【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成18年8月24日(2006.8.24)

【公表番号】特表2005-535329(P2005-535329A)
【公表日】平成17年11月24日(2005.11.24)
【年通号数】公開・登録公報2005-046
【出願番号】特願2004-527960(P2004-527960)
【国際特許分類】
*Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)*
*Ａ６１Ｋ　39/395　(2006.01)*
*Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　14/47　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　14/705　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　16/00　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　16/18　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　16/28　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　16/46　(2006.01)*
*Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｎ　5/06　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｐ　21/08　(2006.01)*
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ａ６１Ｋ　39/395　Ｄ
Ａ６１Ｋ　39/395　Ｎ
Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｐ　43/00　１０５
Ｃ０７Ｋ　14/47
Ｃ０７Ｋ　14/705
Ｃ０７Ｋ　16/00
Ｃ０７Ｋ　16/18
Ｃ０７Ｋ　16/28
Ｃ０７Ｋ　16/46
Ｃ０７Ｋ　19/00
Ｃ１２Ｎ　1/15
Ｃ１２Ｎ　1/19
Ｃ１２Ｎ　1/21
Ｃ１２Ｐ　21/02　Ｃ
Ｃ１２Ｎ　5/00　Ａ
Ｃ１２Ｎ　5/00　Ｂ
Ｃ１２Ｎ　5/00　Ｅ
Ｃ１２Ｐ　21/08

【手続補正書】

【提出日】平成18年7月6日(2006.7.6)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７４】
一本鎖抗体
本発明は、本発明の免疫原性Nogo受容体-1ポリペプチドに結合する一本鎖抗体(scFv)を含む。ScFvを産生するためには、$V_H$および$V_L$をコードするDNAを屈曲性リンカー、例えば、アミノ酸配列 $(Gly_4\ Ser)_3$（配列番号10）をコードするDNAと作動可能に連結し、$V_H$および$V_L$配列が連続した一本鎖タンパク質として発現するようにし、ここで、$V_L$および$V_H$領域は屈曲性リンカーによって連結している(例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423 426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552 554を参照されたい）。一本鎖抗体は１つの$V_H$および$V_L$のみを用いる場合、一価であってもよいし、２つの$V_H$および$V_L$を用いる場合、二価であってもよいし、３以上の$V_H$および$V_L$を用いる場合、多価であってもよい。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５１】
モノクローナル抗体7E11および5B10の配列分析
本発明者らはトータルRNAを Qiagen RNeasy ミニキットを用いて抽出し、単離したRNAからcDNAを作成した。本発明者らは、軽鎖配列をPCRによってプライマー、5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3' (配列番号12)および5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3' (配列番号25)を用いて増幅した。本発明者らは、重鎖配列をPCRによってプライマー、5'-GGGGATATCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3' (配列番号13)および5'-GGGGATATCCACCATGAGGKCCCCWGCTCAGYTYCTKGGA-3' (配列番号14)を用いて増幅した。かかるプライマーは以下の縮重ヌクレオチドを含む: SはGまたはC;MはAまたはC、RはGまたはA;WはAまたはT; KはGまたはT;そしてY はTまたはCを表す。本発明者らはPCR フラグメントを配列決定ベクターにクローニングし、配列決定ベクターに特異的なプライマーを用いてジデオキシ鎖終結によってCDRのDNA配列を決定した。本発明者らは理論的にDNA配列を翻訳した結果、モノクローナル抗体 7E11および5B10の重鎖および軽鎖のCDR領域の部分アミノ酸配列を表２に示す。mAbの重鎖および軽鎖からの3つのCDRを表２において下線にて示す。7E11および5B10の軽鎖は94%のアミノ酸配列同一性を、重鎖は91%のアミノ酸配列同一性を有していた。mAb、7E11、5B10および1H2はIgG1 アイソタイプであり、mAb、3G5および2F7はIgG2a アイソタイプである。これら５つのmAbはそれぞれカッパアイソタイプの軽鎖を有する。本発明者らはこのアプローチによってその他のモノクローナル抗体の配列を分析した。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１６５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１６５】
抗体特異性のELISAによる判定
実施例１および２で産生したモノクローナルおよびFab-ファージ抗体の特異性を調べるために、本発明者らはNogo受容体-1ポリペプチドのパネルを用いてELISAを行った。パネルは、sNogoR310-Fc (ラットNogo受容体-1のアミノ酸26-310およびラットFcフラグメント

を含む融合タンパク質)、sNogoR344-Fc(前掲)、ポリペプチド p-617 (配列番号1)、ポリペプチド p-618 (ラットNogo受容体-1のLRR7領域からの19-アミノ酸ポリペプチド；図2;配列番号11)およびポリペプチド p-4およびp-5 (それぞれNogo受容体-1のLRR5およびLRRCT領域からのポリペプチド)からなるものであった。卵白アルブミンおよびBSAをコントロールとして用いた。図4に示すように、mAb、1H2、3G5および2F7はすべてsNogoR344-Fcに特異的に結合した。類似の実験において、これら抗体はまた、ラットNogo受容体-1のアミノ酸310-344 (配列番号3)からなるポリペプチドに特異的に結合し、mAb、7E11および5B10はポリペプチド p-617 (配列番号1)に特異的に結合した。

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２０６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２０６】

本発明者らはマウス sNogoR310 cDNA (Nogo受容体-1のアミノ酸1-310に対応)をC-3123ベクターのNotI 部位にクローニングした。このベクターにおいて、sNogoR310 発現はグリア細胞繊維性酸性タンパク質 (gfap) 遺伝子調節要素の制御下にあり、損傷部位の反応性星状細胞からの分泌を促進し、高レベルの発現が可能である。本発明者らは結果として得られたベクターを順次AatIIおよびSfiIで消化し、3.4 kb フラグメント上にgfap::sNogoR310 コンストラクトを単離した。本発明者らはこのフラグメントを胚にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作製した。本発明者らは、導入遺伝子が組み込まれていることをPCRによって確認し、５つの創始系統を同定した。本発明者らは発現レベルが最も高い２つの創始系統のヘテロ接合性雄と雌性 C57BL/6J マウスとを交配した。本発明者らはNogo受容体-1に対する抗体を用いたウェスタンブロット分析によってGFAP-陽性細胞がヘテロ接合性トランスジェニックマウスにおいてsNogoR310を発現および分泌していることを確認した。