

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-517340

(P2009-517340A)

(43) 公表日 平成21年4月30日 (2009.4.30)

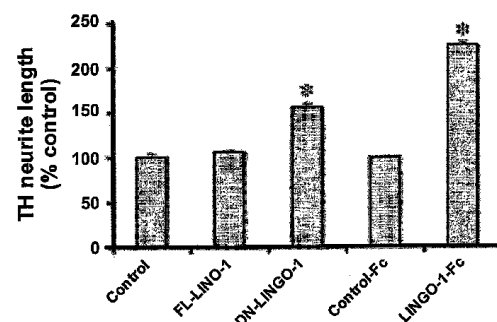
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-539068 (P2008-539068)	(71) 出願人	592221528
(86) (22) 出願日	平成18年11月3日 (2006.11.3)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年6月27日 (2008.6.27)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02142、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター 14
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/042990	(71) 出願人	508135585
(87) 国際公開番号	W02007/056161		ザ マックリーン ホスピタル コーポレイション
(87) 国際公開日	平成19年5月18日 (2007.5.18)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478、ベルモント、ミル ストリート 115
(31) 優先権主張番号	60/733,166	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年11月4日 (2005.11.4)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/800,009		
(32) 優先日	平成18年5月15日 (2006.5.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/814,523		
(32) 優先日	平成18年6月19日 (2006.6.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ドーパミン作動性ニューロンの神経突起成長および生存を促進するための方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的には、ドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、および生存を促進するための方法に関する。この方法には、上記ドーパミン作動性ニューロンを、Sp35アンタゴニストを含む組成物の有効量と、接触させる工程が、含まれる。加えて、本発明は、一般的には、ドーパミン作動性ニューロンの変性または死が関係している様々な疾患、障害、あるいは損傷を、Sp35アンタゴニストの投与によって処置する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、または生存を促進するための方法であって、前記ドーパミン作動性ニューロンを、以下：

- (i) 可溶性 S p 3 5 ポリペプチド；
- (i i) S p 3 5 抗体またはその免疫特異的断片；
- (i i i) S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチド；
- (i v) S p 3 5 アプタマー；および
- (v) 2つ以上の前記 S p 3 5 アンタゴニストの組み合わせ

からなる群より選択される S p 3 5 アンタゴニストを含む組成物の有効量と接触させる工程が含まれる、方法。

10

【請求項 2】

哺乳動物においてドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、または生存を促進するための方法であって、その必要がある哺乳動物に対して、以下：

- (i) 可溶性 S p 3 5 ポリペプチド；
- (i i) S p 3 5 抗体またはその断片；
- (i i i) S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチド、および
- (i v) S p 3 5 アプタマー；ならびに、
- (v) 2つ以上の前記 S p 3 5 アンタゴニストの組み合わせ

からなる群より選択される S p 3 5 アンタゴニストを含む組成物の有効量を投与する工程が含まれる、方法。

20

【請求項 3】

前記哺乳動物が、ドーパミン作動性ニューロンの変性が関係している疾患、障害、または損傷に罹患している、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記疾患、障害、または損傷が、パーキンソン病（P D）、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、パーキンソン病様の特徴を有している運動神経疾患、レヴィー小体認知症、進行性核上麻痺、皮質をベースとする神経節の変性、前頭側頭認知症、パーキンソニズムを伴うアルツハイマー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、チェディアック・東症候群、S C A - 3 脊髄小脳失調、X連鎖ジストニア・パーキンソニズム（D Y T 3）、ハンチントン病（ウェストファール変異体）、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病（C J D）、脳血管性パーキンソニズム、脳性小児麻痺、繰り返し起こる頭部外傷、脳炎後のパーキンソン病、神経梅毒、および統合失調症からなる群より選択される、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記疾患、障害、または損傷がパーキンソン病（P D）である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 S p 3 5 アンタゴニストに可溶性 S p 3 5 ポリペプチドが含まれる、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、以下：

- (i) S p 3 5 I g ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (i i) S p 3 5 L R R ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (i i i) S p 3 5 細胞質ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (i v) S p 3 5 膜貫通ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (v) L R R ドメインに対して C 末端側にある S p 3 5 塩基性領域、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、ならびに、

(v i) (i) から (v) の上記 S p 3 5 ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体の少なくとも 2 つの組み合わせ

からなる群より選択される S p 3 5 領域が含まれる、請求項 6 に記載の方法。

50

【請求項 8】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドには以下：

- (i) S p 3 5 I g ドメイン、
- (i i) S p 3 5 L R R ドメイン、
- (i i i) S p 3 5 細胞質ドメイン、
- (i v) S p 3 5 膜貫通ドメイン、
- (v) L R R ドメインに対して C 末端側にある S p 3 5 塩基性領域、および
- (v i) (i) から (v) の上記 S p 3 5 ドメインの少なくとも 2 つの組み合わせ

からなる群より選択される S p 3 5 領域が欠失している、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドには S p 3 5 膜貫通ドメインと S p 3 5 細胞質ドメインが欠失している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、

- (i) S p 3 5 L R R ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (i i) L R R ドメインに対して C 末端側にある S p 3 5 塩基性領域、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、および
- (i i i) S p 3 5 免疫グロブリン (I g) ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体

が含まれている、請求項 6 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、 S p 3 5 L R R ドメインの少なくとも一部が含まれているが、 S p 3 5 I g ドメイン、 S p 3 5 塩基性領域、 S p 3 5 膜貫通ドメイン、および S p 3 5 細胞質ドメインが欠失している、請求項 8 または請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、以下：

10

20

【化 1】

(i)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 33	
(ii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 35	
(iii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 64	
(iv)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 64	
(v)	配列番号 2 のアミノ酸	66 ~ 89	
(vi)	配列番号 2 のアミノ酸	90 ~ 113	
(vii)	配列番号 2 のアミノ酸	114 ~ 137	
(viii)	配列番号 2 のアミノ酸	138 ~ 161	
(ix)	配列番号 2 のアミノ酸	162 ~ 185	
(x)	配列番号 2 のアミノ酸	186 ~ 209	10
(xi)	配列番号 2 のアミノ酸	210 ~ 233	
(xii)	配列番号 2 のアミノ酸	234 ~ 257	
(xiii)	配列番号 2 のアミノ酸	258 ~ 281	
(xiv)	配列番号 2 のアミノ酸	282 ~ 305	
(xv)	配列番号 2 のアミノ酸	306 ~ 329	
(xvi)	配列番号 2 のアミノ酸	330 ~ 353	
(xvii)	配列番号 2 のアミノ酸	363 ~ 416	
(xviii)	配列番号 2 のアミノ酸	417 ~ 424	
(xix)	配列番号 2 のアミノ酸	419 ~ 493	
(xx)	配列番号 2 のアミノ酸	494 ~ 551	
(xxi)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 64	20
(xxii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 89	
(xxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 113	
(xxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 137	
(xxv)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 161	
(xxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 185	
(xxvii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 209	
(xxviii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 233	
(xxix)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 257	
(xxx)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 281	
(xxxi)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 305	
(xxxii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 329	
(xxxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 353	30
(xxxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 416	
(xxxv)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 424	
(xxxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 493	
(xxxvii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 551	
(xxxviii)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 531	
(iL)	配列番号 2 のアミノ酸	1 ~ 532	
(Li)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 89	
(Lii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 113	
(Liii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 137	
(Liv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 161	
(Lv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 185	40
(Lvi)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 209	

【化 2】

(Lvii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 233
(Lviii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 257
(Lix)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 281
(Lx)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 305
(Lxi)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 329
(Lxii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 353
(Lxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 416
(Lxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 424
(Lxv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 493
(Lxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 551
(Lxxi)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 530
(Lxxii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 531
(Lxxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 532
(Lxxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 533
(Lxxv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 534
(Lxxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 535
(Lxxvii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 536
(Lxxviii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 537
(Lxxix)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 538
(Lxxx)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 539
(Lxxxi)	配列番号 2 のアミノ酸	30 ~ 532
(Lxxxii)	配列番号 2 のアミノ酸	31 ~ 532
(Lxxxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	32 ~ 532
(Lxxxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	33 ~ 532
(Lxxxv)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 532
(Lxxxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	35 ~ 532
(Lxxxvii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 532
(Lxxxviii)	配列番号 2 のアミノ酸	30 ~ 531
(Lxxxix)	配列番号 2 のアミノ酸	31 ~ 531
(Lxxxx)	配列番号 2 のアミノ酸	32 ~ 531
(Lxxxxi)	配列番号 2 のアミノ酸	33 ~ 531
(Lxxxxii)	配列番号 2 のアミノ酸	34 ~ 531
(Lxxxxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	35 ~ 531
(Lxxxxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 531
(Lxxxxv)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 89
(Lxxxxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 113
(Lxxxxvii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 137
(Lxxxxviii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 161
(Lxxxxvc)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 185
(c)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 209
(ci)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 233
(cii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 257
(ciii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 281
(civ)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 305
(cv)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 329
(cvi)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 353
(cvii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 416
(cviii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 424
(cix)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 493
(cx)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 551
(cxi)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 530
(cxii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 531
(cxiii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 532
(cxiv)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 533

10

20

30

40

【化 3】

(cxv)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 534
(cxvi)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 535
(cxvii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 536
(cxviii)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 537
(cxix)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 538
(cxx)	配列番号 2 のアミノ酸	36 ~ 539

(c x x i) 任意の前記ポリペプチド断片の変異体または誘導体、および

(c x x i i) 任意の前記ポリペプチド断片またはその変異体もしくは誘導体の少なくとも 2 つの組み合わせ

からなる群より選択されるポリペプチド断片が含まれている、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、配列番号 2 のアミノ酸残基 3 4 ~ 5 3 2、または配列番号 2 のアミノ酸残基 3 6 ~ 5 3 2 が含まれている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、S p 3 5 I g ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体が含まれている、請求項 6 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 ~ 4 9 3 が含まれている、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 16】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに、S p 3 5 以外の部分がさらに含まれている、請求項 6 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 S p 3 5 以外の部分が、前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドに融合させられたポリペプチドである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 S p 3 5 以外の部分が、抗体 I g 部分、血清アルブミン部分、標的化部分、レポーター部分、および精製を容易にする部分からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 19】

前記 S p 3 5 以外の部分が抗体 I g 部分である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗体 I g 部分がヒンジ部分および F c 部分である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドがポリマーに結合させられている、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ポリマーが、ポリアルキレングリコール、糖ポリマー、およびポリペプチドからなる群より選択される、請求項 21 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記ポリマーがポリアルキレングリコールである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコール (P E G) である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記可溶性 S p 3 5 ポリペプチドが 1 個、2 個、3 個、または 4 個のポリマーに結合させられている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

50

前記ポリマーの分子量の合計が、5,000Daから100,000Daまでである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記Sp35アンタゴニストに、Sp35抗体またはその断片が含まれる、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記Sp35抗体またはその断片が、以下：

【化4】

(i)	配列番号2のアミノ酸	66 ~ 89
(ii)	配列番号2のアミノ酸	66 ~ 113
(iii)	配列番号2のアミノ酸	66 ~ 137
(iv)	配列番号2のアミノ酸	90 ~ 113
(v)	配列番号2のアミノ酸	114 ~ 137
(vi)	配列番号2のアミノ酸	138 ~ 161
(vii)	配列番号2のアミノ酸	162 ~ 185
(viii)	配列番号2のアミノ酸	186 ~ 209
(ix)	配列番号2のアミノ酸	210 ~ 233
(x)	配列番号2のアミノ酸	234 ~ 257
(xi)	配列番号2のアミノ酸	258 ~ 281
(xii)	配列番号2のアミノ酸	282 ~ 305
(xiii)	配列番号2のアミノ酸	306 ~ 329
(xiv)	配列番号2のアミノ酸	330 ~ 353
(xv)	配列番号2のアミノ酸	34 ~ 64
(xvi)	配列番号2のアミノ酸	363 ~ 416

10

20

(xvii) 任意の前記ポリペプチド断片の変異体または誘導体；および

(xviii) 任意の前記ポリペプチド断片またはそれらの変異体もしくは誘導体の2つ以上の組み合わせ

からなる群より選択されるポリペプチド断片から本質的に構成されるエピトープに特異的に結合する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記Sp35アンタゴニストにSp35アンタゴニストポリヌクレオチドが含まれる、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項30】

前記Sp35アンタゴニストポリヌクレオチドが、以下：

(i) アンチセンスポリヌクレオチド；

(ii) リボザイム；

(iii) 低分子干渉RNA (siRNA)；および

(iv) 低分子ヘアピンRNA (shRNA)

からなる群より選択される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記Sp35アンタゴニストポリヌクレオチドが、Sp35 mRNAのコード部分に相補的な少なくとも10塩基を含むアンチセンスポリヌクレオチドである、請求項30に記載の方法。

40

【請求項32】

前記Sp35アンタゴニストポリヌクレオチドがリボザイムである、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記Sp35アンタゴニストポリヌクレオチドがsiRNAである、請求項30に記載の方法。

【請求項34】

前記Sp35アンタゴニストポリヌクレオチドがshRNAである、請求項30に記載の

50

方法。

【請求項 3 5】

前記 s h R N A に、ヌクレオチド配列：

【化 5】

UGAUCGUCAU CCUGCUAGAC UUCAAGAGAG UCUAGCAGGA UGACGAUCUU UUUUC

(配列番号 1 3) が含まれている、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 S p 3 5 アンタゴニストがボラス注射または長期間にわたる注入によって投与される、請求項 1 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記 S p 3 5 アンタゴニストが中枢神経系に直接投与される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

請求項 1 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって：(a) 前記ドーパミン作動性ニューロンの中に、発現制御配列に対する動作可能な連結によって前記 S p 3 5 アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを導入する工程、および (b) 前記 S p 3 5 アンタゴニストを発現させる工程が含まれる、方法。

【請求項 3 9】

前記ポリヌクレオチドが、以下：

- (a) トランスフェクション；
- (b) エレクトロポレーション；
- (c) 形質導入；および
- (d) 直接のマイクロインジェクション

20

からなる群より選択される方法によって前記ドーパミン作動性ニューロンの中に導入される、請求項 3 8 または 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 2 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって：(a) 前記哺乳動物に対して、発現制御配列に対する動作可能な連結によって前記 S p 3 5 アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを投与する工程、および (b) 前記 S p 3 5 アンタゴニストを発現させる工程が含まれる、方法。

30

【請求項 4 1】

前記ポリヌクレオチドが前記ポリヌクレオチドを発現することができる培養された宿主細胞に投与される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ポリヌクレオチドが発現ベクターとして投与される、請求項 3 8 から 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記発現ベクターがウイルスベクターである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ポリヌクレオチドが、前記哺乳動物に、神経系の疾患、障害、または損傷の部位に、あるいはその付近に導入される、請求項 3 8 から 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 4 5】

前記培養された宿主細胞が、(a) レシピエント宿主細胞を、請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 4 2 もしくは請求項 4 3 に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトする工程、および (b) 前記形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を培養する工程が含まれる方法によって作成される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記宿主細胞が処置される哺乳動物に由来する、請求項 4 1 から 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

50

前記 S p 3 5 アンタゴニストが、神経系の疾患、障害、もしくは損傷の部位またはその付近でのドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、あるいは生存の障害を少なくするために十分な量で発現させられる、請求項 1 から 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、エンテロウイルスベクター、ペスチウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、パポバウイルスベクター、パルボウイルス、およびボックスウイルスベクターからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記ヘルペスウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクターおよびエプスタイン・バーウイルスベクターからなる群より選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

10

【請求項 5 0】

前記ボックスウイルスベクターがワクシニアウイルスベクターである、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記レンチウイルスベクターが p L L 3 . 7 である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記パルボウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (A A V) である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記ベクターが、局所投与、眼内投与、非経口投与、髄腔内投与、硬膜下投与、および皮下投与からなる群より選択される経路によって投与される、請求項 4 3、または 4 8 から 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5 4】

ドーパミン作動性ニューロンの中での E G F R と S p 3 5 の相互作用を阻害するための方法であって、前記ドーパミン作動性ニューロンを、以下：

- (i) 可溶性 S p 3 5 ポリペプチド；
- (i i) S p 3 5 抗体またはその断片；
- (i i i) S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチド；
- (i v) S p 3 5 アンタゴニストアプタマー；および
- (v) 2 つ以上の前記 S p 3 5 アンタゴニストの組み合わせ

30

からなる群より選択される S p 3 5 アンタゴニストを含む組成物の有効量と接触させる工程が含まれる、方法。

【請求項 5 5】

ドーパミン作動性ニューロンの中での A k t リン酸化を増加させるための方法であって、前記ドーパミンニューロンを、以下：

- (i) 可溶性 S p 3 5 ポリペプチド；
- (i i) S p 3 5 抗体またはその断片；
- (i i i) S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチド；
- (i v) S p 3 5 アンタゴニストアプタマー；および
- (v) 2 つ以上の前記 S p 3 5 アンタゴニストの組み合わせ

40

からなる群より選択される S p 3 5 アンタゴニストを含む組成物の有効量と接触させる工程が含まれる、方法。

【請求項 5 6】

ドーパミン作動性ニューロンの中での E G F R の発現を増大させるための方法であって、前記ドーパミン作動性ニューロンを、以下：

- (i) 可溶性 S p 3 5 ポリペプチド；
- (i i) S p 3 5 抗体またはその断片；
- (i i i) S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチド；
- (i v) S p 3 5 アンタゴニストアプタマー；および

50

(v) 2つ以上の前記 S p 3 5 アンタゴニストの組み合わせからなる群より選択される S p 3 5 アンタゴニストを含む組成物の有効量と接触させる工程が含まれる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、神経学、神経生物学、および分子生物学に関する。さらに具体的には、本発明は、ドーパミン作動性神経突起の再生、成長、およびドーパミン作動性ニューロン (D Aニューロン) の生存を促進する方法に関する。加えて、本発明は、S p 3 5 (L I N G O-1) 受容体アンタゴニストの投与により、ドーパミン作動性ニューロンの変性または死が関係している症状を処置する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

特定の神経変性障害は、ドーパミン作動性ニューロンの変性を特徴とする。例えば、パーキンソン病には、中脳の黒質の中のドーパミン作動性ニューロンの進行性の破壊が伴う。この破壊は、化学伝達物質であるドーパミンのレベルの低下を生じる。パーキンソン病の身体症状には、随意運動の機能障害、および特徴的な振動を生じる筋肉のグループの制御不可能な律動的な単収縮が含まれる。

【0003】

最も広く使用されているパーキンソン病の処置は、ドーパミン前駆体である L-ドーパ (L-3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン) の投与である。L-ドーパは、残っているドーパミンニューロンによって主に脱カルボキシル化された後に、失われたドーパミンに置き換わることによって間接的に作用する。しかし、L-ドーパの使用には欠点が伴う。患者は、多くの場合には、運動障害、吐き気、嘔吐、腹部膨満、および精神医学的副作用のような副作用に悩まされ、そして患者は、通常は、時間が経つにつれて L-ドーパでの処置にあまり反応しなくなる。L-ドーパでの処置が時間が経つにつれて有効ではなくなってしまうことについての提案されている理由の1つは、生存しているドーパミン作動性ニューロンの数が枯渇してしまい、したがって、投与された L-ドーパに反応できなくなってしまうことである。非特許文献1を参照のこと。加えて、ニューロンの結合 (末端またはシナプス) が続けて失われると、ドーパミン作動性ニューロンの死が原因で、L-ドーパの有効性が低下する。上記を参照のこと。シナプス後のドーパミンアゴニストを使用する治療の別の形態にもまた、副作用が伴う。さらに、L-ドーパでの処置によって患者の生活の質は改善するが、これでは疾患の進行を停止させることはできない。

【0004】

他の化合物 (例えば、グリア細胞株由来神経栄養因子 (G D N F)) は、長期間にわたって注入によって投与された場合には、ヒト患者のパーキンソン病の処置において期待が示されている。例えば、非特許文献2を参照のこと。しかし、これらの処置のレジュメは、依然として開発の初期段階にある。

【0005】

多くの他の疾患および障害もドーパミン作動性ニューロンの変性に関係している可能性がある。これらには、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、パーキンソン病様の特徴を有している運動神経疾患、レヴィー小体認知症、進行性核上麻痺、皮質をベースとする神経節の変性 (c o r t i c a l - b a s e d g a n g l i o n i c d e g e n e r a t i o n)、前頭側頭認知症、パーキンソニズムを伴うアルツハイマー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、チェディアック・東症候群 (C h e d i a k - H i g a s h i d i s e a s e)、S C A - 3 脊髄小脳失調、X連鎖ジストニア・パーキンソニズム (D Y T 3)、ハンチントン病 (ウェストファール変異体)、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、脳血管性パーキ

10

20

30

40

50

ンソニズム (vascular parkinsonism)、脳性小児麻痺、繰り返し起こる頭部外傷 (repeated head trauma)、脳炎後のパーキンソン病、統合失調症、および神経梅毒が含まれる。

【非特許文献1】Isacson O., 「Problems and solutions for circuits and synapses in Parkinson's disease」, Neuron 43:165-168 (2004)

【非特許文献2】Gillら、「Direct brain infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson disease」, Nature Med. 9:589-95 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、ドーパミン作動性ニューロンの変性または死を特徴とするパーキンソン病および他の症状についてのさらに別の処置方法が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の簡単な要旨)

本発明は、LINGO-1が中脳のドーパミン作動性(DA)ニューロンの中で発現され、そして神経突起の成長およびDAニューロンの生存をネガティブ調節することの発見に基づく。これらの発見に基づいて、本発明は、一般的には、ドーパミン作動性ニューロンの増殖、生存、修復、成長、および変性を促進するための方法に関する。この方法には、上記ドーパミン作動性ニューロンを、Sp35アンタゴニストを含む組成物の有効量と接触させる工程が含まれる。加えて、本発明は、一般的には、Sp35アンタゴニストの投与による、ドーパミン作動性ニューロンの変性または死が関係している様々な疾患、障害、または損傷の処置方法に関する。

【0008】

特定の実施形態においては、本発明には、哺乳動物においてドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、または生存を促進するための方法が含まれる。この方法には、その必要がある哺乳動物に、Sp35アンタゴニストを含む組成物の有効量を投与する工程が含まれる。

【0009】

さらに別の実施形態においては、哺乳動物は、ドーパミン作動性神経突起の変性または死が関係している疾患、障害、損傷、または症状を有していると診断されている。いくつかの実施形態においては、疾患、障害、損傷、または症状は、パーキンソン病(PD)、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、パーキンソン病様の特徴を有している運動神経疾患、レヴィー小体認知症、進行性核上麻痺、皮質をベースとする神経節の変性、前頭側頭認知症、パーキンソニズムを伴うアルツハイマー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、チェディアック・東症候群、SCA-3脊髄小脳失調、X連鎖ジストニア・パーキンソニズム(DYT3)、ハンチントン病(ウェストファール変異体)、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、脳血管性パーキンソニズム、脳性小児麻痺、繰り返し起こる頭部外傷、脳炎後のパーキンソン病、神経梅毒、および統合失調症からなる群より選択される。

【0010】

上記方法の様々な実施形態においては、Sp35アンタゴニストは、ドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、または生存をネガティブに調節するSp35の能力を妨害する任意の分子であり得る。特定の実施形態においては、Sp35アンタゴニストは、可溶性Sp35ポリペプチド、Sp35抗体もしくはその断片、Sp35アンタゴニストポリヌクレオチド(例えば、RNA干渉)、Sp35アプタマー、あるいは2つ以上のSp35アンタゴニストの組み合わせからなる群より選択される。

10

20

30

40

50

【0011】

特定の実施形態においては、Sp35アンタゴニストは可溶性Sp35ポリペプチドである。本発明の特定の可溶性Sp35ポリペプチドとしては、以下のドメインの1つ以上を含むか、または以下のドメインの1つ以上が欠失している可溶性Sp35ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない：(i) Sp35ロイシンリッチリピート(LRR)ドメイン、(ii) LRRドメインのC末端側のSp35塩基性領域、および(iii) Sp35免疫グロブリン(Ig)ドメイン。いくつかの実施形態においては、可溶性Sp35ポリペプチドには、Sp35 Igドメイン、Sp35 LRRドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインが欠失している。さらに別の本発明のSp35可溶性ポリペプチドには、膜貫通ドメインと細胞質ドメインが欠失しているポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態においては、可溶性Sp35ポリペプチドには、Sp35 LRRドメインが含まれ、そしてSp35 Igドメイン、Sp35塩基性領域、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインが欠失している。いくつかの実施形態においては、可溶性Sp35ポリペプチドには、配列番号2のアミノ酸残基34～532、または配列番号2のアミノ酸残基36～532が含まれる。

【0012】

いくつかの実施形態においては、Sp35アンタゴニストは、Sp35ではない部分を含む融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態においては、Sp35ではない部分は、抗体Ig部分、血清アルブミン部分、標的化部分、レポーター部分、および精製を容易にする部分からなる群より選択される。いくつかの実施形態においては、抗体Ig部分はヒンジ部分およびFc部分である。

【0013】

別の実施形態においては、Sp35アンタゴニストは、以下のSp35ドメインの1つ以上を含むSp35ポリペプチドに結合する抗体またはその断片である：(i) Sp35ロイシンリッチリピート(LRR)ドメイン、(ii) LRRドメインのC末端側のSp35塩基性領域、および(iii) Sp35免疫グロブリン(Ig)ドメイン。加えて、Sp35抗体またはその断片は、本明細書中に記載されるSp35ポリペプチド断片を含むポリペプチドの中のエピトープに特異的に結合する。

【0014】

他の実施形態においては、Sp35アンタゴニストは、アンチセンスポリヌクレオチド、アプタマー、リボザイム、低分子干渉RNA(sirRNA)、または小さいヘアピンRNA(shRNA)のような、Sp35アンタゴニストポリヌクレオチドである。

【0015】

さらなる実施形態においては、Sp35アンタゴニストはSp35アプタマーである。Sp35アプタマーは、Sp35に結合して、ドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、および生存をネガティブに調節するSp35の能力を妨害する、小さいポリペプチドまたはポリヌクレオチドである。

【0016】

本発明のさらなる実施形態には、インビボでの遺伝子治療による、ドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、および生存を促進するための方法、あるいは、ドーパミン作動性神経突起の変性もしくは死が関係している疾患、障害、または損傷を処置する方法が含まれる。この方法には、哺乳動物に対して、疾患、障害、もしくは損傷の部位またはその近くに、Sp35アンタゴニストをコードするヌクレオチド配列を投与する工程が含まれる。その結果、Sp35アンタゴニストは、損傷部位もしくはその近くでのドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、または生存の障害を少なくするために十分な量で、哺乳動物においてヌクレオチド配列から発現される。特定の実施形態においては、ベクターはウイルスベクターであり、これは、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、エンテロウイルスベクター、ペスチウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、パ

ルボウイルス、および単純ヘルペスウイルスベクターからなる群より選択される。いくつかの実施形態においては、ベクターは、局所投与、眼内投与、非経口投与、クモ膜下投与、硬膜下投与、および皮下投与からなる群より選択される経路によって投与される。いくつかの実施形態においては、疾患、障害、損傷、または症状は、パーキンソン病（PD）、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、パーキンソン病様の特徴を有している運動神経疾患、レヴィー小体認知症、進行性核上麻痺、皮質をベースとする神経節の変性、前頭側頭認知症、パーキンソニズムを伴うアルツハイマー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、チェディアック・東症候群、SCA-3 脊髄小脳失調、X連鎖ジストニア・パーキンソニズム（DYT3）、ハンチントン病（ウェストファール変異体）、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、脳血管性パーキンソニズム、脳性小児麻痺、繰り返し起こる頭部外傷、脳炎後のパーキンソン病、神経梅毒、および統合失調症からなる群より選択される。

10

【0017】

加えて、本発明には、ドーパミン作動性ニューロンの再生、成長、および生存を促進するための方法、あるいは、ドーパミン作動性神経突起の変性もしくはしに関係している哺乳動物の疾患、障害、または損傷を処置する方法が含まれる。この方法には、：（a）ドーパミン作動性ニューロンの中にSp35アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを導入する工程；および（b）上記Sp35アンタゴニストを発現させる工程が含まれる。加えて、本発明は、（a）上記哺乳動物に、発現制御配列に対する動作可能な連結によりSp35アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを投与する工程、および（b）上記Sp35アンタゴニストを発現させる工程が含まれる方法に関する。いくつかの実施形態においては、培養された宿主細胞は、処置される哺乳動物に由来する。特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、トランスフェクション、エレクトロポレーション、ウイルス形質導入、または直接のマイクロインジェクションにより、宿主細胞またはドーパミン作動性ニューロンの中に導入される。特定の実施形態においては、処置される疾患、障害、損傷、または症状は、パーキンソン病（PD）、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、パーキンソン病様の特徴を有している運動神経疾患、レヴィー小体認知症、進行性核上麻痺、皮質をベースとする神経節の変性、前頭側頭認知症、パーキンソニズムを伴うアルツハイマー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、チェディアック・東症候群、SCA-3 脊髄小脳失調、X連鎖ジストニア・パーキンソニズム（DYT3）、ハンチントン病（ウェストファール変異体）、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、脳血管性パーキンソニズム、脳性小児麻痺、繰り返し起こる頭部外傷、脳炎後のパーキンソン病、神経梅毒、および統合失調症からなる群より選択される。

20

30

【0018】

いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド、アプタマー、および抗体はポリマーに結合させられる。いくつかの実施形態においては、ポリマーは、ポリアルキレングリコール、糖ポリマー、およびポリペプチドからなる群より選択される。いくつかの実施形態においては、ポリアルキレングリコールはポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチドおよび抗体は、1個、2個、3個、または4個のポリマーに結合させられる。いくつかの実施形態においては、ポリマーの分子量の合計は、5,000Daから100,000Daまでである。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

（発明の詳細な説明）

定義

他の場所で定義されていない限りは、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。矛盾する場合には、定義を含む本出願が支配するであろう。文脈によって他の場所で必要とされない限りは単数形の用語には複数形の用語が当然含まれ、そして複数形

50

の用語には単数形の用語が当然含まれる。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許、および他の参考文献は、個々の刊行物または特許出願が引用により組み入れられることが具体的かつ個別に示されているかのように、全ての目的のためのそれらの全体が引用により組み入れられる。

【0020】

本明細書中に記載されるものに類似しているまたは同等の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、適切な方法および材料が以下に記載される。材料、方法、および実施例は例示にすぎず、限定とは意図されない。本発明の他の特徴および利点は、詳細な記載から、そして特許請求の範囲から明らかであろう。

【0021】

本発明をさらに定義するために、以下の用語および定義が提供される。

【0022】

用語「a」または「an」のものは、1つ以上のそのものを意味することに留意されたい。例えば、「免疫グロブリン分子(an immunoglobulin molecule)」は、1つ以上の免疫グロブリン分子を示すと理解される。このように、用語「a」(または「an」)、「1つ以上」、および「少なくとも1つ」は、本明細書中ではほとんど同じ意味で使用する事ができる。

【0023】

本明細書および特許請求の範囲を通じて、用語「含む(comprise)」または「含む(comprises)」もしくは「含まれている(comprising)」のようなバリエーションは、任意の記載される請求項数値または整数値のグループが含まれることを示すが、任意の他の整数値または整数値のグループの排除を示すものではない。

【0024】

本明細書中で使用される場合は、「治療有効量」は、所望される治療結果を得るために、必要な投与量で、そして必要な時間の間、有効である量を意味する。治療結果は、例えば、症状の軽減、より長い生存期間、活動の改善などであり得る。治療結果は必ずしも「治癒」でなくてよい。

【0025】

本明細書中で使用される場合は、用語「処置(treatment)」または「処置する(treating)」は、疾患の症状を緩和するかまたは軽減するために動物に薬剤を投与することを意味する。加えて、用語「処置」または「処置する」は、疾患の進行を防ぐための動物への薬剤の投与を意味する。

【0026】

本明細書中で使用される場合は、「予防有効量」は、所望される予防結果を得るために、必要な投与量で、そして必要な時間の間、有効である量を意味する。通常、予防的用量は疾患の前に、または疾患の初期段階に被験体において使用されるので、予防有効量は治療有効量よりも少ないであろう。

【0027】

本明細書中で使用される場合は、「ポリヌクレオチド」には、全長のcDNA配列のヌクレオチド配列が含まれ得、これには、5'および3'非翻訳配列、コード配列、さらには、核酸配列の断片、エピトープ、ドメイン、および変異体が含まれる。ポリヌクレオチドは任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得る。これは、未修飾のRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖の領域と二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖の領域と二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖であってもよく、また、より典型的には二本鎖であるかまたは一本鎖の領域と二本鎖の領域の混合物であってもよい、DNAとRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。加えて、ポリヌクレオチドは、RNA、またはDNA、またはRNAとDNAの両方を含む三本鎖の領域から構成され得る。ポリヌクレオチドには、安定性または他の理由のために修飾された、1つ以上の修飾された塩基、

10

20

30

40

50

またはDNAもしくはRNA骨格が含まれる場合もある。「修飾された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基と、イノシンのような珍しい塩基が挙げられる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができる。したがって、「ポリヌクレオチド」には、化学修飾された形態、酵素によって修飾された形態、または代謝によって修飾された形態が含まれる。

【0028】

本発明においては、「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって互いに結合させられたアミノ酸（すなわち、ペプチド等量式）から構成され得、そしてこれには、20種類の遺伝子をコードするアミノ酸（例えば、自然界には存在しないアミノ酸）以外のアミノ酸が含まれる場合がある。本発明のポリペプチドは、いずれかの自然なプロセス（例えば、翻訳後プロセッシング）によって、あるいは、当該分野で周知の化学修飾技術によって修飾することができる。そのような修飾は、基本的なテキストに、そしてより詳細なモノグラフに、さらには、膨大な量の研究論文に十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ酸末端またはカルボキシル末端を含むポリペプチドのどの場所でも起こり得る。同じタイプの修飾が、任意のポリペプチドの中のいくつかの部位で、同じ程度で、または異なる程度で存在する場合がある。また、任意のポリペプチドには、多くのタイプの修飾が含まれ得る。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分岐している場合があり、そしてこれらは環状である場合もあり、これには分岐を伴う場合も、また分岐を伴わない場合もある。環状のポリペプチド、分岐しているポリペプチド、および分岐している環状のポリペプチドは、翻訳後の自然なプロセスの結果生じる場合も、また、合成方法によって作成される場合もある。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスホチジリノシトル（phosphatidylinositol）の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合による架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解的プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなトランスファーRNAによって媒介されるタンパク質へのアミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる。（例えば、Proteins—Structure And Molecular Properties, 第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1—12頁 (1983); Seifterら, Meth Enzymol 182: 626—646 (1990); Rattanら, Ann NY Acad Sci 663: 48—62 (1992)を参照のこと）。

【0029】

用語「断片」、「変異体」、「誘導体」、およびアナログには、本発明のSp35アンタゴニストについて言及される場合には、Sp35活性を阻害する能力を少なくともいくつか保持している任意のアンタゴニスト分子が含まれる。Sp35アンタゴニストには、本明細書中で使用される場合には、Sp35アンタゴニストがその機能を果たす限りは、断片、変異体、または誘導体分子が制限なく含まれ得る。本発明の可溶性Sp35ポリペプチドには、Sp35タンパク質分解性断片、欠失断片、そして特に、動物に投与されると作用部位により早く到達する断片が含まれ得る。ポリペプチド断片にはさらに、自然界に存在しているポリペプチドの抗原性エピトープまたは免疫原性エピトープ（直鎖状エピトープ、ならびに三次元エピトープが含まれる）を含むポリペプチドの任意の部分が含まれる。本発明の可溶性Sp35ポリペプチドには、上記の断片を含む変異体Sp35領域が含まれる場合があり、そして、アミノ酸置換、欠失、もしくは挿入が原因で変化してい

るアミノ酸配列を有しているポリペプチドも含まれる場合がある。変異体は、自然に生じる場合があり、例えば、対立遺伝子変異体であり得る。「対立遺伝子変異体」によっては、生物の染色体上の任意の遺伝子座を占有している遺伝子の別の形態が意図される。Genes II, Lewin, B., 編., John Wiley & Sons, New York (1985)。自然界には存在しない変異体は、当該分野で公知の突然変異誘発技術を使用して生産することができる。可溶性Sp35ポリペプチドには、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失、あるいは付加が含まれ得る。本発明のSp35アンタゴニストには、誘導分子も含まれる場合がある。例えば、本発明の可溶性Sp35ポリペプチドには、自然界に存在しているポリペプチドについては見られないさらなる特徴を示すように変更されたSp35領域が含まれる場合がある。例としては、融合タンパク質およびタンパク質結合体が挙げられる。

10

【0030】

本発明においては、「ポリペプチド断片」は、Sp35ポリペプチドの短いアミノ酸配列を意味する。タンパク質断片は「独立しているもの(free-standing)」である場合も、また、その断片が一部もしくは領域を形成するより大きなポリペプチドの中に含まれる場合もある。本発明のポリペプチド断片の代表的な例としては、例えば、約5アミノ酸、約10アミノ酸、約15アミノ酸、約20アミノ酸、約30アミノ酸、約40アミノ酸、約50アミノ酸、約60アミノ酸、約70アミノ酸、約80アミノ酸、約90アミノ酸、および約100アミノ酸、またはそれ以上の長さを含む断片が挙げられる。

【0031】

特定の実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用されるSp35アンタゴニストは、「抗体」もしくは「免疫グロブリン」分子、またはそれらの免疫特異的断片であり、例えば、自然界に存在している抗体もしくは免疫グロブリン分子、または抗体分子と同様の様式で抗原に結合する操作された抗体分子もしくは断片である。用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、本明細書中ではほとんど同じ意味で使用される。加えて、本発明の方法において使用される免疫グロブリン分子はまた、「免疫特異的」または「抗原特異的」または「抗原結合性」分子と記載される場合もあり、抗体分子およびその断片を言うようにほとんど同じ意味で使用される。抗体または免疫グロブリンには、重鎖の可変ドメインが少なくとも含まれ、通常は、重鎖の可変ドメインと軽鎖の可変ドメインが、少なくとも含まれる。脊椎動物システムの基本的な免疫グロブリン構造は、比較的十分に理解されている。例えば、引用により本明細書中に組み入れられるHarlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988)を参照のこと。

20

30

【0032】

以下でさらに詳細に議論されるように、用語「免疫グロブリン」には、生化学的に識別することができる5つの広いクラスのポリペプチドが含まれる。5つのクラスは全て、明らかに本発明の範囲にある。以下の議論は、一般的に、IgGクラスの免疫グロブリン分子に関する。IgGに関しては、標準的な免疫グロブリン分子には、およそ23,000ダルトンの分子量の2つの同じ軽鎖ポリペプチドと、53,000~70,000の分子量の2つの同じ重鎖ポリペプチドが含まれる。4つの鎖は、通常、「Y」立体配置でジスルフィド結合によって連結されており、ここでは、軽鎖は「Y」の口の部分で始まり、可変領域を介して伸びる重鎖をひとまとめにしている。

40

【0033】

軽鎖および重鎖はいずれも、構造的相同性と機能的相同性の領域に分けられる。用語「定常」および「可変」は機能的に使用される。これに関して、軽鎖の可変ドメイン(V_L)部分と重鎖の可変ドメイン(V_H)部分の両方によって抗原の認識および特異性が決定されることは明らかであろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン(C_L)と重鎖の定常ドメイン(C_{H1} 、 C_{H2} 、または C_{H3})により、分泌、経胎盤運動性(transplacental mobility)、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性が

50

付与される。慣例により、定常領域ドメインの番号は、これらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から離れるに伴い、大きくなる。N末端部分は可変領域であり、C末端部分は定常領域である。C_H3およびC_Lドメインには、実際には、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端がそれぞれ含まれる。

【0034】

軽鎖は、カッパまたはλ（κ、λ）のいずれかとして分類される。それぞれの重鎖のクラスは、κ軽鎖またはλ軽鎖のいずれかに結合することができる。一般的には、軽鎖と重鎖は互いに共有結合し、2つの重鎖の「テール」部分はジスルフィド共有結合によって、あるいは、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって作成される場合には共有結合以外の結合によって互いに結合する。重鎖の中では、アミノ酸配列は、Y立体配置のフォークの先端部にあるN末端から、それぞれの鎖の低部にあるC末端に向かって並ぶ。当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン（γ、μ、α、δ、ε）として分類され、これらの中にはいくつかのサブクラスがある（例えば、γ1～γ4）ことを理解するであろう。この鎖の性質が、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEとしての抗体の「クラス」を決定する。免疫グロブリンのサブクラス（イソ型）（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁など）は十分に特性決定されており、機能的特異性を付与することが知られている。これらのクラスおよびイソ型のそれぞれの修飾されたバージョンは、本開示を考慮すれば当業者は容易に認識することができ、したがって、本発明の範囲に含まれる。

【0035】

上記に示されたように、可変領域により、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することができる。すなわち、抗体のV_LドメインとV_Hドメインは一緒に可変領域を形成し、これが三次元的な抗原結合部位を定義する。この4つの分子からなる抗体の構造はYのそれぞれのアームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。さらに具体的には、抗原結合部位は、V_H鎖とV_L鎖のそれぞれの上にある3つの相補性決定領域（CDR）によって定義される。いくつかの場合（例えば、ラクダ科の種に由来するか、またはラクダ科の免疫グロブリンに基づいて操作された特定の免疫グロブリン分子）には、完全な免疫グロブリン分子は、重鎖だけから構成され、軽鎖が含まれない場合がある。例えば、Hamers-Castermanら、Nature 363:446-448（1993）を参照のこと。

【0036】

自然界に存在している抗体においては、それぞれの抗原結合ドメインの中に存在する6個の「相補性決定領域」すなわち「CDR」は、アミノ酸の短く、不連続な配列であり、これは水性の環境の中で抗体がその三次元立体配置を確実にとると、抗原結合ドメインを形成するように特異的に配置されている。抗原結合ドメインの中の残りのアミノ酸は「フレームワーク」領域と呼ばれ、低い分子間での可変性を示す。フレームワーク領域はほぼβ-シートの立体配置をとり、CDRは、β-シート構造を繋ぐ、または場合によってはその一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有相互作用によって、正確な方向のCDRの配置を提供する足場を形成する役割を担う。配置されたCDRによって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性の抗原上のエピトープに対する表面相補性を定義する。この相補性の表面は、その同種のエピトープに対する抗体の共有結合ではない結合を促進する。CDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸はそれぞれ、当業者であれば、任意の所定の重鎖または軽鎖可変領域について容易に同定することができる。なぜなら、これらは正確に定義されているからである（「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, Kabat, E. ら、U. S. Department of Health and Human Services, (1983)；およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917（1987）を参照のこと、これらはそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）。

【0037】

しかし、ラクダ科の種においては、重鎖可変領域（ $V_H H$ と呼ばれる）は、完全なCDRを形成する。ラクダ科の $V_H H$ 可変領域と通常の抗体（ V_H ）に由来する領域の間での主な相違点としては、（a） $V_H H$ の中に対応する領域と比較して、 V_H の軽鎖接触表面の中のアミノ酸はより疎水性であること、（b） $V_H H$ のCDR3のほうがより長いこと、そして（c） $V_H H$ の中のCDR1とCDR3の間でジスルフィド結合が頻繁に起こることが挙げられる。

【0038】

1つの実施形態においては、本発明の方法において使用される抗原結合分子には、抗体分子の少なくとも1つの重鎖CDRまたは軽鎖CDRが含まれる。別の実施形態においては、本発明の方法において使用される抗原結合分子には、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも2つのCDRが含まれる。別の実施形態においては、本発明の方法において使用される抗原結合分子には、1つの以上の抗体分子に由来する少なくとも3つのCDRが含まれる。別の実施形態においては、本発明の方法において使用される抗原結合分子には、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも4個のCDRが含まれる。別の実施形態においては、本発明の方法において使用される抗原結合分子には、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも5個のCDRが含まれる。別の実施形態においては、本発明の方法において使用される抗原結合分子には、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも6個のCDRが含まれる。目的の抗原結合分子に含めることができる少なくとも1つのCDRを含む例示的な抗体分子は当該分野で公知であり、そして、例示的な分子は本明細書中に記載される。

【0039】

本発明の方法において使用される抗体またはその免疫特異的断片としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片（例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')₂、Fd、Fvs、単鎖Fvs（scFv）、単鎖抗体、ジスルフィド結合したFvs（sdFv）、V_LもしくはV_Hドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリーによって生産される断片、ならびに、抗イディオタイプ（抗Id）抗体（本明細書中に開示される結合分子に対する抗Id抗体を含む）が挙げられるが、これらに限定はされない。ScFv分子は当該分野で公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂）、またはサブクラスのものであり得る。

【0040】

抗体断片（単鎖抗体を含む）には、可変領域（単数または複数）が単独で、あるいは以下の全体または一部と組み合わせて含まれ得る：ヒンジ領域、重鎖のC_H1、C_H2、およびC_H3ドメイン、または軽鎖のC_L。本発明には、可変領域（単数または複数）のヒンジ領域、C_H1、C_H2、C_H3、またはC_Lドメインとの任意の組み合わせもまた含まれている抗原結合断片も含まれる。本明細書中に開示される方法において使用される抗体またはその免疫特異的断片は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源に由来し得る。好ましくは、抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、ロバ抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、モルモット抗体、ラクダ抗体、ラマ抗体、ウマ抗体、またはニワトリ抗体である。別の実施形態においては、可変領域は、軟質類（condrictoid）起源（例えば、サメ由来）であり得る。本明細書中で使用される場合は、「ヒト」抗体には、以下に、そして例えば、Kucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号に記載されているように、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有している抗体が含まれ、そして、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、もしくは1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックであり、内因性の免疫グロブリンは発現しない動物から単離された、抗体が含まれる。

【0041】

本明細書中で使用される場合は、用語「重鎖部分」には、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。重鎖部分を含むポリペプチドには、以下の少なくとも1つが含まれる： C_H1 ドメイン、ヒンジ（例えば、上部ヒンジ領域、中部ヒンジ領域、および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、 C_H2 ドメイン、 C_H3 ドメイン、またはそれらの変異体もしくは断片。例えば、重鎖部分には、 C_H1 ドメインを含むポリペプチド鎖； C_H1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、および C_H2 ドメインを含むポリペプチド鎖； C_H1 ドメインおよび C_H3 ドメインを含むポリペプチド鎖； C_H1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、および C_H3 ドメインを含むポリペプチド鎖、または、 C_H1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、 C_H2 ドメイン、および C_H3 ドメインを含むポリペプチド鎖が含まれ得る。重鎖部分にはまた、 C_H3 ドメインを含むポリペプチド鎖が含まれるポリペプチドも含まれ得る。さらに、本発明において使用される結合ポリペプチドは、 C_H2 ドメインの少なくとも一部（例えば、 C_H2 ドメイン全体または一部）が欠失している場合がある。上記に示されるように、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）を、それらの自然界に存在している免疫グロブリン分子に由来するアミノ酸配列を変化させるように修飾することができることは、当業者に理解されるであろう。

10

【0042】

本明細書中に開示される方法において使用される特定のSp35アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片においては、多量体のうちの1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体のうちの第2のポリペプチド鎖上の重鎖部分と同じである。あるいは、本発明の方法において使用される、重鎖部分を含む単量体は同じではない。例えば、個々の単量体には、異なる標的結合部位が含まれる場合があり、これによつては、例えば、二重特異的抗体が形成される。

20

【0043】

本明細書中に開示される方法において使用される結合ポリペプチドの重鎖部分は、様々な免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、ポリペプチドの重鎖部分には、IgG₁分子に由来する C_H1 ドメインと、IgG₃分子に由来するヒンジ領域が含まれる場合がある。別の例においては、重鎖部分には、一部分はIgG₁分子に由来し、そして一部分はIgG₃分子に由来するヒンジ領域が含まれる場合がある。別の例においては、重鎖部分には、一部分はIgG₁分子に由来し、そして一部分はIgG₄分子に由来するキメラヒンジが含まれる場合がある。

30

【0044】

本明細書中で使用される場合は、用語「軽鎖部分」には、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。好ましくは、軽鎖部分には、 V_L ドメインまたは C_L ドメインの少なくとも1つが含まれる。

【0045】

免疫グロブリンに由来するポリペプチド（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）の自然界には存在しない変異体をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸の置換、付加、または欠失をコードされるタンパク質の中に導入するように、免疫グロブリンのヌクレオチド配列の中に1つ以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を導入することによって作成することができる。突然変異は、標準的な技術（例えば、部位特異的突然変異誘発およびPCRによって媒介される突然変異誘発）によって導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1つ以上の必須ではないアミノ酸残基に対して行われる。

40

【0046】

本明細書中に開示される方法において使用される抗体またはその免疫特異的断片はまた、本発明のポリペプチドに対するそれらの結合親和性に関して記載されるかまたは明記される場合もある。好ましい結合親和性としては、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、

50

$5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 10^{-11} M 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 10^{-13} M 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 10^{-14} M 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、または 10^{-15} M 未満の解離定数あるいは K_d を有しているものが挙げられる。

【0047】

本明細書中で開示される方法において使用される抗体またはその免疫特異的断片は、本明細書中に記載されるように、Sp35のアンタゴニストとして作用する。例えば、本発明の方法において使用される抗体はアンタゴニストとして機能する場合があります、Sp35ポリペプチドの抑制活性をブロックするかまたは阻害する場合があります。

【0048】

本明細書中で使用される場合は、用語「キメラ抗体」は、免疫反応性領域または部位が第1の種から得られたかまたは第1の種に由来し、そして定常領域（これは、完全なものである場合も、一部である場合も、また、本発明にしたがって修飾される場合もある）が第2の種から得られた任意の抗体を意味するように適用される。特定の実施形態においては、標的結合領域または部位は、ヒト以外の供給源（例えば、マウスまたは霊長類）に由来し、そして定常領域はヒトである。

【0049】

本明細書中で使用される場合は、用語「操作された抗体」は、重鎖および軽鎖のいずれか、または両方の可変ドメインが、特異性が公知である抗体に由来する1つ以上のCDRの少なくとも部分的な置換によって、そして必要に応じて、部分的なフレームワーク領域の置き換えおよび配列の変更によって変化させられた抗体を意味する。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはさらにはサブクラスの抗体に由来する場合がありますが、CDRが様々なクラスの抗体に由来するであろうこと、そして好ましくは、様々な種に由来する抗体に由来するであろうことが予想される。特異性が公知であるヒト以外の抗体に由来する1つ以上の「ドナー」CDRがヒト重鎖または軽鎖のフレームワーク領域につながれている操作された抗体は、本明細書中では「ヒト化抗体」と呼ばれる。1つの可変ドメインの抗原結合能力を別のものに導入するためには、ドナー可変領域に由来する完全なCDR領域でCDR領域の全てを置き換えることは必ずしも必要ではない場合がある。むしろ、標的結合部位の活性を維持するために不可欠なそのような残基を導入することだけが必要であり得る。例えば、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号に示されている説明を前提とすると、これが、機能性の操作された抗体またはヒト化抗体を得るために、日常的に行われている実験を行うことによるか、または試行錯誤により試験することによるかのいずれかによることは、十分に当業者の能力の範囲内であろう。

【0050】

本明細書中で使用される場合は、用語「連結させられた」、「融合させられた」、または「融合」はほとんど同じ意味で使用される。これらの用語は、化学的結合または組み換え手段を含むあらゆる手段により、2つ以上のエレメントまたは成分と一緒に結合させることを意味する。「インフレームでの融合」は、2つ以上のオープンリーディングフレーム（ORF）を結合させて、連続するより長いORFを、もとのORFの正確なリーディングフレームを維持する様式で形成させることを意味する。したがって、得られる組み換え体融合タンパク質は、もとのORFによってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメント（これらのセグメントは、自然界においては通常はそうには結合していない）を含む1つのタンパク質である。したがって、リーディングフレームは、融合させられたセグメント全体を通じて連続させられるが、セグメントは、例えば、インフレームのリンカー配列によって、物理的に、または空間的に隔てられている場合がある。

【0051】

ポリペプチドの状況においては、「直鎖状配列」または「配列」は、アミノ末端からカルボキシ末端方向でのポリペプチドのアミノ酸の順序である。ここでは、配列の中の互いに隣接している残基は、ポリペプチドの一次構造においては連続している。

10

20

30

40

50

【0052】

用語「発現」は、本明細書中で使用される場合は、それによって遺伝子が生化学的物質（例えば、RNAまたはポリペプチド）を生じるプロセスを意味する。このプロセスには、細胞内での遺伝子の機能性の存在のあらゆる発現が含まれ、これには、遺伝子のノックダウン、ならびに一時的な発現と安定な発現の両方が含まれるが、これらに限定はされない。これには、遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、または任意の他のRNA産物への転写、ならびに、そのようなmRNAのポリペプチド（単数または複数）への翻訳が含まれるが、これらに限定はされない。最終的な所望される産物が生化学的物質である場合には、発現には、生化学的物質および任意の前駆体の作成が含まれる。

10

【0053】

「被験体」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」によっては、任意の被験体が意味され、特に、それについての診断、予後診断、または治療が所望される哺乳動物被験体が意味される。哺乳動物被験体には、ヒト、家畜動物（domestic animal）、農場動物（farm animal）、動物園の動物、競技用動物、ペット動物（例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、乳牛）；霊長類（例えば、類人猿、サル、オラウタン、およびチンパンジー）；イヌ科（例えば、イヌおよびオオカミ）；ネコ科（例えば、ネコ、ライオン、およびトラ）；ウマ科（例えば、ウマ、ロバ、およびシマウマ）；食用動物（例えば、乳牛、ブタ、およびヒツジ）；有蹄動物（例えば、シカ、およびキリン）；齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモット）などが含まれるが、これらに限定はされない。特定の実施形態においては、哺乳動物はヒト被験体である。

20

【0054】

用語「RNA干渉」すなわち「RNAi」は、siRNAによる遺伝子発現のサイレンシングまたは低下を意味する。これは、動物および植物における配列特異的な転写後の遺伝子のサイレンシングのプロセスであり、サイレンシングさせられる遺伝子の配列に対してその二本鎖領域において相同であるsiRNAによって開始される。遺伝子は、生物体に対して内因性である場合も、また、外因性である場合もあり、染色体に組み込まれて存在する場合も、また、ゲノムの中には組み込まれないトランスフェクションベクターの中に存在する場合もある。遺伝子の発現は、完全に阻害されるかまたは部分的に阻害されるかのいずれかである。RNAiはまた、標的RNAの機能を阻害するとも考えられ得る；標的RNAの機能は完全である場合も、また部分的である場合もある。

30

【0055】

Sp35（LINGO-1／LRRN6）

本発明は、Sp35のアンタゴニストが神経突起の成長およびDAニューロンの生存を促進することの発見に基づく。自然界に存在しているヒトSp35は、614アミノ酸からなるグリコシル化された神経系特異的タンパク質である（配列番号2）。ヒトSp35ポリペプチドには、14個のロイシンリッチリピート（N末端キャップとC末端キャップを含む）からなるLRRドメイン、Igドメイン、膜貫通領域、および細胞質ドメインが含まれる。細胞質ドメインには、標準的なチロシンリン酸化部位が含まれる。加えて、自然界に存在しているSp35タンパク質には、シグナル配列である短い塩基性領域がLRRCTとIgドメインの間に、そして膜貫通領域がIgドメインと細胞質ドメインの間に含まれる。ヒトSp35遺伝子には、別の翻訳開始コドンが含まれており、その結果、6個のさらに別のアミノ酸（MQVSKR；配列番号3）がSp35シグナル配列のN末端に存在する場合があり、また、存在しない場合もある。表1には、配列番号2の配列をベースとするアミノ酸残基の番号にしたがった、Sp35ドメインと他の領域が列挙される。

40

【0056】

表1

50

【 0 0 5 7 】

【 化 6 】

ドメインまたは領域	最初の残基	最後の残基
シグナル配列	1	33 または 35
LRRNT	34 または 36	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209
LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	414 または 416
塩基性	415 または 417	424

10

20

【 0 0 5 8 】

【 化 7 】

Ig	419	493
結合配列	494	551
膜貫通	552	576
細胞質	577	614

30

Sp 35 の組織分布および発育過程での発現は、ヒトおよびラットにおいて実験されている。Sp 35 の生物学は実験用の動物（ラット）モデルにおいて実験されている。ラット Sp 35 の発現はノーザンブロットおよび免疫組織化学染色によって決定されたように、神経系のニューロンと脳の乏突起膠細胞に局在化されている。ラット Sp 35 mRNA の発現レベルは、発育過程に応じて調節されており、生後間もなく（すなわち、およそ 1 日後に）ピークとなる。ラットの脊髄の離断損傷モデルにおいては、Sp 35 は、RT-PCR によって決定されたように、損傷部位においてアップレギュレートされる。加えて、Sp 35 は Nogo 66 Receptor (Nogo 受容体) と相互作用することが示されている。例えば、国際特許出願番号 PCT/US 2004/00832、PCT 公開番号 WO 2004/08564 を参照のこと。

40

【 0 0 5 9 】

Sp 35 (LINGO-1) は、Nogo Receptor-1-p75 神経栄養因子受容体複合体のさらなる成分である。Mira、Nat Neurosci. 7:221-228 (2004) (引用により本明細書中に組み入れられる) を参照のこと。Nogo 受容体 1 とは異なり、Sp 35 遺伝子の発現は、成人の脊髄の中の神経細胞が外傷性の

50

損傷に曝されると増大し、このことは、S p 3 5 が C N S 神経機構について重要な生物学的役割を有していることを示唆している。I d .

全長の S p 3 5 分子のヌクレオチド配列は以下のとおりである：

【0060】

【化8】

ATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTG
CTGGGCTCAGTGCTGTGAGGCTCGGCCACGGGCTGCCGCCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCCAGGACCGCGCT
GTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAGGGCATCCCCACCGAGACGCGCCTGCTGGACCTA
GGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCAACCAGGACGAGTTCCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTC
AACGAGAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCCGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTCCGGACGCTGGGTCTC
CGCAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCTTCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATC
AGCGAGAACAAAGATTGTTATCTCTGCTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGGTT
GGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAAGCGGCTCAACAGCCTGGAGCAGCTGACGCTG
GAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCGAGGCGCTGTCCACCTGCACGGCCTCATCGTCTGAGGCTC
CGGCACCTCAACATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCTTGGAGATC
TCCCACCTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATC
ACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCCCTACCTGGCCGTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCTCAACCTC
TCCTACAACCCCATCAGCACCATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCAGGAGATCCAGCTG
GTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTCCGCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGTC
TCTGGCAACCAGCTGACCACACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCTG
GACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTCCGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCCGCTGGCGGCTCAACTTCAAC
CGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCCCGAGTTTGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTA
CTGCCCCAACTACTTACCTGCCCGCGCCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAG
GGCCACACGGTGACGTTTGTGTGCCGGGCCGATGGCGACCCGCCCGCCGATCCTCTGGCTCTCACCCCGA
AAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCAATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCAGCTGGAGGTGCGCTAC
GCCCAGGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAACGACTCCATGCCCGCC
CACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCGACTGGCCCCATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAAC
CAGCCGGGCGAGGGAGAGGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCCTTCCCTTCGACATCAAGACCCTCATC
ATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTCTGCGGCTCGTCTCTTCTGCTGCTGCTGTTTCTCTGG
AGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAATCGAGATCGAGTATGTGCCCCGAAAGTCCGACGCAGGCATC
AGCTCCGCCGACGCGCCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGA

10

20

(配列番号1)。

【0061】

全長の S p 3 5 ポリペプチドのポリペプチド配列は以下のとおりである：

【0062】

【化9】

MLAGGVSRMPSPLLACWQPILLVLGSLVSGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFBVAVPEGIPTETRLLDL
GKNRIKTLNQDEFASFPHLEELNENIVSAVEPGAFNNLFNLRTLGLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDI
SENKIVILLDYMFDLYNLKSLVGDNDLVYISHRAFSGLSLEQLTLEKCNLTSTIPTEALSHLHGLIVLRL
RHLNINAIRDYSFKRLYLKVLKLEISHWPYLDTMTNCLYGLNLTSLSITHCNLTAVPYLAVRHLVYLRLNL
SYNPISTIEGSMHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNLYLVLNVSGNQLTTLEESVFHSGVGNLETLL
DSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFNRRQPTCATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRRARIRDRKAQQVFVDE
GHTVQFVCRADGDPFPAILWLSPRKHLVSAKSNGLTVPDPGTLEVRYAQVQDNGTYLCIAANAGGNDMPA
HLHVRSSYPDWPHQPNKTFAFISNQPGEGEANSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVVLFCLVLLFLW
SRGKGNTKHNIEIEYVPRKSDAGISSADAPRKFNMKMI

40

(配列番号2)。

【0063】

S p 3 5 のアンタゴニストを使用する方法

本発明の1つの実施形態によっては、ドーパミン作動性(DA)ニューロンの再生、成長、または生存を促進するための方法が提供される。この方法には、DAニューロンを、有効量のS p 3 5 アンタゴニスト、またはS p 3 5 アンタゴニストを含む組成物と接触させる工程が含まれる。ここでは、S p 3 5 アンタゴニストは、可溶性S p 3 5 ポリペプチド、S p 3 5 抗体、S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチド、S p 3 5 アプタマー、お

50

よび2つ以上の上記Sp35アンタゴニストの組み合わせからなる群より選択される。様々な例示的なSp35アンタゴニスト、ならびに本発明を実施するためにこれらの分子を得るための方法および材料は以下に記載され、そして／または、例えば、国際特許出願番号PCT/US2004/008323、PCT公開番号WO2004/085648（それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）の中に見ることができる。本発明に有用なSp35受容体アンタゴニストとしては、例えば、PCT/US2005/022881、PCT公開番号WO2006/002437（それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されているものが挙げられる。

【0064】

本発明のさらに別の実施形態によっては、そのような疾患に罹患している動物（例えば、哺乳動物）のDAニューロンの変性または死が関係している疾患、障害、または損傷（例えば、パーキンソン病）を処置するための方法が提供される。この方法は、その必要がある動物に対して、可溶性Sp35ポリペプチド、Sp35抗体、Sp35アンタゴニストポリヌクレオチド、Sp35アプタマー、および2つ以上の上記Sp35アンタゴニストの組み合わせからなる群より選択される、治療有効量のSp35アンタゴニスト、またはSp35アンタゴニストを含む組成物を投与する工程が含まれるか、本質的にそのような工程からなるか、あるいはそのような工程からなる。

【0065】

本発明のさらなる実施形態には、DAニューロンの死が関係している疾患、障害、または損傷を処置するために、DAニューロンの再生、成長、または生存を促進する方法が含まれる。この方法には、哺乳動物に対して、疾患、障害、もしくは損傷の部位に、またはその付近に、DAニューロンの再生、成長、または生存の阻害を減少させるために十分な量を投与する工程が含まれる。

【0066】

本発明の方法においては、Sp35アンタゴニストは、可溶性Sp35ポリペプチド、Sp35抗体、Sp35アンタゴニストポリヌクレオチド、Sp35アプタマー、またはそれらの組み合わせの患者への直接の投与によって投与され得る。あるいは、Sp35アンタゴニストは、特異的なSp35アンタゴニストを生産する発現ベクターを介して投与され得る。本発明の特定の実施形態においては、Sp35アンタゴニストは、以下を含む処置方法において投与される：（1）移植することができる宿主細胞を核酸（例えば、Sp35アンタゴニストを発現するベクター）で形質転換するかまたはトランスフェクトする工程；および（2）形質転換された宿主細胞を哺乳動物に、疾患、障害、または損傷の部位に移植する工程。例えば、形質転換された宿主細胞は、ドーパミンニューロンの供給源の特定の罹患した部位（例えば、中脳）またはそれらの接続の標的（例えば、被殻、尾状核、大脳皮質、淡蒼球、または視床下核）に移植され得る。本発明のいくつかの実施形態においては、移植することができる宿主細胞は哺乳動物から取り出され、一時的に培養され、Sp35アンタゴニストをコードする単離された核酸で形質転換またはトランスフェクトされ、そしてそれが取り出された同じ哺乳動物に移植して戻される。細胞は、移植される同じ部位から取り出すことができるが、必ずしもそうでなくてよい。エキソビボ遺伝子治療としてもよく知られているそのような実施形態によって、限られた時間の間作用部位に局在化させられた、Sp35アンタゴニストの持続的な供給を提供することができる。

【0067】

本発明の方法によって処置または緩和することができる疾患または障害としては、DAニューロンの死、変性、または再生もしくは分化の不足が関係している疾患、障害、あるいは損傷が挙げられる。そのような疾患としては、パーキンソン病（PD）、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、パーキンソン病様の特徴を有している運動神経疾患、レヴィー小体認知症、進行性核上麻痺、皮質をベースとする神経節の変性、前頭側頭認知症、パーキンソニズムを伴うアルツハイマー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、チェディアック・東症候群、SCA-

3 脊髄小脳失調、X連鎖ジストニア・パーキンソニズム（DYT3）、ハンチントン病（ウェストファール変異体）、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、脳血管性パーキンソニズム、脳性小児麻痺、繰り返し起こる頭部外傷、脳炎後のパーキンソン病、神経梅毒、および統合失調症が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0068】

本明細書中で開示される方法において使用されるSp35アンタゴニスト（例えば、可溶性Sp35ポリペプチド、Sp35抗体、Sp35アンタゴニストポリヌクレオチド、またはSp35アプタマー）は、DAニューロンの成長、生存、または再生をネガティブに調節するSp35の能力を停止させる、低下させる、妨げる、または阻害する治療薬として調製され得、そして使用され得る。

【0069】

可溶性Sp35ポリペプチド

本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストとしては、自然界に存在しているSp35の生物学的機能をブロックする、阻害する、または妨害するようなポリペプチドが挙げられる。詳細には、本発明の可溶性Sp35ポリペプチドとしては、可溶性Sp35ポリペプチドの断片、変異体、または誘導体が挙げられる。上記の表1には、Sp35ポリペプチドの様々なドメインが記載されている。可溶性Sp35ポリペプチドは膜貫通ドメインを欠いており、通常は、Sp35ポリペプチドの細胞内ドメインが欠けている。例えば、特定の可溶性Sp35ポリペプチドには、Sp35の膜貫通ドメインを含むアミノ酸552～576、および／またはSp35の細胞内ドメインを含むアミノ酸577～614が欠けている。加えて、特定の可溶性Sp35ポリペプチドには、Sp35ポリペプチドのLLRドメイン、Igドメイン、塩基性領域および／または細胞外ドメイン全体（配列番号2のアミノ酸34から532に対応する）が含まれる。当業者は、Sp35の細胞外ドメイン全体に、細胞外ドメインポリペプチドのC末端またはN末端のいずれかにあるさらなるアミノ酸もしくは数個のアミノ酸が含まれる場合があることを理解するであろう。このように、本発明の方法において使用される可溶性Sp35ポリペプチドとしては、配列番号2のアミノ酸41から525；配列番号2のアミノ酸40から526；配列番号2のアミノ酸39から527；配列番号2のアミノ酸38から528；配列番号2のアミノ酸37から529；配列番号2のアミノ酸36から530；配列番号2のアミノ酸35から531；配列番号2のアミノ酸34から531；配列番号2のアミノ酸46から520；配列番号2のアミノ酸45から521；配列番号2のアミノ酸44から522；配列番号2のアミノ酸43から523；および配列番号2のアミノ酸42から524、あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成されるSp35ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。Sp35ポリペプチドアンタゴニストには、表1に記載されるドメインの任意の組み合わせが含まれ得る。

【0070】

本発明の方法において使用されるさらなる可溶性Sp35ポリペプチドとしては、配列番号2のアミノ酸1から33；配列番号2のアミノ酸1から35；配列番号2のアミノ酸34から64；配列番号2のアミノ酸36から64；配列番号2のアミノ酸66から89；配列番号2のアミノ酸90から113；配列番号2のアミノ酸114から137；配列番号2のアミノ酸138から161；配列番号2のアミノ酸162から185；配列番号2のアミノ酸186から209；配列番号2のアミノ酸210から233；配列番号2のアミノ酸234から257；配列番号2のアミノ酸258から281；配列番号2のアミノ酸282から305；配列番号2のアミノ酸306から329；配列番号2のアミノ酸330から353；配列番号2のアミノ酸363から416；配列番号2のアミノ酸417から424；配列番号2のアミノ酸419から493；および配列番号2のアミノ酸494から551、あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成されるSp35ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0071】

本発明の方法において使用されるさらなる可溶性 S p 3 5 ポリペプチドとしては、配列番号 2 のアミノ酸 1 から 3 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 3 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 6 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 8 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 1 1 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 1 3 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 1 6 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 1 8 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 2 0 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 2 3 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 2 5 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 2 8 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 3 0 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 3 2 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 3 5 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 4 1 6 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 4 2 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 5 5 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 1 から 5 3 1 ; および配列番号 2 のアミノ酸 1 から 5 3 2 、あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される S p 3 5 ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。

10

【0072】

本発明の方法において使用されるなさらなる可溶性 S p 3 5 ポリペプチドとしては、配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 6 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 8 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 1 1 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 1 3 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 1 6 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 1 8 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 2 0 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 2 3 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 2 5 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 2 8 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 3 0 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 3 2 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 3 5 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 4 1 6 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 4 2 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 4 9 3 ; および配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 5 1 、あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される S p 3 5 ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。

20

【0073】

本発明の方法において使用されるさらなる可溶性 S p 3 5 ポリペプチドとしては、配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 0 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 6 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 8 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 0 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 1 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 2 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 3 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 5 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 0 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 1 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 2 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 3 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 5 から 5 3 1 ; および、配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 1 、あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される S p 3 5 ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。

30

40

【0074】

本発明の方法において使用されるなさらなる可溶性 S p 3 5 ポリペプチドとしては、配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 6 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 8 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 1 1 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 1 3 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 1 6 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 1 8 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 2 0 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 2 3 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 2 5 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 2 8 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 3 0 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 3 2 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 3 5 3 ; 配列番号 2 のアミ

50

ノ酸 3 6 から 4 1 6 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 4 2 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 4 9 3 ; および、配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 5 1、あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される S p 3 5 ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0075】

本発明の方法において使用されるさらなる可溶性 S p 3 5 ポリペプチドとしては、配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 0 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 6 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 8 ; および、配列番号 2 のアミノ酸 3 6 から 5 3 9 ; あるいはそのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される S p 3 5 ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0076】

さらなる可溶性 S p 3 5 ポリペプチド、それらの断片、変異体、または誘導体としては、S p 3 5 の I g ドメインを含むポリペプチドが挙げられる。例えば、S p 3 5 ポリペプチドには、配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 5 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 6 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 7 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 8 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 9 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 5 0 0 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 2 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 2 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 3 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 4 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 5 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 6 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 1 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 0 から 4 9 3 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 0 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 1 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 2 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 3 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 4 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 5 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 6 から 4 9 4 ; 配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 から 4 9 4 ; および配列番号 2 のアミノ酸 4 1 8 から 4 9 4、あるいは、そのようなポリペプチドの断片、変異体、または誘導体が含まれる、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される。

【0077】

様々な例示的な可溶性 S p 3 5 ポリペプチド、ならびに本発明を実施するためにこれらの分子を得るための方法および材料は以下に記載され、そして／または、例えば、国際特許出願番号 P C T / U S 2 0 0 4 / 0 0 8 3 2 3、P C T 公開番号 W O 2 0 0 4 / 0 8 5 6 4 8 (それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる)の中に見ることができる。

【0078】

本明細書中に記載される本発明の方法において使用される可溶性 S p 3 5 ポリペプチドは、環状である場合がある。可溶性 S p 3 5 ポリペプチドの環化によっては、直鎖状ペプチドの立体構造の自由度が下がり、より構造的に拘束された分子が生じる。多くのペプチドの環化方法は当該分野で公知であり、例えば、ペプチドの N 末端アミノ酸残基と C 末端アミノ酸残基との間でのアミド結合の形成による「骨格対骨格 (b a c k b o n e t o b a c k b o n e)」環化である。「骨格対骨格」環化の方法には、2 つの ω - チオアミノ酸残基 (例えば、システイン、ホモシステイン) の間でのジスルフィド架橋の形成が含まれる。本発明の特定の可溶性 S p 3 5 ペプチドには、環状の S p 3 5 ポリペプチドを形成させるためのペプチドの N 末端および C 末端上での修飾が含まれる。そのような修飾としては、システイン残基、アセチル化されたシステイン残基、N H 2 部分とビオチンを有しているシステイン残基が挙げられるが、これらに限定はされない。他のペプチドの環化方法は、L i & R o l l e r . C u r r . T o p . M e d . C h e m . 3 : 3 2 5

ー 3 4 1 (2 0 0 2) (これはその全体が引用により本明細書中に組み入れられる) に記載されている。

【 0 0 7 9 】

本明細書中に記載されている可溶性 S p 3 5 ポリペプチドには、置換、挿入、または欠失のような様々な変更が含まれ得る。例えば、置換としては以下の置換が挙げられるが、これらに限定はされない：配列番号 2 の S p 3 5 ポリペプチドの 6 位のバリンのメチオニンへの置換；配列番号 2 の S p 3 5 ポリペプチドの 2 9 4 位のセリンのグリシンへの置換；配列番号 2 の S p 3 5 ポリペプチドの 3 4 8 位のバリンのアラニンへの置換；S p 3 5 ポリペプチドの 4 1 9 位のアルギニンのヒスチジンへの置換；4 5 6 位のアルギニンのグルタミン酸への置換；および配列番号 2 の 4 5 8 位のヒスチジンのバリンへの置換。

10

【 0 0 8 0 】

本明細書中に記載される配列番号 2 のポリペプチドに対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 同一である可溶性 S p 3 5 ポリペプチドの対応する断片もまた意図される。

【 0 0 8 1 】

当該分野で公知であるように、2 つのポリペプチドの間での「配列同一性」は、1 つのポリペプチドのアミノ酸配列を第 2 のポリペプチドの配列に対して比較することによって決定される。本明細書中で議論される場合には、任意の特定のポリペプチドが別のポリペプチドに対して少なくとも約 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 同一であるかどうかは、当該分野で公知の方法およびコンピュータープログラム／ソフトウェア（例えば、B E S T F I T プログラム (W i s c o n s i n S e q u e n c e A n a l y s i s P a c k a g e , V e r s i o n 8 f o r U n i x (登録商標) , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , U n i v e r s i t y R e s e a r c h P a r k , 5 7 5 S c i e n c e D r i v e , M a d i s o n , W I 5 3 7 1 1) であるが、これらに限定はされない）を使用して決定することができる。B E S T F I T では、2 つの配列の間での相同性について最良のセグメントを見出すために、S m i t h a n d W a t e r m a n , A d v a n c e s i n A p p l i e d M a t h e m a t i c s 2 : 4 8 2 - 4 8 9 (1 9 8 1) の局所相同性アルゴリズムが使用される。特定の配列が、本発明の参照配列に対して例えば 9 5 % 同一であるかどうかを決定するために B E S T F I T または任意の他の配列アラインメントプログラムが使用される場合には、もちろんパラメーターはセットであり、その結果、同一性の割合 (%) が、参照ポリペプチド配列の全長にわたって計算され、そして参照配列のアミノ酸の総数の 5 % までの相同性の中のギャップが可能である。

20

30

【 0 0 8 2 】

本発明の方法において使用される可溶性 S p 3 5 ポリペプチドには、2 つ以上の可溶性 S p 3 5 ポリペプチドの任意の組み合わせが含まれ得る。

【 0 0 8 3 】

抗体またはその抗原結合断片

1 つの実施形態においては、本発明の方法において使用される S p 3 5 アンタゴニストは、抗体分子またはその免疫特異的断片である。特に明記されていない限りは、本明細書中で使用される場合には、抗体に関する「その断片」は、免疫特異的断片、すなわち、抗原特異的断片を意味する。1 つの実施形態においては、本発明の方法において使用される抗体は、二重特異的結合分子、結合ポリペプチド、または抗体であり、例えば、二重特異的抗体、ミニボディー、ドメイン欠失抗体、または 1 つ以上のエピトープ（例えば、1 つ以上の抗原、または同じ抗原上の 1 つ以上のエピトープ）に対して結合特異性を有している融合タンパク質である。1 つの実施形態においては、二重特異的抗体は、S p 3 5 上の少なくとも 1 つのエピトープに特異的な少なくとも 1 つの結合ドメインを有する。二重特異的抗体は、S p 3 5 の 1 つのエピトープに特異的な 2 つの標的結合ドメインと、第 2 の標的に特異的な 2 つの標的結合ドメインを有している 4 価の抗体である場合もある。それゆえ、4 価の二重特異的抗体は、それぞれの特異性について 2 価であり得る。

40

50

【0084】

本発明の方法において使用される S p 3 5 アンタゴニストにはまた、S p 3 5 活性のアンタゴニストである、S p 3 5 特異的抗体またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体も含まれる。例えば、D A ニューロン上で発現される S p 3 5 に対する特定の S p 3 5 抗体の結合により、D A 神経突起の成長、分化、および生存の障害がブロックされる。

【0085】

本明細書中に記載される方法において使用される特定のアンタゴニスト抗体は、特定の S p 3 5 ポリペプチド断片またはドメインに特異的または優先的に結合する。そのような S p 3 5 ポリペプチド断片としては、配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 2 ; 3 4 から 4 1 7、3 4 から 4 2 5、3 4 から 4 9 3、6 6 から 5 3 2、6 6 から 4 1 7 (L R R ドメ 10
イン)、6 6 から 4 2 6、6 6 から 4 9 3、6 6 から 5 3 2、4 1 7 から 5 3 2、4 1 7 から 4 2 5 (S p 3 5 塩基性領域)、4 1 7 から 4 2 4 (S p 3 5 塩基性領域)、4 1 7 から 4 9 3、4 1 7 から 5 3 2、4 1 9 から 4 9 3 (S p 3 5 I g 領域)、または 4 2 5 から 5 3 2 を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される S p 3 5 ポリペプチド、あるいは、配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 5 3 2 ; 3 4 から 4 1 7、3 4 から 4 2 5、3 4 から 4 9 3、6 6 から 5 3 2、6 6 から 4 1 7、6 6 から 4 2 6、6 6 から 4 9 3、6 6 から 5 3 2、4 1 7 から 5 3 2、4 1 7 から 4 2 5 (S p 3 5 塩基性領域)、4 1 7 から 4 9 3、4 1 7 から 5 3 2、4 1 9 から 4 9 3 (S p 3 5 I g 領域)、または 4 2 5 から 5 3 2 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 同一である S p 3 5 変異体ポリペプチドが挙げられるが、これらに 20
限定はされない。

【0086】

本発明の方法において使用される特定の S p 3 5 特異的抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体がそれに対して結合するさらなる S p 3 5 ペプチド断片としては、S p 3 5 の 1 つ以上のロイシンリッチリピート (L R R) を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成されるそのような断片が挙げられるが、これらに 30
限定はされない。そのような断片としては、例えば、配列番号 2 のアミノ酸 6 6 から 8 9、6 6 から 1 1 3、6 6 から 1 3 7、9 0 から 1 1 3、1 1 4 から 1 3 7、1 3 8 から 1 6 1、1 6 2 から 1 8 5、1 8 6 から 2 0 9、2 1 0 から 2 3 3、2 3 4 から 2 5 7、2 5 8 から 2 8 1、2 8 2 から 3 0 5、3 0 6 から 3 2 9、または 3 3 0 から 3 5 3 を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される断片が挙げられる。配列番号 2 のアミノ酸 6 6 から 8 9、6 6 から 1 1 3、9 0 から 1 1 3、1 1 4 から 1 3 7、1 3 8 から 1 6 1、1 6 2 から 1 8 5、1 8 6 から 2 0 9、2 1 0 から 2 3 3、2 3 4 から 2 5 7、2 5 8 から 2 8 1、2 8 2 から 3 0 5、3 0 6 から 3 2 9、または 3 3 0 から 3 5 3 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 同一である変異体 S p 3 5 ポリペプチドの対応する断片もまた意図される。

【0087】

本発明の特定の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体がそれに対して結合するさらなる S p 3 5 ペプチド断片としては、S p 3 5 の L R R に隣接している 1 つ以上のシステインリッチ領域を含む、本質的にそれから構成される、またはそれから構成 40
されるそのような断片が挙げられるが、これらに限定はされない。そのような断片としては、例えば、配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 6 4 (N 末端 L R R 隣接領域 (L R R N T)) を含む、本質的にそれから構成される、もしくはそれから構成される断片、または配列番号 2 のアミノ酸 3 6 3 から 4 1 6 (C 末端 L R R 隣接領域 (C R R C T)) を含む、本質的にそれから構成される、もしくはそれから構成される断片が挙げられる。配列番号 2 のアミノ酸 3 4 から 6 4、および 3 6 3 から 4 1 6 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 同一である変異体 S p 3 5 ポリペプチドの対応する断片もまた意図される。

【0088】

他の実施形態においては、本明細書中に記載される方法において使用される S p 3 5 ア 50

ンタゴニストとしては、S p 3 5の少なくとも1つのエピトープに特異的または優先的に結合する抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が挙げられる。ここでは、エピトープには、配列番号2の少なくとも4個から5個のアミノ酸、配列番号2の少なくとも7個、少なくとも9個、または少なくとも約15個から約30個の間のアミノ酸が含まれる、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される。記載されるように、配列番号2の任意のエピトープのアミノ酸は、連続している場合もあり、直鎖状である場合もあるが、必ずしもそうでなくてよい。特定の実施形態においては、S p 3 5の少なくとも1つのエピトープには、細胞の表面上で発現される、または可溶性断片としてのS p 3 5の細胞外ドメインによって形成される直鎖状ではないエピトープが含まれる、本質的にそれから構成される、またはそれから構成される（例えば、I g G F c領域に融合させられる）。したがって、特定の実施形態においては、S p 3 5の少なくとも1つのエピトープには、配列番号2の少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも約15個から約30個の間、あるいは少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、もしくは100個の連続するかまたは不連続なアミノ酸が含まれる、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される。ここでは、不連続なアミノ酸はタンパク質の折り畳みによってエピトープを形成する。

【0089】

他の実施形態においては、本発明の方法において使用されるS p 3 5アンタゴニストとしては、S p 3 5の少なくとも1つのエピトープに特異的または優先的に結合するS p 3 5抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が挙げられる。ここでは、エピトープには、さらに、上記のように、さらに、配列番号2の1個、2個、3個、4個、5個、6個、もしくはそれ以上の連続しているかまたは不連続なアミノ酸と、タンパク質を修飾するさらなる部分が含まれる、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される。例えば、炭水化物部分を、S p 3 5抗体が、修飾されていないバージョンのタンパク質に対するよりも高い親和性で修飾された標的タンパク質に結合するように含めることができる。あるいは、S p 3 5抗体は、修飾されていないバージョンの標的タンパク質には全く結合しない。

【0090】

特定の実施形態においては、本発明の方法において使用されるS p 3 5アンタゴニストには、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれる。すなわち、これらは、上記S p 3 5または断片もしくは変異体の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する、すなわち、それが無関係なもしくはランダムなエピトープに結合するよりも容易にそのようなエピトープに結合する；上記S p 3 5または断片または変異体の少なくとも1つのエピトープに優先的に結合する、すなわち、関連する、類似する、相同な、またはアナログであるエピトープに対してそれが結合するよりも容易にそのようなエピトープに結合する；上記S p 3 5または断片または変異体の特定のエピトープに対してそれ自体が特異的または優先的に結合する参照抗体の結合を競合的に阻害する；あるいは、約 5×10^{-2} M、約 10^{-2} M、約 5×10^{-3} M、約 10^{-3} M、約 5×10^{-4} M、約 10^{-4} M、約 5×10^{-5} M、約 10^{-5} M、約 5×10^{-6} M、約 10^{-6} M、約 5×10^{-7} M、約 10^{-7} M、約 5×10^{-8} M、約 10^{-8} M、約 5×10^{-9} M、約 10^{-9} M、約 5×10^{-10} M、約 10^{-10} M、約 5×10^{-11} M、約 10^{-11} M、約 5×10^{-12} M、約 10^{-12} M、約 5×10^{-13} M、約 10^{-13} M、約 5×10^{-14} M、約 10^{-14} M、約 5×10^{-15} M、または約 10^{-15} M未満の解離定数 K_D を特徴とする親和性で、上記S p 3 5または断片もしくは変異体の少なくとも1つのエピトープに結合する。特定の態様においては、抗体またはその断片は、マウスS p 3 5ポリペプチドまたはその断片と比較して、ヒトS p 3 5ポリペプチドまたはその断片に対して優先的に結合する。

【0091】

抗体結合解離定数の状況で使用される場合には、用語「約」は、抗体親和性を測定するために利用される方法についてある程度の固有のバリエーションを可能にする。例えば、使用される機器の精度のレベル、測定される試料の数に基づく標準誤差、および丸め誤差に応じて、用語「約 10^{-2} M 」には、例えば、 0.05 M から 0.005 M までが含まれ得る。

【0092】

特異的な実施形態においては、本発明の方法において使用される Sp35 アンタゴニストとしては、 $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-2} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 、または 10^{-3} sec^{-1} 未満あるいはそれに等しい解離速度 ($k(\text{off})$) で、Sp35 ポリペプチドまたはその断片もしくは変異体に結合する本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が挙げられる。あるいは、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、 $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 、 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} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ 、または 10^{-7} sec^{-1} 未満あるいはそれに等しい解離速度 ($k(\text{off})$) で、Sp35 ポリペプチドまたはその断片もしくは変異体に結合する。

【0093】

他の実施形態においては、本発明の方法において使用される Sp35 アンタゴニストとしては、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、または $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ より大きいまたはそれに等しい速度 ($k(\text{on})$) で、Sp35 ポリペプチドまたはその断片もしくは変異体に結合する、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が挙げられる。あるいは、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、または $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、または $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ より大きいあるいはそれに等しい速度 ($k(\text{on})$) で、Sp35 ポリペプチドまたはその断片もしくは変異体に結合する。

【0094】

本発明の特定の方法には、少なくともわずかな1つ以上の定常領域ドメインが、所望される生化学的特徴（例えば、ほぼ同じ免疫原性の完全な変更されていない抗体と比較した場合の、低いエフェクター機能、共有結合ではない結合によって二量体を形成する能力、腫瘍部位に局在化する高い能力、短い血清半減期または長い血清半減期）を提供するように欠失させられているかまたは別の方法で変更されている、Sp35 アンタゴニスト抗体の投与またはその免疫特異的断片の投与が含まれる。例えば、本明細書中に記載される方法において使用される特定の抗体は、免疫グロブリン重鎖と同様のポリペプチド鎖を含むが、1つ以上の重鎖ドメインの少なくとも一部が欠失している、ドメイン欠失抗体である。例えば、特定の抗体においては、修飾された抗体の定常領域の1つのドメイン全体が欠失させられるであろう。例えば、CH2 ドメイン全体または一部が欠失させられるであろう。

【0095】

本明細書中に記載される方法において使用される特定の Sp35 アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片においては、Fc 部分は、当該分野で公知の技術を使用してエフェクター機能を低下させるように変異させることができる。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活化（点変異または他の手段による）によっては、循環している修飾された抗体の Fc 受容体結合が減少し、それによって腫瘍の局在化が高まる場合がある。他の場合には、本発明と矛盾しない定常領域の修飾によって相補結合が抑えられ、したがって、血清半減期および結合した細胞毒素の非特異的会合が減少する場合がある。定常領域のなお他の修飾を使用して、ジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を修飾することができる。これにより、高い抗原特異性または抗体の可撓性の理由による高い局在化が可能となる。修飾により得られる生理学的プロフィール、生体利用性、および他の生化学的效果（例え

ば、腫瘍の局在化、生体分布、および血清半減期）は、過度の実験を行うことなく周知の免疫学的技術を使用して容易に測定することができ、そして定量することができる。

【0096】

本明細書中に開示される方法において使用される抗体またはその免疫特異的断片の修飾された形態は、当該分野で公知の技術を使用して、完全な前駆体またはもとの抗体から作成することができる。例示的な技術は、本明細書中にさらに詳細に議論される。

【0097】

特定の実施形態においては、本明細書中で開示される方法において使用される S p 3 5 アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片の可変領域および定常領域はいずれも、完全にヒトのものである。完全なヒト抗体は、当該分野で公知であり、そして本明細書中に記載される技術を使用して作成することができる。例えば、特異的な抗原に対する完全なヒト抗体は、抗原性のチャレンジに応答してそのような抗体を生産するように修飾されているが、その内因性の遺伝子座が無効とされているトランスジェニック動物に対して抗原を投与することによって調製することができる。そのような抗体を作成するために使用することができる例示的な技術は、米国特許第 6, 150, 584 号；同第 6, 458, 592 号；同第 6, 420, 140 号に記載されている。他の技術も当該分野で公知である。完全なヒト抗体は、おそらく、本明細書中の別の場所にさらに詳細に記載される様々なディスプレイ技術（例えば、ファージディスプレイまたは他のウイルスディスプレイシステム）によって生産することができる。

【0098】

本明細書中に開示される方法において使用される S p 3 5 アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片は、当該分野で公知の技術を使用して作成することができ、製造することができる。特定の実施形態においては、抗体分子またはその断片は「組み換えによって生産される」。すなわち、組み換え DNA 技術を使用して生産される。抗体分子またはその断片を作成するための例示的な技術は、本明細書中の別の場所でさらに詳細に議論される。

【0099】

本明細書中に開示される方法において使用される S p 3 5 アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片としては、例えば、共有結合が、抗体がその同族であるエピトープに特異的に結合することを妨げることがないように、抗体への任意のタイプの分子の共有結合によって修飾された誘導体が挙げられる。例えば、抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロック基による誘導、タンパク質分解的切断、細胞性のリガンドもしくは他のタンパク質に対する結合などによって修飾された抗体が挙げられるが、これらに限定はされない。任意の多数の化学修飾を、公知の技術によって行うことができ、これには、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝による合成などが含まれるが、これらに限定はされない。加えて、誘導体には、1つ以上の従来のものではないアミノ酸が含まれる場合がある。

【0100】

好ましい実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用される S p 3 5 アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片は、処置される動物（例えば、ヒト）において有害な免疫応答を誘発しないであろう。1つの実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用される S p 3 5 アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片は、当該分野で認識されている技術を使用して免疫原性を低下させるように修飾することができる。例えば、抗体は、ヒト化、霊長類化、脱免疫化させることができ、また、キメラ抗体を作成することもできる。元の抗体の抗原結合特性を保持しているか、または実質的に保持しているが、ヒトにおいては免疫原性が低いこれらのタイプの抗体は、ヒト以外の抗体、通常は、マウス抗体または霊長類抗体から誘導される。これは、以下の工程を含む様々な方法によって行うことができる：（a）キメラ抗体を作成するためにヒト定常領域上にヒト以外の可変ドメインを繋ぐ工程；（b）重要なフレームワーク残基を保持し

ているか、もしくは保持していないヒトフレームワーク領域および定常領域に、ヒト以外の相補性決定領域（CDR）の1つ以上の少なくとも一部を繋ぐ工程；あるいは（c）ヒト以外の可変ドメイン全体を移動させるが、それらを表面残基の置換によりヒト様のセクションで覆い隠す工程。そのような方法は、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)；Morrisonら、Adv. Immunol. 44:65-92 (1988)；Verhoeyenら、Science 239:1534-1536 (1988)；Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991)；Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994)、および米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、および同第6,190,370号（これら全ては、それらの全体において引用により本明細書中に組み入れられる）に開示されている。

【0101】

脱免疫化もまた、抗体の免疫原性を低下させるために使用することができる。本明細書中で使用される場合は、用語「脱免疫化（de-immunization）」には、T細胞エピトープを修飾するための抗体の変更が含まれる（例えば、WO9852976A1、WO0034317A2を参照のこと）。例えば、出発抗体に由来するV_H配列およびV_L配列が分析され、そしてヒトT細胞エピトープが、相補性決定領域（CDR）および配列中の他の鍵となる残基と比較したエピトープの位置を示しているそれぞれのV領域からマップされる。T細胞エピトープマップに由来する個々のT細胞エピトープは、別のアミノ酸置換を同定するために分析され、これに伴う最終的な抗体の活性が変化してしまうリスクは低い。アミノ酸置換の組み合わせを含む別のV_HおよびV_L配列の範囲が設計され、そしてこれらの配列は、続いて、結合ポリペプチドの1つの範囲（例えば、本明細書中に開示される方法において使用されるSp35アンタゴニスト抗体またはその免疫特異的断片）に取り込まれる、その後、これは機能について試験される。通常、12から24種類のさまざまな抗体が作成され、そして試験される。その後、修飾されたV領域およびヒトC領域を含む完全な重鎖および軽鎖遺伝子が発現ベクターにクローニングされ、続いてプラスミドが、完全な抗体の生産のために細胞株に導入される。その後、抗体は、適切な生化学的および生物学的アッセイにおいて比較され、最適な変異体が同定される。

【0102】

本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニスト抗体またはその断片は当該分野で公知の任意の適切な方法によって作成することができる。ポリクローナル抗体は、当該分野で周知の様々な手順によって生産することができる。例えば、Sp35免疫特異的断片は、様々な宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定はされない）に対して、抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の生産を誘導するために投与することができる。様々なアジュバントを使用して、宿主種に応じた免疫学的応答を増大させることができる。そのようなアジュバントとしては、フロイトの（Freund's）（完全なおよび不完全な）アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに、ヒトアジュバントとして有用である可能性のあるもの（例えば、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）およびCorynebacterium parvum））が挙げられるが、これらに限定はされない。そのようなアジュバントもまた当該分野で周知である。

【0103】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組み換え技術、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む当該分野で公知の多種多様な技術を使用して調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知であり、例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版（1988）；Hammerlingら：Monoclonal Antibodi

es and T-Cell Hybridomas Elsevier, N. Y., 563-681 (1981) (上記参考文献はそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる)に教示されている技術を含むハイブリドーマ技術を使用して生産することができる。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合は、ハイブリドーマ技術によって生産された抗体に限定はされない。用語「モノクローナル抗体」は、1つのクローン(任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む)に由来する抗体を意味し、生産される方法を意味するものではない。したがって、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術によって生産された抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、および組み換え技術、およびファージディスプレイ技術の使用を含む、当該分野で公知の多種多様な技術を使用して調製することができる。

10

【0104】

1つの例においては、当該分野で認識されているプロトコルを使用して、抗体は、関連する抗原(例えば、精製されたSp35抗原またはそのような抗原を含む細胞もしくは細胞抽出物)とアジュバントの複数回の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物において惹起させられる。この予防接種によっては、通常、活性化させられた脾臓細胞またはリンパ球からの抗原反応性抗体の生産を含む免疫応答が誘発させられる。得られる抗体は、ポリクローナル調製物を提供するために動物の血清から回収することができるが、多くの場合は、脾臓、リンパ節、または末梢血から個々のリンパ球を単離して、モノクローナル抗体(mAbs)の均質な調製物を得ることが所望され得る。好ましくは、リンパ球は脾臓から得られる。

20

【0105】

この周知のプロセス(Kohlerら、Nature 256:495(1975))においては、抗原が注射された哺乳動物に由来する比較的生存期間の短い、または不死化させられたリンパ球が、不死化腫瘍細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)と融合させられ、それによりハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」が生産される。これらはいずれも不死であり、B細胞の遺伝的にコードされる抗体を生産することができる。得られるハイブリッドは、1つの抗体の形成のための特異的な遺伝子を含む個々の別々の株を用いる選択、希釈、および再増殖によって1つの遺伝的な株に分離される。これらによって、所望される抗原に対して均質であり、そしてそれらの純粋な遺伝的家系について均質である、「モノクローナル」と呼ばれる抗体が生産される。

30

【0106】

このように調製されたハイブリドーマ細胞は、融合させられていないもとの骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質が含まれていることが好ましい適切な培養培地の中に播種され、そして増殖させられる。当業者は、ハイブリドーマの形成、選択、および増殖のための試薬、細胞株、および培地を、多数の供給業者から市販によって入手することができ、標準的なプロトコルが十分に確立されていることを理解するであろう。一般的には、ハイブリドーマ細胞がその中で増殖させられている培養培地は、所望される抗原に対するモノクローナル抗体の生産についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、放射免疫測定(RIA)、または酵素結合免疫吸着アッセイ(ALISA)のようなインビトロでのアッセイによって決定される。所望される特異性、親和性、および/または活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈手順によってサブクロニングされ得、そして、標準的な方法によって増殖させられ得る(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp59-103(1986))。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、従来の精製手順(例えば、protein-A、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー)によって、培養培地、腹水、または血清から調製することができることがさらに理解されるであろう。

40

50

【0107】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技術によって作成することができる。例えば、FabおよびF(ab')₂断片を、パパイン(Fab断片を生じさせるため)またはペプシン(F(ab')₂断片を生じさせるため)のような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解的切断によって生じさせることができる。F(ab')₂断片には、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のC_H1ドメインが含まれる。

【0108】

当業者はまた、抗体または抗体断片(例えば、抗原結合部位)をコードするDNAは、抗体ファージライブラリーから導かれる場合もあることも、理解するであろう。具体的には、そのようなファージは、レパートリーまたは組み合わせ抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現させられた抗原結合ドメインをディスプレイさせるために利用することができる。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合させられたかもしくは捕捉された抗原を用いて、選択あるいは同定することができる。これらの方法で使用されるファージは、通常は、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIITanパク質のいずれかに組み換えによって融合させられた、Fab、Fv、またはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインとともに、ファージから発現させられたfdおよびM13結合ドメインを含む、糸状ファージである。例示的な方法は、例えば、EP 368 684 B1; 米国特許第5,969,108号、Hoogenboom, H. R. and Chames, Immunol. Today 21:371(2000); Nagyら、Nat. Med. 8:801(2002); Huieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682(2001); Luiら、J. Mol. Biol. 315:1063(2002)(これらのそれぞれが引用により本明細書中に組み入れられる)に示されている。いくつかの刊行物(例えば、Marksら、Bio/Technology 10:779-783(1992))には、鎖のシャッフリング、さらには、大きなファージライブラリーを構築するための戦略としての組み合わせ感染およびインビボでの組み換えによる高親和性ヒト抗体の生産が記載されている。別の実施形態においては、リボソーマルディスプレイを、バクテリオファージをディスプレイプラットフォームとして置き換えるために使用することができる(例えば、Hanesら、Nat. Biotechnol. 18:1287(2000); Wilsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750(2001); またはIrvingら、J. Immunol. Methods 248:31(2001)を参照のこと)。なお別の実施形態においては、細胞表面ライブラリーを抗体についてスクリーニングすることができる(Boderら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701(2000); Daughertyら、J. Immunol. Methods 243:211(2000))。このような手順により、モノクローナル抗体の単離、それに続くクローニングのための従来のハイブリドーマ技術に代わるものが提供される。

【0109】

ファージディスプレイ法においては、機能的な抗体ドメインが、それらをコードしているポリヌクレオチド配列を有しているファージ粒子の表面上に提示される。具体的には、V_HおよびV_L領域をコードするDNA配列が、動物のcDNAライブラリー(例えば、リンパ系組織のヒトもしくはマウスのcDNAライブラリー)または合成のcDNAライブラリーから増幅させられる。特定の実施形態においては、V_HおよびV_L領域をコードするDNAは、PCRによりscFvリンカーによって互いに連結させられ、ファージミドベクター(例えば、pCANTAB 6またはpComb 3 HSS)にクローニングされる。ベクターはE. coliにエレクトロポレーションされ、そしてE. coliはヘルパーファージに感染させられる。これらの方法で使用されるファージは、通常は、fdおよびM13を含む糸状ファージであり、V_H領域またはV_L領域は、通常は、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIのいずれかに組み換えによって融合させられている。目的の抗原(すなわち、Sp35ポリペプチドまたはその断片)に結合する抗原結合

ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合させられたかもしくは捕捉された抗原を使用して、選択あるいは同定することができる。

【0110】

抗体を作成するために使用することができるファージディスプレイ法のさらなる例としては、以下に開示されている方法が挙げられる：Brinkmanら、J. Immunol. Methods 182：41-50（1995）；Amesら、J. Immunol. Methods 184：177-186（1995）；Kettleboroughら、Eur. J. Immunol. 24：952-958（1994）；Persicら、Gene 187：9-18（1997）；Burtonら、Advances in Immunology 57：191-280（1994）；PCT出願番号PCT/GB91/01134；PCT公開番号WO90/02809；WO91/10737；WO92/01047；WO92/18619；WO93/11236；WO95/15982；WO95/20401；ならびに、米国特許第5,698,426号；同第5,223,409号；同第5,403,484号；同第5,580,717号；同第5,427,908号；同第5,750,753号；同第5,821,047号；同第5,571,698号；同第5,427,908号；同第5,516,637号；同第5,780,225号；同第5,658,727号；同第5,733,743号；および同第5,969,108号（これらのそれぞれがそれらの全体において引用により本明細書中に組み入れられる）。

【0111】

上記参考文献に記載されているように、ファージ選択の後、ファージに由来する抗体をコードする領域を単離し、完全な抗体（ヒト抗体または任意の他の所望される抗原結合断片を含む）を作成するために使用し、そして、任意の所望される宿主（哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む）の中で発現させることができる。例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')₂断片を組み換えによって生じさせるための技術もまた、当該分野で公知の方法（例えば、PCT公開番号WO92/22324；Mullinaxら、BioTechniques 12（6）：864-869（1992）；およびSawaiら、AJRI 34：26-34（1995）；およびBetterら、Science 240：1041-1043（1988）（上記参考文献はそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる））を使用して利用することができる。

【0112】

単鎖Fvおよび抗体を生産するために使用することができる技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号；Hustonら、Methods in Enzymology 203：46-88（1991）；Shuら、PNAS 90：7995-7999（1993）；およびSkerraら、Science 240：1038-1040（1988）に記載されている技術が挙げられる。ヒトにおけるインビボでの抗体の使用およびインビトロでの検出アッセイを含むいくつかの用途については、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体を使用することが好ましい場合がある。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域と、ヒト免疫グロブリン定常領域を有している抗体である。キメラ抗体を生産するための方法は当該分野で公知である。例えば、Morrison, Science 229：1202（1985）；Oiら、BioTechniques 4：214（1986）；Gilliesら、J. Immunol. Methods 125：191-202（1989）；米国特許第5,807,715号；同第4,816,567号；および同第4,816,397号（それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと。ヒト化抗体は、ヒト以外の種に由来する1つ以上の相補性決定領域（CDR）とヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有している、所望される抗原に結合するヒト以外の種の抗体に由来する抗体分子である。多くの場合には、ヒトフレームワーク領域の中のフレームワーク残基は、抗

原結合を変化させるため、好ましくは抗原結合を改善するために、CDRドナー抗体に由来する対応する残基で置換されるであろう。これらのフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレーム残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基との相互作用のモデル化によって、および特定の位置にある珍しいフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される。（例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号；Riechmannら、Nature 332:323(1988)（それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと）。抗体は、当該分野で公知の様々な技術（例えば、CDR移植（EP 239,400；PCT公開番号WO91/09967；米国特許第5,225,539号；同第5,530,101号；および5,585,089号）、貼り付け（veneer ing）、または表面再生（resurfacing）（EP 592,106；EP 519,596；Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991)；Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814(1994)；Roguskaら、PNAS 91:969-973(1994)）；ならびに鎖のシャッフリング（米国特許第5,565,332号）が含まれる）を使用してヒト化させることができる。

10

【0113】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記のファージディスプレイ法を含む、当該分野で公知の様々な方法によって作成することができる。米国特許第4,444,887号；および同第4,716,111号；ならびに、PCT公開番号WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735、およびWO91/10741；（そのそれぞれがその全体において引用により本明細書中に組み入れられる）もまた参照のこと。

20

【0114】

ヒト抗体はまた、機能的な内因性の免疫グロブリンを発現することはできないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して生産することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、マウスの胚性幹細胞にランダムに導入される場合も、また、相同組み換えによって導入される場合もある。あるいは、ヒト可変領域、定常領域、および送達領域は、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入することができる。マウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別に、またはそれと同時に、相同組み換えによって非機能性にさせることができる。特に、JH領域のホモ接合型欠失は、内因性の抗体の生産を妨げる。修飾された胚性幹細胞が増殖させられ、キメラマウスを得るために胚盤胞にマイクロインジェクションされる。その後、キメラマウスは、ヒト抗体を発現するホモ接合型の子孫を生じるように交配させられる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原（例えば、所望される標的ポリペプチド全体または一部）を用いて通常の様式で予防接種される。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して、予防接種されたトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスが有しているヒト免疫グロブリン遺伝子は、B細胞の分化の間に再配置され、続いて、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。したがって、このような技術を使用して、治療上有用であるIgG、IgA、IgM、およびIgE抗体を生産することが可能である。ヒト抗体を生産するためのこの技術の概要については、Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのこの技術の詳細な考察、ならびにそのような抗体を生産するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、PCT公開番号WO98/24893；WO96/34096；WO96/33735；米国特許第5,413,923号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,569,825号；同第5,661,016号；同第5,545,806号；同第5,814,318号；および同第5

30

40

50

、 939, 598号（これらは、それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) および GenPharm (San Jose, Calif.) のような会社は、上記に記載される技術と同様の技術を使用して、選択された抗原に対して指向させられたヒト抗体を提供することに従事し得る。

【0115】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体は、「誘導選択 (guided selection)」と呼ばれる技術を使用して作成することができる。このアプローチにおいては、選択されたヒト以外のモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を使用して、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を導くことができる (Jespersら、Bio/Technology 12: 899-903 (1988))。米国特許第 5, 565, 332号もまた参照のこと。

【0116】

別の実施形態においては、本発明の方法において使用される所望されるモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離し、そして配列決定することができる。単離され、そしてサブクロニングされたハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源となる。一旦単離されると、DNAを発現ベクターの中に置くことができ、これはその後、別の方法では免疫グロブリンを生産することのない、E. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髓腫細胞のような原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞にトランスフェクトされる。さらに具体的には、単離されたDNA（本明細書中に記載されるように、合成のものである場合がある）を使用して、1995年1月25日に提出されたNewmanら、米国特許第 5, 658, 570号（これは引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されているように、抗体を製造するための定常領域配列および可変領域配列をクローニングすることができる。本質的に、これには、選択された細胞からのRNAの抽出、cDNAへの変換、およびIg特異的プライマーを使用するPCRによる増幅が必然的に伴う。この目的のための適切なプライマーはまた、米国特許第 5, 658, 570号にも記載されている。以下にさらに詳細に議論されるように、所望される抗体を発現する形質転換された細胞は、免疫グロブリンの臨床的および商業的供給を提供するために、比較的多量に増殖させられる場合がある。

【0117】

特定のな実施形態においては、重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、当該分野で周知の方法により（例えば、配列の超可変性の領域を決定するための他の重鎖および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列との比較により）相補性決定領域 (CDR) の配列を同定するために検査され得る。日常的に行われる組み換えDNA技術を使用して、1つ以上のCDRがフレームワーク領域の中に（例えば、ヒト以外の抗体をヒト化させるためにヒトフレームワーク領域の中に）挿入される場合がある。フレームワーク領域は自然界に存在しているフレームワーク領域である場合も、また、コンセンサスなフレームワーク領域である場合もあり、そして好ましくは、ヒトフレームワーク領域である（例えば、ヒトフレームワーク領域のリストについては、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998)を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域とCDRの組み合わせによって作成されたポリヌクレオチドは、所望されるポリペプチド（例えば、Sp35）の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、1つ以上のアミノ酸置換を、フレームワーク領域の中に作成することができ、好ましくは、アミノ酸置換によって、その抗原に対する抗体の結合が改善される。加えて、そのような方法を使用して、1つ以上の鎖間ジスルフィド結合が欠失している抗体分子を作成するための、鎖間ジスルフィド結合に関与している1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作成することができる。ポリヌクレオチドに対する他の変更は本発明に含まれ、そして当業者の能力の範囲内である。

【0118】

加えて、適切な生物学的活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子とともに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子に由来する遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」の生産のために開発された技術（Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neubergerら、Nature 312: 604-608 (1984); Takedaら、Nature 314: 452-454 (1985))を使用することができる。本明細書中で使用される場合は、キメラ抗体は、様々な部分が様々な動物種に由来する分子（例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域を有している分子）であり、例えば、ヒト化抗体である。

10

【0119】

あるいは、単鎖抗体の生産について記載されている技術（米国特許第4,694,778号; Bird, Science 242: 423-442 (1988); Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); およびWardら、Nature 334: 544-554 (1989))を、単鎖抗体を生産するように適応させることができる。単鎖抗体は、アミノ酸の架橋によってFv領域の重鎖断片と軽鎖断片を連結させることによって形成させられ、それによって単鎖抗体が生じる。機能性のFv断片をE. coliの中でアセンブリさせるための技術が使用される場合もある（Skerrraら、Science 242: 1038-1041 (1988))。

20

【0120】

Sp35アンタゴニスト抗体はまた、内因性の免疫グロブリンの生産ができないトランスジェニック動物（例えば、マウス）の中で作成されたヒト抗体または実質的なヒト抗体でもあり得る（例えば、米国特許第6,075,181号、同第5,939,598号、同第5,591,669号、および同第5,589,369号（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと）。例えば、キメラおよび生殖系変異体マウスの中での抗体重鎖結合領域のホモ接合型の欠失によって内因性の抗体の生産の完全な阻害が生じることが記載されている。ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイのそのような生殖系変異体マウスへの導入によっては、抗原でチャレンジされた際にヒト抗体の生産が生じるであろう。SCIDマウスを使用してヒト抗体を作成する別の好ましい手段は、米国特許第5,811,524号（これは引用により本明細書中に組み入れられる）に開示されている。これらのヒト抗体に関連する遺伝的物質もまた、本明細書中に記載されるように単離することができ、そして操作することができることは明らかであろう。

30

【0121】

組み換え体抗体を作成するためのさらに別の非常に効率の高い手段は、Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992)に開示されている。特に、この技術によっては、サルの変域ドメインとヒト定常配列が含まれている霊長類化抗体の作成が生じる。この参考文献はその全体が引用により本明細書中に組み入れられる。さらに、この技術はまた、同一出願人による米国特許第5,658,570号、同第5,693,780号、および同第5,756,096号（それぞれが引用により本明細書中に組み入れられる）にも記載されている。

40

【0122】

別の実施形態においては、リンパ球を顕微操作によって選択することができ、そして可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞を、予防接種された哺乳動物から単離し、そしてインビトロで7日間培養することができる。培養物は、スクリーニング基準を満たす特異的IgGについてスクリーニングすることができる。ポジティブウェルから細胞を単離することができる。個々のIgを生産するB細胞を、FACSによって、または補体媒介性溶血プラークアッセイにおいてそれらを同定することによって単離することができる。Igを生産するB細胞は、試験管の中で顕微操作することができ、そしてV_HおよびV_L遺伝子を、例えば、RT-PCRを使用して増幅させることができる。

50

V_HおよびV_L遺伝子は抗体発現ベクターの中にクローニングし、そして発現のために細胞（例えば、真核生物細胞または原核生物細胞）にトランスフェクトすることができる。

【0123】

あるいは、抗体を生産する細胞株を、当業者に周知の技術を使用して選択し、培養することができる。そのような技術は、様々な実験室用のマニュアルおよび主な刊行物に記載されている。これに関して、以下に記載されるような本発明での使用に適している技術は、補遺を含むCurrent Protocols in Immunology, Coliganら編、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)（これはその全体が引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されている。

10

【0124】

本明細書中に開示される方法において使用される抗体は、抗体の合成のための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または好ましくは、本明細書中に記載される組み換え発現技術によって生産することができる。

【0125】

本発明の範囲には、さらに、抗原結合DNA配列のあらゆる対立遺伝子、変異体、および突然変異体が含まれることが、さらに理解されるであろう。

【0126】

周知であるように、RNAは、もとのハイブリドーマ細胞から、または他の形質転換された細胞から、標準的な技術（例えば、イソチオシアネートグアニジン抽出、および沈殿、それに続く遠心分離またはクロマトグラフィー）によって単離することができる。所望される場合には、mRNAは、標準的な技術（例えば、クロマトグラフィーまたはオリゴdTセルロース）によって全RNAから単離され得る。適切な技術は当該分野でよく知られている。

20

【0127】

1つの実施形態においては、本発明の方法において使用される抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、周知の方法にしたがって逆転写およびDNAポリメラーゼを使用して同時に、または別々にのいずれかで作成することができる。PCRは、コンセンサスな定常領域プライマーによって、あるいは、公開されている重鎖および軽鎖のDNAおよびアミノ酸配列に基づくより特異的なプライマーによって開始され得る。上記で議論されるように、PCRは、抗体軽鎖および重鎖をコードするDNAクローンを単離するために使用される場合もある。この場合は、ライブラリーは、コンセンサスプライマーまたはより大きな相同プローブ（例えば、マウス定常領域プローブ）によってスクリーニングされ得る。

30

【0128】

DNA（通常は、プラスミドDNA）は、当該分野で公知の技術を使用して細胞から単離され得、例えば、組み換えDNA技術に関する上記の参考文献の中に詳細に示されている標準的な周知の技術にしたがって、制限マッピングされ、配列決定される。もちろん、DNAは、単離プロセスまたはその後の分析の間の任意の時点で、本発明によって合成される場合もある。

40

【0129】

抗体、またはその断片、誘導体、もしくはアナログ（例えば、Sp35アンタゴニストである抗体の重鎖または軽鎖）の組み換えによる発現には、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が必要である。一旦、本発明の抗体分子、または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの一部（好ましくは、重鎖または軽鎖可変ドメインを含む）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の生産のためのベクターが、当該分野で周知の技術を使用して組み換えDNA技術によって生産され得る。したがって、抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現によりタンパク質を調製するための方法が本明細書中に記載される。当業者に周知の方法を使用して、抗体

50

をコードする配列と適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロでの組み換えDNA技術、合成技術、およびインビボでの遺伝子組み換えが含まれる。したがって、本発明により、プロモーターに動作可能であるように連結された本発明の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターが提供される。このようなベクターには、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列が含まれ得る（例えば、PCT公開番号WO86/05807；PCT公開番号WO89/01036；および米国特許第5,122,464号を参照のこと）。そして、抗体の可変ドメインは、完全な重鎖または軽鎖の発現のために、そのようなベクターにクローニングされ得る。

10

【0130】

発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞に導入され、そしてその後、トランスフェクトされた細胞が従来技術によって培養されて、本明細書中に記載される方法において使用される抗体が生産される。このように、本発明には、異種プロモーターに動作可能であるように連結された本発明の抗体、またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドが含まれている宿主細胞が含まれる。二本鎖の抗体の発現に好ましい実施形態においては、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターが、以下に記載されるように、完全な免疫グロブリン分子の発現のために宿主細胞の中で同時に発現させられ得る。

【0131】

様々な宿主発現ベクターシステムが、本明細書中に記載される方法において使用される抗体分子を発現させるために利用され得る。そのような宿主発現システムは媒体を示し、それによって目的のコード配列が生産され得、続いて精製され得るが、これはまた、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされると、インサイチュで本発明の抗体分子を発現することができる細胞をも提示し得る。これらには、微生物（例えば、抗体をコードする配列を含む組換え体バクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）；抗体をコードする配列を含む組み換え体酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体をコードする配列を含む組み換え体ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させられた昆虫細胞システム；抗体をコードする配列を含む組み換え体ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染させられたか、または組み換え体プラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞システム；あるいは、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組み換え発現構築物を有している哺乳動物細胞システム（例えば、COS、CHO、BLK、293、3T3細胞）が含まれるが、これらに限定はされない。好ましくは、細菌細胞（例えば、*Escherichia coli*）およびより好ましくは、真核生物細胞（特に、完全な組み換え体抗体分子の発現について）が、組み換え体抗体分子の発現に使用される。例えば、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO））は、ヒトサイトメガロウイルスに由来する主要中期初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせて、抗体のための有効な発現システムである（Foeckingら、Gene 45:101（1986）；Cockettら、Bio/Technology 8:2（1990））。

20

30

40

【0132】

細菌システムにおいては、多数の発現ベクターが、発現させられる抗体分子について意図される用途に応じて有利に選択され得る。例えば、抗体分子の薬学的組成物の作成のために多量のそのようなタンパク質が生産される場合には、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を支持するベクターが所望され得る。そのようなベクターとしては、*E. coli*発現ベクターpUR278（Ruttherら、EMBO J. 2:17

50

91 (1983)) (ここでは、抗体をコードする配列がlacZコード領域とインフレームでベクターの中に別々に連結させられ得、その結果、融合タンパク質が生産される) ; pINベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)) などが挙げられるが、これらに限定はされない。pGEXベクターは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるためにも使用することができる。一般的には、そのような融合タンパク質は可溶性であり、そしてマトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、その後の遊離のグルタチオンの存在下での溶出によって溶解させられた細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、トロンビンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、クローニングされた標的遺伝子産物は、GST部分から解離させられ得る。

10

【0133】

昆虫システムにおいては、Autographa californica核多角体病ウイルス (AcNPV) が、通常は、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞の中で増殖する。抗体をコードする配列は、ウイルスの必須ではない領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) の中に個別にクローニングされ得、そしてAcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置される。

20

【0134】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウイルスをベースとする発現システムが利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合には、目的の抗体をコードする配列がアデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターおよび3成分リーダー配列) に連結させられ得る。このキメラ遺伝子は、その後、インビトロまたはインビボでの組み換えによってアデノウイルスゲノムの中に挿入され得る。ウイルスゲノムの必須ではない領域 (例えば、領域E1またはE3) への挿入によっては、感染させられた宿主の中で生存することができ、そして抗体分子を発現することができる組み換え体ウイルスが生じるであろう (例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984) を参照のこと)。特異的な開始シグナルもまた、挿入された抗体をコードする配列の効率のよい翻訳に必要であり得る。これらのシグナルには、ATG開始コドンと隣接配列が含まれる。さらに、開始コドンは、挿入断片全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレームと一致していなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、様々な起源のものであり得、天然のものであっても、合成のものであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって高めることができる (Bittnerら、Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987) を参照のこと)。

30

【0135】

加えて、挿入された配列の発現を調節する、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を修飾しそしてプロセシングする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のそのような修飾 (例えば、グリコシル化) およびプロセシング (例えば、切断) が、タンパク質の機能に重要であり得る。様々な宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾のための特徴的であり、特異的な機構を有している。適切な細胞株または宿主システムは、発現させられる外来タンパク質の正確な修飾およびプロセシングを確実にするように選択することができる。この目的のためには、遺伝子産物の一次転写物の適切なプロセシング、グリコシル化、およびリン酸化のための細胞性の機構を有している真核生物宿主細胞を使用することができる。そのような哺乳動物宿主細胞としては、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、乳ガン細胞株 (例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、お

40

50

よび T 4 7 D) および正常な乳腺細胞株 (例えば、C R L 7 0 3 0 および H s 5 7 8 B s t) が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0136】

長期にわたる組み換え体タンパク質の高収量での生産のためには、安定な発現が使用され得る。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞株が操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりもむしろ、宿主細胞が、適切な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) によって制御される DNA、および選択マーカーで形質転換され得る。外来 DNA の導入の後、操作された細胞は、富化培地の中で 1~2 日間増殖させられ得、その後、選択培地に移され得る。組み換え体プラスミドの中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをそれらの染色体の中に安定に組み込むことを可能にし、そして、その後に細胞株の中にクローニングすることができ、その中で増殖させることができる遺伝子座を形成するように増殖させられる。この方法は、抗体分子を安定して発現する細胞株を操作するように有利に使用され得る。

【0137】

使用され得る多数の選択システム (単純ヘルペスチミジンキナーゼ (Wigler ら、Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy ら、Cell 22:817 (1980)) 遺伝子を含むが、これらに限定はされない) は、それぞれ、tk-、hgprt-、または aprt- 細胞において使用することができる。また、代謝拮抗物質耐性を、以下の遺伝子についての選択基準として使用することができる: dhfr (これは、メトトレキサートに対する耐性を付与する (Wigler ら、Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980))) ; O'Hare ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)) ; gpt (これは、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する) (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)) ; neo (これは、アミノグリコシド G-418 に対する耐性を付与する) (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) ; および Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191:217 (1993) ; TIB TECH 11 (5) :155-215 (1993 年 5 月)) ; ならびに hygromycin (これは、ハイグロマイシンに対する耐性を付与する) (Santerre ら、Gene 30:147 (1984))。使用することができる組み換え DNA 技術についての当該分野で一般的に知られている方法は、Ausubel ら (編)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993) ; Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) ; ならびに、第 12 章および 13 章、Dracopolis ら (編)、Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994) ; Colberre-Garapin ら、J. Mol. Biol. 150:1 (1981) (これらはそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる) に記載されている。

【0138】

抗体分子の発現レベルは、ベクターの増幅によって増大させることができる (概要については、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for

10

20

30

40

50

the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, 第3巻(1987)を参照のこと)。抗体を発現するベクターシステムの中のマーカーが増幅可能である場合には、宿主細胞の培養物中に存在する阻害因子のレベルの増大によって、マーカー遺伝子のコピー数が増加するであろう。増幅された領域は抗体遺伝子に関係しているので、抗体の生産もまた増加するであろう(Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3:257(1983))。

【0139】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクターで同時トランスフェクションすることができ、第1のベクターは重鎖に由来するポリペプチドをコードし、そして第2のベクターは軽鎖に由来するポリペプチドをコードする。2つのベクターには、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同じ選択マーカーが含まれ得る。あるいは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方をコードする1つのベクターが使用される場合もある。そのような状況では、軽鎖は、毒性のない(toxic free)重鎖が過剰になることを避けるために、重鎖の前に配置されることが有効である(Proudfoot, Nature 322:52(1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197(1980))。重鎖および軽鎖のコード配列には、cDNAとゲノムDNAが含まれ得る。

【0140】

一旦、本発明の抗体分子が組み換えによって発現させられると、これは、免疫グロブリン分子の精製のための当該分野で公知の任意の方法によって(例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー(特に、Protein A後の特異的抗原に対する親和性による)、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、可溶性の差によって、あるいは、タンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製することができる。あるいは、本発明の抗体の親和性を増大させるための好ましい方法は、US 2002 0123057 A1に開示されている。

【0141】

1つの実施形態においては、本発明の方法において使用される結合分子または抗原結合分子には、1つ以上のドメインが部分的または完全に欠失させられている合成の定常領域が含まれる(「ドメイン欠失抗体」)。特定の実施形態においては、適合する修飾された抗体には、ドメイン欠失構築物または変異体が含まれるであろう。ここでは、 C_H2 ドメイン全体が除去されている($\square C_H2$ 構築物)。他の実施形態については、短い結合ペプチドが、可変領域に可撓性、および移動の自由度を提供するために、欠失させられたドメインについて置換される場合がある。当業者は、抗体の代謝速度に対する C_H2 ドメインの調節特性の理由から、そのような構築物が特に好ましいことを理解するであろう。

【0142】

特定の実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用される修飾された抗体はミニボディーである。ミニボディーは当該分野で記載されている方法を使用して作成することができる(例えば、米国特許第5,837,821号、またはWO 94/09817 A1を参照のこと)。

【0143】

別の実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用される修飾された抗体は、当該分野で公知である C_H2 ドメイン欠失抗体である。ドメイン欠失構築物は、IgG₁ヒト定常ドメインをコードするベクター(例えば、Biogen IDEC Incorporatedによる)を使用して誘導することができる(例えば、WO 02/060955 A2およびWO 02/096948 A2を参照のこと)。この例示的なベクターは、 C_H2 ドメインを欠失させて、ドメイン欠失IgG₁定常領域を発現する合成のベクターを提供するように操作されている。

【0144】

1つの実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用されるSp35

10

20

30

40

50

アンタゴニスト抗体またはその断片には、それが単量体サブユニットの間での会合が可能である限りにおいて、数個のアミノ酸もしくはさらには1つのアミノ酸の欠失または置換を有している免疫グロブリン重鎖が含まれる。例えば、 $C_H 2$ ドメインの選択された領域の中での1つのアミノ酸の変異が、 F_c の結合を実質的に減少させ、それによって腫瘍の局在化を増大させるために十分である場合がある。同様に、調節されるエフェクター機能（例えば、補体結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインの一部を単純に欠失させることが望まれる場合もある。そのような定常領域の部分的な欠失によっては、目的の定常領域ドメインに付随する他の所望される機能を完全なまま残しつつ、抗体の選択された特性（血清半減期）が改善され得る。さらに、上記で触れられたように、開示される抗体の定常領域は、得られる構築物のプロフィールを高める1つ以上のアミノ酸の変異または置換による合成のものである場合もある。この態様においては、修飾された抗体の立体配置および免疫原性プロフィールを実質的に維持したまま、保存されている結合部位によって提供される活性（例えば、 F_c 結合）を破壊してしまうことが可能であり得る。なお他の実施形態には、エフェクター機能のような所望される特性を高めるか、またはさらなる細胞毒素または炭水化物の結合を提供するための、定常領域への1つ以上のアミノ酸の付加が含まれる。そのような実施形態においては、選択された定常領域ドメインに由来する特異的配列を挿入するまたは複製させることが所望される場合がある。

【0145】

本発明によっては、本明細書中に記載される抗体分子（例えば、 V_H 領域および／または V_L 領域）の変異体（誘導体を含む）を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される抗体の使用も提供される。抗体またはその断片は、 $Sp35$ ポリペプチドに免疫特異的に結合する。当業者に公知の標準的な技術を使用して、アミノ酸置換を生じる部位特異的突然変異誘発およびPCRによって媒介される突然変異誘発を含む（しかし、これらに限定はされない）結合分子をコードするヌクレオチド配列の中に変異を導入することができる。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、参照 V_H 領域、 $V_H CDR 1$ 、 $V_H CDR 2$ 、 $V_H CDR 3$ 、 V_L 領域、 $V_L CDR 1$ 、 $V_L CDR 2$ 、または、 $V_L CDR 3$ と比較して、50未満のアミノ酸置換、40未満のアミノ酸置換、30未満のアミノ酸置換、25未満のアミノ酸置換、20未満のアミノ酸置換、15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4未満のアミノ酸置換、3未満のアミノ酸置換、または2未満のアミノ酸置換をコードする。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似する電化を有している側鎖を持つアミノ酸で置き換えられる置換である。類似する電荷を有している側鎖を持つアミノ酸残基のファミリーは当該分野で定義されている。これらのファミリーには以下が含まれる：塩基性側鎖を持つアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を持つアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、電化を有していない側鎖を持つアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を持つアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分岐側鎖を持つアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を持つアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。あるいは、変異は、コード配列全体または一部にランダムに、例えば、飽和突然変異誘発によって導入することができ、そして得られる変異体を、活性を保持している変異体を同定するために生物学的活性についてスクリーニングすることができる。

【0146】

例えば、抗体分子のフレームワーク領域だけに、またはCDR領域だけに変異を導入することが可能である。導入された変異はサイレントである場合も、または当たり障りのないミッセンズ変異（すなわち、抗原に結合する抗体の能力に影響を及ぼさないか、またはほとんど影響を及ぼさない）である場合もある。これらのタイプの変異は、コドン使用を最適化させるため、またはハイブリドーマ抗体の生産を改善するために有用であり得る。あるいは、当たり障りのある（non-neutral）ミッセンズ変異によっては、抗

原に結合する抗体の能力が変化する場合がある。ほとんどのサイレントな当たり障りのないミッセンス変異の位置は、おそらくフレームワーク領域の中にあり、一方、ほとんどの当たり障りのあるミッセンス変異の位置は、おそらくCDRの中にある。しかしこれは絶対条件ではない。当業者は、抗原結合活性に変化がない、または結合活性に変化がある（例えば、抗原結合活性の改善または抗体特異性の変化）のような所望される特性を有している変異体分子を設計し、そして試験することができるであろう。突然変異誘発の後、コードされるタンパク質は日常的に行われているように発現させられ得、そしてコードされるタンパク質の機能的および／または生物学的活性が、本明細書中に記載される技術を使用するか、または当該分野で公知の日常的に行われている修飾技術によって決定することができる。

10

【0147】

本発明の方法において使用される例示的な抗体またはその断片としては、以下からなる群より選択される参照モノクローナル抗体と同じSp35エпитープに対して特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片が挙げられるが、これらに限定はされない：201'、3A3、3A6、1A7、1G7、2B10、2C11、2F3、3P1D10、2C3、3P1E11、3B7、3P2C6、3G10、2H7、3P2C9、2G4、3P4A6、1D9、3P4A1、2B9、3P4C2、2D2、3P4C5、1D8、3P4C8、2G9、30-C12(Li01)、38-D01(Li02)、35-E04(Li03)、36-C09(Li04)、30-A11(Li05)、34-F02(Li06)、29-E07(Li07)、34-G04(Li08)、36-A12(Li09)、28-D02(Li10)、30-B01(Li11)、34-B03(Li12)、3383(L1a.1)、3495(L1a.2)3563(L1a.3)、3564(L1a.4)3565(L1a.5)、3566(L1a.6)3567(L1a.7)、3568(L1a.8)、3569(L1a.9)、3570(L1a.10)、3571(L1a.11)、3582(L1a.12)、および1968(L1a.13)（全て、米国仮特許出願番号60/697,336、同60/771,990、および同60/814,522（これらはそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されている）。

20

【0148】

融合タンパク質ならびに結合させられたポリペプチドおよび抗体

30

本明細書中に開示される方法において使用されるSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、およびアンタゴニスト抗体はさらに、N末端もしくはC末端で異種ポリペプチドに組み換えによって融合させることができ、また、ポリペプチドまたは他の組成物に化学的に結合させる（共有結合および共有結合以外の結合を含む）こともできる。例えば、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、および抗体は、検出アッセイにおいて標識として有用である分子、およびエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、または毒素）に組み換えによって融合させることも、あるいは、結合させることもできる。例えば、PCT公開番号WO92/08495；WO91/14438；WO89/12624；米国特許第5,314,995号；およびEP396,387を参照のこと。

40

【0149】

本明細書中に開示される方法において使用されるSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、および抗体としては、修飾された（すなわち、共有結合がSp35の生物学的機能を阻害することによってSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体を妨げないような任意のタイプの分子の共有結合による）誘導体が挙げられる。例えば、本発明のSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、および抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、ホスホリル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロック基による誘導、タンパク質分解的切断、細胞性のリガンドもしくは他のタンパク質に対する結合などによって修飾することができる。多数の化学的修飾のうちの任意のものが、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝に

50

よる合成などを含むがこれらに限定はされない公知の技術によって行われ得る。加えて、誘導体には、1つ以上の従来のものではないアミノ酸が含まれる場合がある。

【0150】

本明細書中に開示される方法において使用される Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、および抗体は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって互いに結合させられたアミノ酸（すなわち、ペプチド等量式）から構成され得、そしてこれには、20種類の遺伝子をコードするアミノ酸（例えば、自然界には存在しないアミノ酸）以外のアミノ酸が含まれる場合がある。Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、および抗体は、自然なプロセス（例えば、翻訳後プロセッシング）によって、あるいは、当該分野で周知の化学修飾技術によって修飾することができる。そのような修飾は、基本的なテキストに、そしてより詳細なモノグラフに、さらには、膨大な量の研究論文に十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ酸末端またはカルボキシル末端を含む Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチドまたは抗体のどの場所でも、あるいは、炭水化物のような部分に対しても起こり得る。同じタイプの修飾が、任意の Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体の中のいくつかの部位で、同じ程度で、または異なる程度で存在する場合があることは明らかであろう。また、任意の Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体には、多くのタイプの修飾が含まれ得る。Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として分岐している場合があり、そしてこれらは環状である場合もあり、これには分岐を伴う場合も、また分岐を伴わない場合もある。環状、分岐している、および分岐している環状の、Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、ならびに抗体は、翻訳後の自然なプロセスの結果生じる場合も、また、合成方法によって作成される場合もある。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスホチジリンシトール（phosphatidylinositol）の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合による架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解のプロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなトランスファーRNAによって媒介されるタンパク質へのアミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる。（例えば、Proteins-Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 第2版（1993）；Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1-12頁（1983）；Seifterら、Meth Enzymol 182:626-646（1990）；Rattanら、Ann NY Acad Sci 663:48-62（1992）を参照のこと）。

【0151】

本発明によってはまた、Sp 3 5 機能を阻害する Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体融合体を含む、本質的にそれらから構成される、あるいはそれらから構成される融合タンパク質も提供される。好ましくは、Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体が融合させられる異種ポリペプチドは機能について有用であるか、あるいは、Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチドまたは抗体を標的化するために有用である。本発明の特定の実施形態においては、可溶性 Sp 3 5 アンタゴニストポリペプチド（例えば、LRドメイン、Igドメイン、または細胞外ドメイン全体を含む Sp 3 5 ポリペプチド（配列番号2のアミノ酸34から532に対応する））が、異種ポリペプチド部分に融合させられて、Sp 3 5 アンタゴニスト融合ポリペプチドが形成せられる。Sp 3 5 アンタゴニスト融合タンパク質、アプタマー、および抗体は、様々な

目的（例えば、長い血清半減期、改善された生体利用性、特異的な臓器もしくは組織のタイプに対するインビボでの標的化、改善された組み換え発現効率、改善された宿主細胞の分泌、精製の容易さ、および高い親和力）を達成するために使用することができる。達成される目的（単数または複数）に応じて、異種部分是不活性であっても、または生物学的に活性であってもよい。また、これはSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、もしくは抗体に対して安定に融合させられるように、あるいは、インビトロまたはインビボで切断できるように選択することができる。これらの他の目的を達成するための異種部分は当該分野で公知である。

【0152】

Sp35アンタゴニスト融合ポリペプチド、アプタマー、または抗体の発現の変わりとして、異種部分の選択を行い、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に化学的に結合させることができる。ほとんどの場合には、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に対して融合させられるか、あるいは結合させられるかにはかわらず、選択される異種部分は機能が類似しているであろう。したがって、異種アミノ酸配列についての以下の議論においては、他に明記されない限りは、異種配列は融合タンパク質の形態で、または化学的結合体として、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に結合させることができることが理解される。

【0153】

薬理学的活性のあるポリペプチド（例えば、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体）は、多くの場合は、迅速なインビボでのクリアランスを示し、したがって、体内で治療有効濃度を得るためには高い用量が必要である。加えて、約60kDaよりも小さいポリペプチドは、糸球体濾過を受ける可能性があり、これは多くの場合には腎臓毒性を導く。比較的小さいポリペプチド（例えば、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体）の融合体または結合体を、そのような腎臓毒性のリスクを下げるか、または回避するために使用することができる。治療用ポリペプチドのインビボでの安定性（すなわち、血清半減期）を高めるための様々な異種アミノ酸配列（すなわち、ポリペプチド部分または「担体」）は公知である。

【0154】

その長い半減期、インビボでの広い分布、および酵素機能もしくは免疫学的機能の欠失の理由から、原則的に全長のヒト血清アルブミン（HSA）またはHSA断片が、一般的には異種部分として使用される。Yehら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:1904-08 (1992) および Syedら、Blood 89:3243-52 (1997) に教示されているもののような方法および材料の適用によって、HSAは、Sp35アンタゴニスト融合ポリペプチド、アプタマー、抗体、またはポリペプチド/抗体結合体を形成させるために使用することができる。これらは、Sp35部分によって薬理学的活性を示し、一方では、有意に高いインビボでの安定性（例えば、10倍または100倍高い）を示す。HSAのC末端は、可溶性Sp35部分のN末端に融合させることができる。HSAは自然に分泌されるタンパク質であるので、HSAシグナル配列を、融合タンパク質が真核生物（例えば、哺乳動物）の発現システムの中で生産される場合には、細胞培養培地中への可溶性Sp35融合タンパク質の分泌を得るために利用することができる。

【0155】

特定の実施形態においては、本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、およびその抗体断片にはさらに、標的化部分が含まれる。標的化部分には、体の特定の部分（例えば、脳またはその中の区画）への局在化を指向するタンパク質またはペプチドが含まれる。特定の実施形態においては、本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体またはその抗体断片は、脳を標的化する部分に結合または融合させられる。脳を標的化する部分は、共有結合される（例えば、直接、翻訳による融合、または直接もしくは状況に応じて切断することができるスペーサー分子を介するかのいずれかの化学的結合による）、または共

有結合以外の結合によって結合させられる（例えば、アビジン、ビオチン、protein A、IgGなどのような可逆的相互作用による）。他の実施形態においては、本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、またはその抗体断片は、1つ以上の脳を標的化する部分に結合させられる。さらなる実施形態においては、脳を標的化する部分は、本発明の方法において使用される複数のSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、またはその抗体断片に結合させられる。

【0156】

Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、またはその抗体断片を伴う脳を標的化する部分は、そのようなSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、またはその抗体断片の脳への送達を促進する。タンパク質または治療薬に融合させられた場合に、血液脳関門（BBB）を通過してタンパク質または治療薬を送達する多数のポリペプチドが記載されている。限定ではない例としては、以下が挙げられる：1ドメイン抗体FC5（Abulrobら、（2005）J. Neurochem. 95, 1201-1214）；mAB 83-14、ヒトインシュリン受容体に対するモノクローナル抗体（Pardridgeら、（1995）Pharmacol. Res. 12:807-816）；ヒトトランスフェリン受容体（hTfR）に結合するB2、B6、およびB8ペプチド（Xiaら、（2000）J. Virol. 74, 11359-11366）；トランスフェリン受容体に対するOX26モノクローナル抗体（Pardridgeら、（1991）J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 66-70）；および米国特許第6,306,365の配列番号1~18。上記参考文献の内容は、それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる。

【0157】

Sp35組成物の脳への送達の促進は、当該分野で十分に確立されている多数の手段によって決定される。例えば、脳を標的化する部分に連結させられた放射標識されたSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、またはその抗体断片の動物への投与；脳への局在化の決定；ならびに、脳を標的化する部分に結合させられていない同じ放射標識されたSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、抗体、またはその抗体断片を用いた場合の局在化との比較である。標的化の促進を決定する他の手段は、上記参考文献に記載されている。

【0158】

シグナル配列は、小胞体の膜を通過するタンパク質の輸送を開始するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである。免疫融合体（immunofusion）の構築に有用なシグナル配列としては、抗体の軽鎖シグナル配列（例えば、抗体14.18（Gilliesら、J. Immunol. Meth. 125:191-202（1989））、抗体の重鎖シグナル配列、例えば、MOPC141抗体重鎖シグナル配列（Sakanoら、Nature 286:5774（1980））が挙げられる。あるいは、他のシグナル配列も使用することができる。例えば、Watson, Nucl. Acids Res. 12:5145（1984）を参照のこと。シグナルペプチドは、通常、シグナルペプチダーゼによって小胞体の内腔で切断される。これによって、Fc領域と可溶性のSp35部分を含む免疫融合体タンパク質の分泌が生じる。

【0159】

いくつかの実施形態においては、DNA配列は、分泌カセットと可溶性Sp35部分の間のタンパク質分解的切断部位をコードし得る。このような切断部位によって、例えば、コードされる融合タンパク質のタンパク質分解的切断が提供され得、したがって、標的タンパク質からFcドメインが分離される。有用なタンパク質分解的切断部位としては、トリプシン、プラスミン、トロンビン、第Xa因子、またはエンテロキナーゼKのようなタンパク質分解酵素によって認識されるアミノ酸配列が挙げられる。

【0160】

分泌カセットは、複製可能な発現ベクターの中に組み込むことができる。有用なベクタ

ーとしては、直鎖状の核酸、プラスミド、ファージミド、コスミドなどが挙げられる。例示的な発現ベクターはp d Cであり、ここでは、免疫融合体DNAの転写はヒトサイトメガロウイルスのエンハンサーとプロモーターの制御下に配置されている。例えば、L oら、Biochim. Biophys. Acta 1088:712 (1991)およびL oら、Protein Engineering 11:495-500 (1998)を参照のこと。適切な宿主細胞は、可溶性のSp 35ポリペプチドをコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトすることができ、そして可溶性Sp 35ポリペプチドの発現および分泌のために使用することができる。通常使用される宿主細胞としては、不死化ハイブリドーマ細胞、骨髄腫細胞、293細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、およびCOS細胞が挙げられる。

10

【0161】

1つの実施形態においては、可溶性Sp 35ポリペプチドは、ヒンジ領域およびFc領域 (すなわち、Ig重鎖定常領域のC末端部分) に融合させられる。Sp 35-Fc融合体についての可能性のある利点としては、可溶性、インビボでの安定性、および多価 (例えば、二量体化) が挙げられる。使用されるFc領域は、IgA、IgD、またはIgG Fc領域 (ヒンジ-C_H2-C_H3) であり得る。あるいは、これは、IgEまたはIgMのFc領域 (ヒンジ-C_H2-C_H3-C_H4) であり得る。IgG Fc領域 (例えば、IgG₁ Fc領域またはIgG₄ Fc領域) が一般的に使用される。1つの実施形態においては、IgG Fcを化学的に定義する、ババイン切断部位のすぐ上流にあるヒンジ領域の中で始まる配列 (すなわち、残基216、Kabatsシステムにしたがって重鎖定常領域の最初の残基を114とする) または他の免疫グロブリンの同様の部位が融合に使用される。融合が行われる正確な部位は重要ではない; 特定の部位は周知であり、そして分子の生物学的活性、分泌、または結合特性を最適化するために選択され得る。Fc融合体をコードするDNAを構築し、そして発現させるための材料および方法は当該分野で公知であり、そして過度の実験を行うことなく可溶性Sp 35融合体を得るために適用することができる。本発明のいくつかの実施形態では、Sp 35融合タンパク質 (例えば、Caponら、米国特許第5, 428, 130号および同第5, 565, 335号に記載されているもの) が使用される。

20

【0162】

完全にもとのままの野生型Fc領域は、通常は必要のないエフェクター機能を提示し、本発明の方法において使用されるFc融合タンパク質においては所望されない。したがって、特定の結合部位は、通常、分泌カセットの構築の際にFc領域から欠失させられる。例えば、軽鎖との同時発現は必要ないので、重鎖結合タンパク質Bip (Hendershotら、Immunol. Today 8:111-14 (1987)) についての結合部位が、IgEのFc領域のC_H2ドメインから欠失させられる。その結果、この部位は免疫融合体の効率的な分泌を妨害することはない。膜貫通ドメイン配列 (例えば、IgMの中に存在している膜貫通ドメイン配列) もまた、通常は欠失させられる。

30

【0163】

IgG₁ Fc領域はほとんどの場合に使用される。あるいは、免疫グロブリンγの他のサブクラス (γ-2、γ-3、およびγ-4) のFc領域が分泌カセットの中で使用され得る。免疫グロブリンγ-1のIgG₁ Fc領域が、一般的に、分泌カセットの中で使用され、これにはヒンジ領域、C_H2領域、およびC_H3領域の少なくとも一部が含まれる。いくつかの実施形態においては、免疫グロブリンγ-1のFc領域は、C_H2が欠失させられたFcであり、これには、ヒンジ領域とC_H3領域の一部が含まれるが、C_H2領域は含まれない。C_H2が欠失させられたFcは、Gilliesら、(1990) Hum. Antibod. Hybridomas 1:47によって記載されている。いくつかの実施形態においては、IgA、IgD、IgE、またはIgMのうちの1つのFc領域が使用される。

40

【0164】

Sp 35-Fc融合タンパク質は、いくつかの様々な立体配置で構築することができる

50

。1つの立体配置においては、可溶性Sp35部分のC末端が、Fcヒンジ部分のN末端に直接融合させられる。わずかに異なる立体配置においては、短いポリペプチド（例えば、2～10アミノ酸）が、可溶性Sp35部分のN末端とFc部分のC末端の間での融合の中に取り込まれる。このようなリンカーによっては、立体構造上の可撓性が提供され、これによりいくつかの状況においては生物学的活性が改善され得る。ヒンジ領域の十分な部分がFc部分の中に保持されている場合には、Sp35-Fc融合体は二量体化し、それによって二価の分子を形成するであろう。単量体Fc融合体の均質な集団によっては、単特異的な二価の二量体が生じるであろう。2つの単量体Fc融合体（それぞれは異なる特異性を有している）の混合によっては、二重特異的な二価の二量体が生じるであろう。

【0165】

対応するアミノ反応基とチオール反応基を含む任意の数の架橋を、血清アルブミンに対してSp35アンタゴニストポリペプチドを連結させるために使用することができる。適切なリンカーの例としては、チオール反応性のマレイミドを挿入するアミン反応性の架橋剤が挙げられる（例えば、SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、およびGMBs）。他の適切なリンカーによっては、チオール反応性ハロアセテート基が挿入される（例えば、SBAP、SIA、SIAB）。還元させることができるリンカーを生じさせるためのスルフヒドリル基との反応のための保護されたチオールまたは保護されていないチオールを提供するリンカーとしては、SPDP、SMPPT、SATA、およびSATPが挙げられる。このような試薬は市販されている（例えば、Pierce Chemicals）。

【0166】

結合は、可溶性Sp35ポリペプチドのN末端または血清アルブミン上のチオール部分には関与しない。例えば、可溶性Sp35-アルブミン融合体を、遺伝子操作技術を使用して得ることができ、ここでは可溶性Sp35部分は、そのN末端、C末端、または両方で血清アルブミン遺伝子に融合させられる。

【0167】

可溶性Sp35ポリペプチドは、可溶性Sp35部分の精製または同定を容易にするために異種ペプチドに融合させることができる。例えば、ヒスチジントグを、可溶性Sp35ポリペプチドに融合させて、市販によって入手することができるクロマトグラフィー媒体を使用する精製を容易にすることができる。

【0168】

本発明のいくつかの実施形態においては、可溶性Sp35融合構築物が、細菌の中での可溶性Sp35部分の生産を促進するために使用される。このような構築物の中では、通常は高レベルで発現させられ、そして／または分泌される細菌タンパク質が、可溶性Sp35ポリペプチドのN末端融合パートナーとして使用される。例えば、Smithら、Gene 67:31 (1988)；Hoppら、Biotechnology 6:1204 (1988)；La Vallieら、Biotechnology 11:187 (1993)を参照のこと。

【0169】

適切な融合パートナーのアミノ末端およびカルボキシ末端に可溶性Sp35部分を融合させることによって、二価または四価の形態の可溶性Sp35ポリペプチドを得ることができる。例えば、可溶性Sp35部分を、Ig部分のアミノ末端およびカルボキシ末端に融合させて、2つの可溶性Sp35部分を含む二価の単量体ポリペプチドを生じさせることができる。2つのこれらの単量体の二量体化の際には、Ig部分によって、可溶性Sp35タンパク質の四価の形態が得られる。このような多価形態は、標的に対する高い結合親和性を得るために使用することができる。可溶性Sp35の多価形態はまた、可溶性Sp35部分をタンデムに配置して、コンカタマーを形成させることによって得ることができる。これは、単独で使用することができ、また、IgもしくはHSAのような融合パートナーに融合させることもできる。

【0170】

結合させられたポリマー（ポリペプチド以外）

本発明のいくつかの実施形態には、可溶性 S p 3 5 ポリペプチド、S p 3 5 アプタマー、または S p 3 5 抗体が含まれ、ここでは、1つ以上のポリマーが、本発明の方法において使用される S p 3 5 ポリペプチド、アプタマー、または抗体に結合（共有結合）させられる。そのような結合体に適しているポリマーの例としては、ポリペプチド（上記で議論されている）、アプタマー、糖ポリペプチド、およびポリアルキレングリコール鎖が挙げられる。通常は、ポリマーは、以下の1つ以上：可溶性、安定性、または生体利用性を改善する目的のために、可溶性 S p 3 5 ポリペプチド、アプタマー、または S p 3 5 抗体に結合させられるが、必ずしもそうではない。

【0171】

10

S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に対する結合のために一般的に使用されるポリマーのクラスは、ポリアルキレングリコールである。ポリエチレングリコール（PEG）が最も頻繁に使用される。PEG部分（例えば、1、2、3、4、または5 PEGポリマー）を、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体の単独と比較して、血清半減期を長くするために、個々の S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に結合させることができる。PEG部分は非抗原性であり、本質的に生物学的に不活性である。本発明の実施において使用されるPEG部分は、分岐している場合も、また、分岐していない場合もある。

【0172】

20

S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に結合させられるPEG部分の数、ならびに個々のPEG鎖の分子量は様々であり得る。一般的には、ポリマーの分子量が大きければ大きいほど、ポリペプチドの結合させられるポリマー鎖は少ない。通常、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に結合させられるポリマーの質量の合計は、20 kDaから40 kDaである。したがって、1つのポリマー鎖が結合させられる場合には、鎖の分子量は、一般的には、20 kDa～40 kDaである。2つの鎖が結合させられる場合には、個々の鎖の分子量は、一般的には、10～20 kDaである。3つの鎖が結合させられる場合には、分子量は、一般的には、7～14 kDaである。

【0173】

30

ポリマー（例えば、PEG）は、ポリペプチド上の任意の適切な露出している反応基を介して、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体に連結させることができる。露出している反応基（単数または複数）は、例えば、内部リジン残基のN末端アミノ基またはイプシロンアミノ基、あるいはそれらの両方であり得る。活性化されたポリマーは、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体上の任意の遊離のアミノ基と反応することができ、それらに共有結合することができる。S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体の遊離のカルボキシル基、適切に活性化されたカルボニル基、ヒドロキシル基、グアニジル基、イミダゾール基、酸化された炭水化物部分、およびメルカプト基（利用できる場合）もまた、ポリマーの結合のための反応基として使用することができる。

【0174】

40

結合反応においては、ポリペプチドの濃度に応じて、ポリペプチド1モルあたり約1.0から約10モルの活性化させられたポリマーが、通常、使用される。通常は、選択される比は、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチドまたは抗体の所望される薬理学的活性を損なう可能性のある副反応（多くの場合には非特異的である）を最小につつ、反応を最大にする平衡を示す。好ましくは、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体の生物学的活性（例えば、本明細書中に記載されているかまたは当該分野で公知のアッセイのうちの任意のものに示されている）の少なくとも50%が保持され、そしてほぼ100%が保持されることが最も好ましい。

【0175】

50

ポリマーは、従来の化学反応を使用して、S p 3 5 アンタゴニストポリペプチド、アプ

タマー、または抗体に結合させることができる。例えば、ポリアルキレングリコール部分は、Sp 35 アントゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体のリジンイブシロンアミノ基にカップリングさせることができる。リジン側鎖への結合は、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 活性エステル (例えば、PEG スクシンイミジルスクシネート (SS-PEG) およびスクシンイミジルプロピオネート (SPA-PEG)) を用いて行うことができる。適切なポリアルキレングリコール部分としては、例えば、カルボキシメチル-NHS およびノルロイシン-NHS、SC が挙げられる。これらの試薬は市販によって入手することができる。さらなるアミン反応性 PEG リンカーをスクシンイミジル部分について置換することができる。これらとしては、例えば、イソチオシアネート、ニトロフェニルカルボネート (PNP)、エポキシド、ベンゾトリアゾール、炭酸塩、SC-PEG、トレシレート、アルデヒド、エポキシド、カルボニルイミダゾール、および PNP カルボネートが挙げられる。条件は、通常、反応の選択性および程度を最大にするように最適化される。そのような反応条件の最適化は当業者の能力の範囲内である。

10

【0176】

PEG 化は、任意の当該分野で公知の PEG 化反応によって行うことができる。例えば、Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992)、ならびに、欧州特許出願番号 EP 0 154 316 および同 EP 0 401 384 を参照のこと。PEG 化は、反応性ポリエチレングリコール分子 (または同様の反応性の水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を使用して行われる場合もある。

【0177】

アシル化による PEG 化には、一般的には、ポリエチレングリコールの活性エステル誘導体を反応させる工程が含まれる。任意の反応性 PEG 分子が PEG 化において使用され得る。N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) に対してエステル化された PEG が頻繁に使用される活性化 PEG エステルである。本明細書中で使用される場合は、「アシル化」には、治療用タンパク質と水溶性ポリマー (例えば、PEG) との間に以下のタイプの連結が含まれるが、これらに限定はされない: アミド、カルバメート、ウレタンなど。例えば、Bioconjugate Chem. 5:133-140, 1994 を参照のこと。反応のパラメーターは、一般的には、可溶性 Sp 35 ポリペプチド、アプタマー、または抗体を損傷する、あるいは不活化させる温度、溶媒、および pH 条件を避けるように選択される。

20

30

【0178】

一般的には、結合による連結はアミドであり、典型的には少なくとも 95% の得られる産物が、モノー、ジマー、またはトリマー PEG 化される。しかし PEG 化の程度が高いいくつかの種が、使用される特異的な反応条件に応じた量で形成され得る。状況に応じて、精製された PEG 化された種は、従来の精製方法 (例えば、透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性交換クロマトグラフィー、および電気泳動を含む) によって、混合物 (具体的には、未反応の種) から分離される。

【0179】

アルキル化による PEG 化には、通常、PEG の末端アルデヒド誘導体を、還元剤の存在下で、Sp 35 アントゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体と反応させる工程が含まれる。加えて、当業者は、Sp 35 アントゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体の N 末端アミノ基だけを実質的に PEG 化させる (すなわち、モノー PEG 化タンパク質) ために好ましいように反応条件を操作することができる。モノー PEG 化またはポリマー PEG 化のいずれの場合においても、PEG 基は通常は、 $-CH_2-NH-$ 基を介してタンパク質に結合させられる。特に $-CH_2-$ 基に関して、このタイプの結合は「アルキル」結合として知られている。

40

【0180】

N 末端タグ化モノー PEG 化産物を生じさせるための還元的アルキル化による誘導では、誘導に利用することができる様々なタイプの第 1 級アミノ基の様々な反応性 (N 末端に

50

対するリジン）が利用される。反応は、リジン残基のイプシロンアミノ基とタンパク質のN末端アミノ基のイプシロンアミノ基との間の pK_a の差を利用することができる pH で行われる。そのような選択的誘導によって、反応基（例えば、アルデヒド）を含む水溶性ポリマーのタンパク質に対する結合が制御される：ポリマーとの結合には、主にタンパク質のN末端が利用され、他の反応基（例えば、リジン側鎖のアミノ基）の有意な修飾は起らない。

【0181】

アシル化およびアルキル化のいずれのアプローチにおいても使用されるポリマー分子は、水溶性ポリマーの中から選択される。選択されるポリマーは、通常、1つの反応基（例えば、アシル化のための活性なエステルまたはアルキル化のためのアルデヒド）を有するように修飾され、その結果、重合の程度が本発明の方法において提供されるように制御され得る。例示的な反応性PEGアルデヒドはポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは水安定性、またはモノC1～C10アルコキシ、またはそのアリアルオキシ誘導体である（例えば、Harrisら、米国特許第5,252,714号を参照のこと）。ポリマーは分岐していても、また分岐していなくてもよい。アシル化反応のためには、選択されるポリマー（単数または複数）は、通常、1つの反応性のエステル基を有している。還元的アルキル化のためには、選択されるポリマー（単数または複数）は、通常、1つの反応性アルデヒド基を有している。一般的には、水溶性ポリマーは、自然界に存在しているグリコシル残基からは選択されないであろう。なぜなら、これらは通常、哺乳動物の組み換え発現システムによってより簡単に作成されるからである。

【0182】

PEG化された可溶性のSp35ポリペプチド、アプタマー、または抗体を調製するための方法には、一般的には、以下の工程が含まれる：（a）分子を1つ以上のPEG基に結合させる条件下で、Sp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体をポリエチレングリコール（例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、ならびに、（b）反応産物（単数または複数）を得る工程。一般的には、アシル化反応のための最適な反応条件は、公知のパラメーターと所望される結果に基づいて、個々のケースに応じて決定されるであろう。例えば、タンパク質に対するPEGの割合が大きければ大きいほど、一般的には、ポリPEG化産物のより大きな割合が導かれる。

【0183】

モノポリマー／可溶性Sp35ポリペプチド、Sp35アプタマー、またはSp35抗体の実質的に均質な集団を生じさせるための還元的アルキル化には、一般的には、以下の工程が含まれる：（a）可溶性Sp35タンパク質またはポリペプチドを、ポリペプチドまたは抗体のN末端アミノ基のpen-nit選択的修飾に適している pH での還元的アルキル化条件下で、反応性PEG分子と反応させる工程；ならびに、（b）反応産物（単数または複数）を得る工程。

【0184】

モノポリマー／可溶性Sp35ポリペプチド、Sp35アプタマー、またはSp35抗体の実質的に均質な集団については、還元的アルキル化反応条件は、ポリペプチドまたは抗体のN末端に対する水溶性ポリマー部分の選択的結合を可能にする条件である。そのような反応条件によっては、通常、リジンの側鎖アミノ基とN末端アミノ基との間での pK_a の差が提供される。本発明の目的については、 pH は通常、3～9の範囲であり、典型的には3～6である。

【0185】

可溶性Sp35ポリペプチド、アプタマー、または抗体には、タグ（例えば、その後にタンパク質分解によって解離させることができる部分）が含まれ得る。したがって、リジン部分はTraut's試薬（Pierce）（これは、リジンおよびN末端の両方と反応し、次いでHisタグを解離させるであろう）のような低分子量のリンカーと、修飾されたHisタグ部分が最初に反応させられることによって選択的に修飾され得る。したが

って、ポリペプチドには、チオール反応性の頭基（例えば、マレイミド基、ビニルスルホン基、ハロアセテート基、または遊離のもしくは保護されたSH）を含むPEGで選択的に修飾することができるSH基が含まれるであろう。

【0186】

Traut's 試薬は、PEGの結合のための特異的な部位を設置するであろう任意のリンカーで置き換えることができる。例えば、Traut's 試薬は、SPDP、SMP T、SATA、またはSATP（Pierce）で置き換えることができる。同様に、当業者は、タンパク質を、マレイミド（例えば、SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、またはGMBs）、ハロアセテート基（SBAP、SIA、SIAB）、またはビニルスルホン基を挿入するアミン反応性リンカーと反応させることができ、そして、得られる産物を遊離のSHを含むPEGと反応させることができる。

10

【0187】

いくつかの実施形態においては、ポリアルキレングリコール部分は、本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストポリペプチド、アプタマー、または抗体のシステイン基にカップリングさせられる。カップリングは、例えば、マレイミド基、ビニルスルホン基、ハロアセテート基、またはチオール基を使用して行うことができる。

【0188】

状況に応じて、可溶性Sp35ポリペプチド、アプタマー、または抗体が、不安定な結合によってポリエチレングリコール部分に結合させられる。不安定な結合は、例えば、生化学的加水分解、タンパク質分解、またはスルフヒドリル切断において切断することができる。例えば、結合は、インビボ（生理学的）条件下で切断することができる。

20

【0189】

反応は、反応基がN末端にあるαアミノ基上に存在する場合には、生化学的活性のある物質を不活性なポリマーと、一般的には、約pH5～8（例えば、pH5、6、7、または8）で反応させるために使用される任意の適切な方法で行われ得る。通常、このプロセスには、活性化させられたポリマーを調製する工程と、その後、タンパク質を活性化させられたポリマーと反応させて、処方に適している可溶性のタンパク質を生じさせる工程が含まれる。

【0190】

Sp35ポリヌクレオチドアンタゴニスト

本発明の方法のSp35アンタゴニストとしては、Sp35をコードするポリヌクレオチドに特異的に結合する核酸分子を含むSp35ポリヌクレオチドアンタゴニストが挙げられる。Sp35ポリヌクレオチドアンタゴニストはSp35の発現を妨げる（ノックダウンさせる）。Sp35ポリヌクレオチドアンタゴニストとしては、アンチセンス分子、リボザイム、siRNA、shRNA、RNAiが挙げられるが、これらに限定はされない。通常、このような結合分子は動物に別々に投与される（例えば、O'Connor, J. Neurochem. 56:560 (1991)を参照のこと）が、そのような結合分子はまた、宿主細胞によって取り込まれたポリヌクレオチドからインビボで発現させることも、そしてインビボで発現させることもできる。Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)もまた参照のこと。

30

40

【0191】

RNAiは、標的化されたmRNAの発現を妨害するRNAの発現を意味する。詳細には、RNAiは、siRNA（短い干渉RNA）を介した特異的mRNA（例えば、Sp35）の相互作用により、標的化された遺伝子をサイレンシングさせる。その後、dsRNA複合体は細胞による分解のために標的化される。さらなるRNAi分子としては、短いヘアピンRNA（shRNA）（短い干渉ヘアピンでもある）が挙げられる。shRNA分子には、ループによってつながれた標的遺伝子に由来するセンス配列とアンチセンス

50

配列が含まれる。shRNAは、核から細胞質に輸送され、これはmRNAと共に分解される。Pol IIIまたはU6プロモーターを使用して、RNAiのためのRNAを発現させることができる。本発明のいくつかの実施形態においては、shRNAは、レンチウイルスベクター（例えば、pLL3.7）から発現させられる。

【0192】

RNAiは、それらの「標的」mRNAに対して配列特異的の相同性を有している二本鎖のRNA(dsRNA)分子によって媒介される(Caplenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747, 2001)。Drosophilaの細胞を含まない溶解物の中での生化学的実験は、RNA依存性の遺伝子のサイレンシングの媒介因子が、21~25ヌクレオチドの「短い干渉」RNA二本鎖(siRNA)であることを示している。したがって、siRNA分子は、本発明の方法において有利に使用される。siRNAは、DICERとして知られているRNaseによるdsRNAのプロセッシングによって導かれる(Bernsteinら、Nature 409:363-366, 2001)。siRNA二本鎖産物は、RISC(RNAによって誘導されるサイレンシング複合体(RNA Induced Silencing Complex))と呼ばれる多タンパク質siRNA複合体の中に動員されるようである。いずれの特定の理論にも束縛されることは望ましくないが、RISCは標的mRNAに導かれ、ここでsiRNA二本鎖が配列特異的に相互作用して、触媒様式で切断を媒介すると考えられている(Bernsteinら、Nature 409:363-366, 2001; Boutlaら、Curr Biol 11:1776-1780, 2001)。

【0193】

RNAiは、遺伝子機能を分析し、そして哺乳動物細胞（これにはニューロンが含まれるが、限定はされない(Krichevskyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11926-11929, 2002)）の中の必須の遺伝子を同定するために使用されている(Elbashirら、Methods 26:199-213, 2002; Harborthら、J. Cell Sci 114:4557-4565, 2001)。RNAiはまた、治療様式（例えば、ウイルス（ポリオウイルス(Gitlinら、Nature 418:379-380, 2002)およびHIV(Capodiciら、J. Immunol 169:5196-5201, 2002)を含むがこれに限定はされない)の感染、複製、および／または増殖の阻害あるいはブロック、ならびに腫瘍遺伝子（例えば、bcr-abl遺伝子; Scherrら、Blood 101(4):1566-9, 2002)の発現の低下)についても評価される。RNAiは、哺乳動物(マウス)および両生類(Xenopus)の胚の中での(それぞれ、Calegariら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14236-14240, 2002; およびZhouら、Nucleic Acids Res 30:1664-1669, 2002)、ならびに、乳児マウスの中での(Lewisら、Nat Genet 32:107-108, 2002)遺伝子発現を調節するために、そして、成体のトランスジェニックマウスの中でのトランスジーンを発現を低下させるために(McCaffreyら、Nature 418:38-39, 2002)使用されている。細胞培養物の中およびインビボでのsiRNAの効力および特異性を決定するための方法は記載されている(例えば、Bertrandら、Biochem Biophys Res Commun 296:1000-1004, 2002; Lassusら、Sci STKE 2002(147):PL13, 2002; およびLeirdalら、Biochem Biophys Res Commun 295:744-748, 2002を参照のこと)。

【0194】

RNAi(siRNAを含むがこれに限定はされない)を媒介する分子は、インビトロで化学合成によって(Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002)、dsRNAの加水分解(Yangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9942-9947, 2002)、T7 RNAポリメラーゼでのイン

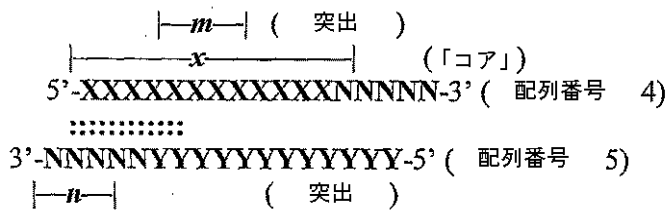
ビトロでの転写によって (Donzeetら、Nucleic Acids Res 30: e46, 2002; Yuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6047-6052, 2002)、および E. coli RNase III のようなヌクレアーゼを使用する二本鎖 RNA の加水分解によって (Yangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 9942-9947, 2002) 生産することができる。

【0195】

s i RNA 分子はまた、2つのオリゴヌクレオチドを互いにアニーリングさせることによって形成させることもでき、これは通常は以下の一般的構造を有しており、これには、二本鎖部分と一本鎖部分の両方が含まれる：

【0196】

【化10】



式中、N、X、およびYはヌクレオチドであり；XはYに対する水素結合であり；「：」は、2つの塩基の間での水素結合を示し；xは1から約100の間の値を有している自然数であり；そしてmおよびnは、0から約100の間の値を独立して有しているあらゆる整数である。いくつかの実施形態においては、N、X、およびYは、独立して、A、G、C、およびTまたはUである。自然界には存在しない塩基およびヌクレオチドが、特に、合成の s i RNA (すなわち、2つのオリゴヌクレオチドのアニーリング産物) の場合には存在し得る。二本鎖の中心部分は「コア」と呼ばれ、測定単位として塩基対 (bp) を有する；一本鎖部分は突出であり、測定単位としてヌクレオチド (nt) を有している。示される突出は3'突出であるが、5'突出を有している分子もまた本発明の範囲に含まれる。本発明の範囲にはまた、突出を有していない s i RNA 分子 (すなわち、m=0 および n=0)、およびコアの一方の側に突出を有しているが、他方には突出を有していない s i RNA 分子 (例えば、m=0、および n ≥ 1、またはその逆) もまた存在する。

【0197】

最初、RNA i 技術は、哺乳動物システムには容易には適用できないと思われていた。これは、哺乳動物においては、dsRNAがdsRNAによって活性化されるプロテインキナーゼ (PKR) を活性化して、アポトーシスのカスケードおよび細胞死を生じるからである (Derら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3279-3283, 1997)。加えて、dsRNAが哺乳動物細胞においてインターフェロンカスケードを活性化させることは以前から知られており、これは、細胞生理学の変化を導き得る (Colbyら、Annu. Rev. Microbiol. 25: 333, 1971; Kleinschmidtら、Annu. Rev. Biochem. 41: 517, 1972; Lampsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 782, 1976; Lomnicziら、J. Gen. Virol. 8: 55, 1970; および Youngerら、J. Bacteriol. 92: 862, 1966)。しかし、dsRNAによって媒介されるPKRおよびインターフェロンカスケードの活性化には、約30塩基対を超える長さのdsRNAが必要である。対照的に、30塩基対未満の長さのdsRNAは、哺乳動物細胞においてRNA iを生じることが明らかにされている (Caplenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747, 2001)。したがって、より長いdsRNA分子に付随する望ましくない非特異的作用は、より長いdsRNAを実質的に含まない短いRNAを調製することによって回避できると予想される。

10

20

30

40

50

【0198】

s iRNAに関する参考文献：Bernsteinら、Nature 409：363－366，2001；Boutlaら、Curr Biol 11：1776－1780，2001；Cullen, Nat Immunol. 3：597－599，2002；Caplenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：9742－9747，2001；Hamiltonら、Science 286：950－952，1999；Nagaseら、DNA Res. 6：63－70，1999；Napoliら、Plant Cell 2：279－289，1990；Nicholsonら、Mamm. Genome 13：67－73，2002；Parrishら、Mol Cell 6：1077－1087，2000；Romanoら、Mol Microbiol 6：3343－3353，1992；Tabaraら、Cell 9：123－132，1999；およびTuschl, Chembiochem. 2：239－245，2001。

10

【0199】

Paddisonら（Genes & Dev. 16：948－958，2002）では、RNAiを行うための手段として、ヘアピンに折り畳まれた小さいRNA分子が使用された。したがって、そのような短いヘアピンRNA（shRNA）分子は、本発明の方法においても有利に使用される。機能的なshRNAのステムおよびループの長さは様々である；ステムの長さは、約25から約30ntまでのどの長さでもあり得、ループの大きさは、4から約25ntの間の範囲であり得、サイレンシング活性に影響はない。いずれの特定の理論にも束縛されることは望ましくないが、これらのshRNAはDICER RNaseのdsRNA産物に似ており、いずれにしても、特異的遺伝子の発現を阻害することについて同じ能力を有していると考えられている。

20

【0200】

アンチセンス技術を使用して、アンチセンスDNAもしくはRNAによって、または三重ヘリックスの形成を通じて、遺伝子発現を制御することができる。アンチセンス技術は、Okano, J. Neurochem. 56：560（1991）；Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL（1988）において議論されている。三重ヘリックスの形成は、例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6：3073（1979）；Cooneyら、Science 241：456（1988）；およびDervanら、Science 251：1300（1991）において議論されている。この方法は、相補的DNAまたはRNAに対するポリヌクレオチドの結合に基づく。

30

【0201】

例えば、Sp35をコードするポリヌクレオチドの5'コード部分を使用して、約10から40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計することができる。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関係している遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それによって、標的タンパク質の転写および生産が妨げられる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子の標的ポリペプチドへの翻訳をブロックする。

40

【0202】

1つの実施形態においては、Sp35遺伝子に特異的なアンチセンス核酸は、外因性配列からの転写によって細胞内で生産される。例えば、ベクターまたはその一部が転写されて、アンチセンス核酸（RNA）が生じる。そのようなベクターはエピソームを保持し得るか、または、それが所望されるアンチセンスRNAを生じるように転写することができる限りは、染色体に組み込まれる。そのようなベクターは、当該分野で標準的である組み換えDNA技術方法によって構築することができる。ベクターは、脊椎動物細胞の中での複製および発現に使用される、プラスミド、ウイルス、または当該分野で公知の他のものであり得る。アンチセンス分子の発現は、本明細書中に別の場所に記載されるもののよう

50

な、脊椎動物（好ましくは、ヒト細胞）の中で作用するように当該分野で公知の任意のプロモーターによって行うことができる。

【0203】

アンチセンス分子の絶対的な相補性が好ましいが、これは必ずしも必要ではない。Sp35をコードするDNAの少なくとも一部に対する配列相補性は、RNAとハイブリダイズすることができるために十分な相補性を有している配列を意味する。形成された安定な二本鎖；または三本鎖がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、アンチセンス核酸の相補性の程度および長さの両方に依りて様々であろう。一般的には、ハイブリダイズする核酸が長ければ長いほど、より多くの塩基不適合が含まれ得るが、なおも安定な二本鎖（または場合によっては三本鎖である場合もある）が形成される。当業者は、ハイブリ

10

【0204】

メッセンジャーRNAの5'末端（例えば、5'非翻訳配列まで、およびAUG開始コドンを含む）に相補的であるオリゴヌクレオチドは、翻訳の阻害について最も効率よく作用するはずである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列が、mRNAの翻訳を阻害することに関して十分に有効であることが示されている。一般的には、Wagner, R., Nature 372:333-335 (1994)を参照のこと。したがって、5'もしくは3'非翻訳非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、Sp35の翻訳を阻害するためのアンチセンスアプローチにおいて使用することができる。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドには、AUG開始コドンの相補物が含まれるはずである。mRNAのコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳の阻害因子としてはあまり有効ではないが、本発明にしたがって使用することができる。アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチドの長さであるべきであり、好ましくは、6から約50ヌクレオチドの長さの範囲のオリゴヌクレオチドである。特異的な態様においては、オリゴヌクレオチドは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも50ヌクレオチドである。

20

【0205】

なお別の実施形態においては、本明細書中に開示される方法において使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは α -アノマーオリゴヌクレオチドである。 α -アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、ここでは、通常の状態とは対照的に、鎖は互いに平行に並ぶ（Gautierら、Nucleic Acids Res. 15:6625-6641 (1987)）。オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド（Inoueら、Nucleic Acids Res. 15:6131-6148 (1987)）またはキメラRNA-DNAアナログ（Inoueら、FEBS Lett. 215:327-330 (1987)）である。

30

【0206】

本明細書中に開示される方法において使用されるポリヌクレオチド組成物にはさらに、触媒RNAまたはリボザイムが含まれる（例えば、1990年10月4日に公開されたPCT国際公開番号WO90/11364；Sarverら、Science 247:1222-1225 (1990)を参照のこと）。ハンマーヘッドリボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、隣接する領域によって示された位置でmRNAを切断し、これは標的mRNAと相補的な塩基対を形成する。標的mRNAが以下の2塩基の配列：5'-UG-3'を有することだけが必要とされる。ハンマーヘッドリボザイムの構築および生産は当該分野で周知であり、そしてHaseloff and Gerlach, Nature 334:585-591 (1988)にさらに完全に記載されている。好ましくは、リボザイムは、切断認識部位が標的mRNAの5'末端付近に配置されるように操作され、すなわち、効率を高め、そして非機能的mRNA転写物の細胞内蓄積を最少にするために、操作される。

40

50

【0207】

アンチセンスアプローチと同様に、本明細書中に開示される方法において使用されるリボザイムは、修飾されたオリゴヌクレオチド（例えば、安定性、標的化などの改善のため）から構成され得、そして、インビボでSp35を発現する細胞に送達され得る。リボザイムをコードするDNA構築物は、アンチセンスをコードするDNAの導入についての上記と同じ様式で細胞に導入され得る。好ましい送達方法には、強い構成的プロモーター（例えば、pol IIIまたはpol Iプロモーターの制御下にリボザイムを「コードする」DNA構築物の使用が含まれ、その結果、トランスフェクトされた細胞は、内因性のSp35メッセージを破壊し、そして翻訳を阻害するために十分な量のリボザイムを生じるであろう。アンチセンス分子とは異なり、リボザイムは触媒性であるので、低い細胞濃度しか効率には必要ない。

10

【0208】

本明細書中に開示される方法において使用されるポリヌクレオチド（以下に記載されるアダプターを含む）は、DNAまたはRNAまたはキメラ混合物、あるいはそれらの誘導体または修飾されたバージョン、一本鎖または二本鎖であり得る。ポリヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションなどを改善するために修飾することができる。ポリヌクレオチドには、（インビボでの宿主細胞レセプターの標的化のための）ペプチド、または細胞膜を通過する輸送を促進する物質（例えば、Lettingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:6553-6556 (1989); Lemaîtreら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652 (1987); 1998年12月15日に公開されたPCT公開番号WO88/09810を参照のこと）もしくは脳血液関門を通過する輸送を促進する物質（例えば、1988年4月25日に公開されたPCT公開番号WO89/10134を参照のこと）、ハイブリダイゼーションによって誘発される切断試薬（例えば、Krollら、BioTechniques 6:958-976 (1988)を参照のこと）、あるいは挿入剤（例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549 (1988)を参照のこと）のような他の付加基（append group）が含まれる場合がある。この目的のためには、ポリヌクレオチドが別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションによって誘発される架橋剤、輸送物質、ハイブリダイゼーションによって誘発される切断物質など）に結合させられる場合がある。

20

30

【0209】

本明細書中に開示される方法において使用されるポリヌクレオチド（アダプターを含む）には、以下からなる群より選択される少なくとも1つの修飾された塩基部分が含まれ得る：5フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルエオシン、イノシン、N-6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N-6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ウェイブトキシン、シュードウラシル、エオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3（3-アミノ-3-N2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、および2, 6-ジアミノプリンが含まれるが、これらに限定はされない。

40

【0210】

50

本明細書中に開示される方法において使用されるポリヌクレオチド（アプタマーを含む）にはまた、アラビノース、２－フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースが含まれる（が、これらに限定はされない）群より選択される少なくとも１つの糖部分が含まれる場合がある。

【０２１１】

なお別の態様においては、本明細書中に開示される方法において使用されるポリヌクレオチド（アプタマーを含む）には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホルアミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール、あるいはそれらのアナログが含まれる（が、これらに限定はされない）群より選択される少なくとも１つの修飾されたリン酸骨格が含まれる。

10

【０２１２】

本発明の方法において使用されるポリヌクレオチド（アプタマーを含む）は、例えば、自動DNA合成装置（例えば、Biosearch, Applied Biosystemsなどから市販されているもの）の使用によって、当該分野で公知の標準的な方法によって合成することができる。例としては、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinら、Nucleic Acids Res. 16:3209 (1988)の方法によって合成することができ、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御された多孔性のガラスポリマー支持体の使用によって調製することができる（Sarinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:7448-7451 (1988)など）。

20

【０２１３】

アプタマー

別の実施形態においては、本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストはアプタマーである。アプタマーは、特有の配列を有しており、所望される標的（例えば、ポリペプチド）に特異的に結合する特性を有しており、そして、所定の標的の特異的リガンドであるヌクレオチドあるいはポリペプチドであり得る。本発明のヌクレオチドアプタマーとしては、Sp35に結合する二本鎖DNAおよび一本鎖RNA分子が挙げられる。

【０２１４】

核酸アプタマーは、当該分野で公知の方法を使用して、例えば、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) プロセスによって選択される。SELEXは、例えば、米国特許第5,475,096号、同第5,580,737号、同第5,567,588号、同第5,707,796号、同第5,763,177号、同第6,011,577号、および同第6,699,843号（それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されているように、標的分子に対して極めて高い特異性の結合を有する核酸分子のインビトロでの進化のための方法である。アプタマーを同定するための別のスクリーニング方法は、単量体であるか多量体（他の核酸分子およびポリペプチドを含む）かどうかにはかわらず、米国特許第5,270,163号（これもまた、引用により本明細書中に組み入れられる）に記載されている。SELEXプロセスは、様々な二次元および三次元構造を形成するために、ならびに実質的に任意の化合物とともにリガンドとして作用する（特異的結合対を形成する）ためにヌクレオチド単量体の中で利用することができる化学的多様性 (versatility) についての核酸の能力に基づく。任意の大きさまたは組成の分子が標的となり得る。

30

40

【０２１５】

SELEX方法には、所望される結合親和性および選択性を得るための、候補のオリゴヌクレオチドの混合物からの選択と、同じ一般的選択スキームを使用する、結合、分配、および増幅の段階的反復が含まれる。核酸の混合物（好ましくは、ランダム化された配列のセグメントを含む）から出発する場合には、SELEX方法には、混合物を結合に好ましい条件下での標的と接触させる工程；標的分子に特異的に結合したそのような核酸が

50

ら結合していない核酸を分配する工程；核酸－標的複合体を解離させる工程；リガンドを多く含む核酸の混合物を得るために、核酸標的複合体から解離させられた核酸を増幅する工程。結合、分配、解離、および増幅の工程は、標的分子に対する高度に特異的な高親和性核酸リガンドを得ることが所望される場合には、複数回のサイクルによって繰り返される。

【0216】

ヌクレオチドアプタマーは、例えば、細胞内シグナル伝達および輸送経路を分析するための診断ツールまたは特異的阻害因子として、使用され得る（James (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 1:540-546）。ヌクレオチドアプタマーの高い親和性および特異性は、それらを、薬物の発見のための良好な候補とする。例えば、毒素リシンに対するアプタマーアンタゴニストが単離されており、これらはナノモル範囲のIC50値を有している（Hesselberth JRら、(2000) J Biol Chem 275:4937-4942）。ヌクレオチドアプタマーもまた、細胞の感染性を低下させるために、感染性疾患、悪性腫瘍、およびウイルス表面タンパク質に対して使用される場合がある。

【0217】

本発明の方法において使用されるヌクレオチドアプタマーは、他のポリヌクレオチドについて本明細書中に記載されるように（例えば、骨格もしくは塩基を修飾することによって、またはペプチドに結合させることによって）修飾することができる。

【0218】

Sp35のタンパク質構造を使用する、SELEXプロセスを使用したSp35に作用するアプタマーのスクリーニングにより、Sp35によって媒介されるプロセス（例えば、Sp35によって媒介される軸索再生）を阻害するアプタマーを同定することができるであろう。

【0219】

本発明の方法において使用されるポリペプチドアプタマーは、Sp35に結合し、それによってSp35の作用をブロックするそれらの能力について選択されるランダムペプチドである。ポリペプチドアプタマーには、タンパク質の足場の両方の末端に対して結合させられた短い可変性ペプチドドメインが含まれ得る。この二重構造による拘束は、抗体のものに匹敵するレベル（ナノモルレベル）にまでペプチドアプタマーの結合親和性を大きく増大させる。例えば、Hoppe-Seyler Fら、(2000) J Mol Med 78(8):426-430を参照のこと。短い可変ペプチドの長さは、通常、約10から20アミノ酸であり、足場は、良好な溶解度とcompactity特性を有している任意のタンパク質であり得る。足場タンパク質の1つの限定ではない例は細菌タンパク質チオレドキシン-A（Thioredoxin-A）である。例えば、Cohen BAら、(1998) PNAS 95(24):14272-14277を参照のこと。加えて、本発明の方法において使用されるポリペプチドアプタマーの限定ではない例は、Ligand Regulated Peptide Aptamer (LiRPA)である。LiRPA足場は、3つのタンパク質ドメイン：FK506結合タンパク質（FKBP）、FRBP-ラバマイシン結合ドメイン（FRB）、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）から構成され得る。例えば、Binkowski BFら、(2005) Chem & Biol 12(7):847-855（引用により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと。

【0220】

ポリペプチドアプタマーは、タンパク質機能の優性阻害因子としての役割を担うペプチドまたは低分子ポリペプチドである。ペプチドアプタマーは標的タンパク質に特異的に結合して、それらの機能的な能力をブロックする（Kolonićら、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:14,266-14,271）。標的タンパク質に対して高い親和性および特異性で結合するペプチドアプタマーは、当該分野で公知の様々な技術によって単離することができる。ペプチドアプタマーは、酵母ツーハイブリッ

ドスクリーニングによって (Xu, C. W. ら、(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12, 473-12, 478)、またはリボザイムディスプレイによって (Hanes ら、(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4937-4942) ランダムペプチドライブラリーから単離することができる。これらは、ファージライブラリーから (Hoogenboom, H. R. ら、(1998) Immunotechnology 4:1-20) または化学的に作成されたペプチドライブラリーから単離することもできる。ペプチドアプタマーがそれによって合成される難しい手段によっては、それらの使用はポリヌクレオチドアプタマーよりも複雑となるが、これらは化学的送達に限定されない。

【0221】

本発明の方法において使用されるペプチドアプタマーは、本明細書中で別の場所に他のポリペプチドについて記載されているように修飾することができる (例えば、ポリマーに結合させられるか、またはタンパク質に融合させられる)。

【0222】

ベクター

Sp35 アントゴニストをコードする核酸を含むベクターもまた、本発明の方法において使用されるアントゴニストを提供するように使用され得る。そのような核酸がそれに対して動作可能であるように連結させられるベクターおよび発現制御配列の選択は、所望される機能的特性 (例えば、タンパク質の発現および形質転換される宿主細胞) に応じて様々である。

【0223】

動作可能であるように連結されたコード配列の発現の調節に有用な発現制御エレメントは当該分野で公知である。例として、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、分泌シグナル、および他の調節エレメントが挙げられるが、これらに限定はされない。誘導性プロモーターが使用される場合は、これは、例えば、宿主細胞培地の中での栄養状態の変化、温度の変化によって制御することができる。

【0224】

ベクターとしては、原核生物のレプリコン、すなわち、細菌宿主細胞の中で染色体外での組み換え DNA 分子の自律複製と維持を指示する能力を有している DNA 配列を挙げることができる。そのようなレプリコンは当該分野で周知である。加えて、原核生物のレプリコンを含むベクターにはまた、その発現により薬剤耐性のような検出可能なマーカーが付与される遺伝子が含まれる場合もある。細菌の薬剤耐性遺伝子の例としては、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対して耐性を付与する遺伝子が挙げられる。

【0225】

原核生物のレプリコンを含むベクターには、細菌宿主細胞の中でコード遺伝子配列の発現を指示するための原核生物あるいはバクテリオファージプロモーターもまた含まれ得る。細菌宿主と適合するプロモーター配列は、通常、発現させられる DNA セグメントの挿入のための通常の制限部位を含むプラスミドベクターの中に提供される。そのようなプラスミドベクターの例は、pUC8、pUC9、pBR322、および pBR329 (BioRad)、pPL および pKK223 (Pharmacia) である。任意の適切な原核生物宿主を、本発明の方法において使用されるタンパク質をコードする組み換え体 DNA 分子を発現させるために使用することができる。

【0226】

本発明の目的のためには、多数の発現ベクターシステムを使用することができる。例えば、1つのクラスのベクターでは、動物ウイルス (例えば、ウシバビローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス (RSV、MMTV、もしくは MOMLV)、または SV40 ウイルス) に由来する DNA エレメントが利用される。他には、内部リボソーム結合部位を有している多シストロン性システムの使用が含まれる。加えて、それらの染色体の中に DNA が組み込まれた細胞を、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする 1つ以上のマーカーを導

入することによって選択することができる。マーカーは、栄養素要求性宿主 (autotrophic host) に原栄養性 (prototrophy)、殺生物剤 (biocide) 耐性 (例えば、抗生物質)、あるいは、銅などの重金属に対する耐性を提供することもできる。選択マーカー遺伝子は発現させられるDNA配列に直接結合させられるか、または同時トランスフェクション (cotransfection) により同じ細胞内へ導入されるかのいずれかであり得る。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (neo) 遺伝子は、選択マーカー遺伝子の一例である (Southernら、J. Mol. Anal. Genet. 1: 327-341 (1982))。さらに別のエレメントがまた、mRNAの最適な合成に必要である場合がある。これらのエレメントには、シグナル配列またはスプライシングシグナル、さらには転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルが含まれ得る。

10

【0227】

1つの実施形態においては、Biogen IDEC, Inc., の工業所有権のある発現ベクター (NEOSPLA (米国特許第6, 159, 730号) と呼ばれている) が使用される場合がある。このベクターには、サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー、マウスβグロビン主要プロモーター、SV40複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエキソン1およびエキソン2、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、ならびにリーダー配列が含まれる。このベクターは、CHO細胞の中へのトランスフェクション、それに続き、G-418を含む培地の中での選択、およびメトトレキセート増幅されると非常に高い発現レベルを生じることが明らかにされている。もちろん、真核生物細胞の中で発現を誘発することができる任意の発現ベクターが本発明において使用され得る。適切なベクターの例としては、プラスミドpCDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRC/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、およびpZeoSV2 (Invitrogen, San Diego, CAから入手することができる)、ならびにプラスミドpCI (Promega, Madison, WIから入手することができる) が挙げられるが、これらに限定はされない。さらなる真核生物細胞発現ベクターは当該分野で公知であり、市販されている。通常、そのようなベクターには、所望されるDNAセグメントの挿入のための便利な制限部位が含まれる。例示的なベクターとしては、pSVLおよびpKSV-10 (Pharmacia)、pBPV-1、およびpml2d (International Biotechnologies)、pTDT1 (ATCC31255)、レトロウイルス発現ベクターpMIGおよびpLL3.7、アデノウイルスシャトルベクターpDC315、ならびにAVVベクターが挙げられる。他の例示的なベクターシステムは、米国特許第6, 413, 777号に開示されている。

20

30

【0228】

一般的には、形質転換された多数の宿主細胞を、アンタゴニストを適切な高いレベルで発現するものについてスクリーニングすることは、例えば、ロボットシステムによって行うことができる日常的に行われている実験である。

【0229】

哺乳動物の宿主細胞での発現のために頻繁に使用される調節配列としては、哺乳動物細胞の中でのタンパク質の高レベルでの発現を指示するウイルスエレメント (例えば、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス (CMV) (例えば、CMVプロモーター/エンハンサー)、シミアンウイルス40 (SV40) (例えば、SV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター (Adm1P)) に由来するプロモーターおよびエンハンサー、ポリオーマおよび強力な哺乳動物プロモーター (例えば、自然界に存在している免疫グロブリンおよびアクチンプロモーター) が挙げられる。ウイルス調節エレメント、およびその配列のさらなる記載については、例えば、Stinski, 米国特許第5, 168, 062号; Bell, 米国特許第4, 510, 245号; およびSchaffner, 米国特許第4, 968, 615号を

40

50

参照のこと。

【0230】

組み換え発現ベクターは、宿主細胞の中でのベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）と選択マーカー遺伝子を有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターがその中に導入されている宿主細胞の選択を容易にする（例えば、Axel，米国特許第4，399，216号；同第4，634，665号、および同第5，179，017号を参照のこと）。例えば、通常は、選択マーカー遺伝子は薬剤（例えば、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキセート）に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に付与する。頻繁に使用される選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（メトトレキセート選択／増幅と共にdhfr-宿主細胞において使用される）およびneo遺伝子（G418選択のため）が挙げられる。

10

【0231】

Sp35アンタゴニストをコードするベクターは、適切な宿主細胞の形質転換のために使用することができる。形質転換は任意の適切な方法によって行うことができる。外来DNAの哺乳動物細胞への導入のための方法は当該分野で周知であり、これには、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソームの中へのポリヌクレオチド（単数または複数）のカプセル化によるトランスフェクション、および核へのDNAの直接のマイクロインジェクションが含まれる。加えて、核酸分子は、ウイルスベクターによって哺乳動物細胞の中に導入することができる。哺乳動物細胞はまた、哺乳動物細胞の中に導入される外来DNAを含む組換え体ウイルスによって導入することもできる。

20

【0232】

宿主細胞の形質転換は、使用されるベクターおよび宿主細胞に適する従来法によって行うことができる。原核生物宿主細胞の形質転換には、エレクトロポレーションおよび塩処理方法を使用することができる（Cohenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-14（1972））。脊椎動物細胞の形質転換には、エレクトロポレーション、陽イオン性脂質、または塩処理方法を使用することができる。例えば、Grahamら、Virology 52:456-467（1973）；Wiglerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-76（1979）を参照のこと。

30

【0233】

タンパク質の発現に使用される宿主細胞株は、哺乳動物起源のものが最も好ましい；当業者は、その中で発現させられる所望される遺伝子産物に最も適している特定の宿主細胞株を特異的に決定する能力を有していると思われる。例示的な宿主細胞株としては、NSO、SP2細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞ガン細胞（例えば、Hep G2）、A549細胞DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣株、DHFRマイナス）、HELA（ヒト子宮頸ガン）、CVI（サル腎臓株）COS（SV40 T抗原でのCVIの誘導体）、R1610（チャイニーズハムスター線維芽細胞）、BALBC/3T3（マウス線維芽細胞）、HAK（ハムスター腎臓株）、SP2/O（マウス骨髄腫）、P3x63-Ag3.653（マウス骨髄腫）、BFA-1c1BPT（ウシ内皮細胞）、RAJI（ヒトリンパ球）および293（ヒト腎臓）が挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞株は、通常、商業的サービスによってAmerican Tissue Culture Collectionから、または公開されている文献から入手することができる。

40

【0234】

生産細胞株からのポリペプチドの発現は、公知の技術を使用して高めることができる。例えば、グルタミンシンターゼ（GS）システムは、特定の条件下での発現を高めるために一般的に使用されている。例えば、欧州特許第0 216 846号、同第0 256 055号、および同第0 323 997号、ならびに欧州特許出願番号893039

50

64. 4を参照のこと。

【0235】

宿主細胞

本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストの発現のための宿主細胞は、原核生物である場合も、また、真核生物細胞である場合もある。例示的な真核生物宿主細胞としては、酵母および哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（ATCC登録番号CCL61）、NIH Swissマウス胚細胞NIH-3T3（ATCC登録番号CRL1658）、およびベビーハムスター腎臓細胞（BHK））が挙げられるが、これらに限定はされない。他の有用な真核生物宿主細胞としては、昆虫細胞および植物細胞が挙げられる。例示的な原核生物宿主細胞はE. coliおよびStreptomycesである。

10

【0236】

遺伝子治療

Sp35アンタゴニストは、哺乳動物（例えば、ヒト患者）において、DAニューロンの変性、死、もしくは欠失、または再生が関係している疾患、障害、あるいは損傷の処置のための遺伝子治療アプローチを使用して、インビボで生産することができる。これには、適切な発現制御配列に動作可能であるように連結された適切なSp35アンタゴニストをコードする核酸の投与が含まれる。一般的には、これらの配列はウイルスベクターに組み込まれる。このような遺伝子治療に適しているウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、アルファウイルスb稀有ター、エンテロウイルスベクター、ペスチウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、および単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられる。ウイルスベクターは、複製欠損ウイルスベクターであり得る。それらのE1遺伝子またはE3遺伝子に欠失を有しているアデノウイルスベクターが、通常は使用される。アデノウイルスベクターが使用される場合には、ベクターは、通常は、選択マーカー遺伝子を有していない。

20

【0237】

薬学的組成物

本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストは、ヒトを含む哺乳動物への投与のために、薬学的組成物に処方される。本発明の方法において使用される薬学的組成物には、薬学的に許容される担体（例えば、イオン交換体、酸化アルミニウム、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和脂肪酸の部分的なグリセリド混合物、水、塩、または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂が含まれる。

30

40

【0238】

本発明の方法において使用される組成物は、任意の適切な方法（例えば、非経口で、脳室内に、経口で、吸入噴霧によって、局所的に、直腸に、鼻腔内に、舌下に、腔に、または埋め込み型のレザーバーによって）投与することができる。用語「非経口」には、本明細書中で使用される場合には、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病変内、および頭蓋内への注射ならびに注入技術が含まれる。先に記載されたように、本発明の方法において使用されるSp35アンタゴニストは、乏突起膠細胞の生存、再生、および分化、ならびにニューロンの髄鞘形成を促進するように、神経系において作用する。したがって、本発明の方法においては、Sp35アンタゴニストは、それらが脳血液関門を通過するそのような方法で投与される。この通過によっては、Sp35

50

アンタゴニスト分子自体に固有の生理化学的特性によって、薬学的処方物中の他の成分によって、または血液脳関門を破るための針、カニューレ、もしくは外科手術用機器のような機械的デバイスの使用によって生じ得る。Sp35アンタゴニストが血液脳関門を本質的には通過できない分子（例えば、通過を容易にする部分への融合体）である場合には、適切な投与経路は、例えば、髄腔内または頭蓋内であり、例えば、MSの慢性的病変への直接の投与である。Sp35アンタゴニストが、血液脳関門を本質的に通過できる分子である場合には、投与経路は、以下に記載されるさまざまな経路の1つ以上によって行われ得る。

【0239】

本発明の方法において使用される組成物の滅菌の注射可能な形態は、水性または油性の懸濁液であり得る。これらの懸濁液は、適切な分散剤もしくは湿潤剤と懸濁剤を使用して、当該分野で公知の技術にしたがって処方され得る。滅菌の注射可能な調製物はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤あるいは溶媒中の、滅菌の注射可能な溶液または懸濁液（例えば、1, 3-ブタンジオール中の懸濁液）でもあり得る。中でも、使用することができる許容される媒体および溶媒は、水、Ringerの溶液、および等張性の塩化ナトリウム溶液である。加えて、滅菌の固定油が、溶媒または懸濁媒体として通常使用される。この目的のためには、任意の混合された固定油（合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含む）が使用され得る。脂肪酸（例えば、オレイン酸およびそのグリセリド誘導体）が、オリーブ油またはヒマシ油のような天然の薬学的に許容される油と同様に、注射可能な調製物において、特にそれらのポリオキシエチル化バージョンが有用である。これらの油溶液または懸濁液にはまた、長鎖アルコールの希釈剤または分散剤（例えば、カルボキシメチルセルロースまたは類似の分散剤）も含まれ得、これらは、エマルジョンおよび懸濁液を含む薬学的に許容される投与形態の処方物として一般的に使用される。他の一般的に使用される界面活性剤（例えば、Tweens, Spans, および他の乳化剤または生体利用性エンハンサー（薬学的に許容される固体、液体、もしくは他の投与形態の製造において一般的に使用される））もまた処方の目的のために使用することができる。

【0240】

非経口処方物は、1回のボーラス用量、注入、または負荷ボーラス用量であり得、その後維持用量が続く。これらの組成物は、例えば、特異的な固定された間隔、または様々な間隔（例えば、1日に1回）で投与される場合も、あるいは、「必要に応じ」た基準で投与される場合もある。

【0241】

本発明の方法において使用される特定の薬学的組成物は、例えば、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤、または溶液剤を含む許容される投与量形態で経口投与することができる。特定の薬学的組成物にはまた、鼻腔エアゾールまたは吸入によっても投与され得る。そのような組成物は、ベンジルアルコール、または他の適切な保存剤、生体利用性を高めるための吸収促進剤、および／または他の従来の可溶化剤もしくは分散剤を使用して、生理食塩水中の溶液として調製され得る。

【0242】

単回の投与量形態を生じさせるために担体物質と組み合わせられ得るSp35アンタゴニストの量は、処置される宿主、使用されるアンタゴニストのタイプ、および特定の投与形式に応じて様々であろう。組成物は、単回用量として、および多用量として、または確立された時間にわたる注入として投与され得る。投与レジメもまた、最適な所望される応答（例えば、治療応答または予防応答）を提供するように調整され得る。

【0243】

本発明の方法では、Sp35アンタゴニストの「治療有効量」または「予防有効量」が使用される。そのような治療有効量または予防有効量は、複数の要因（例えば、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重）にしたがって様々であり得る。治療有効量または予防有効量はまた、治療上有効な効果があらゆる毒性または有害な作用を上回る量である。

【0244】

10

20

30

40

50

任意の特定の患者についての特異的投与量および処置レジュメは、様々な要因に応じて変化するであろう。要因には、使用される特定の S p 3 5 アンタゴニスト、患者の年齢、体重、全体的な健康状態、性別、および食事療法、ならびに投与のタイミング、排出速度、薬物の組み合わせ、および処置される特定の疾患の重篤度が含まれる。医学的な介護人によるそのような要因の判断は、当業者の能力の範囲内である。量はまた、処置される個々の患者、投与の経路、処方物のタイプ、使用される化合物の特徴、疾患の重篤度、および所望される効果に応じても様々であろう。使用される量は、当該分野で周知の薬理学的および薬物動態的原理によって決定することができる。

【0245】

本発明の方法においては、S p 3 5 アンタゴニストは、一般的には、神経系に直接、脳室内に、またはくも膜下に、（例えば、M S の慢性病変内に）投与される。本発明の方法にしたがう投与のための組成物は、1日あたり体重1 k g あたり0.001～10 m g の S p 3 5 アンタゴニストポリペプチドの投与量が投与されるように処方することができる。本発明のいくつかの実施形態においては、投与量は、0.01～1.0 m g / k g 体重/日である。いくつかの実施形態においては、投与量は、0.001～0.5 m g / k g 体重/日である。

【0246】

S p 3 5 アンタゴニスト抗体での処置については、投与量は、例えば、約0.0001から100 m g / k g まで、そしてより通常は、宿主の体重について、0.01～5 m g / k g （例えば、0.02 m g / k g 、0.25 m g / k g 、0.5 m g / k g 、0.75 m g / k g 、1 m g / k g 、2 m g / k g など）の範囲であり得る。例えば、投与量は、1 m g / k g 体重、または10 m g / k g 体重、または1～10 m g / k g の範囲内、好ましくは、少なくとも1 m g / k g であり得る。上記範囲の中間の用量もまた、本発明の範囲内に入ると意図される。被験体には、そのような用量が毎日、1日置きに、1週間おきに、または経験的な分析によって決定された任意の他のスケジュールにしたがって投与され得る。例示的な処置には、長期間の間（例えば、少なくとも6ヶ月間）にわたる複数回の投与量での投与が必然的に伴う。さらなる例示的な処置レジュメには、2週間に1回、または1ヶ月に1回、または3から6ヶ月に1回の投与が必然的に伴う。例示的な投与スケジュールには、毎日連続して1～10 m g / k g もしくは15 m g / k g 、1日おきに30 m g / k g 、または1週間おきに60 m g / k g が含まれる。いくつかの方法においては、異なる結合特異性を有している2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、この場合は、投与される個々の抗体の投与量は、示される範囲に入る。

【0247】

特定の実施形態においては、被験体は、S p 3 5 アンタゴニストポリヌクレオチドをコードする核酸分子で処置することができる。核酸についての用量は、患者1人あたり約10 n g から1 g 、100 n g から100 m g 、1 μ g から10 m g 、または30～300 μ g のDNAの範囲である。感染性ウイルスベクターの用量は、1用量あたり10～100、またはそれ以上のビリオンまでで変化する。

【0248】

補助活性化合物もまた、本発明の方法において使用される組成物の中に組み入れることができる。例えば、可溶性S p 3 5 ポリペプチドまたは融合タンパク質は、1つ以上のさらなる治療薬と一緒に処方することができ、そして/または同時に投与することができる。

【0249】

本発明には、選択された標的組織へのS p 3 5 アンタゴニストの任意の適切な送達方法が含まれる。これには、水性溶液のボーラス注射、または徐放システムの埋め込みが含まれる。徐放用のインプラントの使用によっては、注射の反復の必要性が低減する。

【0250】

本発明の方法において使用されるS p 3 5 アンタゴニストは、脳に直接注入することができる。化合物の直接の脳への注入のための様々なインプラントが公知であり、神経学的

10

20

30

40

50

障害に罹患しているヒト患者への治療用化合物の送達に有効である。これらには、ポンプ、定位固定で埋め込まれた、一次的な間質カテーテル (temporary interstitial catheter)、永久的な頭蓋内カテーテルインプラント、および外科手術によって埋め込まれた生体分解性インプラントを使用する脳への長期にわたる注入が含まれる。例えば、Gillら、前出；Scharfenら、「High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas」, Int J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24 (4) : 583-591 (1992) ; Gasparら、「Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas」, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 43 (5) : 977-982 (1999) ; 第66章、577-580頁、Bellezzaら、「Stereotactic Interstitial Brachytherapy」, in Gildenbergrら、Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery, McGraw-Hill (1998) ; およびBremら、「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) を参照のこと。

【0251】

組成物にはまた、化合物に適している送達システムまたは支持システムとしての役割を担う、生体適合性の担体物質の中に分散させられたSp35アンタゴニストも含まれ得る。徐放担体の適切な例としては、成型された製品 (例えば、坐剤またはカプセル剤) の形態の半透過性ポリマーマトリックスが含まれる。埋め込むことができるマトリックス、またはマイクロカプセル徐放マトリックスとしては、ポリラクチド (米国特許第3, 773, 319号 ; EP 58, 481)、L-グルタミン酸と γ -エチルーL-グルタミン酸のコポリマー (Sidmanら、Biopolymers 22 : 547-56 (1985)) ; ポリ (2-ヒドロキシエチルーメタクリレート)、エチレン酢酸ビニル (Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15 : 167-277 (1981) ; Langer, Chem. Tech. 12 : 98-105 (1982)) またはポリD-(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP 133, 988) が挙げられる。

【0252】

本発明のいくつかの実施形態においては、Sp35アンタゴニストが、脳の適切な領域への直接の注入により患者に投与される。例えば、Gillら、「Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease」, Nature Med. 9 : 589-95 (2003) を参照のこと。別の技術を利用することができ、これは、本発明のSp35アンタゴニストを投与するために適応させることができる。例えば、カテーテルまたはインプラントの定位配置は、Riechert-Munding ユニットおよびZD (Zamorano-Dujovny) 多目的局在化ユニット (multipurpose localizing unit) を使用して行うことができる。2mmの切片厚みを用いた、120mlのomnipaque、350mgのヨウ素/mlを注入する造影CT (contrast enhanced computerized tomography (CT)) スキャンによっては三次元多平面治療計画 (STP, Fischer, Freiburg, Germany) が可能である。この機器によって、磁気共鳴画像法の実験に基づく計画が可能であり、明確な標的の立体構造についてのCTおよびMRI 標的情報を比較併合することができる。

【0253】

GE CTスキャナー (General Electric Company, Mil 50

wauke e, WI)と共に使用するために改良されたLeksel l 定位固定システム (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA)、ならびに、Brown-Roberts-Well s (BRW) 定位固定システム (Radionics, Burlington, MA) を、この目的のために使用することができる。したがって、埋め込みの朝、BRW定位固定フレームの輪状のベースリングが患者の頭蓋骨に取り付けられ得る。連続するCTの断像を、ベースプレートに固定されたグラファイトロッド (graphite rod) のローカライザーフレームを用いて、領域全体 (標的組織) について3mmの間隔で得ることができる。コンピューター処理設計プログラム (computerized treatment planning program) をVAX 11/780コンピューター (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) 上で、グラファイトロッド画像のCT座標を使用して行うことができ、CT空間とBRW空間がマップされる。

【0254】

本明細書中に記載されるような障害の処置方法は、通常、ヒトで使用される前に、所望される治療活性または予防活性について、インビトロで、その後、許容される動物モデルにおいてインビボで試験される。適切な動物モデル (トランスジェニック動物を含む) は当業者に公知であろう。例えば、Sp35アンタゴニストの区別および生存性の効果を明らかにするためのインビトロでのアッセイは本明細書中に記載されている。Sp35アンタゴニストの軸索の髄鞘形成に対する効果は、実施例に記載されているようにインビトロで試験することができる。最後に、インビボでの試験は、Sp35アンタゴニストを発現するトランスジェニックマウスを作成すること、またはSp35アンタゴニストを本明細書中に記載されるようなモデルにおいてマウスもしくはラットに投与することによって行うことができる。

【0255】

本発明の実施では、他の場所で明記されていない限りは、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組み換えDNA、および免疫学の従来技術が使用されるであろう。これらは当業者の能力の範囲内である。そのような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3巻セット)、J. Sambrook, D. W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); Genes VIII, B. Lewin, Prentice Hall (2003); PCR Primer, C. W. Diffenbach and G. S. Dveksler, CSHL Press (2003); DNA Cloning, D. N. Glover編, 第I巻および第II巻 (1985); Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology), P. Herdewijn (編), Humana Press (2004); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第4版, R. I. Freshney, Wiley-Liss (2000); Oligonucleotides Synthesis, M. J. Gait (編), (1984); Mullisら、米国特許第4, 683, 195号; Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins編, (1984); Nucleic Acid Hybridization, M. L. M. Anderson, Springer (1999); Animal Cell Culture and Technology, 第2版, M. Butler, BIOS Scientific Publishers (2004); Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (Practical Approach Series), J. Woodward, Irl Pr (1992); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins (編) (1984); Culture Of Animal C

ells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); A Practical Guide To Molecular Cloning, 第3版, B. Perbal, John Wiley & Sons Inc. (1988); the treatise, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., N. Y.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos編, Cold Spring Harbor Laboratory (1987); Methods In Enzymology, 第154巻および第155巻, Wuら、(編); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer and Walker, (編), Academic Press London (1987); Handbook Of Experimental Immunology, 第I~IV巻, D. M. Weir and C. C. Blackwell (編), (1986); Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques (4巻セット), 第1版, I. Lefkovits, Academic Press (1997); Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2002); ならびに、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)を参照のこと。

【0256】

抗体の操作の一般的原理は、Antibody Engineering: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), B. L. Lo (編), Humana Press (2003); Antibody engineering, R. Kontermann and S. Dubel (編), Springer Verlag (2001); Antibody Engineering, 第2版, C. A. K. Borrebaeck (編), Oxford Univ. Press (1995)に示されている。タンパク質の操作の一般的原理は、Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D. ら (編), IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995)に示されている。抗体と抗体-ハプテン結合の一般的原理は、Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Nisonoff, A., Molecular Immunology, 第2版, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); および Steward, M. W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984)に示されている。加えて、当該分野で公知であり、詳細に記載されていない免疫学の標準的方法は、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stitesら (編), Immunochemical Protocols (Methods in Molecular Biology), 第2版, J. D. Pound (編), Humana Press (1998), Weir's Handbook of Experimental Immunology, 第5版, D. M. Weir (編), Blackwell Publishers (1996), Methods in Cellular Immunology, 第2版, R. Fernandez-Botran, CRC Press (2001); Basic and Clinical Immunology, 第8版, Appleton & Lan

ge, Norwalk, CT (1994)、ならびに、Mishell and Shiggi (編), Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., New York (1980) に記載されているものに一般的にしたがう。

【0257】

免疫学の一般的原理を説明している標準的な参考文献としては、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J.; Kuby Immunology, 第4版, R. A. Goldsbyら、H. Freeman & Co. (2000); Basic and Clinical Immunology, M. Peakmanら、Churchill Livingstone (1997); Immunology, 第6版, I. Roittら、Mosby, London (2001); Cellular and Molecular Immunology, 第5版; A. K. Abbas, A. H. Lichtman, Elsevier-Health Sciences Division (2005); Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques (4巻セット), 第1版, I. Lefkovits, Academic Press (1997) Immunology, 第5版, R. A. Goldsbyら、W. H. Freeman (2002); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第3版, J. W. Goding, Academic Press (1996); Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R. ら (編), Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., 「Monoclonal Antibody Technology」, Burden, R., ら、(編), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第13巻, Elsevier, Amsterdam (1984) が挙げられる。

【0258】

上記で引用された参考文献の全て、さらには、本明細書中で引用される全ての参考文献は、それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる。

【実施例】

【0259】

(実施例1)

Sp35 (LINGO-1) はラットの中脳のドーパミン作動性 (DA) ニューロンの中で発現される。

【0260】

Sp35の発現を、生後7日 (P7期) のラットの脳、成体ラットの脳、およびラットの一次胚培養物 (E15) において、免疫組織化学および／またはインサイチュハイブリダイゼーションによって評価した。凍結させたラットの脳の切片を、P7、および上記の成体発生段階のラットから調製した。脳の切片を、以下のプロトコールを使用し、そしてMiら、Neurosci. 7: 221-228 (2004) に記載されているように、インサイチュハイブリダイゼーションのために調製した。動物を、CO₂で安楽死させた。すぐに脳を取り出し、48時間の間、10%の中性の緩衝化ホルマリンで固定した。脳を、冷凍保護 (cryoprotection) のためにPBS中の30%のスクロースの中で平衡化させ、連続的に切片化した。インサイチュハイブリダイゼーションを、腹側の (ventral) 中脳全体のそれぞれ6番目を含む、ランダムに選択した切片のシリーズについて行った。

【0261】

脳切片を、ジゴキシゲニンで標識したSp35アンチセンスおよびセンスRNAでプローブした。切片を、TSAと蛍光、および抗ジゴキシゲニン結合抗体キット(Perkin Elmer)を使用して、製造業者の説明書にしたがって染色した。その後、切片を、DAPI(Sigma)、および抗チロシンヒドロキシラーゼ(TH)抗体(Chemicon)で染色した。P7期では、Sp35 mRNAは、中脳のチロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性DAニューロンの中で中程度で発現されていた。以前に報告されているように、また、小脳の中でのSp35 mRNAの強い発現が存在し、そして線条体の中では弱い発現が存在していた。Mira, Nat. Neurosci. 7:221-228(2004)を参照のこと。しかし、成体の中脳の中においては、TH陽性DAニューロンの中ではSp35 mRNAはほとんど発現されていなかった。

10

【0262】

一次胚腹側中脳(VM)培養物を、Lin, L.ら、Mol Cell Neurosci. 28:547-555(2005)に記載されているように、E15 Sprague Dawleyラット(Charles River, MA)から単離した。簡単に説明すると、脳組織を、熱で不活化させたウマ血清(10%)、グルコース(6.0mg/ml)、ペニシリン(10,000U/ml)、ストレプトマイシン(10mg/ml; Sigma)、およびグルタミン(2mM; Gibco)を含む冷却したダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, NY))の中で、研磨したパスツールピペットを用いて機械的に解離させた。2×10⁵個の細胞を培地の中に再懸濁し、24ウェルトレイ(Falcon)のそれぞれのウェルの15mg/mlのポリ-L-オルニチン(Sigma)および1mg/mlのフィブロネクチン(Sigma)で予めコーティングしたカバースライドの上に播種した。

20

【0263】

蛍光免疫組織化学分析を、Lin, L.ら、Mol Cell Neurosci. 28:547-555(2005)に記載されているように、脳切片およびVM一次培養物について行った。簡単に説明すると、およそ2×10⁵個の細胞を含むカバースライドを、0.1Mのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中の10%の正常なヤギ血清(Jackson Laboratories, Maine)および0.1%のTriton X-100で、室温で30分間処理した。その後、カバースライドを、4℃で一晩、一次抗体とともに、その後、別の蛍光と結合させた適切な二次抗体とともに、室温で1時間インキュベートした。DAニューロンのマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)に対する抗体(Chemicon)を、1:300希釈で使用した。Alexa 488(Molecular Probes)と結合させた二次抗体を、1:500の濃度で使用した。一次抗体または過剰な抗原とともに予めインキュベートした抗体の脱落を対照として使用した。蛍光シグナルを、共焦点画像化システム(LSM510 META, Carl Zeiss, NY)によって試験した。

30

【0264】

一次VM培養物においては、Sp35がDAニューロンの中で観察された。ここでは、Sp35とTHの染色は一緒に局在化していた。Sp35特異的抗体を過剰のSp35タンパク質とともに予めインキュベートした場合には、染色は検出されなかった。Sp35はまた、ヒトの中脳黒質および齧歯類の中脳のいずれにおいても、非THニューロンの中で発現されていた。

40

【0265】

これらの実験は、Sp35が中脳胚(E15)およびP7 DAニューロンの中で発現されており、これは、成体VMの中よりも少ないことを示している。免疫組織化学実験もまた、Sp35タンパク質が神経突起の中だけではなく、中脳の一次培養物においてDAニューロンの血漿膜の中でも発現されていることを示している。

【0266】

50

(実施例2)

Sp35 (LINGO-1) アンタゴニストはインビトロでDA神経突起の成長および生存を促進する。

【0267】

Sp35の細胞質ドメインには、標準的な (canonical) EGFR様チロシンリン酸化部位が含まれており、したがって、シグナル伝達において直接的または間接的に関与している可能性がある。細胞質ドメインの重要性を評価するために、細胞質ドメインが欠失しているSp35の短縮型 (DN-Sp35) を作成した (配列番号2のアミノ酸34~581または34~548)。細胞質ドメインが欠失している短縮型のSp35は、Nogo受容体1 (NgR1) およびp75NTRおよび/または別の受容体 (例えば、TAJ/TROY) と複合体を形成し、それによってシグナル伝達を妨げることによって、優性陰性 (DN) 分子として機能することが示されている。Shaoら、Neuron 45:353-359 (2005) およびParkら、Neuron 45:345-351 (2005) を参照のこと。

【0268】

全長 (FL) - Sp35 (配列番号2のアミノ酸24~614) または優性陰性 (DN) - Sp35を発現するレンチウイルスを、以下の方法を使用し、そしてMira、Neurosci. 7:221-228 (2004) に記載されているように作成した。全長および短縮型 (DN-Sp35) のヒトSp35のcDNA配列を、HAタグ化融合タンパク質を発現させるためにpSECTAG-A (Invitrogen) にサブクロニングし、その後、HRST-IRESeGFPベクターに連結した。レンチウイルス構築物を、Wangら、Nature 417:941-944 (2002) に記載されているように、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) およびHIV-1パッケージングベクターデルタ8.9と共に293T細胞に同時トランスフェクトして、組み換え体レンチウイルスを作成した。

【0269】

ラットの一次VMニューロンの培養物を、FL-Sp35、優性DN-Sp35を生産するレンチウイルス、またはベクター対照で形質導入した。それぞれのウイルスのグループを、1または5の感染多重度 (MOI) でVMニューロン培養物に添加した。細胞を24時間培養し、PB (pH7.4) 中の4%パラホルムアルデヒドで、室温で30分間固定した。神経突起の成長を、これらの感染させたニューロンの中で試験した。神経突起の伸張または細胞数の試験のために、各ウェルからのいくつかの領域を、一体型のAxioskop 2顕微鏡 (Carl Zeiss, NY) およびStereoInvestigator image capture機器およびソフトウェア (MicroBrightField, VT) を使用して捕捉した。

【0270】

神経突起の成長は、DN-Sp35に感染させたTH陽性ニューロンの中で促進された。対照的に、TH陽性ニューロンは、FL-Sp35で形質導入した場合には、神経突起の長さの差は示さなかった。これらの観察は、DN-Sp35が、内因性のSp35の機能を破壊し、それによってDN神経突起の成長を促進することを示している。図1を参照のこと。

【0271】

Sp35-Fcタンパク質 (Fcドメインに融合させられた配列番号2のアミノ酸1~532) を使用して、これが、DA神経突起の成長を促進することによってDAニューロンの中でFL-Sp35機能のアンタゴニストとして機能するかどうかを決定した。対照-FcおよびSp35-Fcを、Mira、Nat. Neurosci. 7:221-228 (2004) に記載されているように調製した。簡単に説明すると、ヒトSp35のアミノ酸1~532を、ヒトIgG1のヒンジおよびFc領域に融合させた。Sp35-FcポリペプチドをCHO細胞の中で発現させ、そしてプロテインAセファロース (Protein A Sepharose) (Pharmacia) 上で精製した。精製したタ

ンパク質 (>95%の純度)は、還元条件下でのSDS-PAGEゲル上のゲル電気泳動によって測定し、既知のタンパク質標準物と比較すると、90kDaの分子量を有していた。このタンパク質は、非還元条件下でSDS-PAGEゲル上で泳動させ、機知の標準物と比較した場合には、180kDaの分子量を有していた。

【0272】

精製したSp35-Fcポリペプチドを、VMニューロンの培養物に対して外部から提供した。神経突起の成長は、過剰のSp35-Fcの添加によって促進された。図1を参照のこと。外部から供給された対照IgGポリペプチドは、DA神経突起の成長を促進しなかった。加えて、DN-Sp35を発現するレンチウイルスで処理した培養物のTH神経突起の長さを試験した。DN-Sp35およびSp35-Fcで処理した培養物は、対照レンチウイルスでの処理と比較して ($p < 0.05$ 、一元ANOVA)、および対照Fcと比較して ($p < 0.003$)、有意に長かった。

【0273】

DN-Sp35の効果を、また、1-メチルフェニルピリジニウムイオン(MPP+)で処理した一次VM培養物に対しても試験した。MPP+は、通常は、一次DA神経細胞の細胞死を誘導し、そしてこれは、PDの実験用の十分に確立されているモデルシステムである。Gillieら、Ann NY Acad Sci 1018:533-540 (2004)を参照のこと。VMニューロンを、上記のようにレンチウイルスに感染させた。培養した細胞を、10μMのMPP+に対して、4日目に48時間暴露し、その後、固定した(6日目)。DN-Sp35は、ラットの中脳の一次培養物の中で10μMのMPP+に暴露させられたTH陽性ニューロンを保護した。図2を参照のこと。MPP+に暴露した場合のTHニューロンの数は、FL-Sp35を形質導入したニューロンおよび対照を形質導入したニューロンと比較して ($p < 0.05$ 、一元ANOVA)、DN-Sp35を形質導入した細胞において有意に高かった。加えて、米国仮特許出願番号60/697,336(その全体が引用により本明細書中に組み入れられる)に記載されているように、MPP+に暴露させた一次VM培養物は、Sp35-FcおよびSp35アンタゴニスト抗体1A7への暴露によって、細胞死から保護された。Sp35-Fcおよび1A7抗体で処理した細胞は、対照Fcまたは対照であるIgGで処理した培養物と比較して(1A7については $p < 0.01$ 、Sp35-Fcについては $p < 0.05$ 、一元ANOVA)、TH陽性ニューロンに対して、MPP+の毒性に対する有意な防御効果を示した。図3を参照のこと。これらの結果は、内因性Sp35の障害が、MPP+神経毒素への暴露に対してDAニューロンを保護することを示している。

【0274】

(実施例3)

Sp35活性を遮断することによってAktリン酸化が誘導される

Aktは、PI3キナーゼ生存経路の下流のエフェクターである。Williams and Doherty Mol. Cell. Neurosci. 13:270-280 (1999)。ラットの一次VM培養物中での正常なAktリン酸化レベルを、ウェスタンブロット分析によって評価した。ラットの一次VMニューロンに、実施例2に記載したように、FL-Sp35またはDN-Sp35(HAタグ化)を発現するレンチウイルスを形質導入した。形質導入したラット一次VMニューロを48時間後に回収し、そして500μlの溶解緩衝液(50mMのHEPES(pH7.5);150mMのNaCl;1.5mMのMgCl₂;1mMのEDTA;1%のTriton X-100、および10%のグリセロール)の中に、4℃で30分間溶解させた。上清を、4~20%のSDS-PAGEゲル(Bio-Rad, CA)上で電気泳動させ、免疫ブロット膜に移動させ、そして抗HA親和性マトリックス(Roche, Switzerland)または抗ホスホAkt抗体(Cell Signaling, MA)、またはAkt全体に対する抗体(Cell Signaling, MA)のいずれかでプローブした。

【0275】

Aktリン酸化は、FL-Sp35を発現するレンチウイルスまたは対照ベクターでの

形質導入と比較して、DN-Sp35を発現するレンチウイルスでのラットの一次VMニューロンの形質導入の後に有意に増大した。図4を参照のこと。これらの結果は、DN-Sp35が、PI3/Aktシグナル伝達経路の関与によって、一部、TH陽性ニューロンの生存性に影響を与えることを示唆している。

【0276】

(実施例4)

Sp35ノックアウトマウスの作成

Sp35ノックアウトマウスを、Schiemannら、(Science 293: 2111-2114 (2001))に記載されているように、Sp35の1つのエキソコード配列全体を標的化するGFP/Neo (緑色蛍光タンパク質/ネオマイシン)の置き換えを用いて作成した。マウスのゲノム129/SvJ DNAを、λゲノムライブラリー(Stratagene #946313)から単離した。14.6 kbのEcoRV断片をpBSK+にサブクローニングし、次いで、ATGで始まるeGFP-Q40受容体遺伝子を挿入するために、細菌の中での相同組み換えによって標的化した。最終的な構築物は、Sp35の1つのエキソコード配列の全体である1~1,841ヌクレオチドを欠失していた。この構築物を使用して、D3(129/Sv)胚性幹細胞の中のSp35遺伝子座を標的化した。正確に標的化された細胞を、EcoRIで消化した胚性幹細胞のDNAのサザンブロッティングによって同定し、そしてこれらを、キメラマウスを作成するためにC57Bl/6胚盤胞に注入した。キメラをC57Bl/6マウスに交配して、ヘテロ接合型の創始(founder)マウスを作成した。遺伝子型を、末端DNAの3プライマーPCRによって決定した。正方向プライマー: 5'-CTATCCAAGCACTGCCCTGCTC-3' (配列番号6)と、2つの逆方向プライマー: 5'-GAGTTCTAGCTCCTCCAAGGTGTG-3' (配列番号7)および5'-GATGCCCTTTCAGCTCGATGCG-3' (配列番号8)によっては、それぞれ35サイクルの反応(94℃で20秒間、65℃で30秒間、72℃で30秒間)において、275 bpの野生型と356 bpの変異体対立遺伝子産物が生じた。Mi, S. ら、Nat. Neurosci. 7: 221-228 (2004)を参照のこと。Sp35遺伝子の欠失の確認を、サザンブロット、RT-PCR、およびノーザンブロット分析によって行った。突出したバンドが、野生型マウスにおいてはノーザンブロット、RT-PCRにおいて検出されたが、複数のバンドの完全な消滅がノックアウトマウスにおいて見られた。ヘテロ接合型のサザンブロットは、野生型と修飾されたSp35の対立遺伝子の両方を示した。Sp35ノックアウトマウスは正常であるように見え、行動、運動、または繁殖力に明白な身体的異常または変化はなかった。ヘテロ接合型F1の子孫の同腹子は様々な大きさであった。Sp35ノックアウトマウスの作成は、Miら、Nat. Neuroscience 7: 221-228 (2004) (引用により本明細書中に組み入れられる)に記載されている。

【0277】

(実施例5)

Sp35ノックアウトマウスの中でのDAニューロンの生存および再生についてのインビトロ6-OHDAアッセイ

Sp35ノックアウトマウスを、Sp35を有していないマウスが、ニューロンの生存性を増大させ、そして損傷後の脳のドーパミン作動性経路の機能回復を改善するかどうかを決定するために試験した。13匹のSp35ノックアウトマウスと13匹の野生型同腹子である対照マウスを、ケタミンとキシラジンを使用して(それぞれ、100 mg/kg および10 mg/kg、ip)麻酔し、6-ヒドロキシドーパミンHCl(6-OHDA)の片側性の線条体内注射を投与するために定位固定フレームの中に配置した。手術部位をベタジンとアルコールで拭い、そして0.5 cmの中線矢状切開を行って、ブレグマを露出させた。小さい頭蓋穿孔(burr hole)を、注射部位の上に頭蓋骨に作成し、0.02%のアスコルビン酸/生理食塩水(Sigma)の中に溶解させた10 μgの6-OHDAを、頭蓋骨の表面に対して腹側DV-2.5 mm、中線に対して側面に、L

ateral 1.5 mmの、AP+0.4の座標で左線条体に注射した。6-OHDAを、26ゲージの10 μ lのHamilton注射器を使用して、0.5 μ l/分の速度で2分間かけて注入した。

【0278】

6-OHDAの注入後、カニュレを、さらに2分間かけて適切な場所に配置し、その後、ゆっくりと引き抜いた。この切開は1つのオートクリップ (auto clip) を使用して閉じ、マウスを、麻酔から回復するまで暖かいパッドの上に置いた。マウスの線条体への6-OHDAの注射によって、DA軸索及びニューロンの進行性の消失が生じ、これは、PDの研究のための十分に確立されているモデルシステムである (Brundinら、Brain Res. 366:346-349 (1986) を参照のこと)。

10

【0279】

回転試験を、6-OHDAの注入後、1週間、2週間、3週間、および4週間で行った。回転試験のために、マウスには、0.4 mg/kgの用量で、0.02%のアスコルビン酸中のアポモルヒネを皮下に注射した。病変部位に対して反対側への回転を、30分の間カウントした。

【0280】

「回転行動」は、黒質線条体ドーパミン経路に対して片側性の損傷を有している動物に、ドーパミンアゴニスト (例えば、アポモルヒネ) またはドーパミン放出剤 (例えば、アムフェタミン) を投与した場合に見られる行動である。動物は線条体ドーパミン受容体によるより大きな刺激を経験した脳の側から離れる方向に円を描きながら繰り返し回転する。回転応答の大きさ (すなわち、行われた回転数) は、黒質線条体ドーパミン経路に対する損傷の程度に正比例する。例えば、Fuxeら、Pharmacol. Ther. 2:41-47 (1976) を参照のこと。

20

【0281】

回転行動の測定 of the least 24 時間後に、マウスを、CO₂での窒息によって安楽死させた。すぐに脳を取り出し、48時間の間、10%の中性の緩衝化ホルマリンで固定した。脳を、冷凍保護のためにPBS中の30%のスクロースの中で平衡化させ、連続的に切片化した。日常的に行われているABC免疫組織化学試験を、腹側の中脳全体のそれぞれ6番目を含む、ランダムに選択した切片のシリーズについて行った。切片を、抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) (1:300、Pel Freez, AK) とともに4℃で一晩インキュベートし、その後、それぞれ、ビオチニル化ヤギ抗ヒツジ二次抗体 (1:300、Vector Laboratories, CA) とともに、そしてストレプトアビジン-ビオチン複合体とともに、室温で1時間インキュベーションした。染色を、ニッケル増強 (nickel enhancement) (Vector Laboratories, CA) を用いた3,3'-ジアミノベンジジン溶液とともにインキュベーションすることによって視覚化させた。一次抗体の脱落を対照とした。立体学を、一体型のAxioskop 2顕微鏡 (Carl Zeiss, NY) およびStereo Investigator画像取り込み機器およびソフトウェア (MicroBrightField, VT) を使用して、染色した切片上で行った。TH陽性細胞を、光学的フラクションプローブ (optical fraction probe) を使用してカウントした。おおよその細胞の総数を、MicroBrightfieldソフトウェアを使用して得た。立体学的分析は、グループについての処置について知らない研究者に行わせた。

30

40

【0282】

運動の対称性は、試験した全ての時点で、野生型同腹子である対照と比較して、ノックアウトマウスにおいては有意に低かった ($p < 0.001$ 、二元ANOVA)。図5を参照のこと。6-OHDAの注射の32日後の死後分析により、病変である中脳の中のTHニューロンの数の顕著な減少が明らかになった。立体学的分析により、中脳の中のTHニューロンの数は、野生型マウスとノックアウトマウスにおいて相違ないことが明らかになった ($p > 0.05$ 、対応のないt検定)。図6Aを参照のこと。遺伝子型によって生じた差を補正するために、病変である中脳の中のTHニューロンの数を、それぞれの動物の

50

病変ではない側の数と割合として表した。統計分析により、野生型マウスよりもノックアウトマウスにおいて高いTHニューロンの割合が明らかになり ($p = 0.002$ 、対応のない t 検定)、これは、ノックアウトマウスが、野生型同腹子である対照と比較して6-OHDAモデルにおいて防御されていることを示している。図6Bを参照のこと。

【0283】

THニューロンの数を、腹側被蓋領域 (VTA、A10領域) と黒質緻密部 (substantia nigra compacta) (SNc、A9領域) 領域において、Blum, M., Nat. Neurosci. 1:374-377 (1998) に記載されている、偏りのない光学フラクショネーター (unbiased optical fractionator) 法を使用して、立体学的にカウントした。KOマウスとWTマウスの間に、THニューロンの数の有意な差はなかった ($F_{1, 48} = 1.321$, $p > 0.05$)。しかし、TH細胞数には、病変側と、病変ではない側との間では有意な差があった ($F_{1, 48} = 27.53$, $p < 0.0001$)。そして、病変側と病変ではない側との間でのTH細胞数の差は、遺伝子型によって有意な影響を受けていた (遺伝子型と脳の側との間での相互作用) ($F_{1, 48} = 4.34$, $p > 0.05$)。図8を参照のこと。病変側のニューロンの数を、それぞれの動物の病変ではない側に対して校正して、遺伝子型によるあらゆる影響を防いだ。統計分析は、WTマウス ($56\% \pm 5.5\%$) よりもKOマウスにおいてより多いTHニューロンの数 (平均 $\pm$ s. e. m. : $79\% \pm 4.5\%$) を示した (対応のない Student's t 検定, $t(24) = 3.34$; $p = 0.003$)。これは、これらのマウスにおけるノックアウトの神経防御効果を明らかにしている。

【0284】

6-OHDAによって誘導した実験用のパーキンソニズムモデルにした野生型マウスにおいては、Sp35タンパク質は、注射の3日後に、線条体の中で増加していた。図9を参照のこと。Sp35は、野生型マウスにおいては線条体6-OHDAの投与の3日後に、反対側 (対照) と比較して病変側 (6-OHDA) の中でアップレギュレートされていた。3匹のマウスを、それぞれの時点 (0日目、3日目、7日目、および15日目) でそれぞれ試験した (対応のない Student's t 検定, $p < 0.05$)。

【0285】

(実施例6)

Sp35ノックアウトマウスの中でのDAニューロンの生存および再生についてのインビトロMPTPアッセイ

Sp35を有していないマウスが高いニューロン生存性と、損傷後の脳におけるドーパミン作動性経路の機能回復の改善を示すことをさらに確認するために、マウスを、PDのMPTPモデルにおいても評価した。13匹のWTマウスと14匹のSp35ノックアウトマウスに、 25 mg/kg のMPTPヒドロクロライド (Sigma) を4回、それぞれの注射の間に2時間あけて、腹腔内に注射した。例えば、Battaglia G. ら、Neuropharmacology 45:155-166 (2003) を参照のこと。全ての動物を、注射の7日後に屠殺した。マウスをCO₂での窒息によって安楽死させた。すぐに脳を取り出し、48時間の間、10%の中性の緩衝化ホルマリンで固定した。脳を、冷凍保護のためにPBS中の30%のスクロースの中で平衡化させ、連続的に切片化した。立体学を、一体型のAxioskop 2顕微鏡 (Carl Zeiss, NY) およびStereo Investigator画像取り込み機器およびソフトウェア (MicroBrightField, VT) を使用して、染色した切片上で行った。TH陽性細胞を、光学的フラクショナルプローブ (optical fraction probe) を使用してカウントした。おおよその細胞の総数を、MicroBrightFieldソフトウェアを使用して得た。立体学的分析は、グループについての処置について知らない研究者に行わせた。MPTP処置の7日後の死後の立体学的分析により、WTマウスと比較して、KOマウスにおいて中脳の中のTHニューロンの数がより多いことが明らかになった。図6Cを参照のこと。

【0286】

別の実験においては、10匹のKOマウスと10匹のWTである同腹子を、PDのMPTPモデルにおいて評価した。生理食塩水を注射したWTマウス ($n=7$) およびKOマウス ($n=8$) を対照とした。MPTPでの処置の7日後の死後の立体学的分析により、黒質緻密部 (SNc、A9領域) 中のTH細胞の数は、対照WTマウスおよびKOマウスとの間で差がないことが明らかとなった。しかし、THニューロンの数は、媒体で処置したWTおよびKOマウスと比較すると、MPTPで処置したWTマウスのSNcの中では減少していた (Kruskal-Wallis 試験、 $p<0.001$ 、それぞれ)。図10を参照のこと。THニューロンの数は、対照マウスとMPTPで処置したKOマウスとの間では統計的な差はなかった。

10

【0287】

対照で処置したKOマウスおよびWTマウス、ならびにMPTPで処置したKOマウスおよびWTマウスの線条体ドーパミンレベルもまた試験した。切開した線条体を超音波処理し、そして冷却した0.1Mのパーコール酸 (PCA、約100 μ l/mg組織) の中で遠心分離した。上清を、Yang, L. ら、Exp. Neurol. 191:86-93 (2005) に記載されているように、ドーパミンの測定のためにとった。簡単に説明すると、15 μ lの上清を、0.1MのLiH₂PO₄、0.85mMの1-オクタンスルホン酸、および10% (v/v) のメタノールを含む移動相を用いて、80 $\times$ 4.6mmのC18カラム (ESA, Inc., Chelmsford, MA) から等張で溶出させ、2チャンネルCoulchem II電気化学的検出器 (ESA, Inc., Chelmsford, MA) によって検出した。ドーパミンの濃度は、タンパク質1ミリグラムあたりのナノグラム数として表した。組織ホモジネートのタンパク質濃度を、Bradford法 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) およびPerkin Elmer Bio Assay Reader (Norwalk, CT) を使用して決定した。線条体ドーパミンレベルは、対照WTマウス (Kruskal-Wallis 試験、 $p<0.01$) および対照KOマウス ($p<0.05$) と比較して、MPTPで処置したWTマウスにおいては低かった。図11を参照のこと。ドーパミンレベルは、対照マウスとMPTPで処置したKOマウスとの間では統計学的には差はなく、これは、6-OHDAの実例においても観察された神経保護と一致している。

20

【0288】

Sp35の遺伝的消耗によってMPTP毒素の取り込みおよび代謝が変化するかどうかを決定するために、Sp35 KOおよびWT (それぞれのグループについて $n=6$) の中での線条体MPP+レベルを、MPTP処置の90分後に測定した。MPP+を測定するために、線条体組織を超音波処理し、0.1MのPCAの中で遠心分離し、そして上清のアリコート、META 250 $\times$ 4.6 C18カラム (ESA, Inc., Chelmsford, MA) 上に注入した。試料を、3mMの硫酸水素テトラブチルアンモニウム、0.25mMの1-ヘプタンスルホン酸、および10%のイソプロパノールを含む20mMのホウ酸-ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH7.75) で等張で溶出させた。MPP+を、295nmでの励起、および375nmでの放射に設定した蛍光検出器で検出した。KOおよびWTの中でのMPP+レベルは、MPTP処置後には、有意には異ならなかった (対応のないStudent's検定; $t(10)=1.69$; $p>0.05$ 、平均 $\pm$ s.e.m.、WTについては 39.68 ± 3.92 、そしてKOについては 62.06 ± 12.67)。ウェスタンブロット分析もまた、ドーパミン輸送 (DAT) レベルは、Sp35 KOマウスにおいては変化しなかったことを示していた。図14を参照のこと。

30

40

【0289】

加えて、ウェスタンブロットを、MPTPに暴露したKOマウスおよびWTマウス、ならびに対照に由来するVM組織の溶解物について行った。マウスの組織を500 μ lの溶解緩衝液 [Complete Protease Inhibitors (Roche, Basal, Switzerland) とPhosphatase Inhibitor

50

s (Sigma) を含む 50 mM の HEPES、pH 7.5、150 mM の NaCl、1.5 mM の MgCl₂、1 mM の EDTA、1% の Triton x-100、10% のグリセロール」の中に溶解させた。上清を、4~20% または 10% のいずれかの SDS-PAGE ゲル (Bio-Rad, Hercules, CA) 上で電気泳動させ、抗ホスホAkt、抗Akt、および抗EGFR抗体 (Cell Signaling, Beverly, MA) で免疫ブロットした。MPTP に暴露したKOマウスの腹側の (ventral) 中脳の中でのリン酸化Aktの増加もまた、MPTP に暴露したWT同腹子である対照のものと比較して見られた。図6D~6Fを参照のこと。

【0290】

加えて、Sp35-Fcタンパク質 (6.5 μg/μl、全部で2 μl) (これは、優性陰性分子として機能するSp35の短縮型である) を、C57BL/6マウス (n=9) の線条体の中に片側だけに注射した。これらのマウスに、外科手術の6日後にMPTPを投与し、その後、さらに7日間生存させた。これらの動物におけるTHニューロン数の死後分析は、反対側のSNcよりも同じ側のSNcにおいてより多い数を示した (対応のないStudent's t検定; $t(16) = 2.114$; $p < 0.05$)。図15Aを参照のこと。線条体ドーパミンレベルは、Sp35-Fcを注射した脳において高かった (Mann-Whitney試験、 $p < 0.05$)。したがって、これは神経防御効果を示している。図15Bを参照のこと。さらに、MPTPの注射の90分後に試験した線条体MPP+レベルは、脳のSp35-Fcを注射した側と反対側との間で差はなかった。図15Cを参照のこと。

【0291】

(実施例7)

RNAiノックダウンレンチウイルスの作成

Sp35特異的RNAiを使用して、DA神経突起の生存、再生、および分化にSp35がどの程度寄与しているかを試験するために、DAニューロンの中でのSp35の発現を除去した。DAニューロン培養物を、以下のように調製したSp35特異的RNAi配列または対照RNAiを有しているレンチウイルスに感染させた。

【0292】

マウスおよびラットのSp35 DNA配列を、候補の低分子ヘアピンRNA (shRNA) に使用するための相同領域を見出すために比較した。Sp35 RNAiのレンチウイルスでの発現のために、CH324を、オリゴヌクレオチドLV1-035とLV1-036をアニーリングさせ、そしてHpaIとXhoIで消化したpLL3.7に連結させることによって構築した。pLL3.7ベクター、さらなる方法論、およびウイルスの産生は、Rubinsonら、Nat. Genet. 33, 401-06 (2003) に記載されている。Sp35 RNAiオリゴヌクレオチドをMWGから購入した。これは以下の配列を有している：

【0293】

【化11】

LV1-035 (センスオリゴ) -

5'-TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCTAGCAGGATGACGATCTTTTTC-3'

(配列番号9) および

LV1-036 (アンチセンスオリゴ) 5' -

TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTCTAGCAGGATGACGATCA

3' (配列番号10)

【0294】

対照RNAiは、小文字で示したヌクレオチドの変化を除き、同じオリゴヌクレオチド配列を用いて設計した：

【0295】

【化12】

5'-TGATC_cTCAT_cC_tCTA_tACTTCAAGAGAGT_gTAGCAGGATGAcGATCTTTTTTCTCGA-3'

(配列番号11) および

5'-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTaTAGaAGGATGACGA

TCA-3'. (配列番号12)

。

【0296】

10

レンチウイルスを生産させるために、pLL3.7に由来するDNAまたはpLL3.7中の候補のshRNAを、6ウェル形式で、CHO細胞の中に5対1の割合で、マウスSp35-HAタグ化プラスミドとともに同時トランスフェクトした。ノックダウンを、トランスフェクトしたCHO細胞溶解物からのSp35-HAタグのウェスタンブロット検出によって、さらには、2連のウェルから調製した全RNAのノーザンブロットによって分析した。プロットを、Sp35 cDNAの断片でプローブした。アッセイを、トランスフェクションの48時間後に行った。予想したとおり、対照で処置した細胞と比較して、CH324 RNAiで処理したCHO細胞の中では、Sp35 mRNAは10分の1に減少していた。

【0297】

20

(実施例8)

Sp35の発現のSp35特異的RNAiによるノックダウンによって、DAニューロンの生存および分化が促進される

DAニューロンの中でのSp35の発現の欠失の効果を試験するために、Sp35の発現を消滅させるRNAi分子を発現するレンチウイルス(実施例7に記載した)を使用して、ラットの一次VMニューロンを感染させた。緑色蛍光タンパク質(GFP)を有しているレンチウイルスを、Rubinsonらに記載されており、そして実施例7に記載したように作成した。ラットの一次VMニューロン培養物を、対照またはSp35 RNAiのいずれかで、1~5の感染多重度(MOI)で感染させた。GFPポジティブ細胞は、レンチウイルスに感染したDAニューロンを示す。Sp35ノックダウンの効果を、DAニューロンの伸張および生存によって決定した。

30

【0298】

(実施例9)

Sp35-FcおよびSp35 1A7抗体は、MPP+で処理したVM培養物の中でのEGFRの発現とAktのリン酸化を増大させる。

【0299】

MPP+で処理したVM培養物中でのAktのリン酸化、およびSp35とEGFRとの間での相互作用を試験するために、DAニューロンの一次培養物を、E15またはE16 Sprague Dawleyラット(Charles River, MA)の腹側の(ventral)中脳から得た。Shahら、J Cell Physiol(近刊)を参照のこと。簡単に説明すると、組織を、熱で不活化させたウマ血清(10%)、グルコース(6.0mg/ml)、ペニシリン(10,000U/ml)、ストレプトマイシン(10mg/ml; Sigma)、およびグルタミン(2mM; Gibco)を含む冷却したダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, NY))の中で、研磨したパスツールピペットを用いて機械的に解離させた。2×10⁵個の細胞を培地の中に再懸濁し、24ウェルトレイ(Falcon)のそれぞれのウェルの15mg/mlのポリ-L-オルニチン(Sigma)および1mg/mlのフィブロネクチン(Sigma)で予めコーティングしたカバースライドの上に播種した。付着しなかった細胞を4日目に吸引し、そしてLINGO-1-Fc、1A7、対照IgG、または対照-Fcを含む1mlの新し

40

50

い培地を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した。8時間後、培養した細胞を、 $10 \mu\text{M}$ のMPP+に対して、48時間の間暴露した。培養したVM細胞を、 $500 \mu\text{l}$ の溶解緩衝液〔Complete Protease Inhibitors (Roche, Basel, Switzerland)とPhosphatase Inhibitors (Sigma)を含む 50mM のHEPES (pH 7.5), 150mM のNaCl; 1.5mM の MgCl_2 , 1mM のEDTA, 1%のTriton x-100、および10%のグリセロール)の中に、 4°C で30分間溶解させた。上清を、4~20%または10%のいずれかのSDS-PAGEゲル(Bio-Rad, Hercules, CA)上で電気泳動させ、抗ホスホAkt、抗EGFR抗体(Cell Signaling, Beverly, MA)、または抗アクチン抗体でプローブした。EGFRおよびAktのリン酸化は、対照IgGおよび対照-Fcタンパク質とそれぞれ比較して、1A7抗体およびSp35-Fcタンパク質とともにインキュベートした、MPP+で処理したVMニューロン培養物の中で増大していた(1A7については、 $F_{3, 12} = 23.645$; $p < 0.001$ 、Sp-Fcについては、 $F_{3, 12} = 18.89$, $p < 0.001$)。図7A~7C、および7Gを参照のこと。

【0300】

加えて、全長のSp35はEGFRの発現を低下させた。COS7細胞を、実施例2に記載したFL-Sp35レンチウイルスで、0、1、および5MOIで2日間、トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞の中でのEGFRタンパク質の発現を、それぞれのMOIについて測定した。図12に見ることができるように、EGFRの発現レベルは、用量依存性の様式で低下した。

【0301】

培養細胞、ならびに、WTおよびKOマウスに由来するVM脳組織中でのSp35とEGFRとの間での直接の相互作用を、抗Sp35(1A7または2F3)または抗EGFR抗体を使用して免疫沈降によって明らかにした(図7D~7Fを参照のこと)。COS-7またはHEK203細胞(100mm 皿)を、Sp35-EGFR、およびSp35/EGFRでトランスフェクトした。細胞を48時間後に回収し、 1ml の溶解緩衝液(50mM のHEPES (pH 7.5); 150mM のNaCl; 1.5mM の MgCl_2 ; 1mM のEDTA; 1%のTriton X-100、10%のグリセロール)またはRIPA緩衝液(50mM のTRIS、pH 7.2、1%のTriton X-100、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、0.1%のSDS、 150mM のNaCl、 10mM の MgCl_2 、5%のグリセロール)の中に、 4°C で30分かけて溶解させた。 $14,000 \times g$ で15分間の遠心分離の後、上清を、Protein A/G-Sepharoseビーズ(Santa Cruz Biotechnology)とともに、 4°C で1時間インキュベートし、その後、 $200 \mu\text{l}$ の予め明澄化させた溶解物を、抗EGFR(Santa Cruz Biotechnology)、抗Sp35抗体(Biogen Idec、米国仮特許出願番号60/697,336(その全体が引用により本明細書中に組み入れられる)に記載されている)のいずれかとともに 4°C で1時間インキュベートし、その後、Protein A/G-Sepharoseビーズで処理した。ビーズを溶解緩衝液で3回洗浄し、Laemmli試料緩衝液中で沸騰させ、4~20%のSDS-PAGEを行い、そして抗EGFR抗体または抗Sp35抗体を用いてウェスタンブロッティングによって分析した。EGFR抗体およびSp35抗体を、抗ウサギIgG-HRPを使用して視覚化させた。

【0302】

Sp35 KOまたはWT VMをRIPA緩衝液中に溶解させ、上記に記載したように、Protein A/GとSepharoseビーズによって予め明澄化させた。その後、 1mg の腹側の(ventral)中脳の抽出物について、抗Sp35で、 4°C で一晩免疫沈降させ、その後、Protein A/GとSepharoseビーズと共に1時間インキュベーションした。Sp35とEGFRとの間での直接の相互作用もまた、腹側の(ventral)中脳培養物の中で観察した。図7Eを参照のこと。

【0303】

加えて、Sp35とEGFRで同時トランスフェクトした細胞株を用いたIP実験においては、抗Sp35抗体1A7はEGFRに対するSp35の結合をブロックしたが、抗Sp35抗体2F3は結合をブロックしなかった。図7Fを参照のこと。この実験では、OMgpを抗体結合についての対照として使用した。

【0304】

(実施例10)

死後のパーキンソン病(PD)患者の中脳黒質(SN)に由来する生存しているドーパミン作動性ニューロンの中でのSp35の発現を試験した。死後組織は、Harvard Brain Tissue Resource Centerから承認を得て入手した。以下の表2には、この実施例に記載した実験において使用したPD患者と、それらの年齢が適合する対照に関する情報を含めた。

【0305】

表2

PD患者と年齢が適合する対照についての情報

【0306】

【化13】

脳の番号	診断	年齢(歳)	性別	PMI(時間)	SN 病状
PD1	PD	77	M	30.5	4+蒼白
PD2	PD	70	M	13.58	4+蒼白
PD3	PD	75	M	14.9	4+蒼白 広範囲のレヴィー小体
PD4	PD	75	M	20	青白い、レヴィー小体
PDS	PD	78	F	4.25	青白い、レヴィー小体
PD6	PD	79	F	18.5	3-4+ 蒼白
C1	対照	70	M	15.1	正常
C2	対照	73	M	30.25	中程度の色素沈着
C3	対照	74	M	14.33	正常
C4	対照	75	F	16.67	正常
C5	対照	75	M	20.5	正常
C6	対照	78	F	22.67	正常

Sp35の発現を、上記の患者に由来する生存しているドーパミン作動性ニューロンにおいて、インサイチュハイブリダイゼーションによって試験した。SN組織を、Optimum Cutting Temperature(OCT)化合物の中に包埋した。凍結切片を調製し、処理し、そしてジゴキシゲニンで標識したSp35アンチセンスおよびセンスRNAで、Mira、Nat. Neurosci. 7:221-228(2004)に記載されているようにプローブした。切片を、TSAと蛍光、および抗ジゴキシゲニン結合抗体キット(Perkin Elmer, Wellesley, MA)を使用して、製造業者の説明書にしたがって染色した。その後、切片を、抗TH抗体(Chemicon, Temecula, CA)およびDAPI(Sigma)で染色した。PDの死後組織のSN(n=6)の中の生存しているドーパミン作動性ニューロンの中のSp35は、年齢が適合している対照(n=6)と比較してアップレギュレートされていた。

【0307】

半定量的PCRもまた使用して、表2に記載した患者の中でのSp35発現を試験した。mRNAをヒトSN組織から、Absolutely RNAミニプレップキット (Stratagene) を使用し、製造業者の説明書にしたがって抽出した。Sp35 mRNAを、Sp35正方向プライマー5'-AGAGACATGCGATTGGTGA-3' (配列番号14) と逆方向プライマー5'-AGAGATGTAGACGAGGTCATT-3' (配列番号15) を使用して増幅させた。図13Aに示すように、Sp35は、年齢が適合している対照と比較して、PDの死後組織のSNの中の生存しているドーパミン作動性ニューロンの中でアップレギュレートされていた。Sp35 mRNAレベルは、対照よりもPD SNの中で統計学的に高かった (対応のないStudent's T検定; $t(10) = 2.280$; $p < 0.05$)。図13Bを参照のこと。

10

【0308】

本発明は、記載した特異的な実施形態による範囲に限定はされない。記載した特異的な実施形態は、本発明の個々の態様、および任意の組成物または方法 (これらは本発明の範囲の含まれるものと機能的に同等である) の1つの説明として意図される。実際、本明細書中に示され、記載されるものに加えて、本発明の様々な改良が、上記の記載と添付の図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような改良は添付の特許請求の範囲に入るように意図される。

【0309】

本明細書中に記載した全ての刊行物および特許出願は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が引用により本明細書中に組み入れられる具体的かつ個別に組み入れられることが示されているかのように、同じ程度に引用により本明細書中に組み入れられる。

20

【図面の簡単な説明】

【0310】

【図1】Sp35タンパク質を含まない対照Fc ($*p < 0.003$) および対照レンチウイルス ($*p < 0.05$) と比較した、ベクター対照、FL-Sp35 (FL-LINGO-1)、およびDN-Sp35 (DN-LINGO-1) が形質導入された、あるいは、可溶性Sp35-Fc (LINGO-1-Fc) タンパク質で処置された、初代ラットDAニューロン培養物のドーパミン作動性ニューロンの成長を示すグラフ。

【図2】全長のSp35 (FL-LINGO-1)、優性陰性Sp35 (DN-LINGO-1) を生産するレンチウイルス、または対照のレンチウイルスに感染させ、そして10 μ Mの1-メチルフェニルピリジウムイオン (MPP+) またはMPP+の投与に使用した媒体組成物だけで処置した、培養したラットの腹側中脳 (VM) ニューロンの生存性を示すグラフ。MPP+に暴露した場合には、DN-Sp35とともにインキュベートしたチロシンヒドロラーゼ (TH) ニューロンの数は、FL-Sp35および対照と比較して有意に多かった ($*p < 0.05$ 、一元ANOVA)。

30

【図3】Sp35-Fc (LINGO-1-Fc) または1A7 Sp35アンタゴニスト抗体、および対照Fcまたは対照抗体で処置したVMのTHニューロンの数を示すグラフ。Sp35-Fcまたは1A7での処置によっては、対照Fcまたは対照抗体と比較して、MPP+に暴露した場合には、多数のニューロンが生じた (1A7については $*p < 0.01$ 、そしてSp35-Fcについては $*p < 0.05$ 、一元ANOVA)。

40

【図4】DN-LINGO-1、FL-LINGO-1、または対照の形質導入後のVM初代ラットニューロン培養物中のリン酸化Akt (p-Akt) のウェスタンブロット。リン酸化Aktの増加が、FL-LINGO-1および対照と比較した場合に、DN-LINGO-1を形質導入した細胞において観察された。

【図5】野生型マウスと比較した、Sp35ノックアウトマウスにおける運動の対称性を示すグラフ。運動の対称性は、野生型 (WT) マウスおよびノックアウト (KO) マウスの左の線条体の中に6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を注射した後、1週間、2週間、3週間、および4週間で評価した。運動の対称性は、野生型マウスと比較してノックアウトマウスにおいては有意に低かった ($*p = 0.001$ 、二元ANOVA)。

【図6A】図6Aは、6-OHDA実験において、野生型マウスとノックアウトマウスの

50

病変となっていない中脳の中のTHニューロンの数を示しているグラフである。

【図6B】図6Bは、6-OHDA実験において、ノックアウトマウスと野生型マウスの体の反対の(c o n t r o l a t e r a l)病変となっていない側の数によって校正した、病変部位のTHニューロンの数を示しているグラフである。THニューロンの割合(%)は、WTマウスよりもKOマウスにおいて統計的に多かった(* $p=0.001$ 、対応のないt検定)。

【図6C】図6Cは、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)実験における、野生型マウスとノックアウトマウスの中脳の中のTHニューロンの数を示しているグラフである。THニューロンの割合(%)は、WTマウスよりもKOマウスにおいて統計的に多かった(* $p=0.002$ 、対応のないt検定)。

【図6D】図6Dは、MPTPに暴露しなかったマウスと比較した、MPTP暴露後のWTマウスおよびKOマウスの中でのリン酸化Akt(P-Akt)のレベルを示しているウェスタンブロットである。

【図6E】図6Eは、生理食塩水、およびMPTPで処置したWTおよびKOのVMの中のリン酸化Akt(p-Akt)、Akt、および β -アクチンについてのウェスタンブロットである(それぞれのグループについて $n=6$)。

【図6F】図6Fは、MPTPで処置したWT(* $p<0.05$)および生理食塩水で処置したKO VM(# $p<0.05$ 、それぞれのグループについて $n=6$)と比較して、p-Aktレベルが7日目のMPTPで処置したマウスのVMにおいては有意に高かったことを示しているグラフである。

【図7A】図7Aは、Sp35抗体(1A7)または対照抗体で処理した、VM THニューロンのP-Aktおよび表皮成長因子受容体(EGFR)の発現についてのウェスタンブロットである。

【図7B】図7Bは、Sp35-Fcまたは対照で処理したVM THニューロンのEGFRおよびP-Aktの発現についてのウェスタンブロットである。

【図7C】図7Cは、Sp35-FcまたはSp35抗体(1A7)で処理したVM培養物のEGFR、p-Akt、全Akt、および β -アクチンについてのウェスタンブロットである。

【図7D】図7Dは、Sp35および/またはEGFRでトランスフェクトした培養細胞中でのEGFRとSp35の免疫共沈である。+または-は、EGFRおよびSp35の存在(+)または存在しないこと(-)を示す。IPは、免疫沈降に使用した抗体を示し、そしてIBは、ウェスタンブロットに使用した抗体を示す。

【図7E】図7Eは、WTおよびKO VM中でのEGFRとLINGO-1の免疫共沈である。

【図7F】図7Fは、Sp35抗体1A7が同時トランスフェクトした細胞株の中でのEGFRに対するSp35の結合をブロックすることを示しているウェスタンブロットである。加えて、別のSp35抗体2F3は、EGFRに対するSp35の結合をブロックしない。乏突起膠細胞-ミエリン糖タンパク質(OMgp)のトランスフェクションを対照として使用した。

【図7G】図7Gは、対照およびFc断片とそれぞれ比較した、1A7およびSp35-Fcで処理した培養物中でのp-Aktレベルの統計学的分析を示しているグラフである。

【図8】6-OHDAで実験用のパーキンソニズムを誘導したWTマウスおよびKOマウスの病変となっていないVMおよび病変側のVMの中のTHニューロンの数を示しているグラフ。

【図9】6-OHDA病変後のSp35タンパク質レベルの変化を示しているグラフ。Sp35は、野生型マウスにおいては、線条体6-OHDAの投与の3日後に、反対側(対照)と比較して病変側(6-OHDA)においてアップレギュレートされていた(それぞれの時点について $n=3$ 、対応のないStudent's t検定、* $p<0.05$)。

【図10】生理食塩水(WT: $n=7$ 、KO: $n=8$)およびMPTP(それぞれのグル

10

20

30

40

50

ープについて $n=10$)で処置したWTマウスおよびKOマウスの黒質緻密部 (substantia nigra compacta) (SNc) 中のTHニューロンの数を示しているグラフ。

【図11】生理食塩水またはMPTPで処置したKOマウスおよびWTマウスの中での線条体ドーパミン (DA) レベル (ng/ml) を示しているグラフ。

【図12】0、1、および5MOIのFL-Sp35を発現するレンチウイルスでのトランスフェクションの2日後、COS-7細胞の中でのSp35およびEGFRの発現を示しているウェスタンブロット。

【図13A】図13Aは、対照と比較したパーキンソン病患者 (PD) の黒質中のSp35レベルの有意な上昇を示す半定量的PCR反応の結果を示しているゲルである。

【図13B】図13Bは、対照と比較したパーキンソン病の患者 (PD) の黒質中の較正されたSp35のmRNAレベルを示しているグラフである。

【図14】図14Aは、KO (—/—) マウスおよびWT (+/+) マウス (それぞれのグループにおいて $n=6$) の中でのドーパミン輸送 (DAT) レベルを示しているウェスタンブロットである。図14Bは、WTマウスとKOマウスにおける相対的なDATレベルを示しているグラフである。WTマウスとKOマウスの間にはDATの発現に有意な差はなかった (対応のないStudent's t検定、 $p>0.05$)。

【図15A】図15Aは、MPTPに暴露した対照と比較した、Sp-35-Fcを注射したマウスのSNc中のTHニューロンの数を示しているグラフである (* $p<0.05$ 、 $n=9$)。

【図15B】図15Bは、MPTPに暴露した対照と比較した、Sp35-Fcマウスの線条体ドーパミンレベルを示しているグラフである (* $p<0.05$ 、 $n=9$)。

【図15C】図15Cは、MPTPに暴露した対照と比較した、Sp35-Fcを注射したマウスの線条体MPP+レベルを示しているグラフである。

【図1】

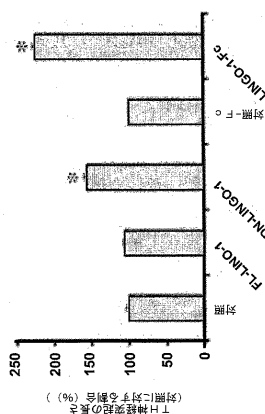


FIG. 1

【図2】

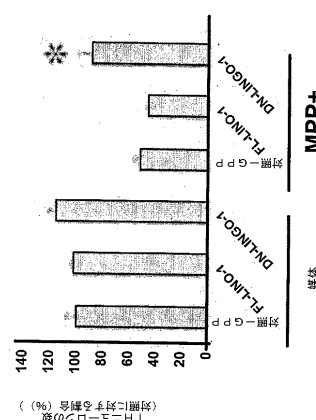


FIG. 2

【図 3】

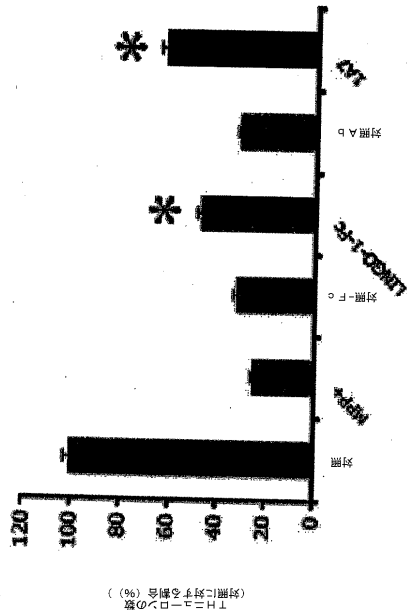


FIG. 3

【図 4】

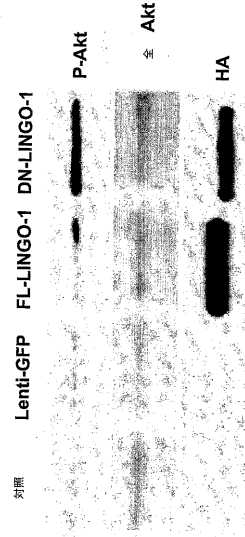


FIG. 4

【図 5】

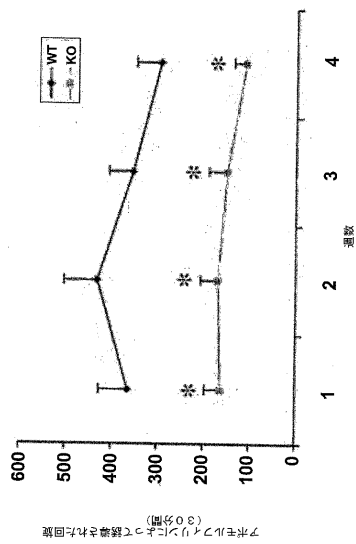


FIG. 5

【図 6 A】

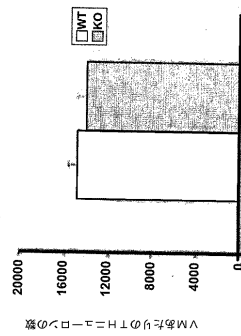


FIG. 6A

【図 6 B】

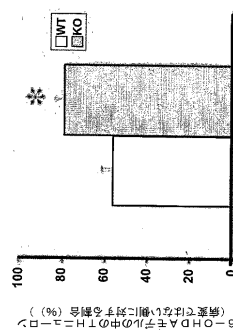


FIG. 6B

【図 6 C】

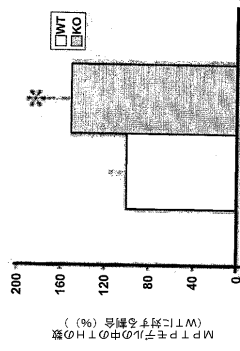


FIG. 6C

【図 6 D】

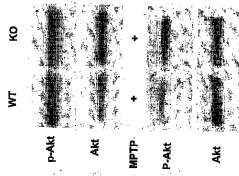


FIG. 6D

【図 6 E】

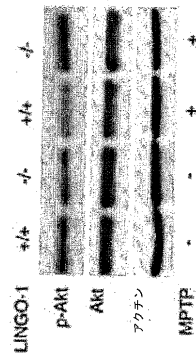


FIG. 6E

【図 6 F】

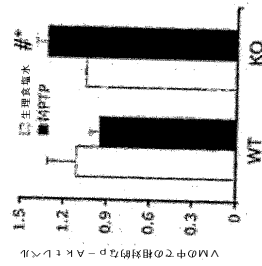


FIG. 6F

【図 7 A】

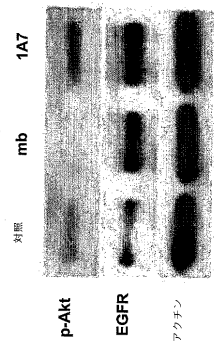


FIG. 7A

【図 7 C】

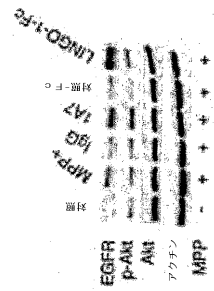


FIG. 7C

【図 7 B】

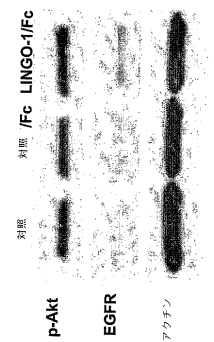


FIG. 7B

【図 7 D】

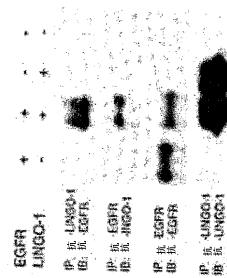


FIG. 7D

【図 7 E】

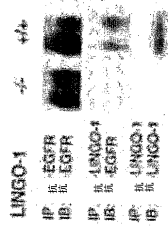


FIG. 7E

【図 7 F】

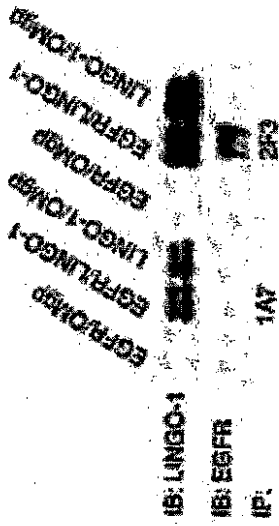


FIG. 7F

【図 9】

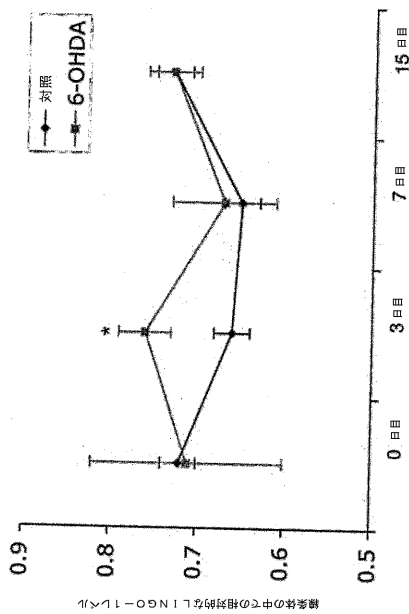


FIG. 9

【図 7 G】

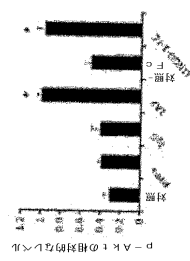


FIG. 7G

【図 8】

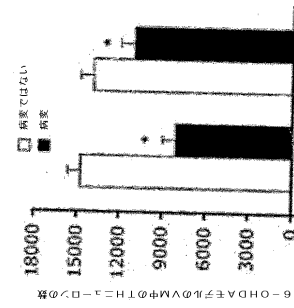


FIG. 8

【図 10】

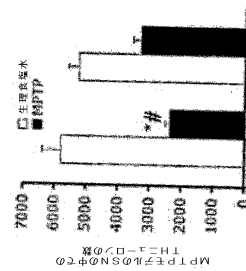


FIG. 10

【図 11】

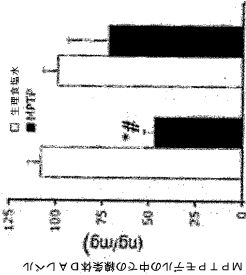


FIG. 11

【図 1 2】

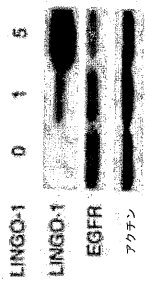


FIG. 12

【図 1 3 A】

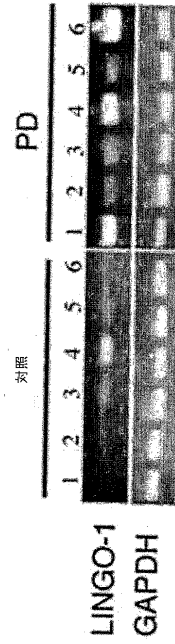


FIG. 13A

【図 1 3 B】

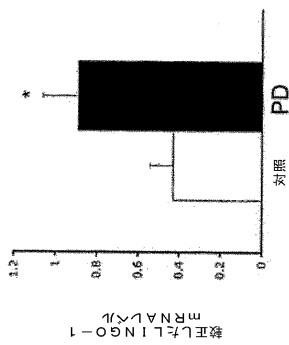
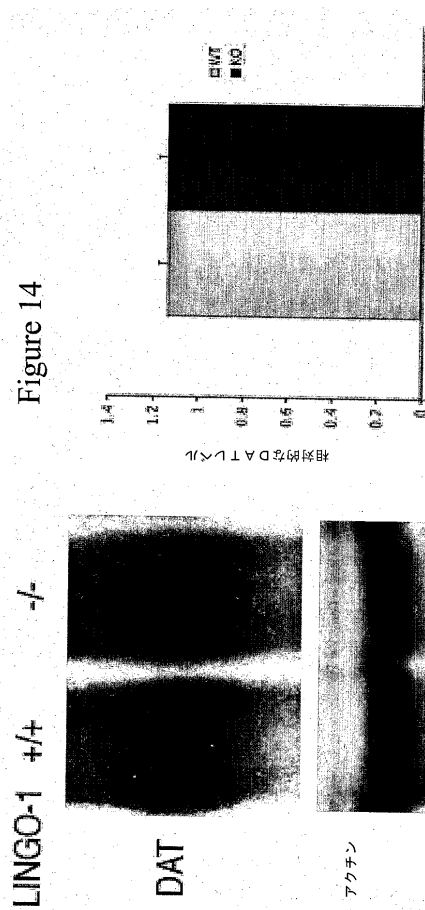


FIG. 13B

【図 1 4】



A

B

【図 15 A】

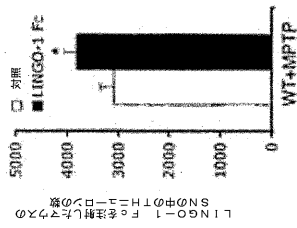


FIG. 15A

【図 15 C】

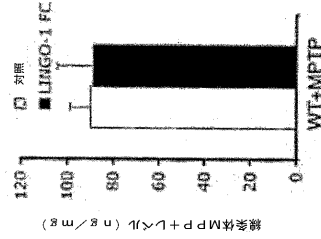


FIG. 15C

【図 15 B】

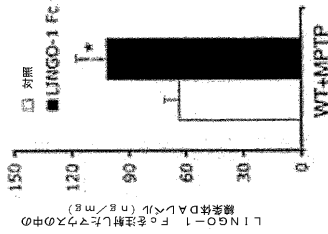


FIG. 15B

【配列表】

[2009517340000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成20年7月10日(2008.7.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2009517340000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/42990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: A61K 38/00(2006.01)

USPC: 514/12

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/12

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/085648-A2 (MI et al) 07 October 2004 (07.10.2004), entire document	1-9, 15, 27-35 and 54-56

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

05 March 2007 (05.03.2007)

Date of mailing of the international search report

18 APR 2007

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Gregory S. Buch

Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/42990

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-14, 16-26 and 36-53
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/42990

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
USPAT, USOCR, PGPUBS, EPO, JPO, DERWENT MEDLINE, BIOSIS, LIFESCI, EMBASE, SCISEARCH, CAPLUS

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/02
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
			A 6 1 P 21/04
			C 1 2 N 15/00 A

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

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ミー, シャ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 8, ベルモント, バーノン ロード 4

(72)発明者 アイザックソン, オーレ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, エラリー スクエア 1 4

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA61 CA04 CA11 CA20 DA02 EA04 GA12 HA17

4C084 AA02 AA13 AA17 AA20 BA13 BA23 BA35 BA44 BA50 MA02

MA13 MA17 MA23 MA31 MA35 MA37 MA52 MA56 MA59 MA60

MA63 MA65 MA66 MA67 NA14 ZA022 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202

ZA222 ZC412

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 AA34 BB11 BB41 BB43 CC02 DD62

DD63 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA02 ZA15 ZA16

ZA20 ZA22 ZC41