 分子也可有利地用于本发明所述的方法。功能性 shRNA 的主干和环的长度可以变化; 主干长度可变动于约 25 至约 30nt 的任何值, 而环大小可变动于 4 至约 25nt 之间同时不影响沉默活性。尽管不希望受任何特定理论束缚, 但可以相信这些 shRNA 类似于 DICER RNA 酶的 dsRNA 产物, 而且在任何情况下, 均具有相同的用于抑制特定基因表达的能力。

在本发明的一些具体实施例中, shRNA 由慢病毒载体 (如 pLL3.7) 表达。

反义技术可以用来通过反义 DNA 或 RNA 或者通过三重螺旋链形成以控制基因表达。反义技术描述在例如 Okano, *J. Neurochem.* 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) 中。三重螺旋链的形成描述在例如 Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241:456 (1988); and Dervan *et al.*, *Science* 251:1300 (1991) 中。所述方法基于多核苷酸结合于互补性 DNA 或 RNA。

例如, 编码 TAJ 的多核苷酸的 5' 编码部分可用来设计长度为约 10 至 40 个碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。DNA 寡核苷酸被设计为互补于涉及转录的基因的区域, 由此阻止转录和产生靶蛋白。反义 RNA 寡核苷酸在体内杂交于 mRNA, 并阻断 mRNA 分子翻译成靶多肽。

在一个具体实施方式中, 通过从外源性序列转录而在细胞内产生特异于 TAJ 基因的反义核酸。例如, 载体或其一部分经过转录, 产生反义核酸 (RNA)。这样的载体可保留游离或整合于染色体,

只要其可被转录而产生需要的反义 RNA。这样的载体可通过本领域标准化的重组 DNA 技术方法进行构建。载体可以为质粒、病毒或本领域中已知的其它载体，用于在脊椎动物细胞中的复制和表达。反义分子的表达可通过本领域已知的在脊椎动物（优选人类细胞，如本文其它地方所述的）中发挥作用的任何启动子。

尽管优选反义分子的绝对互补性，但并非必要。互补于编码 TAJ 的 RNA 至少一部分的序列指的是这样一个序列，其具有足够的互补性而能够与该 RNA 杂交，形成稳定的双链体；或者形成可测定的三重螺旋体。杂交能力取决于互补程度以及反义核酸的长度。通常，杂交核酸越大，其含有的碱基错配会越多，但仍然形成稳定双链体（视具体情况可为三重螺旋体）。本领域技术人员可利用标准步骤测定杂交复合物的熔点而确定可接受程度的错配。

互补于信使 RNA 5' 末端（例如 5' 未翻译序列直至并包括 AUG 起始密码子）的寡核苷酸，在抑制翻译方面应该最有效。然而，互补于 mRNA 的 3' 未翻译序列的序列已表明在抑制 mRNA 翻译方面也有效。通常参见 Wagner, R., *Nature* 372:333-335 (1994)。因此，互补于 5' 或 3' 未翻译、非编码区的寡核苷酸可用于反义途径以抑制 TAJ 的翻译。互补于 mRNA 的 5' 未翻译区的寡核苷酸应该包括 AUG 起始密码子的补体。互补于 mRNA 编码区的反义寡核苷酸是翻译的较低有效抑制剂，但可按照本发明使用。反义核酸长度应该至少为 6 个核苷酸，优选长度变动于 6 至约 50 个核苷酸的寡核苷酸。在特定方面，寡核苷酸为至少 10 个核苷酸、至少 17 个核苷酸、至少 25 个核苷酸或者至少 50 个核苷酸。

用于本文披露的治疗方法中的多核苷酸可以为 DNA 或 RNA 或其嵌合混合物或衍生物或修饰的形式，可为单链或双链。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸酯主链加以修饰，例如以改善所述

分子的稳定性、杂交等。寡核苷酸可以包括其它附属部分如肽（例如用于靶向于体内宿主细胞受体）或促进输送跨越细胞膜（见例如 Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556 (1989); Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648-652 (1987)); 于 1998 年 11 月 15 日公开的 PCT 公开 WO88/09810) 或血脑屏障(参见例如 1988 年 4 月 25 日公开的第 WO89/10134 号 PCT 公开申请案) 试剂、杂交启动的切割试剂（参见例如 Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958-976 (1988)）或嵌入剂（参见例如 Zon, *Pharm. Res.* 5:539-549(1988)）。为此，寡核苷酸可结合于另一个分子例如肽、杂交启动的交联剂、转移剂、杂交启动的切割剂等。

用于本文披露的治疗方法中的反义寡核苷酸可包括至少一个修饰的碱基部分，其选自以下的组，其包括但不限于 5 氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基胺甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基胺甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基 Q 核苷、肌苷、N-6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N-6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲胺甲基尿嘧啶、5-甲氧胺甲基-2-硫代尿嘧啶、 β -D-甘露糖基 Q 核苷、5'甲氧羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N-6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸 (v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q 核苷、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-甲基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸 (v)、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、3 (3-氨基-3-N2-羧基丙基) 尿嘧啶、(acp3) w、以及 2,6-二氨基嘌呤。

用于本文披露的治疗方法中的反义寡核苷酸还可以包括至少一个修饰的糖部分，其选自以下的组，其包括但不限于阿拉伯糖、2-氟代阿拉伯糖、木酮糖以及己糖。

在又一个具体实施方式中，用于本文披露的治疗方法中的反义寡核苷酸包括至少一个修饰的磷酸酯主链，其选自以下的组，其包括但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代氨基磷酸胺、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、烷基磷酸三酯、以及甲缩醛或其类似物。

在又一个具体实施方式中，用于本文披露的治疗方法中的反义寡核苷酸是 α -端基（差向）异构寡核苷酸。 α -端基异构寡核苷酸与互补 RNA 形成特异性双链杂交体，其中与通常情况相反的是，所述链彼此平行(Gautier *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641(1987))。寡核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148(1987))，或嵌合性 RNA-DNA 类似物(Inoue *et al.*, *FEBS Lett.* 215:327-330(1987))。

本发明的多核苷酸可利用本领域已知的标准方法合成，例如利用自动化 DNA 合成器（如可从 Biosearch, Applied Biosystems 等购得）。作为实例，硫代磷酸酯寡核苷酸可通过 Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988) 中的方法合成，甲基磷酸酯寡核苷酸可利用可控孔玻璃聚合物支持物来制备(Sarin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451(1988))等。

用于本文披露的治疗方法中的多核苷酸组合物进一步包括催化性 RNA 或者核酶（参见例如 1990 年 10 月 4 日公开的 PCT 国际公开 WO90/11364; Sarver *et al.*, *Science* 247:1222-1225 (1990)）。优选利用锤头核酶。锤头核酶在由与靶 mRNA 形成互补碱基对的侧翼

区所指定的位点切割 mRNA。唯一要求的是靶 mRNA 具有下列两个碱基的序列：5'-UG-3'。锤头核酶的构建和生产在本领域是熟知的，并且在 Haseloff and Gerlach, *Nature* 334:585-591 (1988) 中更充分的加以阐述。优选地，核酶被改造以使切割识别位点位于靶 mRNA 的 5' 末端附近，即以增加效率并将分子内非功能性 mRNA 转录本的堆积减少到最少。

如在反义方式中，用于本文披露的诊断和治疗方法的核酶可由修饰的寡核苷酸构成（例如，为了改善稳定性、靶向性等），并且可以递送至体内表达 TAJ 的细胞。编码核酶的 DNA 构建体可以如上所述导入反义编码 DNA 的相同方式被导入细胞。优选的递送方法涉及到在强构建性启动子如 pol III 或 pol II 启动子的控制之下利用“编码”该核酶的 DNA 构建体，以使转染的细胞产生足够量的核酶以破坏内源性 TAJ 信息以及抑制翻译。与反义分子不同，由于核酶是催化性的，所以为了达到效用需要较低的细胞内浓度。

反义

在一些具体实施反式中，可以利用反义核酸以通过与靶标 mRNA 杂交直接阻断 mRNA 的翻译并阻止蛋白质翻译来抑制 TAJ 表达。

“反义”核酸包括核苷酸序列，其互补于编码该组分的“有义”核酸，如互补于双链 cDNA 分子的编码链或互补于 mRNA 序列。因此，反义核酸可以与有义核酸形成氢键。反义核酸可以互补于整个编码链，也可以仅互补于其部分。例如，可以使用这样的反义核酸分子，其反义于编码该组分的核苷酸序列的编码链的“编码区”。

编码 TAJ 的编码链序列是已知的。因此，本领域的技术人员可以根据沃森和克里克碱基配对规则设计反义核酸。该反义核酸分子

可以互补于 mRNA 的整个编码区，但是更优选地，这样的寡核苷酸仅是反义于 mRNA 的编码或非编码区的部分。例如，该反义寡核苷酸可以互补于环绕 mRNA 的翻译起始位点的区域。反义寡核苷酸的长度可以例如为约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个核苷酸。可以利用本领域已知的方法（过程）利用化学合成和酶促连接反应构建反义核酸。例如，可以利用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸化学合成反义核酸（如反义寡核苷酸），其中修饰的核苷酸被设计以提高该分子的生物稳定性或提高反义和有义核酸之间形成的双链体的物理稳定性，例如可以使用硫代磷酸酯衍生物或吡啶取代的核苷酸。

可以用于产生反义核酸的修饰的核苷酸的实例包括 5 氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基胺甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基胺甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基 Q 核苷、肌苷、N-6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N-6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲胺甲基尿嘧啶、5-甲氧胺甲基-2-硫代尿嘧啶、 β -D-甘露糖基 Q 核苷、5'甲氧羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N-6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸 (v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q 核苷、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-甲基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸 (v)、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N2-羧基丙基)尿嘧啶、(acp3)w、以及 2,6-二氨基嘌呤。可替换地，该反义核酸可以利用表达载体生物地生成，其中核酸以反义方向被亚克隆入该表达载体中（即，从该插入的核酸转录的 RNA 将是感兴趣的靶标核酸的反义方向）。

核酶是能够催化 RNA 特异性切割的酶性 RNA 分子。核酶通过序列特异性地与互补靶标 RNA 杂交，随后内切核苷酸的切割而起作用。可以通过已知的技术鉴定可能的 RNA 靶标内的特异性核酶切割位点。更多的细节参见，如，Rossi, *Current Biology* 4, 469-471 (1994)，以及 PCT 公开第 WO 97/3355 号。

涉及 CNS 疾病的反义治疗的综述提供在 Jaeger, 2004, *Front Biosci.* 9:1720-7 中。

RNAi

在一些具体实施方式中，TAJ 基因的表达还可以利用 RNA 干扰 (“RNAi”) 来抑制。RNAi 是一种现象，其中双链 RNA (dsRNA) 引入细胞导致同源 mRNA 的降解。RNAi 在线虫 *Caenorhabditis elegans* 中首次发现，从那时起已经在许多生物体中发现 RNAi 起作用。本文所用的 “RNAi 核酸” 是其长度通常短于 50 个核苷酸的核酸序列，其在 mRNA 水平引起基因沉默。RNAi 核酸包括基因特异性短干扰 RNA (siRNA) 和双链 RNA (dsRNA)。

例如，在哺乳动物细胞中，长 dsRNA (>30 个核苷酸) 的引入可以引起强烈的抗病毒反应，举例为蛋白合成的非特异性抑制和 RNA 降解。RNA 干扰提供了 mRNA 水平的基因沉默的机制。近几年，RNAi 已经成为内源性和有效的基因特异性沉默技术，其利用双链 RNA (dsRNA) 以标记特定的转录体用于体内的降解。它还提供了用于基因剔除的有效和广泛应用的方法。此外，RNAi 技术可以用于治疗目的。如已经证明靶向 Fas 介导的凋亡的 RNAi 保护小鼠免于爆发型肝炎。RNAi 技术已披露于许多出版物中，如美国专利第 5919619 号、第 6506559 号和 PCT 公开第 WO99/14346、

WO01/70949、WO01/36646、WO00/63364、WO00/44895、WO01/75164、WO01/92513、WO01/68836、以及WO01/29058号中。

能够通过RNA干扰抑制基因表达的序列可以是任何长度的。如，该序列可以具有至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、100或更多个连续核苷酸。该序列可以为dsRNA或任何其它类型的多核苷酸，只要该序列可以形成功能性沉默复合体以降解靶标mRNA转录本。

在一个具体实施方式中，该序列包括短干扰RNA (siRNA) 或由短干扰RNA (siRNA) 组成。该siRNA可以为具有19-25个核苷酸的dsRNA。siRNA可以借助RNA酶III相关的核酸酶(称为Dicer)通过较长dsRNA分子的降解内源地生成。siRNA还可以被外源地引入细胞中，或者通过表达构建体的转录。一旦形成，siRNA与蛋白组分组装成含有内核糖核酸酶的复合体，称为RNA导致的沉默复合体(RISC)。该siRNA的ATP产生的解链激活RISC，其又通过沃森-克里克碱基配对靶向互补的mRNA转录物，由此切割并破坏该mRNA。mRNA的切割发生在由siRNA链连接的该区域的中部附近。该序列特异性mRNA降解导致基因沉默。

可以采用至少两个方法获得siRNA介导的基因沉默。第一，siRNA可以在体外合成并引入细胞内以短暂抑制基因表达。合成的siRNA提供了获得RNAi的容易且有效的途径。siRNA是短混合寡核苷酸的双链体，其可以包括例如具有对称的二核苷酸3'突出端的19 RNA核苷酸。利用合成的21bp siRNA双链体(例如，19RNA碱基，接着为UU或dTdT 3'突出端)，在哺乳动物细胞中可以获得序列特异性基因沉默。这些siRNA可以在哺乳动物中特异性地抑制靶标基因翻译而不导致通过较长dsRNA的DNA依赖性蛋白激酶(PKR)的活化，其导致许多蛋白的翻译的非特异性抑制。SiRNA可以在体内由载体表达。

载体

包含编码 TAJ 拮抗剂的核酸的载体也可以用于生产用于本发明方法中的拮抗剂。载体和这样的核酸可操作地连接至其的表达控制序列的选择取决于所希望的功能性（例如蛋白表达）、以及待转化的宿主细胞。

在典型的具体实施方式中，在本文所述的组合物和方法中所用的 TAJ 多肽为由细胞（例如 CHO 细胞）产生的重组蛋白，该蛋白运载编码该蛋白的外源性核酸。在另外的具体实施方式中，该重组多肽通过通常称为基因活化的方法生成，其中运载外源性核酸（包括启动子或增强子）的细胞被可操作地连接至编码该多肽的内源性核酸。

用于制备重组多肽（例如，重组 TAJ 或其片段）的常规技术可以用于构建编码感兴趣的多肽的表达载体，该过程利用合适的转录/翻译控制信号和蛋白编码序列。（参见，如，Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory 2001)）。这些方法可以包括体外重组 DNA 和合成技术和体内重组，如体内同源重组。编码多肽的核酸序列的表达可以由可操作地连接至多肽编码序列的第二核酸序列所调节，以便该多肽在转化有重组 DNA 分子的宿主中进行表达。

对于调节可操作连接的编码序列的表达很有用的表达控制因子在本领域是已知的。实例包括但不限于诱导性启动子、构建性启动子、分泌信号、以及其它调节性因子。当使用诱导性启动子时，其例如可通过宿主细胞介质中的营养状况变化、或温度变化而被控制。

能够在细菌或真核宿主中被复制的表达载体（包括编码多肽的核酸）被用于转染宿主，并由此直接表达这样的核酸以产生多肽，其随后可以被分离。优选地，哺乳动物表达载体含有原核序列（以促进细菌中该载体的增殖）和一个或多个在真核细胞中表达的真核转录单位。pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 和 pHyg 衍生的载体是适用于真核细胞转染的哺乳动物表达载体的实例。用于利用外源性 DNA 序列来转染细胞的常规技术可以用于本发明。转染方法可以包括：化学方法，例如磷酸钙、DEAE-葡聚糖、或脂质体；或物理方法，例如显微注射或电穿孔。转染的细胞通过常规技术培养生长。例如，参见 Kuchler *et al.* (1977) *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*。表达产物在这些系统中（其中该蛋白由宿主细胞分泌）从细胞培养基分离，或者在通过如常规的机械、化学、或酶促方法破坏宿主细胞系统后从细胞悬液分离。

还可以利用已经通过其它方法（包括基因靶向和基因活化）被遗传修饰的细胞实施这些方法（参见 Treco *et al.* WO 95/31560，通过引用方式合并于此作为参考；还参见 Selden *et al.* WO 93/09222）。

载体可包括原核复制子，即具有在细菌宿主细胞中引导自主复制并保持染色体外的重组 DNA 分子的能力的 DNA 序列。这样的复制子在本领域是熟知的。另外，包括原核复制子的载体还可以包括其表达赋予可检测标记如药物耐受性的基因。细菌药物抗性基因的实例为对氨苄青霉素（ampicilin）或四环素赋予抗性的那些基因。

包括原核复制子的载体也可包括原核或抗菌素启动子用于引导细菌宿主细胞中的编码基因序列的表达。与细菌宿主相容的启动子序列通常在含有用于便利待表达 DNA 片段插入的限制位点的质

粒载体中提供。这样的质粒载体的实例为 pUC8、pUC9、pBR322 和 pBR329 (BioRad)、pPL 以及 pKK223 (Pharmacia)。任何合适的原核宿主可以用于表达编码用于本发明方法中的蛋白的重组 DNA 分子

对于本发明来说,可以采用大量的表达载体系统。例如,一类载体利用 DNA 因子,其衍生自动物病毒如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录酶病毒 (RSV, MMTV 或 MOMLV) 或 SV40 病毒。其它涉及具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统的应用。另外,已将 DNA 并入其染色体中的细胞可以通过引入允许选择转染的宿主细胞的一个或多个标记物加以选择。标记物可以为自养宿主提供原营养、杀生剂抗性(例如抗生素)或对重金属如铜的耐受性。该可选择的标记基因可以或者直接连接至待表达的 DNA 序列、或者通过共转化引入到同一细胞中。新霉素磷酸转移酶(neo)基因是可选标记基因的一实例(Southern et al., *J. Mol. Anal. Genet.* 1:327-341 (1982))。还可以需要其它因子用于 mRNA 的最佳合成。这些因子可以包括信号序列、剪接信号、以及转录启动子、增强子、和终止信号。

在一个具体实施方式中,可以使用 Biogen IDEC, Inc.的称为 NEOSPLA 的所有表达载体(美国专利 6,159,730)。这种载体含有细胞巨化病毒启动子/增强子、小鼠 β 球蛋白主启动子、SV40 复制源、牛生长素多腺苷酸化序列、新霉素磷酸转移酶外显子 1 和外显子 2、二氢叶酸还原酶基因以及前导序列。已发现这种载体导致在 CHO 细胞中转染的非常高水平的表达,接着是在含有介质的 G418 中的选择和氨甲喋呤扩增。当然,能够在真核细胞中引导表达的任何表达载体可以用于本发明。合适的载体的实例包括但不限于质粒 pcDNA3、pHCMV/Zeo、PCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、以及质

粒 pCI (可获自 Promega, Madison, WI)。另外的真核细胞表达载体在本领域是已知的并且可商业性获得。通常,这样载体含有用于插入希望的 DNA 片段的便利限制位点。示例性载体包括 pSVL 和 pKSV-10 (Pharmacia)、pBPV-1、pml2d (International Biotechnologies)、pTDT1 (ATCC 31255)、逆转录酶病毒表达载体 pMIG 以及 pLL3.7、腺病毒穿梭载体 pDC315、以及 AAV 载体。其它示例性载体系统披露于例如美国专利 6,413,777 中。

通常,筛选大量用于适宜表达高水平的拮抗剂的转化细胞是常规实验,其可由例如机器人系统来完成。

经常使用的用于哺乳动物宿主细胞表达的调节序列包括在哺乳动物细胞中引导高水平的蛋白质表达的病毒因子,如衍生自逆转录酶病毒 LTR、细胞巨化病毒 (CMV) (如 CMV 启动子/增强子)、猿病毒 40 (SV40) (如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒 (例如腺病毒主要后启动子 (AdmlP)) 的启动子和增强子,多瘤和大哺乳动物启动子如本身的免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。对于病毒调节性因子及其序列的进一步描述,参见例如 Stinski 的美国专利第 5,168,062 号; Bell 的美国专利第 4,510,245 号; 以及 Schaffner 的美国专利第 4,968,615 号。

重组表达载体可以带有调节在宿主细胞 (例如,复制源) 和可选标记基因中载体的复制的序列。可选标记基因促进宿主细胞 (载体已被引入其中) 的选取 (参见,例如 Axel 的美国专利第 4,399,216、4,634,665 以及 5,179,017 号)。例如,通常可选标记基因对在宿主细胞 (载体已被引入其中) 上的药物如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤赋予抗性。经常使用的可选标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于具有甲氨蝶呤选择/扩增的 dhfr-宿主细胞) 以及 neo 基因 (用于 G418 选择)。

编码 TAJ 拮抗剂的载体可被用于合适宿主细胞的转化。可以通过任何合适的方法进行转化。用于将外源 DNA 引入哺乳动物细胞中的方法在本领域是熟知的并且包括葡聚糖介导转染、磷酸钙沉淀、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物 (polybrene) 介导转染、原生质体融合、电穿孔、脂质体中的多核苷酸的囊化 (encapsulation), 并将 DNA 的显微注射导入细胞核中。另外, 核酸分子可以通过病毒载体引入哺乳动物细胞中。

宿主细胞的转化可通过适合于采用载体和宿主细胞的传统方法来完成。对于原核宿主细胞的转化, 可采用电穿孔和盐处理方法 (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-14 (1972))。对于脊椎动物细胞的转化, 可采用电穿孔、阳离子脂类或盐处理方法。参见例如 Graham et al., Virology 52:456-467 (1973); Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-76 (1979)。

用于蛋白质表达的宿主细胞系最有选为哺乳动物源; 相信本领域的技术人员具有优先确定特定宿主细胞系 (其最佳地适合于在其中待表达的所希望的基因产品) 的能力。示范性宿主细胞系包括但不限于 NSO、SP2 细胞、幼年仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人肝细胞癌细胞 (例如 Hep G2)、A549 细胞 DG44 以及 DUXB11 (中华仓鼠卵巢系, 没有 DHFR)、HELA (人宫颈癌)、CVI (猴肾系)、COS (具有 SV40 T 抗原的 CVI 的衍生物)、R1610 (中华仓鼠成纤维细胞)、BALBC/3T3 (小鼠成纤维细胞)、HAK (仓鼠肾系)、SP2/O (小鼠骨髓瘤)、P3x63-Ag3.653 (小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT (牛内皮细胞)、RAJI (人淋巴细胞) 以及 293 (人肾)。宿主细胞系通常可从商业服务点、美国组织培养中心或从公开文献获得。

来自生产细胞系的多肽的表达可利用已知技术来增强。例如, 谷酰胺合成酶 (GS) 系统通常在某种条件下用于增强表达。参见例

如欧洲专利第 0216 846、0 256 055、和 0 323 997 号以及欧洲专利申请第 89303964.4 号。

宿主细胞

用于表达用于本发明方法中的 TAJ 拮抗剂的宿主细胞可以是原核或真核细胞。示例性真核宿主细胞包括但不限于酵母细胞和哺乳动物细胞例如中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (ATCC 登记号 CCL61)、NIH 瑞士小鼠胚胎细胞 NIH-3T3 (ATCC 登记号 CRL1658)、以及幼年仓鼠肾细胞 (BHK)。其它有用的真核宿主细胞包括昆虫细胞以及植物细胞。示例性原核宿主细胞是大肠杆菌和链霉菌 (*Streptomyces*)。

如本文所述通过培养的细胞产生的多肽可以作为分泌的多肽从培养基中回收, 或者, 如果它没有通过细胞分泌, 则它可以从宿主细胞裂解产物中回收。作为分离多肽的第一步, 该培养基或裂解产物通常被离心以除去微粒细胞碎片。其后该多肽从混合可溶性蛋白和其它细胞成分分离并优选纯化, 其中以下是示例性的合适纯化步骤: 在免疫亲和力或离子交换柱上分馏; 乙醇沉淀; 反相 HPLC; 在硅胶或阳离子交换树脂 (如 DEAE) 上进行层析; 色谱聚焦; SDS PAGE; 硫酸铵沉淀; 以及凝胶过滤, 例如采用 Sephadex™ 柱 (Amersham Biosciences)。在纯化期间可以采用蛋白酶抑制剂以抑制蛋白水解的降解。本领域的技术人员将理解, 考虑到在重组细胞培养物中表达后多肽性质的变化, 适用于感兴趣的多肽的纯化方法可能需要改变。

多肽的纯化可能需要使用如亲和色谱法、常见的离子交换色谱、分级色谱、疏水相互作用色谱、反相色谱、凝胶过滤或其它常见的蛋白纯化技术。参见, 如 Deutscher, ed. (1990) "Guide to Protein Purification" in *Methods in Enzymology*, Vol. 182。

细胞治疗

在本发明的一些具体实施方式中，在治疗方法中给予可溶性 TAJ 多肽，其包括：（1）用核酸（例如载体，其表达 TAJ 多肽）转化或转染的可植入宿主细胞；以及（2）在疾病、病症或创伤的部位将转化的宿主细胞植入哺乳动物中。例如，该转化的宿主细胞可以在脊髓损伤部位植入。在本发明的一些具体实施方式中，该可植入的宿主细胞从哺乳动物去除、短暂培养、用分离的编码 TAJ 多肽的核酸转化或转染、以及植回到同一哺乳动物（其从该哺乳动物中去除）。该细胞可以但不要求从其被植入的同一位置被去除。这样的具体实施方式，有时称为来自体内的基因治疗，可以提供 TAJ 多肽的持续供应、定位于起作用的部位、在有限的时间期内。

基因治疗

利用治疗神经系统疾病、失调或损伤的基因治疗方法（其中治疗性有益地增进少突细胞的存活、增生以及分化或增进神经元的髓鞘生成），在哺乳动物（例如人类患者）体内可产生 TAJ 拮抗剂。这涉及给予合适的编码核酸（其可操作地连接至合适的表达控制序列）的 TAJ 拮抗剂。通常，这些序列被并入载体中。用于这样的基因治疗的合适病毒载体包括腺病毒载体、甲病毒载体、肠道病毒载体、痘病毒、慢病毒载体、杆状病毒载体、疱疹病毒载体、痘病毒载体、牛痘病毒载体、腺相关病毒载体以及单纯疱疹病毒载体。病毒载体可以是复制缺陷型病毒载体。通常使用在其 E1 基因或 E3 基因中具有缺失的腺病毒载体。当使用腺病毒载体时，该载体通常不具有可选标记基因。

可以以任何生物学上有效的载体例如任何能够在体内将 TAJ 基因有效递送至细胞的制剂或组合物递送 TAJ 多肽的表达构建体。方法包括将主题基因（subject gene）插入病毒载体，该病毒载体包括

重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒-1、或者重组细菌或真核质粒。病毒载体直接转染细胞；质粒 DNA 可以通过以下物质递送：例如，阳离子脂质体（lipofectin）或衍生化（例如抗体轭合）、多熔素共轭物、短杆菌肽 S、人造病毒外壳或其它这样的细胞内载体，以及通过基因构建体的直接注射或者在体内实施 CaPO_4 沉淀。

用于将核酸体内引入细胞的优选方法是借助含有核酸的病毒载体，例如编码 TAJ 多肽的 cDNA，或 TAJ 反义核酸。用病毒载体感染细胞的优点在于大比例的靶标细胞可以接受该核酸。此外，在病毒载体内编码的分子，例如通过包含在病毒载体内的 cDNA，在已经摄取了病毒载体核酸的细胞内有效地表达。

逆转录病毒载体和腺相关病毒载体可以用作重组基因递送系统，用于在体内将外源性基因转移入尤其是人。这些载体将基因有效地递送入细胞内，并且转移的核酸被稳定地整合入宿主的染色体 DNA。特化的细胞系（称为“包装细胞”（packaging cell））（其仅产生复制缺陷型逆转录病毒）的发育增加了逆转录病毒用于基因治疗的效用，并且缺陷型逆转录病毒特征为在用在基因转移中用于基因治疗目的。复制缺陷型逆转录病毒可以被包装为病毒粒子，其可以被用于通过标准技术利用辅助病毒感染靶标细胞。用于产生重组逆转录病毒的方法和用于在体外或体内用这样的病毒感染细胞的方法可以在 M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. 和其它标准实验室手册中找到。合适的逆转录病毒的实例包括：pLJ、pZIP、pWE 和 pEM，其对于本领域的技术人员来说是已知的。合适的用于制备嗜亲性和双嗜性逆转录病毒系统的包装病毒系包括 .psi.Crip、.psi.Cre、.psi.2、和 .psi.Am。逆转录病毒已经用于在体

外和/或体内将多种基因引入许多不同的细胞类型，包括上皮细胞，（参见，如，Eglitis, *et al.* (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et al.* (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay *et al.* (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu *et al.* (1993) *J. Immunol.* 150:4104-4115; 美国专利第 4868116 号; 美国专利第 4980286; PCT 申请 WO 89/07136; PCT 申请 WO 89/02468; PCT 申请 WO89/05345; 以及 PCT 申请 WO 92/07573)。

用于本发明的另一病毒基因递送系统利用腺病毒衍生的载体。腺病毒的基因组可以被操作以便它编码并表达感兴趣的基因产物，但是根据其在正常细胞溶解的病毒生命周期中复制的能力失活。参见，例如，Berkner *et al.* (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld *et al.* (1991) *Science* 252:431-434; 以及 Rosenfeld *et al.* (1992) *Cell* 68:143-155。从腺病毒菌株 Ad 5 d1324 型或腺病毒的其它菌株（例如 Ad2、Ad3、Ad7 等）获得的合适腺病毒载体对本领域的技术人员来说是已知的。在一些情况下，重组腺病毒是有利的，因为它们不能感染不分裂的细胞并且能够被用于感染多种细胞类型，包括上皮细胞（前面提到的 Rosenfeld *et al.* (1992)）。此外，病毒颗粒相对稳定并适于纯化和浓缩，这样，可被修饰以便影响感染谱。另外，引入的腺病毒 DNA（和其中包含的外来 DNA）不被整合入宿主细胞的基因组中，保持游离，由此避免了可能的问题，该问题由于在原位的插入突变（其中引入的 DNA 被整合入宿主基因组（如逆转录病毒 DNA）而发生。此外，相对于其它基因递送载体，腺病毒基因组对外来 DNA 的运载能力较大（达到 8 千碱基）(Berkner *et al.* cited *supra*; Haj-Ahmand and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267)。

而另一种用于递送主题基因的病毒载体系统是腺相关病毒 (AAV)。综述见 Ali, 2004, *Novartis Found Symp.* 255:165-78; and Lu, 2004, *Stem Cells Dev.* 13(1):133-45。腺相关病毒是天然存在的缺陷病毒, 其需要另一病毒 (例如腺病毒或疱疹病毒) 作为辅助病毒用于有效的复制和繁殖生命周期 (综述参见 Muzyczka *et al.* (1992) *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129)。它还是可以将其 DNA 整合入不分裂的细胞的少数病毒之一, 并且展示出稳定整合的高频率 (参见, 如, Flotte *et al.* (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; 以及 McLaughlin *et al.* (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973)。含有 300 个 AAV 的 300 个碱基对这么少的载体可以被包装并可以整合。用于外源性 DNA 的空间限于约 4.5kb。AAV 载体 (如 Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 中描述的载体) 可以用于将 DNA 引入细胞。已经利用 AAV 载体将许多核酸引入不同的细胞类型 (参见, 如, Hermonat *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford *et al.* (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin *et al.* (1984) *J. Virol.* 51:611-619; 以及 Flotte *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790)。

除了病毒转移方法, 如上所述, 非病毒方法也可以用于引起 TAJ 多肽、片段、或类似物在动物的组织中的表达。基因转移的大多数非病毒方法依赖于哺乳动物细胞中用于大分子的摄取和细胞内转运的通常机制。在优选的具体实施方式中, 本发明的非病毒基因递送系统依赖于靶标细胞摄取主题 TAJ 基因的内吞途径。这种类型的示例性的基因递送系统包括脂质体来源的系统、多熔素共轭物、以及人工病毒外壳。其它具体实施方式包括质粒注射系统, 如在 Meuli *et al.* (2001) *J Invest Dermatol.* 116(1):131-135 ;

Cohen *et al.* (2000) *Gene Ther* 7(22):1896-905; 或 Tam *et al.* (2000) *Gene Ther* 7(21):1867-74 中所描述的。

在代表性的具体实施方式中，编码 TAJ 多肽、活性片段、或类似物的基因可以被捕获入表面带有阳性电荷脂质体中（如 lipofectins）并且（可选地）其被标记以用于靶标组织的细胞表面抗原的抗体（Mizuno *et al.* (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551; PCT 公开 WO91/06309; 日本专利申请 1047381; 以及欧洲专利申请 EP-A-4075）。

在临床环境中，用于治疗性 TAJ 基因的基因递送系统可以通过多种方法中的任何一种来引入患者中，这些方法的每一种在本领域是熟知的。例如，基因递送系统的药物制剂可以通过如静脉内注射系统地引入，并且靶细胞中蛋白的特异性转导主要根据由基因递送载体、细胞型或组织型表达提供的转染的特异性发生，这是由于转录调节序列控制受体基因或其组合物的表达。在其它具体实施方式中，重组基因的最初递送更受限，同时很定位地引入动物。例如，基因递送载体可以通过导管（参见美国专利第 5328470 号）或通过定向注射（参见 Chen *et al.* (1994) *Pros. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057）被引入。

基因治疗构建体的药物制剂可以基本上由在可接受稀释剂中的基因递送系统组成，或者可以包括其中基因递送载体被包埋的缓释基质。可替换地，其中完整的基因递送系统可以从重组细胞中完整地生成，如逆转录病毒载体，药物制剂可以包括一种或多种产生该基因递送系统的细胞。

关于基因治疗（尤其是治疗本文所述的 CNS 疾病或病症）的指导可以在以下文献中找到：如，美国专利申请第 2002/0193335 号（提供了将基因治疗载体或转化的细胞递送至神经组织的方法）；美国

专利申请第 2002/0187951 号(提供了利用到达哺乳动物的脑或神经系统的慢病毒载体治疗神经变性病的方法); 美国专利申请第 2002/0107213 (披露了用于治疗 and 防止神经变性病的基因治疗载体和方法); 美国专利申请第 2003/0099671 号 (披露了适于将基因递送至 CNS 的突变的狂犬病病毒); 以及美国专利第 6436708 号 (披露了导致整个脑长期表达的基因递送系统); 美国专利第 6140111 号 (披露了适用于各种疾病治疗中的人类基因治疗的逆转录病毒载体); 以及 Kaspar *et al.* (2002) *Mol Ther.* 5:50-6; Suhr *et al* (1999) *Arch Neurol.* 56:287-92; 以及 Wong *et al.* (2002) *Nat Neurosci* 5, 633-639)。

药物组合物

在本发明方法中使用的 TAJ 拮抗剂可以被配制成药物组合物用于给予至哺乳动物, 包括人。在本发明方法中使用的药物组合物包括药用载体 (carrier), 其包括例如离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、水、盐或电解质如鱼精蛋白硫酸盐、磷酸氢二钠、胶体硅、三硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、石蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇以及羊毛脂。

在本发明方法中使用的组合物可以通过任何合适的方法给予, 例如非肠道、心室内、口服、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻内、口腔、阴道或借助于移植库 (implanted reservoir) 进行给予。如在本发明中所使用的术语“非肠道”包括皮下、静脉内、肌内、动脉内、滑膜内 (intra-synovial)、胸内 (intrasternal)、鞘内、肝内、伤口内以及头颅内注射或灌注技术。如前所述, 本发明的方法中所用的 TAJ 拮抗剂在神经系统中起作用以促进神经元存活、神经突长出、和/或神经元再生。因此, 在本发明的方法中, TAJ 拮抗剂以这样的方

式被给予，其中它们穿越血-脑屏障 (blood-brain barrier)。这种穿越可由 TAJ 拮抗剂分子本身固有的物化性质所导致、由药物制剂中的其它成分所导致、或由使用机械装置如针、插管或手术器械来破坏血-脑屏障。在 TAJ 拮抗剂是本身不会穿越血-脑屏障的分子的情况下，例如融合至促进穿越的部分，合适的给予路径是例如鞘内或头颅内给予，例如直接给予到 MS 的慢性伤口内。在 TAJ 拮抗剂是本身可穿越血-脑屏障的分子的情况下，给予的路径可以是下述的各种路径中的一种或多种。

在本发明方法中所使用的组合物的无菌可注射剂型可以为含水或含油悬浮液。这些悬浮液可以利用合适的分散剂或润湿剂以及悬浮剂根据本领域已知技术制成。该无菌、可注射制剂还可以是在非毒性肠道外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌、可注射溶液或悬浮液，例如作为在 1,3-丁二醇中的悬浮液。在可接受赋形剂和溶剂之中，可以被采用的是水、林格氏溶液、以及等渗氯化钠溶液。另外，无菌、固定油（不挥发性油，fixed oil）通常被用作溶剂或悬浮介质。这样，可以使用任何刺激性小的固定油，包括合成的单-或二-甘油酯。脂肪酸如油酸及其甘油酯衍生物作为天然药用油在可注射的制剂中很有用，如橄榄油或蓖麻油，尤其是以其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂如羧甲基纤维素或类似分散剂，其通常用于药用剂型（包括乳液和悬浮液）的制剂中。对于制剂来说，还可以使用其它通常使用的表面活性剂如吐温、司盘以及其它乳化剂或生物可用增强子，其通常用于制造药用固体、液体、或其它剂型。

含有本文所述的试剂（例如，TAJ 多肽、抗 TAJ 抗体、或 TAJ 抗体的抗原结合片段）的组合物可以包含合适的药学上可接受载体。例如，它们可以含有赋形剂和/或辅剂，其促进将活性化合物加工成被设计为递送至作用位点的制剂。用于肠胃外给予的合适制剂

包括水可溶形式的活性化合物的水溶液，例如，水溶性盐。此外，可以给予作为合适的油性注射悬浮液的活性化合物的悬浮液。合适的亲脂性溶剂或赋形剂包括脂肪油，例如芝麻油，或合成的脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯。水性注射悬浮液可以包含提高该悬浮液的粘性的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和葡聚糖。可选地，该悬浮液也可以包含稳定剂。脂质体还可以用于包封本发明的分子用于递送入细胞内或胞间隙。示例性的药学上可接受载体是生理上相容的溶剂、分散介质、涂覆物、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、水、盐水、磷酸缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等。在一些具体实施方式中，该组合物包括等渗剂例如糖，多元醇例如甘露醇、山梨糖醇、或氯化钠。在一些具体实施方式中，该组合物包括药学上可接受的物质，如湿润或少量的辅助物质，例如湿润或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其提高了该活性成分的储存期限或有效性。

非肠道制剂可以是单一推注剂量、注射液或加载推注剂量接着是维持剂量。这些组合物可以以特定固定的或可变间隔期例如每天一次或基于“根据需要”的间隔期加以给予。

在本发明方法中使用的某些药物组合物可以以可接受的剂型，例如胶囊剂、片剂、水性悬浮液或溶液口服给予。某些药物组合物也可以通过鼻内气雾剂或吸入进行给予。这样的组合物可以被制成在盐水中的溶液，采用苯甲醇或其它合适的防腐剂、吸收促进剂以增强生物可利用度、和/或其它传统稳定剂或分散剂。

本发明的组合物可以为各种形式，包括例如液体剂型（如可注射和难溶溶液）、分散剂型、悬浮剂型、半固体剂型和固体剂型。优选的形式取决于给予方式和治疗用途。用于治疗中枢神经系统中的组织，给予可以通过例如注射或注入脑脊髓液（CSF）。给予还可以结合一种或多种能够促进 TAJ 多肽穿过血脑屏障的试剂。

该组合物可以被配制为溶液、微型乳剂、分散剂、脂质体、或其它适于高药物浓度的规则结构。无菌注射溶液可以通过将需要量的活性成分组合到具有一种上述所列成分或上述所列成分的组合的合适溶剂中加以制备，如需要，随后进行过滤灭菌。通常，分散剂通过将活性成分组合入无菌赋形剂（含有基本分散介质和需要的来自上述列举的物质的其他成分）中制备。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，制备的优选方法是真空干燥和冷冻干燥，其形成活性成分和任何来自先前无菌过滤溶液的其它需要的成分的粉末。可以通过以下方式维持溶液的适当流动性，例如通过如卵磷脂的涂覆物、在分散的情况下通过维持所需要的粒度、以及通过使用表面活性剂。可注射组合物的吸收延长可以通过将吸收延迟的试剂（例如，单硬脂酸盐和明胶）包含在组合物中而获得。

该活性成分可以与控释制剂或装置进行配制。这样的制剂和装置的实例包括：植入物、经皮片、和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解、生物相容性的聚合物，如乙烯基醋酸乙烯酯、聚酐、聚羟基乙酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸。用于制备这样的制剂和装置的方法在本领域是已知的。参见，例如，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

可以通过在可生物降解的聚合物（如聚交酯-聚乙交酯）中形成微囊化的药物基质来制备可注射的贮存（depot）制剂。依赖于药物与聚合物的比例以及采用聚合物的性质，药物释放的速率可以被控制。其它示例性的生物可降解聚合物是聚原酸酯和聚酐。还可以通过将药物捕获入脂质体或微乳中制备贮存的注射的制剂。

补充的活性化合物可以被并入该组合物。在一些具体实施方式中，TAJ多肽、抗TAJ抗体或其片段与抗NgR1抗体或其抗原结合片段共同给予。

TAJ 拮抗剂（其可以与载体物质结合以产生单剂型）的量根据所处理的宿主、所用拮抗剂的类型和给予的具体方式而变化。该组合物可以作为单剂量、多剂量或注射中确定的时间给予。给药方案还可以调整以提供最佳的理想响应（如治疗性或预防性响应）。

本发明的方法使用“治疗有效量”或“预防有效量”的 TAJ 拮抗剂。这样的治疗或预防有效量可以根据许多因素（如疾病状态、年龄、性别、个体的重量）来变化。治疗或预防有效量还指这样的量，其中治疗有利作用超过任何毒性或有害作用。

用于任何特定患者的特定给药和治疗方案依赖于各种因素，包括所用的特定 TAJ 拮抗剂、患者的年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、以及给药时间、排泄率、联合用药、以及要治疗的具体疾病的严重性。医疗者（caregiver）对这样的因素的判断是在本领域普通技术人员的能力范围内。该量还将依赖于要治疗的个体患者、给药途径、制剂类型、所用化合物的性质、疾病的严重性、想希望的效果。所用的量可以通过本领域技术人员熟知的药理学和药物动力学原理确定。

可以调整给药方案以提供最佳的希望响应。例如，可以给予单一推注、可以随时间给予若干单独的剂量、或者该剂量可以根据治疗情况的紧急程度成比例地减少或增加。以剂量单位形式配制肠胃外组合物是有利的，方便给予和剂量的一致性。参见，如，Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA 1980)。

除了活性化合物，液体剂型可以包含无活性成分，如水、乙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇、以及山梨糖醇的脂肪酸酯。

在本发明的方法中，TAJ拮抗剂通常可以直接脑心室内或鞘内地给予至神经系统，如进入MS的慢性病灶。根据本发明的方法，用于给予的组合物可以被配制以便以每天0.001-10mg/kg体重的剂量给予TAJ拮抗剂多肽。在本发明的一些具体实施方式中，该剂量为每天0.01-1.0mg/kg体重。在一些具体实施方式中，该剂量为每天0.001-0.5mg/kg体重。

对于TAJ拮抗剂抗体的治疗，该剂量可以在如宿主体重的约0.001到100mg/kg，更通常为0.01到5mg/kg（如，0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg等）的范围内。例如，剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内，优选至少1mg/kg。上述范围内的剂量中间值也在本发明的范围内。患者可以被给予这样的剂量，给予时间为每天、交替的天、每周或根据由试验分析确定的任何其它时间表。示例性的治疗需要以多剂量在较长时间内（如至少六个月）给予。其它示例性的治疗方案需要每2周给予一次或每个月一次或每3-6个月一次。示例性的剂量时间表包括在连续多天的1-10mg/kg或15mg/kg，在交替的多天的30mg/kg或每周60mg/kg。在一些方法中，具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体被同时给予，其中给予的每种抗体的剂量落入规定的范围内。

在某些具体实施方式中，受治疗者可用编码TAJ拮抗剂多肽的核酸分子来治疗。核酸的剂量范围为每个患者约10ng至1g、100ng至100mg、1 μ g至10mg、或30-300 μ g DNA。用于感染性病毒载体的剂量在每剂量10-100或更多病毒颗粒变化。补充活性化合物也可组合到用于本发明方法中的组合物中。例如，可溶性TAJ多肽或融合蛋白可以与一种或多种另外的治疗剂共配制和/或共同给予。本发明包括任何合适的将TAJ拮抗剂递送至所选靶组织的方法，包括水

溶液的推注或控释系统的植入。控释植入物的应用减少对重复注射的需要。

用于本发明方法中的 TAJ 拮抗剂可直接注入脑中。用于化合物的直接脑注入的各种植入物是已知的，并且有效将治疗化合物递送至患有神经性失调的人患者。这些包括利用泵来慢慢注入大脑中、定向植入、暂时性空隙导管、永久性头颅内导管植入、以及手术植入的生物可降解植入物。参见例如 Gill *et al.*, *supra*; Scharfen *et al.*, “High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas,” *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24(4):583-591 (1992); Gaspar *et al.*, “Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas,” *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 43(5):977-982 (1999); chapter 66, pages 577-580, Bellezza *et al.*, “Stereotactic Interstitial Brachytherapy,” in Gildenberg *et al.*, *Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery*, McGraw-Hill (1998); and Brem *et al.*, “The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial,” *J. Neuro-Oncology* 26:111-23 (1995)。

该组合物还可包含分散在生物相容性载体材料（充当用于化合物的合适递送或支撑系统）中的 TAJ 拮抗剂。缓释载体的合适实例包括呈成型制品形式如栓剂或胶囊的半渗透性聚合物基质。可植入或微胶囊缓释基质包括聚乳酸（美国专利 3,773,319; EP58,481）、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酰胺的共聚物（Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22:547-56 (1985))、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)、乙烯乙基乙酸酯(Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982))或聚-D-(-)-3-羟基丁酸（EP 133,988）。

在本发明的一些具体实施方式中，TAJ 拮抗剂通过直接注入脑的合适区中来给予至患者。参见例如 Gill *et al.*, “Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease,”

Nature Med. 9: 589-95 (2003)。可获得替换技术并且可以根据本发明用于给予 TAJ 拮抗剂。例如，导管或植入物的定向放置可利用 Riechert-Mundinger 装置和 ZD (Zamorano-Dujovny) 多用途定位装置来实现。对比增强的计算机化 x 线体层照相术 (CT) 扫描，注射 120ml 的椎管造影剂 (omnipaque)、350mg 碘/ml，利用 2mm 薄片厚度，可允许三维多平面治疗方案 (STP, Fisher, Freiburg, Germany)。这种装置允许在磁共振成像研究的基础上进行设计，集中用于清楚的靶构型的 CT 和 MRI 靶信息。

经改进以与 GE CT 扫描装置 (General Electric Company, Milwaukee, WI) 以及 Brown-Roberts-Wells (BRW) 定向系统 (Radionics, Burlington, MA) 一起使用的 Leksell 定向系统 (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) 可用于本用途。因此，在植入的开始，BRW 定向框架的环形底座圈可连接至患者的颅骨。尽管具有石墨棒定位器框架的 (靶组织) 区夹住基板，但连续的 CT 部分可以以 3mm 间隔获得。计算机化治疗设计程序可在 VAX 11/780 计算机 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) 上运行，其中利用石墨棒照片对在 CT 间隔和 BRW 间隔之间图谱的 CT 坐标。

如本文所述的治疗 CNS 失调的方法通常在用于人之前，对希望的治疗或预防活性在体外进行试验，然后以可接受的动物模型进行体内试验。合适的动物模式包括转基因动物对于本领域的普通技术人员来说是已知的。例如，本文描述了用来证实 TAJ 拮抗剂的分化和存活作用的体外测定。TAJ 拮抗剂对轴突再生的作用可如实施例所述在体外进行测试。最后，体内试验可通过形成表达 TAJ 拮抗剂的转基因小鼠或通过将 TAJ 拮抗剂给予至小鼠来实施。

实施例

本发明将进一步通过下面的实验实施例来描述说明。这些实施例仅用于说明的目的，而不能以任何方式解释为限制本发明的范围或内容。

实施例 1

TAJ 融合蛋白的制备

融合至人 IgG1 的铰链和 Fc 区的鼠 TAJ 的残基 1-168 被表达在 CHO 细胞中，并在蛋白 A 琼脂糖 (Pharmacia) 上纯化。纯化的蛋白在具有还原条件下的 Mr=50KDa 和在非还原条件下的 Mr=D KDa 的 SDS-PAGE 上运行。AP-TAJ (具有在其 C-末端融合至人 TAJ 残基 26-168 的 N-末端 6 个组氨酸标记物的人胎盘 AP) 被表达在 CHO 细胞中。在 TMAE-Fractogel (EM Industries) 和 Ni-NTA Agarose (Qiagen) 上进行纯化。类似的方案用于 AP-p75、AP-Nogo66 的构建、表达、和纯化，其表达在 293 细胞中。髓磷脂制剂从野生型 C57B16 小鼠和牛脑中利用标准方案 (Norton and Podulso, 1973) 加以纯化。

实施例 2

TAJ 结合 NgR1 和 LINGO-1

这个实施例利用大量不同生化方法来表明 TAJ 与 NgR1 和 LINGO-1 的关联性。

将 ELISA 板 (Costar) 涂覆 10 μ g/ml 可溶性 NgR1 (融合至大鼠 IgG1 的铰链和 Fc 的大鼠 NgR1 外部结构域残基 1-310 或 1-344) 或全长 NgR1。将该板分块并在 4 $^{\circ}$ C 下利用大量 TNFR 总科/Fc 融合

蛋白 (30 μ g/ml), 包括 TAJ-Fc、CD40-Fc、Fn14-Fc、TNFR1-Fc、TNFR2-Fc 以及 BaffR-Fc 来孵育过夜。用加了 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗涤该板, 并且结合的融合蛋白利用与 HRP 结合的抗-人-Ig 进行检测。音猬因子用作特异性对照。如图 1A 所示, 筛选所有的备选物, 只有 TAJ-Fc 结合至 NgR1。

90% 融合的 COS-7 细胞利用 Fugene 6 试剂 (Roche) 通过人 NgR1 表达质粒进行转染。在 48h 后, 转染的细胞用 HBH (汉克平衡的盐缓冲液, 1mg/ml BSA, 20mM HEPES, pH7.0) 洗涤, 在 23 $^{\circ}$ C 下用 4 μ g/ml 的 AP-TAJ 或在 HBH 中的其它 AP-融合孵育 1.5h, 并如所述 (Mi et al., 2004) 进行处理。结合的 AP-TAJ 通过用 NBT/BCIP (Roche) 的孵育或随后的细胞 (Mi et al. 2004) 提取物溶解直接检测。在所选的研究中, COS-7 细胞用 NgR1、p75、以及 LINGO-1 的各种组合进行转染并如上所述对 AP-TAJ 结合进行分析。

TAJ 结合至 NgR1 在随后的分析中利用表达的融合蛋白 (图 1B、1C) 得以证实。也对 MAIF 受体复合物的其它鉴定成分单独和以各种组合的 TAJ 结合进行评价。共表达 NgR1/LINGO-1 和 NgR1/LINGO-1p75 的 TAJ 结合至 COS 细胞稍微低于单独的 NgR1, 可能是由于竞争或空间位阻。注意的是, TAJ 结合 NgR1 比 p75 具有显著更高的亲和力 (图 1B)。

为了鉴定通过 TAJ 结合的 NgR1 的区, 形成可溶性截短形式的 NgR1 并用于涂覆 ELISA 板, 用于通过 AP-TAJ 的结合。含有距氨基末端 344 个氨基酸的截短 NgR1 构建体通过 TAJ 如同全长 NgR1 一样有效地进行结合。然而, 含有 N-末端 310 个氨基酸的稍微较短的构建体表现出远低于对于 AP-TAJ 的亲和力, 表明 NgR1 的氨基酸 310-344 对于 Taj/NgR1 结合很重要 (图 3)。

COS-7 细胞 (100mm 表面皿) 用人 TAJ 和人 NgR1、人 TAJ、人 LINGO-1、人 NgR1/大鼠 p75 以及人 NgR1/BaffR 的组合进行转染。BaffR 用作特异性对照。在 48h 小时后收获细胞并在 4°C 下溶解在 1ml 溶解缓冲液 (50mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 和 10% 甘油) 中 30min。在 14,000xg 离心 15min 后, 将上清液用蛋白质 A/G-琼脂糖珠 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 在 4°C 下孵育 1h, 然后用抗-NgR1、抗-TAJ 抗体加蛋白质 A/G 琼脂糖珠或 myc 标记的抗-LINGO-1 加了抗-myc (9E10) 琼脂糖珠在 4°C 下孵育 1h。用细胞溶解缓冲液洗涤珠子三次, 在 Laemmli 样品缓冲液中沸腾, 经受 4-20% 的 SDS-PAGE, 通过蛋白质印迹利用抗-NgR1 或抗-LINGO-1 或抗-TAJ (Alexis Biochemical) 抗体加以分析。将人 TAJ 残基 26 至 416 插入 PV90HA 标记物表达载体中。

NgR1 和 LINGO-1 通过人-TAJ 的结合通过免疫沉淀研究所证实, 该研究中 TAJ 结合了 NgR1 或 LINGO-1 (图 2)。在利用抗 NgR1 或 LINGO-1 抗体的免疫沉淀之后, TAJ 和 NgR1 或 TAJ 和 LINGO-1 的共表达在蛋白质印迹中产生抗-TAJ 免疫反应带。同样地, 利用抗-TAJ 抗体的反应混合物的免疫沉淀在蛋白质印迹上产生由 NgR1 或 LINGO-1 抗体易于检测的带。这些数据表明 TAJ 与 NgR1 和 LINGO-1 有关。

实施例 3

脑中的 TAJ 表达

这个实施例表明在脑中的 TAJ 表达是高度和广泛表达的。人多个组织的 DNA 印迹分析和人大脑印迹 (Clontech) 利用标准方案来实施, 并且人 TAJ 探针利用 PCR (419bp 片段, 正向引物

(5'-tatggggaggatgcacagtgtgtg-3' (SEQ ID NO: 19)) 和反向引物 (5'-agaccagctgggtttcttccat-3' (SEQ ID NO: 20)) 产生。

小鼠组织 cDNA (Clontech) 和大鼠 cDNA 通过半定量 PCR 利用生成 419bp 的扩增 TAJ 片段的正向引物 (5'-tatggggaggatgcacagtgtgtg-3' (SEQ ID NO: 19)) 和反向引物 (5'-agaccagctgggtttcttccat-3' (SEQ ID NO: 20)) 进行分析。GAPDH 的扩增以标准化目的平行地实施。对于单个大鼠细胞型的 PCR 分析来说, 出生后第 6-7 天 (P6-7) 的小脑颗粒神经元、P2 小脑少突胶质细胞、P4 小脑星形胶质细胞、以及胚胎期第 14 天 (E14) 背根神经中枢神经元的纯化培养物如所述 (本文插入的参考文献和插入的方法) 进行制备并利用 Trizol 实际和制造商协议 (Invitrogen) 收获 RNA。纯化的 RNA 用于利用 GeneAmp 成套工具 (Applied Biosystem) 来生成细胞型特异性 cDNA。

利用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 将 mRNA 自胚胎期第 14 天 (E14)、E18、出生后第 0 天 (P0)、P4、P8、P23、以及成熟小鼠脑提取出来。将这些 RNA 进行 Taqman RT-PCR 以量化 TAJ、p75、LINGO-1、以及 NgR1 信息水平。

通过半量化 PCR 的转录分析证实了在小鼠脑中发现了高水平的 TAJ mRNA, 在心、肺、肝、骨骼肌、以及睾丸中具有更适中的表达。TAJ mRNA 表达在跨越多个大脑区广泛分布, 在皮层、小脑、海马状突起、以及丘脑中具有最高表达。

为了确定 TAJ 是否在神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞中表达, 制备出生后第 6-7 天 (P6-7) 的小脑颗粒神经元、P2 小脑少突胶质细胞、P4 小脑星形胶质细胞、以及胚胎期第 14 天 (E14)

背根神经中枢神经元的纯化培养物，并通过半量化 RT-PCR 对 TAJ mRNA 进行分析。在每个细胞型中发现了粗略可比较水平的信息。

将 TAJ 表达的相对水平进行比较以在发育和成熟大脑中获得对 MAIF 受体复合物的有效组合物的观察。在整个大脑均浆上对 TAJ 实施定量的实时 PCR，该大脑均浆取自发育时间期 E14、E18、P0、P4、P8、P11、P23、以及成熟期。这些数据表明在 P23 和成熟大鼠中显著降低了 TAJ 表达（图 6）。

P6-7 小脑颗粒神经元的纯化培养物在体外生长 24 小时，然后利用抗-TAJ、p75、LINGO-1、以及 NgR1 抗体进行染色。免疫组织化学数据表明 TAJ、LINGO-1 和 NgR1 被共定位在相同细胞中。

实施例 4

TAJ 诱导 Rho 活化

这个实施例表明 TAJ 介导响应于神经突长出的抑制剂的 Rho 活化。

通过 Nogo、Omgp、或 MAG 的 MAIF 受体的结合导致 RhoA 的活化，对于髓磷脂对神经突长出的抑制作用很关键的 MAIF 受体信号传导途径的一个步骤。为了确定 TAJ 和 NgR1 的作用是否真正是功能活性的 MAIF 受体复合物的指示，将 COS 细胞用 TAJ、NgR1、以及 LINGO-1 的任何组合进行转染，并用 AP-标记的 Omgp 或不相关 AP-标记的对照蛋白进行处理。然后检测在细胞中活化的 RhoA 的水平。将 COS-7 细胞用 AP-Omgp 配体处理 10min，溶解在 50mM Tris-HCl, pH7.5, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 500mM NaCl, 10mM MgCl₂, 加上蛋白酶抑制剂。GTP-结合和全部

RhoA 蛋白质通过蛋白质印迹利用抗-RhoA mAb (Santa Cruz) 进行检测。

用单独 TAJ、TAJ 和 LINGO-1、或 TAJ 和 NgR1 转染的 COS 细胞在活化的 RhoA 中没有表现出增加。然而, 用所有三种组分进行的转染在用 AP-Omgp 处理后导致增加的 RhoA 活化 (未示出), 表明 TAJ、LINGO-1、以及 NgR1 的表达足以重新构建能够下游信号传导的功能性 MAIF 受体复合物。

实施例 5

制备 TAJ 剔除小鼠

产生 TAJ 剔除小鼠, 其中 TAJ 基因的起始两个编码外显子通过同源性重组缺失。TAJ 剔除小鼠在混合的 129 Sv/C57B16 本底物 (background) 上生成。用于 TAJ 的起始编码外显子的起始 66 个氨基酸通过与 CD2-新霉素融合构建体的同源性重组而缺失 (图 4)。对于 Taj, 存在至少两种剪接变异体; 然而, 二者利用相同起始蛋氨酸, 并且 CD2-neo 构建体含有两个中止密码子 (一个符合读框, 另一个不符合读框), 因此认为 TAJ 的缺失是完全的。TAJ mRNA 表达的缺少通过 TAJ 剔除小鼠大脑 RNA 的 RT-PCR 得以证实。所使用的引物是野生型上游 - 5'-AGGAAGAGAATGGCAGCGAAGAGC-3' (SEQ ID NO: 21)、剔除上游 - 5'-CAAGTTGATGTCCTGACCCAAGGCACC-3' (SEQ ID NO: 22)、以及野生型 / 剔除下游 5'-AGCGCCTCGTATGGACAAAGAGTG-3' (SEQ ID NO: 23), 并分别产生 195 和 277bp 的野生型和剔除扩增片段。

这些小鼠非常普通，没有明显的物理异常或行为、运动、或繁殖力的变化。利用小鼠大脑组织来实施 RT-PCR 以证实 TAJ 基因剔除。

制备初级 CG 或 DRG 神经元培养物，利用 Labtek 培养物载波片（8 孔），在单独地利用 300ng/3 μ l AP-Nogo66，或 500ng/3 μ l 髓磷脂；或在存在 AP-Nogo66（300ng/3 μ l）下利用 1 μ g/3 μ l TAJ-Fc 或对照 Fc（融合蛋白的人 IgG1-铰链-CH2CH3 部分）成斑之前，将该载波片涂覆了 0.1mg/ml 聚-D-赖氨酸（Sigma）。在室温下干燥该载波片 2 小时。将来自 p7 大鼠的 CG 神经元（ 1×10^5 个细胞/8 孔）或 5000DRG/96 孔进行分离并接种在该载波片上，并在 5% CO₂ 中、37 °C 下孵育 24h。将该载波片固定在 4% 多聚甲醛/20% 葡萄糖上并用抗- β III-微管蛋白（Covance TUJ1）。

实施例 6

缺少 TAJ 的神经元对神经突抑制表现出降低的响应性

为了分析 TAJ 缺失对于神经元对 MAIF 响应的作用，将来自 TAJ 剔除和野生型小鼠的 P8 小脑颗粒神经元（CGN）置于髓磷脂涂覆的载波片上，并在放置后 1 天检测神经突长出（图 5A 和 5B）。来自 TAJ 剔除的 CGN 在各自剂量响应曲线中的神经突的定量表明缺少 TAJ 的 CGN 对髓磷脂诱导的抑制比野生型 CGN 是更低响应的（图 5C）。

对髓磷脂的抑制性响应在普通 CGN 中通过破坏具有 TAJ-Fc 融合蛋白的 MAIF 受体复合物可以减少。TAJ-Fc 插入导致更长的 CGN 长出，表明 MAIF 受体复合物受到损害（图 5A 和 5B）。

Taj-Fc 对神经突长出的恢复的显著作用可利用分离的来自出生后 7 天的大鼠的 DRG 神经元进行观察。当在聚-D-赖氨酸 (PDL) 基质和 AP-Nogo66 基质上生长时, 在 24 小时后在体外观察到的通常广泛的神经突长出相比于在单独 PDL 上的生长显著地被缩减了。然而, 如果 TAJ-Fc 也加到基质中, 则 DRG 长出恢复至接近对照水平 (图 5D)。测试的其它 TNFR-Fc 家族成员 CD40-Fc、TNFR1-Fc、TNFR2-Fc、Fn14-Fc 以及 LT β R-Fc 对大鼠 DRG 神经突长出没有作用 (数据未示出)。这个结果表明 TAJ 明确地涉及到调节的轴突生长。

<110> 比奥根艾迪克 MA公司	
<120> 神经元功能中的TAJ	
<130> 2159.056PC02/EKS/EJH	
<150> US 60/598,247	
<151> 2004-08-03	
<160> 25	
<170> PatentIn version 3.3	
<210> 1	
<211> 1489	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 1	
ggacctgcag cctcccaggt ggctgggaag aactctccaa caataaatac atttgataag	60
aaagatggct ttaaaagtc tactagaaca agagaaaacg tttttcactc ttttagtatt	120
actaggctat ttgtcatgta aagtgacttg tgaatcagga gactgtagac agcaagaatt	180
cagggatcgg tctggaaact gtgttccctg caaccagtgt gggccaggca tggagttgtc	240
taaggaatgt ggcttcggct atggggagga tgcacagtgt gtggcgtgcc ggctgcacag	300
gttcaaggag gactggggct tccagaaatg caagccctgt ctggactgcg cagtgggtgaa	360
ccgcttticag aaggcaaatt gtteagccac cagtgaigcc atctgcgggg actgcttgcc	420
aggatlttat aggaagaaga aacttgtegg ctitcaagac atggagtgtg tgccttggtg	480
agacctect cciccttacg aaccgcactg tcccagcaag gtcaacctcg tgaagatcgc	540
gtccacggcc tccagccac gggacacggc gctggetgcc gttatctgca gcgctctggc	600
caccgctctg ctggccctgc tcatctctg tgtcatctat lgtaaagac agtttatgga	660
aaagaaacec agctgggtct tgggtcaca ggacattcag tacaacgaga ctgagctgtc	720
gtgttttgac agacctcagc tccacgaata tccccacaga gcttctgcc agtgcgcccg	780
tgactcagtg cagacctcgc ggcgggtgct cttgctccca tccatgtgct gtgaggagge	840
ctgcagcccc aaccggcga ctcttggttg tgggtgcat tctgcagcca gcttcagge	900
aagaaacgca ggcccagcgc gggagatggt gccgacttc ttcggatccc tcacgcagtc	960
catctgtgge gagttttcag atgcctggcc tctgatcag aatcccatgg gtggtgacaa	1020
catctctttt tgtgactctt atcctgaact cactggagaa gacattcatt ctctcaatcc	1080
agaacttgaa agctcaactg ctttggattc aaatagcagt caagatttgg ttggtggggc	1140
tgttccagtc cagtctcatt ctgaaaactt tacagcagct actgatttat ctatagataa	1200
caacacactg gtagaatcag catcaactca ggatgcacta actatgagaa gccagctaga	1260
tcaggagagt ggcgctgtea tccaccagc cactcagacg tccctccagg taaggcagcg	1320
actgggttcc ctgtgaacac agcactgact tacagtagat cagaactctg tcccagcat	1380
aagatttggg ggaacctgga tgagtttttt tttttgcatc ttttaataatt tcttatatgt	1440
tgtagaglat gttttaaaat aaatttcaag tattttttta aaaaacttt	1489
<210> 2	
<211> 423	

<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Ser Gly
20 25 30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro
35 40 45

Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe
50 55 60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Ala Cys Arg Leu His Arg Phe
65 70 75 80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala
85 90 95

Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala
100 105 110

Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val
115 120 125

Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro
130 135 140

Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser
145 150 155 160

Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser
165 170 175

Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr
180 185 190

Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Glu Thr Glu Leu Ser Cys Phe Asp Arg Pro
210 215 220

Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp
225 230 235 240

Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys
245 250 255

Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His
260 265 270

Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met
275 280 285

Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe
290 295 300

Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile
305 310 315 320

Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser
325 330 335

Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser
340 345 350

Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn
355 360 365

Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu
370 375 380

Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln
385 390 395 400

Glu Ser Gly Ala Val Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val
405 410 415

Arg Gln Arg Leu Gly Ser Leu
420

<210> 3
<211> 1364
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3
agaactcicc aacaataaat acatitgata agaaagatgg ctttaaaagt gctactagaa 60
caagagaaaa cgittttcac tcttttagta ttactaggct atttgtcatg taaagtgact 120
tgtgaaticag gagactgtag acagcaagaa ttcagggatc ggtctggaaa ctgtgttccc 180
tgcaaccagt gtgggccagg catggagttg tctaaggaat gtggcttcgg ctatggggag 240
gatgcacagt gtgtgacctg ccggetgcac aggttcaagg aggactgggg ctccagaaa 300
tgcaagccct gtctggactg cgcagtggtg aaccgcttc agaaggcaaa ttgttcagcc 360
accagtgatg ccatctgcgg ggaactgctt ccaggattt ataggaagac gaaacttgtc 420
ggctttcaag acatggagtg tgtgcttgt ggagaccctc ctctcctta cgaaccgca 480
tgtgccagca aggcaacct cgtgaagatc gcgtccacgg cctccagccc acgggacacg 540
gcgctggctg ccgctatctg cagcctctg gccaccgtcc tgcctggcct gctcactctc 600
tgtgtcatct attgtaagag acagtttatg gagaagaaac ccagctggtc tctgcggtca 660
caggacattc aglacaacgg ctctgagctg tcgigttttg acagacctca gctccacgaa 720
tatgcccaca gagectgctg ccagtgccgc cgtgactcag tgcagacctg cgggccggtg 780
cgcttgctcc catccatgtg ctgtgaggag gccgcagcc ccaaccgggc gactcttgg 840
tgtggggtgc attctgcagc cagtcttcag gcaagaaaac caggcccagc cggggagatg 900
gtgcccacit tcttcggatc cctcacgcag tccatctgtg gcgagtttc agatgcctgg 960

cctctgatgc agaatcccat gggtagtgac aacatctctt tttgtgactc ttatcctgaa 1020
 ctcaactggag aagacattca ttctctcaat ccagaacttg aaagctcaac gtctttggat 1080
 tcaaatagca gtcaagattt ggttggtagg getgttccag tccagtctca ttctgaaaac 1140
 tttacagcag ctactgattt atctagatat aacaacacac tggtagaate agcatcaact 1200
 caggatgcac taactatgag aagccagcta gatcaggaga gtggcgtgt catccacca 1260
 gccactcaga cgtccctcca ggtaaggcag cgactgggtt cctgtgaac acagcactga 1320
 cttacagtag atcagaactc tgttcccagc ataagatttg gggg 1364

<210> 4
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Ser Gly
20 25 30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro
35 40 45

Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe
50 55 60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe
65 70 75 80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala
85 90 95

Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala
100 105 110

Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val
115 120 125

Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro
130 135 140

Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser
145 150 155 160

Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser
165 170 175

Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr
180 185 190

Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Phe Asp Arg Pro
210 215 220

Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp
225 230 235 240

Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys
245 250 255

Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His
260 265 270

Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met
275 280 285

Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe
290 295 300

Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile
305 310 315 320

Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser
325 330 335

Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser
340 345 350

Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn
355 360 365

Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu
370 375 380

Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln
385 390 395 400

Glu Ser Gly Ala Val Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val
405 410 415

Arg Gln Arg Leu Gly Ser Leu
420

<210> 5

<211> 1325

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

atggttttaa aagtgtact agaacaagag aaaacgtttt tcactctttt agtattacta 60

ggctatttgt catgtaaagt gacttgtgaa acaggagact gtagacagca agaattcagg 120

gatcggctcg gaaactgtgt tccttgaac cagtgtgggc caggcatgga gttgtciaag 180

gaatgtggct tcggctatgg ggaggatgca cagtgtgtga cgtgccggct geacaggttc 240

aaggaggact ggggcttcca gaaatgcaag cctgtcttgg actgcgcagt ggtgaaccgc 300

tttcagaagg caaattgttc agccaccagt gatgcatcti gcggggactg ctigccagga 360

ttttatagga agacgaaact tgtcggcttt caagacatgg agtgtgtgcc ttgtggagac 420

```

cctcctcctc cttacgaacc gcaactgtgcc agcaaggcca acctcgtgaa gatcgcgtcc 480
acggcctcca gccccggga cacggcgctg gctgccgtta tctgcagcgc tctggccacc 540
gtccigtctg ccctgctcat cctctgtgtc atctattgta agagacagtt tatggagaag 600
aaaccagct ggtctctgcg gtcacaggac attcagtaca acggctctga gctgtcgtgt 660
cttgacagac ctcagctcca cgaatatgcc cacagagcct gctgccagtg ccgccgtgac 720
tcagtgcaga cctgcggggc ggtgcgcttg ctcccatcca tgtctgtga ggaggcctgc 780
agccccaacc cggcgactct tggttgtggg gtgcattctg cagccagtct tcaggcaaga 840
aacgcaggcc cagccgggga gatgggtgccc actttcttcg gatccctcac gcagtcctc 900
tgtggcgagt tttcagatgc ctggcctctg atgcagaatc ccatgggtgg tgacaacatc 960
tctttttgtg actcttatcc tgaactcgtt ggagaagaca ttcattctct caatccagaa 1020
ctlgaaagct caacgtcttt ggattcaaat agcagtcagg atttggttgg tggggctgtt 1080
ccagtcagc ctcattctga aaacttiaca gcagctactg attlatctag atataacaac 1140
acactggtag aatcagcacc aactcaggat gcactaacta tgagaagcca gctagatcag 1200
gagagtggcg ctatcatcca cccagccact cagacgtccc tccaggtgag gcagcgactg 1260
ggttccctgt gaacacagca ctgacttaca gtagatcaga actctgttcc cagcataaga 1320
tttgg 1325

```

<210> 6
<211> 423
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

```

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu
1          5          10          15
Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly
20          25          30
Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro
35          40          45
Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe
50          55          60
Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe
65          70          75          80
Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala
85          90          95
Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala
100         105         110
Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val
115         120         125
Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro
130         135         140

```

Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser
 165 170 175
 Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr
 180 185 190
 Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser
 195 200 205
 Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Arg Pro
 210 215 220
 Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys
 245 250 255
 Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His
 260 265 270
 Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met
 275 280 285
 Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe
 290 295 300
 Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile
 305 310 315 320
 Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Ala Gly Glu Asp Ile His Ser
 325 330 335
 Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser
 340 345 350
 Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn
 355 360 365
 Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu
 370 375 380
 Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln
 385 390 395 400
 Glu Ser Gly Ala Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val
 405 410 415
 Arg Gln Arg Leu Gly Ser Leu
 420

<210> 7

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

 <400> 7
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

 <400> 8

Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

 <400> 9

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

 <400> 10

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

 <400> 11

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
 1 5 10

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>

<223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

<400> 12

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

<400> 13

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用来分隔两个多肽编码区的接头序列

<400> 14

Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp
1 5 10 15

<210> 15

<211> 3087

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

```

gggagggtaa ctacctgctg aaagtgaact ttciltgata tccatgcata tatataaact   60
cagccctgcc tttgatgttc agcaactgat tcaactgatca gattacagge atttcatctc   120
cctgctegtc igccittgat ctgcatggtt aatittatit tcttgattt gaagtctcgt   180
ctgggcttgt gctgacatac atitttgga aggtagaagc atttggcaca gaagtctgctc   240
caggagaaac taagtgtctg aacggaactc tccaacaata aatacatttg ataagaaaga   300
tggcttlaaa agtgctacta gaacaagaga aaacgttttt cactctttta gtattactag   360
gctatitgtc atgtaaagtg acttgtgaat caggagactg tagacagcaa gaattcaggg   420
atcggctctg aaactgtggt cctgcaacc agtgtgggcc aggcattggag ttgtctaagg   480
aatgtggcct cggctatggg gaggatgcac agtgtgtgac gtgccggctg cacaggttca   540
aggaggactg gggcttccag aaatgcaagc cctgtctgga ctgcccagtg gtgaaccgct   600
ttcagaagge aaattgttca gccaccagtg atgccatctg cggggactgc ttgccaggat   660
tttataggaa gacgaaactt gtcggctttc aagacatgga gtgtgtgect tgtggagacc   720
ctcctctccc ttaagaaccg cactgtgcca gcaagglicaa cctctgtaag atcgcgtcca   780
cggectccag cccacgggac acggcgctgg ctgccgttat ctgcagcgtc ctggccaccg   840
tctgctggc cctgcicac cctctgtgtca tctattgtaa gagacagttt atggagaaga   900

```

aacccagctg gtctctgceg tcacaggaca ttcagtacaa cggtcttgag ctgtcgtgtt	960
ttgacagacc tcagctccac gaatatgccc acagagcctg ctgccagtgc cggcgtgact	1020
cagtgcagac ctgcgggceg gtgcgcttgc tcccatccat gtgctgtgag gaggcctgca	1080
gccccaaacc ggcgactctt ggttgtgggg tgcattctgc agccagtctt caggaagaa	1140
acgcaggccc agccggggag atgggtcccga ctttcttcgg atccctcacg cagtccatct	1200
gtggcgagtt ttcagatgccc tggcctctga tgcagaatcc catgggtggg gacaacatct	1260
ctttttgtga ctcttatcct gaactcactg gagaagacat tcattctctc aatccagaac	1320
ttgaaagctc aacgtctttg gattcaata gcagtaaga tttgggtggg gggcgtgttc	1380
cagtccagtc tcattctgaa aactttacag cagctactga tttatctaga tataacaaca	1440
cactggtaga atcagcatca actcaggatg cactaactat gagaagccag ctagatcagg	1500
agagigggtc tgcactccac ccagccactc agacgtccct ccaggaagct taaagaacct	1560
gcttctttct gcagtagaag cgtgtgctgg aacccaaaga gtactccttt gttaggctta	1620
tggactgagc agtctggacc ttgcatggct tctggggcaa aaataaatct gaaccaaact	1680
gacggcattt gaagccttc agccagttgc tctgagcca gaccagctgt aagctgaaac	1740
ctcaatgaat aacaagaaaa gactccagge cgactcatga tactctgcat ctctctaca	1800
tgagaagctt ctctgccaca aaagtactt caaagacgga tgggttgagc tggcagccta	1860
tgagattgtg gacatalaac aagaacaga aatgccctca tgcttatttt catggtgatt	1920
gtggttttac aagactgaag acccagagta tactttttct tccagaaat aatttcatac	1980
cgcctatgaa atatcagata aattacctta gcttttatgt agaattgggtt caaaagtgag	2040
tgtttctatt tgagaaggac acttttctat catctaaact gattcgata ggtggttaga	2100
atggccctca taitgcctgc ctaaactctg ggittattag atgaagtta ctgaatcaga	2160
ggaatcagac agaggaggat agctcttcc agaatccaca ctctgacct cagcctcggt	2220
ctcatgaaca cccgctgac tcaggagaac acctgggcta gggaatgtgg tcgagaaagg	2280
gcagcccatl gccagaatt aacacatatt gtagagactt glatgcaaag gttggcatat	2340
ttatatgaaa attagttgct atagaacat ttgttgcac tgteccctctg cctgagctta	2400
gaaggttata gaaaagggt atttataaac ataatgacc ttttacttgc attgtatctt	2460
ataclaaagg cttagaanaa tacaacatat caggttcccc tactactgaa gtagccttcc	2520
gtagaagcac accacatgtt aggactagaa gaaaagcac aattttagg ggtttggatg	2580
aagcagctgt aactgcctca gtgtagttg accaggacat tgcctgctc ctccaattg	2640
tgtaaagatt gtagcacat catctctac ttagccatc cgggtctgga ttaagagga	2700
cgggtcttct tctattaaa gtctccatc ccctaccatc tacacattag cattgtctct	2760
agagctaaga cagaatttaa cccggtcag tcacaaagca gggaatgggt catttactct	2820
taatctttat gccctggaga agacctactt gaacagggca ttttttttag acttctgaac	2880
atcagtatgt tcgagggtac tatgatattt tggtttggaa ttgccctgcc caagtcactg	2940
tcttttaact tttaaactga atattaaaat gtatctgtct ttcctagtat gtttttatct	3000
tcctatgtat tatccatggt tttctctggt tgtgacagat tagtaaaatt taatgagccc	3060
tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	3087

<210> 16
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 16
 Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu
 1 5 10 15

 Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Ser Gly
 20 25 30

 Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro
 35 40 45

 Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe
 50 55 60

 Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe
 65 70 75 80

 Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala
 85 90 95

 Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala
 100 105 110

 Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val
 115 120 125

 Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro
 130 135 140

 Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser
 145 150 155 160

 Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser
 165 170 175

 Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr
 180 185 190

 Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser
 195 200 205

 Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Phe Asp Arg Pro
 210 215 220

 Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp
 225 230 235 240

 Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys
 245 250 255

 Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His
 260 265 270

Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met
275 280 285

Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe
290 295 300

Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile
305 310 315 320

Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser
325 330 335

Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser
340 345 350

Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn
355 360 365

Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu
370 375 380

Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln
385 390 395 400

Glu Ser Gly Ala Val Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Glu
405 410 415

Ala

<210> 17
<211> 1914
<212> DNA
<213> Mus肌

<400> 17
atggcactca agtctctacc tctacacagg acggtgctct tcgctgccat tctcttcta 60
ctccacctgg catgtaaagt gagttgcgaa accggagatt gcaggcagca ggaattcaag 120
gatgatctg gaaactgtgt cctctgcaaa cagtgcggac ctggcatgga gttgtccaag 180
gaatgtggct tcgctatgg ggaggatgca cagtgtgtgc cctgcaggcc gcaccggtc 240
aaggaagaact ggggtttcca gaagtgaag ccatgtgcgg actgtgcgct ggtgaaccgc 300
tttcagaggg ccaactgctc acacaccagt gatgctgtct gcggggactg cctgccagga 360
ttttaccgga agaccaaact ggttggtttt caagacatgg agtgtgtgcc ctgcggagac 420
ccacctctc ctaagaacc acactgtacc agcaaggtga accttgtaa gatctctcc 480
accgtctcca gccctcggga caggcgctg gctgccgta tctgcagtgc tctggccagc 540
gtgctgctcg cctgtctcat cctgtgtgtc atctactgca agaggcagtt catggagaag 600
aaaccagct ggctctcgc gtcacaggac attcagtaca atggtctcga gctgtcatgc 660
tttgaccage ctcggtctcg ccactgtgcc catagagcat gctgtcagta tcaccgggac 720
tcagcccaaa tgtatgggcc tgttaactg attccgtcct tgtgctgtga agaggccccg 780
agetctgccc gagctgtgct tggctgtggg ctgcgttctc ccactaccct ccaggagaga 840

aaccceggctt ctgtggggga cacgatgeca geettcttcg ggtctgttcc cegtccatc 900
tgcgetgaat ttictgatgc ctggectctg atgcagaatc ctctgggtgg tgacagctct 960
ctctgtgact ctatctcga actcactgga gaagatacca attecctcaa tccgaaaaac 1020
gaaagcgcag catctctgga ttccagtggc ggccaggatc tggctgggac agctgctcta 1080
gagtctctcg ggaatgttcc agaacttact gactcaccta gacatggtga cactggtaca 1140
gtctggggagc agacgctagc tcaggatgct caaaggactc caagccaagg aggctgggaa 1200
gacaggggaaa acctgaatct agccatgecc acagccttcc aggatgcctg aaggccatct 1260
tctgacgctg gaggtgtggg tctggacaag cctgtgatga ggcttacaga ctgagcagtc 1320
ttgggtctcg gaagcaaaaa taaactgaa ccaaacctgac aacatttcca tctttcagc 1380
cactagcttc tgagccagac cagctgtaag ctgaaacccc agcaagaagc aaggagagac 1440
tgactgtagg cggccttggg acatgtgctt ctccctaag cgagaacctt agctggggcc 1500
aatttgaagg acctatgggt ggaatgtgct gctgtgagc ttgtgggac agcaggacce 1560
agcctggctc ctcttatgt ccacggtgaa tgtggttca caagaccag agtataaact 1620
ttcatagaca ttctcttta gaaataatcc attacctgt ctcaaaaac caaaaaaaaa 1680
aaaaagtgtt gtaaggttt tgaacatcac ctageccaagt tagtaaaac tttatttga 1740
ttcatctca attttttaa ctattcattt tcttgiatg aattcttctg tgttttatgt 1800
gtaaatatct ctattattt gacactatca atattcttg tggttttgta attttactt 1860
ttattaalga ctcaagctgt aaaaataaac taatttcaac gtcgacgagg ccgc 1914

<210> 18
<211> 416
<212> PRT
<213> Mus肌

<400> 18

Met Ala Leu Lys Val Leu Pro Leu His Arg Thr Val Leu Phe Ala Ala
1 5 10 15

Ile Leu Phe Leu Leu His Leu Ala Cys Lys Val Ser Cys Glu Thr Gly
20 25 30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Lys Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Leu
35 40 45

Cys Lys Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe
50 55 60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Pro Cys Arg Pro His Arg Phe
65 70 75 80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Ala Asp Cys Ala
85 90 95

Leu Val Asn Arg Phe Gln Arg Ala Asn Cys Ser His Thr Ser Asp Ala
100 105 110

Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val
115 120 125

Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro
 130 135 140
 Tyr Glu Pro His Cys Thr Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ser Ser
 145 150 155
 Thr Val Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser
 165 170 175
 Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr
 180 185 190
 Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser
 195 200 205
 Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Phe Asp Gln Pro
 210 215 220
 Arg Leu Arg His Cys Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Tyr His Arg Asp
 225 230 235 240
 Ser Ala Pro Met Tyr Gly Pro Val His Leu Ile Pro Ser Leu Cys Cys
 245 250 255
 Glu Glu Ala Arg Ser Ser Ala Arg Ala Val Leu Gly Cys Gly Leu Arg
 260 265 270
 Ser Pro Thr Thr Leu Gln Glu Arg Asn Pro Ala Ser Val Gly Asp Thr
 275 280 285
 Met Pro Ala Phe Phe Gly Ser Val Ser Arg Ser Ile Cys Ala Glu Phe
 290 295 300
 Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Leu Gly Gly Asp Ser Ser
 305 310 315 320
 Leu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Thr Asn Ser Leu
 325 330 335
 Asn Pro Glu Asn Glu Ser Ala Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Gly Gln
 340 345 350
 Asp Leu Ala Gly Thr Ala Ala Leu Glu Ser Ser Gly Asn Val Ser Glu
 355 360 365
 Ser Thr Asp Ser Pro Arg His Gly Asp Thr Gly Thr Val Trp Glu Gln
 370 375 380
 Thr Leu Ala Gln Asp Ala Gln Arg Thr Pro Ser Gln Gly Gly Trp Glu
 385 390 395 400
 Asp Arg Glu Asn Leu Asn Leu Ala Met Pro Thr Ala Phe Gln Asp Ala
 405 410 415

<210> 19

<211> 24

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用来显示脑中TAJ的表达的正向引物	
<400> 19	
tatggggagg atgcacagtg tgtg	24
<210> 20	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用来显示脑中TAJ的表达的反向引物	
<400> 20	
agaccagctg ggtttcttct ccat	24
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用来形成TAJ剔除小鼠的引物	
<400> 21	
aggaagagaa tggcagcga ggc	24
<210> 22	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用来形成TAJ剔除小鼠的引物	
<400> 22	
caagttgatg tcttgacceca aggcacc	27
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用来形成TAJ剔除小鼠的引物	
<400> 23	
agcgcctcgt atggacaaag agtg	24
<210> 24	
<211> 200	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于制备siRNA分子的寡核苷酸的通用结构	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(200)	
<223> n为a、c、g、t或u	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (2)..(200)	

<223> 核苷酸可能缺失

<400> 24
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 60
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 120
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 180
 0000000000 0000000000 200

<210> 25
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于制备siRNA分子的寡核苷酸的通用结构

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(200)
 <223> n为a、c、g、t或u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(200)
 <223> 核苷酸可能缺失

<400> 25
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 60
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 120
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 180
 0000000000 0000000000 200

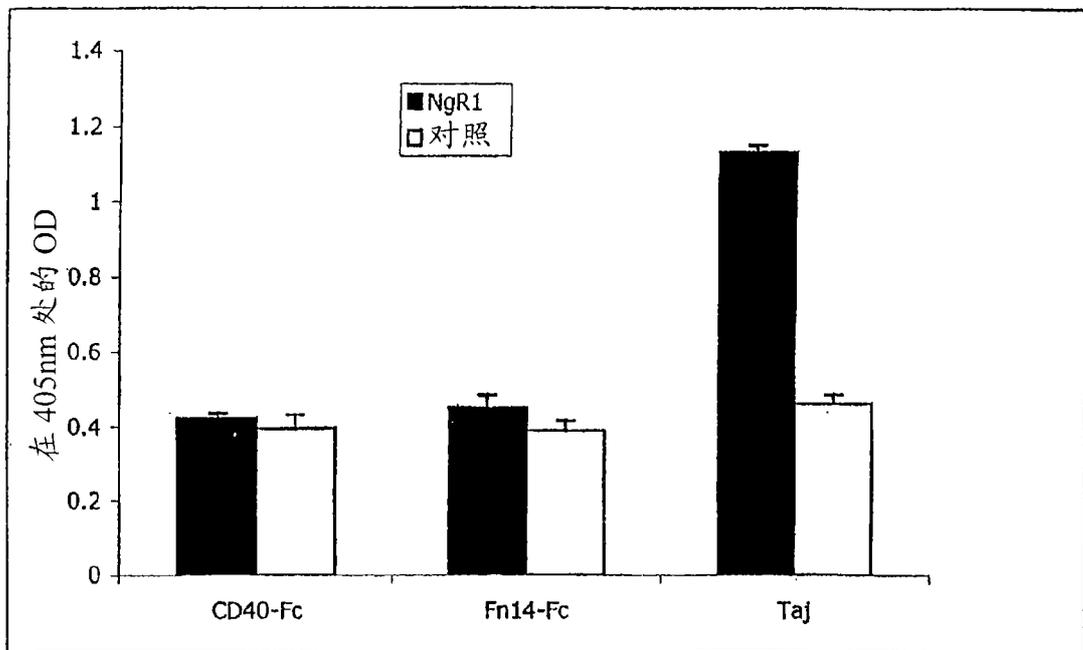
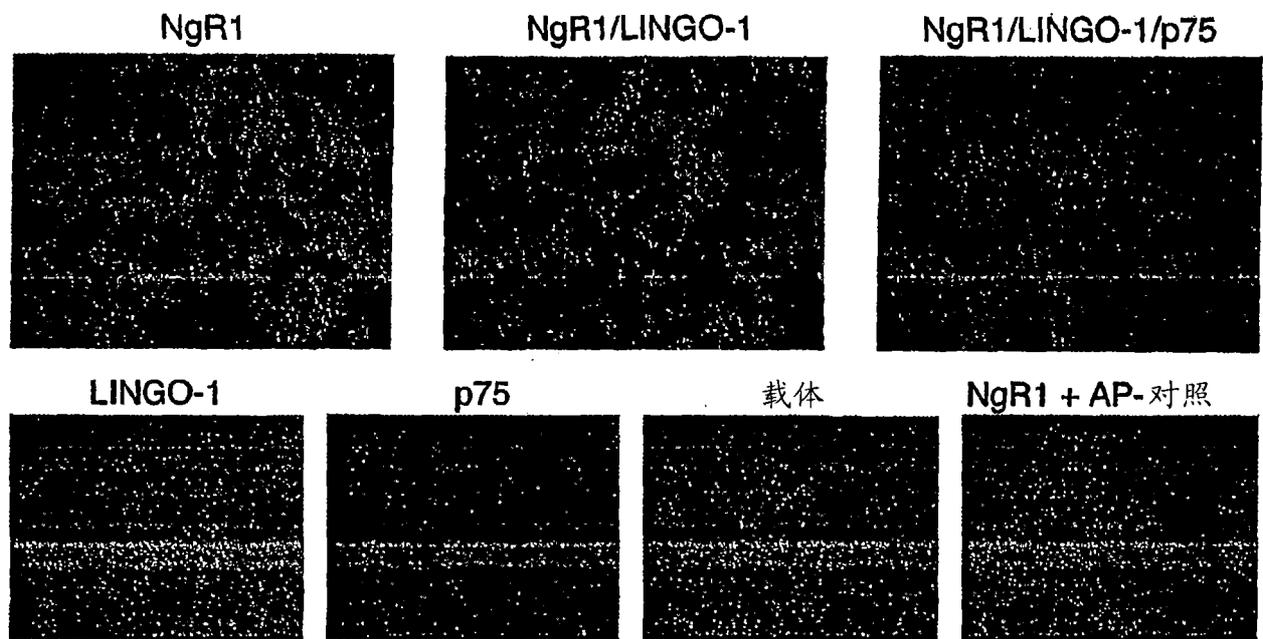


图 1A



AP-Taj 结合至 NgR1 表达的 CHO 细胞

图 1B

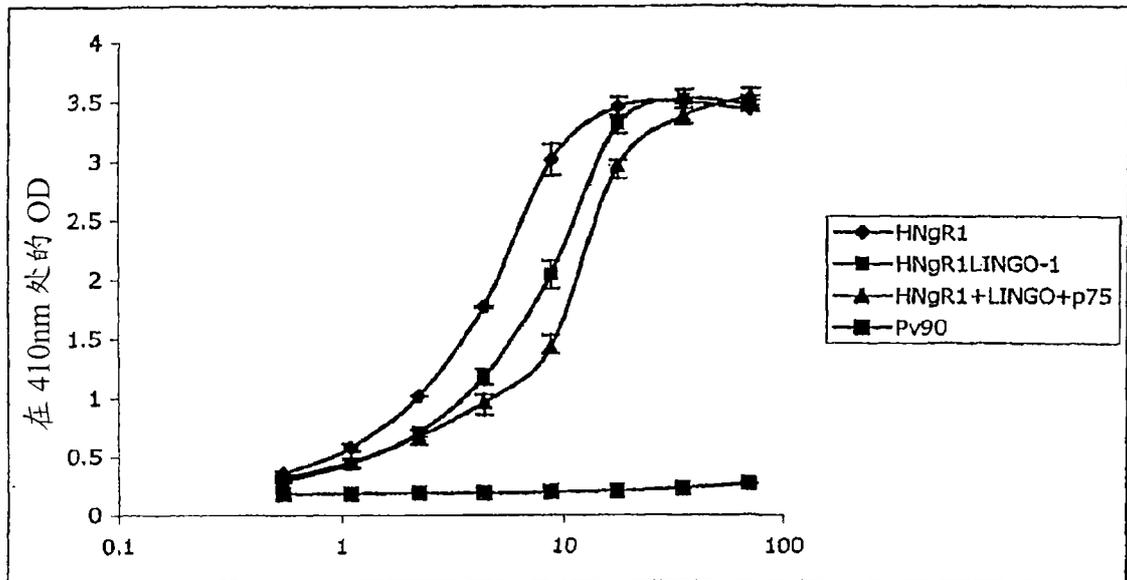


图 1C

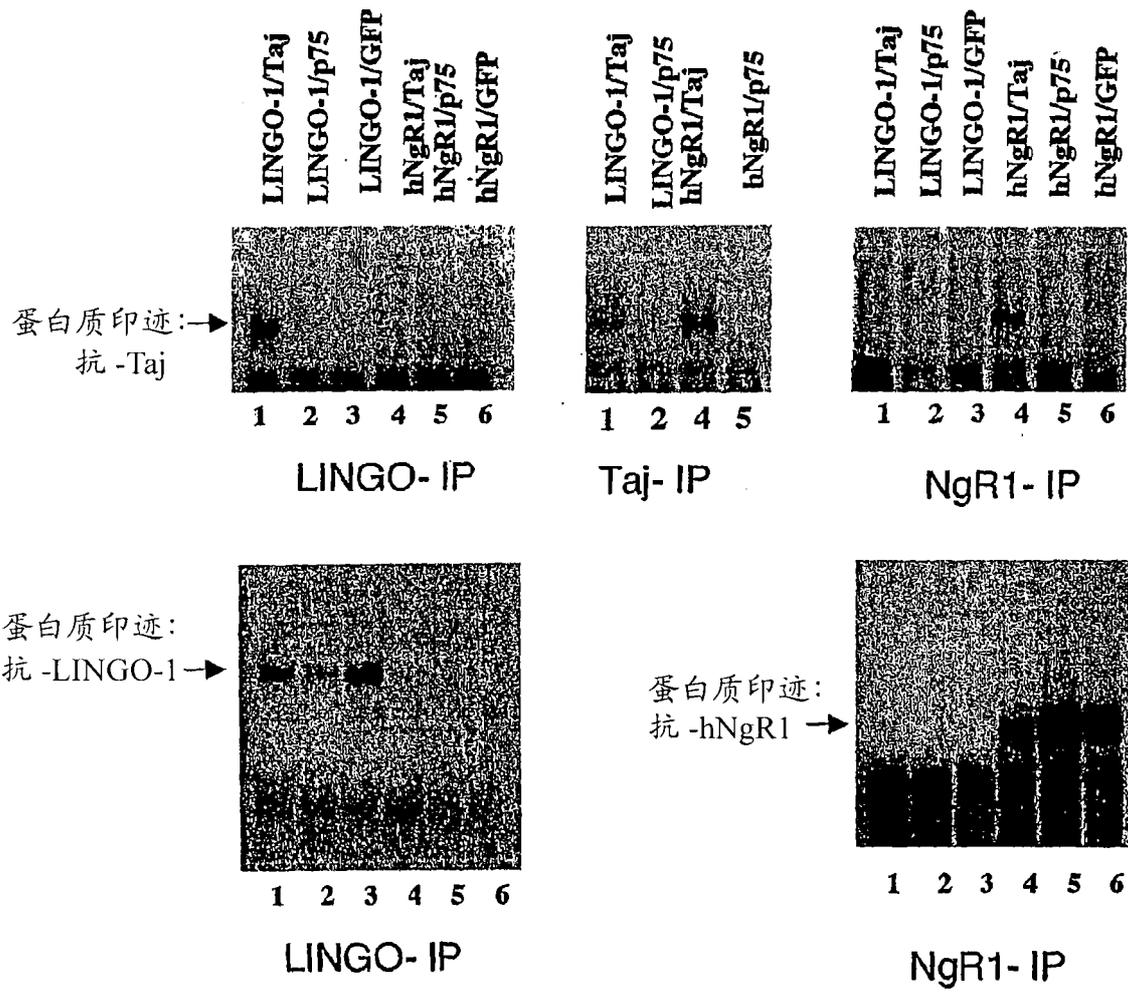


图 2

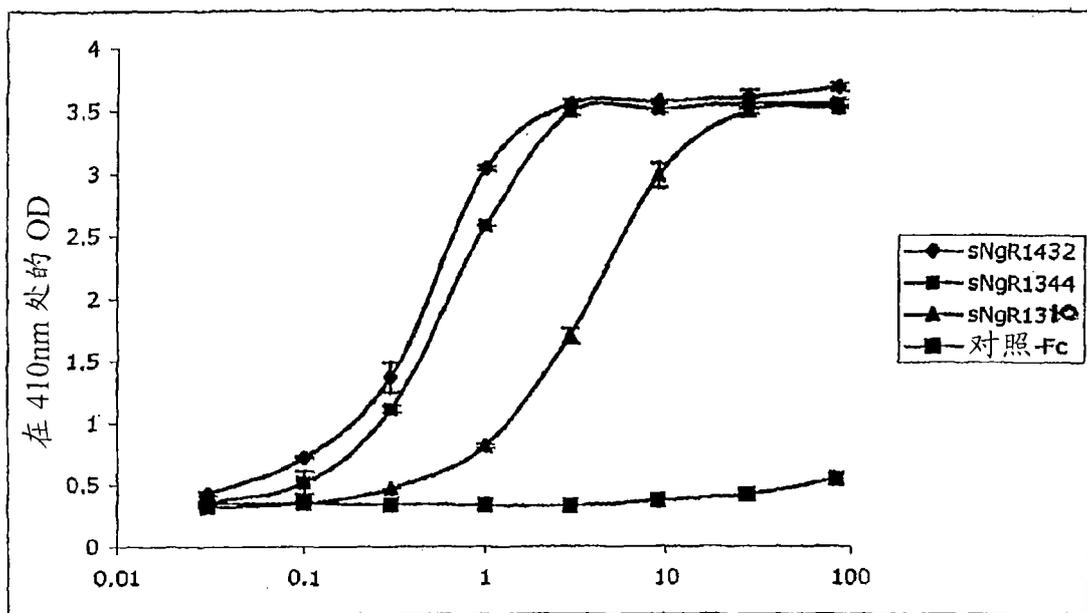


图 3

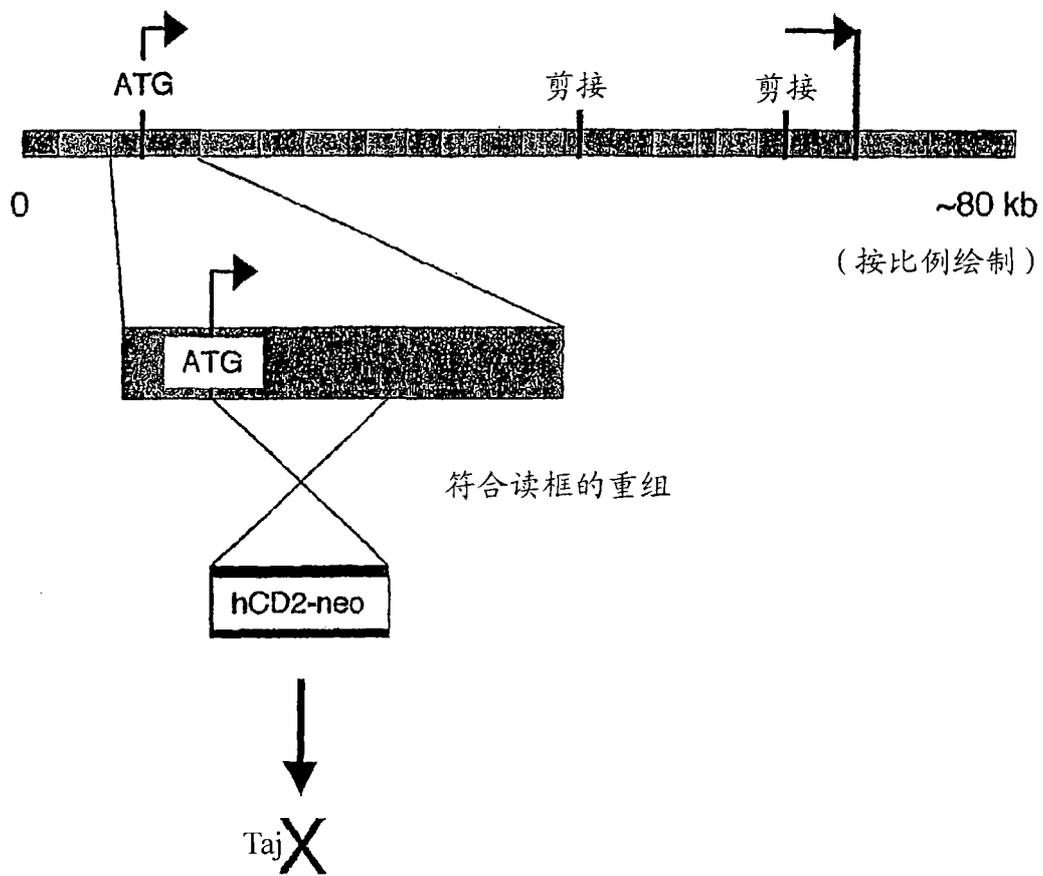
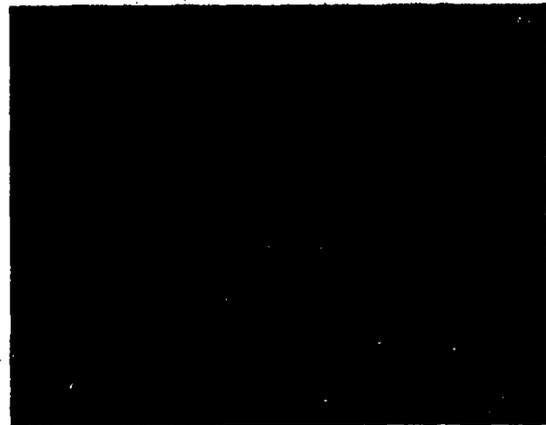


图 4

野生型神经元



对照 Fc + 髓磷脂

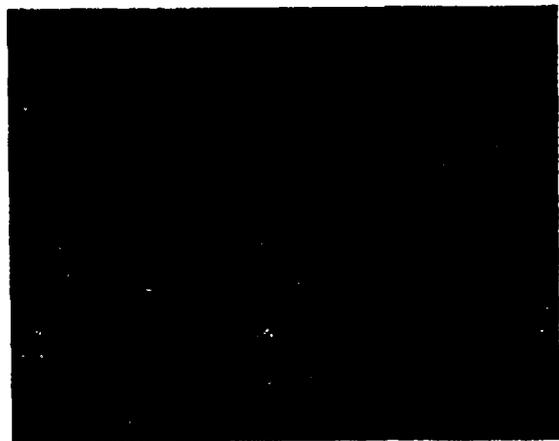


Taj Fc + 髓磷脂

Taj KO 神经元



- 髓磷脂



+ 髓磷脂

图 5A

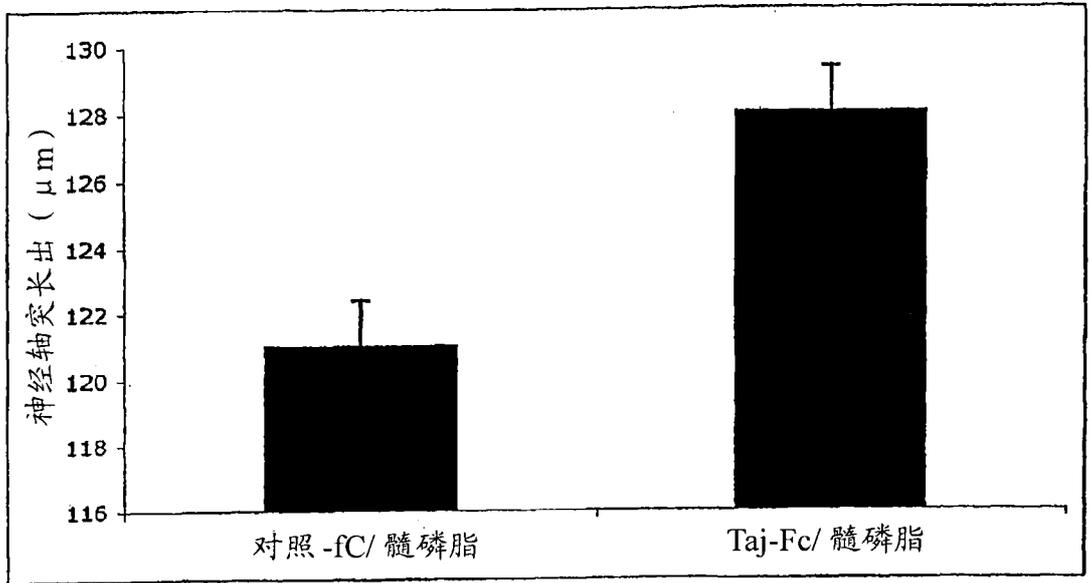


图 5B

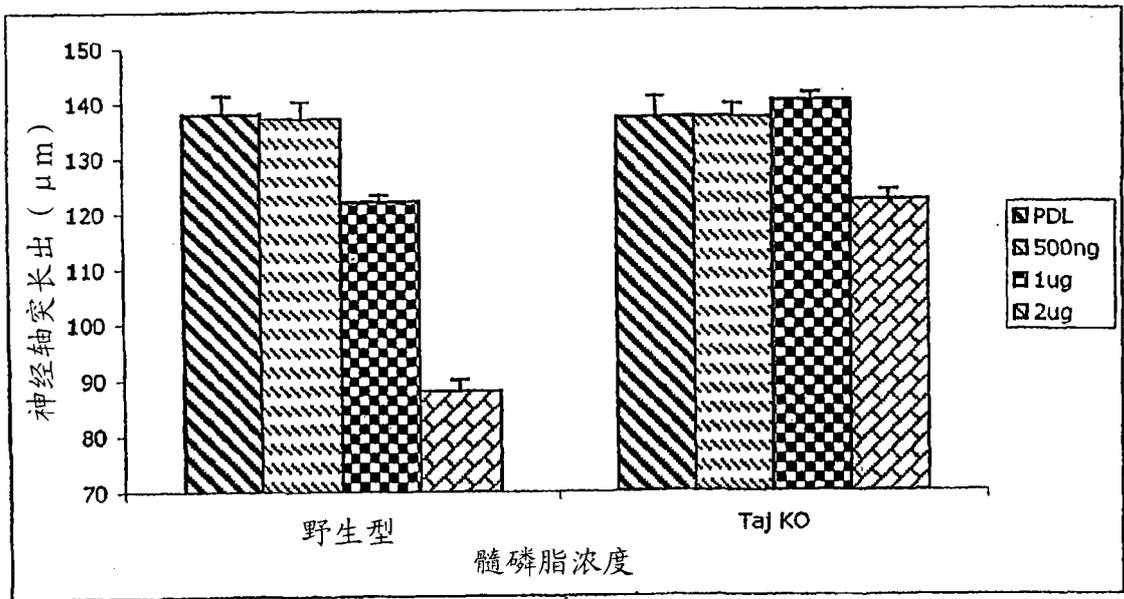


图 5C

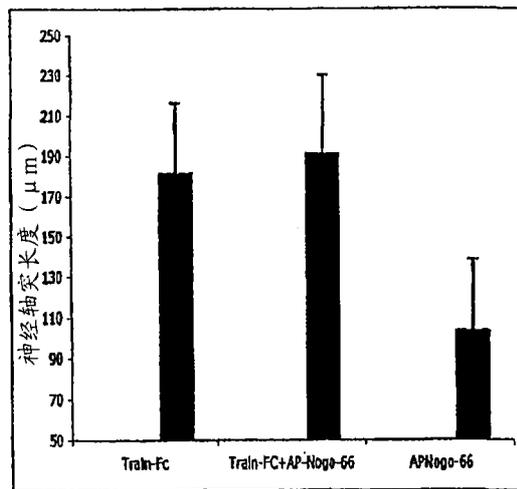
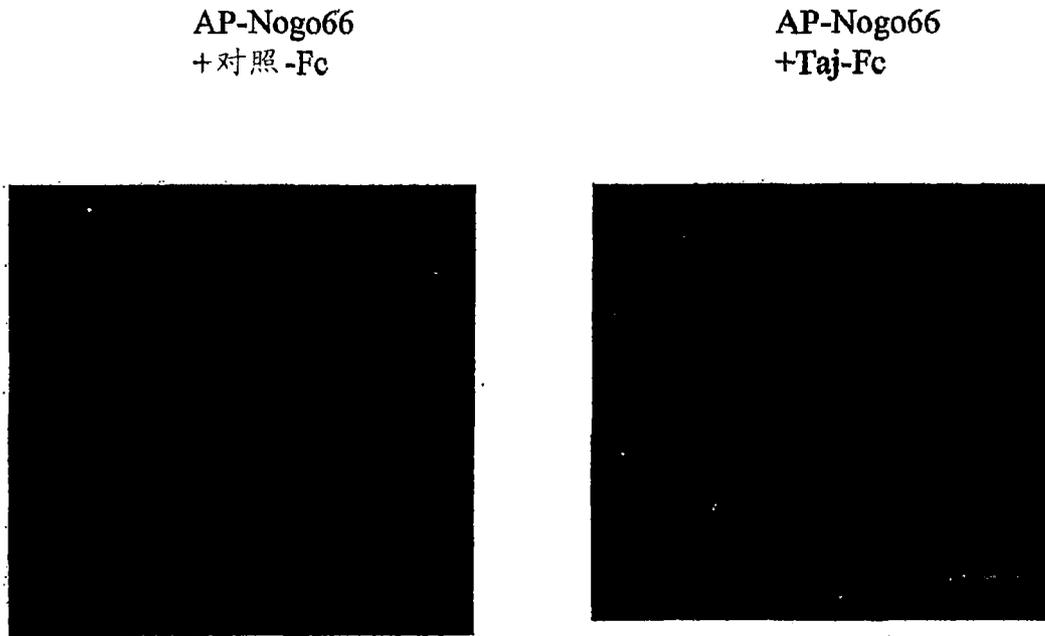


图 5D

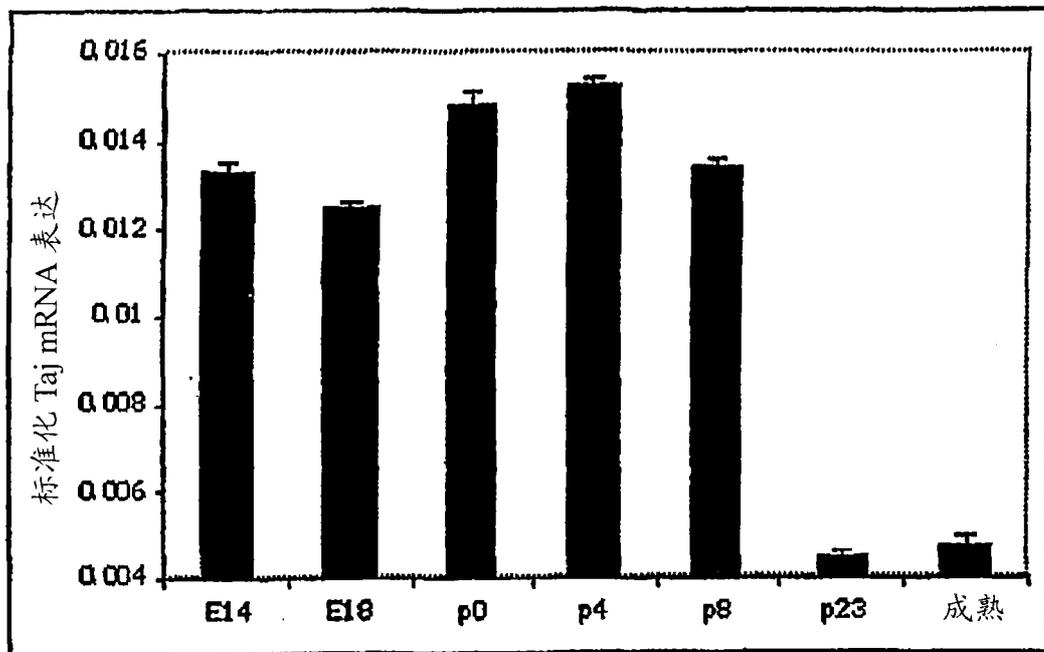


图 6