(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101980603 A
(43)申请公布日 2011.02.23

(21)申请号 200880121178.4
(22)申请日 2008.10.10
(30)优先权数据
60/979,338 2007.10.11 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.06.11
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2008/011633 2008.10.10
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/048605 EN 2009.04.16
(83)生物保藏信息
7.P1D5.1G9 2006.12.27
2.P3B5.2 2006.12.27
(71)申请人 比奥根艾迪克 MA 公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 米莎
(74)专利代理机构 上海华晖信康知识产权代理事务所(普通合伙) 31244
代理人 樊英如
(51)Int.Cl.
A01N 37/18(2006.01)
A61K 31/00(2006.01)

权利要求书 10 页 说明书 71 页 序列表 26 页
附图 19 页

(54)发明名称

LINGO-1 和 TrkB 拮抗剂的用途

(57)摘要

本发明涉及使用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂促进神经元存活和再生的方法。此外,本发明涉及使用 LINGO-1 拮抗剂治疗压力诱导的视神经病变的方法。本发明还通常涉及使用 LINGO-1 拮抗剂增加 TrkB 活性并抑制 JNK 通路信号转导的方法。

CN 101980603 A

1. 一种抑制细胞中 LINGO-1 和 TrkB 相互作用的方法，包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。

2. 一种促进细胞中 TrkB 磷酸化的方法，包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。

3. 一种促进 TrkB 磷酸化的方法，包括将 CNS 神经元与 LINGO-1 拮抗剂接触。

4. 一种抑制细胞中 JNK 磷酸化的方法，包括将共表达 LINGO-1 和 JNK 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。

5. 一种抑制 JNK 磷酸化的方法，包括将 CNS 神经元与 LINGO-1 拮抗剂接触。

6. 一种促进处于死亡危险的神经元存活的方法，包括将所述神经元与有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂接触。

7. 一种促进显示压力诱导的视神经病变的体征或症状的哺乳动物中视网膜神经节细胞存活的方法，包括向需要这种治疗的哺乳动物施用治疗有效量的 LINGO-1 拮抗剂和载体。

8. 一种促进显示压力诱导的视神经病变的体征或症状的哺乳动物中视网膜神经节细胞存活的方法，包括向需要这种治疗的哺乳动物施用治疗有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的组合。

9. 一种治疗与神经元细胞死亡相关的疾病或病症的方法，包括向需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂。

10. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法，还包括将所述细胞与 TrkB 激动剂接触。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂包含可溶的 LINGO-1 多肽。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含选自由下列组成的组的 LINGO-1 区：

(i)LINGO Ig 结构域或者其片段、变体或衍生物，

(ii)LINGO LRR 结构域或者其片段、变体或衍生物，

(iii)LINGO 胞质结构域或者其片段、变体或衍生物，

(iv)LINGO 跨膜结构域或者其片段、变体或衍生物，

(v)LRR 结构域 C- 端的 LINGO 碱性区或者其片段、变体或衍生物，和

(vi)(i) 至 (v) 的所述 LINGO-1 结构域或者其片段、变体或衍生物中的至少两种的组合。

13. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽缺少选自由下列所组成的组的 LINGO-1 区：

(i)LINGO Ig 结构域，

(ii)LINGO LRR 结构域，

(iii)LINGO 胞质结构域，

(iv)LINGO 跨膜结构域，

(v)LRR 结构域 C- 端的 LINGO 碱性区，和

(vi)(i) 至 (v) 的所述 LINGO-1 结构域中的至少两种的组合。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽缺少 LINGO-1 跨膜结构

域和 LINGO-1 胞质结构域。

15. 如权利要求 11 至 14 中任一项所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含

(i)LINGO-1LRR 结构域或者其片段、变体或衍生物，

(ii)LRR 结构域 C- 端的 LINGO 碱性区或者其片段、变体或衍生物，和

(iii)LINGO-1 免疫球蛋白 (Ig) 结构域或者其片段、变体或衍生物。

16. 如权利要求 13 或权利要求 14 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含所述 LINGO-1LRR 结构域的至少一部分，但缺少 LINGO-1 Ig 结构域、LINGO-1 碱性区、LINGO-1 跨膜结构域和 LINGO-1 胞质结构域。

17. 如权利要求 11 至 15 中任一项所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含选自由下列组成的组的多肽片段：

(i)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 33；

(ii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 35；

(iii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 64；

(iv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 64；

(v)SEQ ID NO:2 的氨基酸 66 至 89；

(vi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 90 至 113；

(vii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 114 至 137；

(viii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 138 至 161；

(ix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 162 至 185；

(x)SEQ ID NO:2 的氨基酸 186 至 209；

(xi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 210 至 233；

(xii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 234 至 257；

(xiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 258 至 281；

(xiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 282 至 305；

(xv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 306 至 329；

(xvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 330 至 353；

(xvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 363 至 416；

(xviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 417 至 424；

(xix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 419 至 493；

(xx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 494 至 551；

(xxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 64；

(xxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 89；

(xxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 113；

(xxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 137；

(xxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 161；

(xxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 185；

(xxvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 209；

(xxviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 233；

(xxix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 257；

(xxxx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 281；
(xxxxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 305；
(xxxxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 329；
(xxxxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 353；
(xxxxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 416；
(xxxxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 424；
(xxxxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 493；
(xxxxvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 551；
(xxxxviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 531；
(iL)SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 532；
(Li)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 89；
(Lii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 113；
(Liii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 137；
(Liv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 161；
(Lv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 185；
(Lvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 209；
(Lvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 233；
(Lviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 257；
(Lix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 281；
(Lx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 305；
(Lxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 329；
(Lxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 353；
(Lxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 416；
(Lxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 424；
(Lxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 493；
(Lxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 551；
(Lxxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 530；
(Lxxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 531；
(Lxxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 532；
(Lxxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 533；
(Lxxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 534；
(Lxxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 535；
(Lxxvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 536；
(Lxxviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 537；
(Lxxix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 538；
(Lxxx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 539；
(Lxxxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 30 至 532；
(Lxxxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 31 至 532；
(Lxxxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 32 至 532；

(Lxxxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 33 至 532；
(Lxxxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 532；
(Lxxxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 35 至 532；
(Lxxxvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 532；
(Lxxxviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 30 至 531；
(Lxxxix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 31 至 531；
(Lxxxx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 32 至 531；
(Lxxxxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 33 至 531；
(Lxxxxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 531；
(Lxxxxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 35 至 531；
(Lxxxxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 531；
(Lxxxxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 89；
(Lxxxxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 113；
(Lxxxxvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 137；
(Lxxxxviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 161；
(Lxxxxvc)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 185；
(c)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 209；
(ci)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 233；
(cii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 257；
(ciii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 281；
(civ)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 305；
(cv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 329；
(cvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 353；
(cvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 416；
(cviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 424；
(cix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 493；
(cx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 551；
(cxi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 530；
(cxii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 531；
(cxiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 532；
(cxiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 533；
(cxv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 534；
(cxvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 535；
(cxvii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 536；
(cxviii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 537；
(cxix)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 538；
(cxx)SEQ ID NO:2 的氨基酸 36 至 539；
(cxxi) 任何所述多肽片段的变体或衍生物，以及
(cxxii) 任何所述多肽片段或者其变体或衍生物中的至少两种的组合。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 34-532 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸 36-532。

19. 如权利要求 11-18 中任一项所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含 LINGO-1 Ig 结构域或者其片段、变体或衍生物。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 417-493。

21. 如权利要求 11 至 20 中任一项所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽还包含非 LINGO-1 部分。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述非 LINGO-1 部分是融合至所述可溶的 LINGO-1 多肽的异源多肽。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中异源多肽选自由免疫球蛋白片段、血清白蛋白、靶向蛋白、报告蛋白和促进纯化的蛋白组成的组。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述异源多肽是免疫球蛋白片段。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中所述免疫球蛋白片段含有铰链和 Fc 区。

26. 如权利要求 21-25 中任一项所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽被轭合至聚合物。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中所述聚合物选自由聚亚烷基二醇、糖聚合物和多肽所组成的组。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述聚合物是聚亚烷基二醇。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述聚亚烷基二醇是聚乙二醇 (PEG)。

30. 如权利要求 26 所述的方法，其中所述可溶的 LINGO-1 多肽被轭合至 1、2、3 或 4 个聚合物。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中所述聚合物的总分子量从 5,000Da 至 100,000Da。

32. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂包含 LINGO-1 抗体或其片段。

33. 如权利要求 32 所述的方法，其中所述 LINGO-1 抗体或其片段与主要由选自由下列所组成的组的多肽片段组成的表位特异性结合 :

(i)SEQ ID NO :2 的氨基酸 66 至 89 ;

(ii)SEQ ID NO :2 的氨基酸 66 至 113 ;

(iii)SEQ ID NO :2 的氨基酸 66 至 137 ;

(iv)SEQ ID NO :2 的氨基酸 90 至 113 ;

(v)SEQ ID NO :2 的氨基酸 114 至 137 ;

(vi)SEQ ID NO :2 的氨基酸 138 至 161 ;

(vii)SEQ ID NO :2 的氨基酸 162 至 185 ;

(viii)SEQ ID NO :2 的氨基酸 186 至 209 ;

(ix)SEQ ID NO :2 的氨基酸 210 至 233 ;

(x)SEQ ID NO :2 的氨基酸 234 至 257 ;

(xi)SEQ ID NO :2 的氨基酸 258 至 281 ;

(xii)SEQ ID NO :2 的氨基酸 282 至 305 ;

(xiii)SEQ ID NO:2 的氨基酸 306 至 329；

(xiv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 330 至 353；

(xv)SEQ ID NO:2 的氨基酸 34 至 64；

(xvi)SEQ ID NO:2 的氨基酸 363 至 416；

(xvii) 任何所述多肽片段的变体或衍生物，以及

(xviii) 任何所述多肽片段或者其变体或衍生物中的两种或更多种的组合。

34. 如权利要求 32 所述的方法，其中所述 LINGO-1 抗体选自由下列所组成的组：201 ′、3A3、3A6、3B5、1A7、1D5、1G7、2B10、2C11、2F3、3P1B1.1F9、3P1D10.2C3、3P1E11.3B7、3P2C6.3G10.2H7、3P2C9.2G4、3P4A6.1D9、3P4A1.2B9、3P4C2.2D2、3P4C5.1D8、3P4C8.2G9、6P4F4.1Ds、6P4F4.1F9、7P1D5.1G9、1B6.4、2C7.2、2D6.1、2F7.3、2H3.2、3C11.1、3E3.1、3H11.2、3G8.1、2B8.1、3B5.230-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)、Li13、Li32、Li33、Li34、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)、1968(L1a.13)、3011、3012、3013、3418、3422、3562、D05、D07、D08、D10 和 D11。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述 LINGO-1 抗体是 1A7。

36. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述 LINGO-1 抗体是 3B5。

37. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂包含 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸选自由下列组成的组：

(i) 反义多核苷酸；

(ii) 核酶；

(iii) 小干扰 RNA(siRNA)；和

(iv) 小发夹 RNA(shRNA)。

39. 如权利要求 38 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸是包含与 LINGO-1 mRNA 的编码部分互补的至少 10 个碱基的反义多核苷酸。

40. 如权利要求 39 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸是核酶。

41. 如权利要求 38 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸是 siRNA。

42. 如权利要求 38 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸是 shRNA。

43. 如权利要求 39 所述的方法，其中所述 shRNA 包含核苷酸序列：UGAUCGUCAU CCUGCUAGAC UUCAAGAGAGUCUAGCAGGA UGACGAUCUU UUUUC(SEQ ID NO:34)。

44. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂是适体。

45. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中所述接触包括 (a) 将通过与表达控制序列可操作连接的编码所述 LINGO-1 拮抗剂的多核苷酸引入所述细胞或所述 CNS 神经元，和 (b) 允许所述 LINGO-1 拮抗剂的表达。

46. 如权利要求 45 所述的方法，其中所述多核苷酸通过选自由下列所组成的组的方法引入所述细胞：

(a) 转染；

(b) 电穿孔；

(c) 转导；和

(d) 直接的微注射。

47. 如权利要求 44-46 中任一项所述的方法，其中所述多核苷酸作为表达载体施用。

48. 如权利要求 47 所述的方法，其中所述表达载体是病毒载体。

49. 如权利要求 48 所述的方法，其中所述病毒载体选自由腺病毒载体、甲病毒载体、肠病毒载体、瘟病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、疱疹病毒载体、乳多空病毒载体、痘病毒载体和细小病毒所组成的组。

50. 如权利要求 49 所述的方法，其中所述疱疹病毒载体选自由单纯疱疹病毒载体和埃巴病毒载体所组成的组。

51. 如权利要求 49 所述的方法，其中所述痘病毒载体是牛痘病毒载体。

52. 如权利要求 49 所述的方法，其中所述慢病毒载体是 pLL3.7。

53. 如权利要求 49 所述的方法，其中所述细小病毒载体是腺伴随病毒 (AAV)。

54. 如权利要求 1-6 或 10 中任一项所述的方法，所述方法还包括将所述细胞、所述神经元或所述 CNS 神经元与选自由下列所组成的组的另外的拮抗剂接触：

(i)NGF 拮抗剂；

(ii)NgR1 拮抗剂；

(iii)TAJ 拮抗剂；和

(iv)OMgp 拮抗剂。

55. 如权利要求 7-9 中任一项所述的方法，所述方法还包括施用选自由下列所组成的组的另外的拮抗剂：

(i)NGF 拮抗剂；

(ii)NgR1 拮抗剂；

(iii)TAJ 拮抗剂；和

(iv)OMgp 拮抗剂。

56. 如权利要求 6、8、9 或 10 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂化合物。

57. 如权利要求 56 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂化合物选自由 L-783,281、腺苷和 CGS 21680 所组成的组。

58. 如权利要求 6、8、9 或 10 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂是 TrkB- 激动剂多肽。

59. 如权利要求 58 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多肽选自由 TrkB 配体、TrkB 配体的片段、TrkB 配体的变体、TrkB 多肽、TrkB 多肽的片段或 TrkB 多肽的变体所组成的组。

60. 如权利要求 59 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多肽是 BDNF 多肽。

61. 如权利要求 58-60 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多肽还包含非 TrkB- 激动剂部分。

62. 如权利要求 61 所述的方法，其中所述非 TrkB- 激动剂部分是融合至所述 TrkB 激动剂多肽的异源多肽。

63. 如权利要求 61 或 62 中任一项所述的方法，其中所述非 TrkB- 激动剂部分选自由免疫球蛋白片段、血清白蛋白、靶向蛋白、报告蛋白和促进纯化的蛋白所组成的组。

64. 如权利要求 63 所述的方法，其中所述非 TrkB- 激动剂部分是免疫球蛋白片段。

65. 如权利要求 63 所述的方法，其中所述免疫球蛋白片段包含铰链和 Fc 区。

66. 如权利要求 61 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多肽轭合至聚合物。

67. 如权利要求 66 所述的方法，其中所述聚合物选自由聚亚烷基二醇、糖聚合物和多肽所组成的组。

68. 如权利要求 67 所述的方法，其中所述聚合物是聚乙二醇 (PEG)。

69. 如权利要求 61 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多肽轭合至 1- 酰基 - 甘油衍生物。

70. 如权利要求 66 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多肽轭合至 1、2、3 或 4 个聚合物。

71. 如权利要求 70 所述的方法，其中所述聚合物的总分子量是从 5,000Da 至 100,000Da。

72. 如权利要求 6、8、9 或 10 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂抗体或其片段。

73. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂抗体或其片段选自由下列所组成的组 :6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12、29D7 或 TrkB 单克隆抗体。

74. 如权利要求 6、8、9 或 10 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂多核苷酸。

75. 如权利要求 74 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多核苷酸编码神经营养蛋白或其片段或变体。

76. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述神经营养蛋白是 BDNF。

77. 如权利要求 6、8、9 或 10 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂适体。

78. 如权利要求 1-6 或 10 中任一项所述的方法，其中所述细胞或神经元或所述 CNS 神经元是在哺乳动物中，并且其中所述接触包括向需要其的哺乳动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂或所述 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂。

79. 如权利要求 7-10 或 78 中任一项所述的方法，其中所述哺乳动物已经被诊断为患有涉及神经变性的疾病、病症或损伤。

80. 如权利要求 79 所述的方法，其中所述疾病、病症或损伤是青光眼。

81. 如权利要求 7-10 或 78 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂或 LINGO-1 拮抗剂中的至少一种通过弹丸注射或慢性输注来施用。

82. 如权利要求 7-10 或 78 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂或 LINGO-1 拮抗剂中的至少一种被直接施用至中枢神经系统中。

83. 如权利要求 6、8、9、10 或 78 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂选自由 TrkB 激动剂多核苷酸或者编码 TrkB 激动剂多肽或 TrkB 激动剂适体的多核苷酸所组成的组。

84. 如权利要求 83 所述的方法，其中所述接触或施用包括 (a) 向细胞引入所述 TrkB 激

动剂多核苷酸或者编码所述 TrkB 激动剂的多核苷酸和 (b) 允许所述 TrkB 激动剂的表达。

85. 如权利要求 84 所述的方法，其中所述多核苷酸通过选自由下列所组成的组的方法引入所述细胞：

(a) 转染；

(b) 电穿孔；

(c) 转导；和

(d) 直接的微注射。

86. 如权利要求 84-85 中任一项所述的方法，其中所述细胞是在哺乳动物中，并且其中所述引入包括 (a) 向所述哺乳动物施用所述 TrkB 激动剂多核苷酸或者编码所述 TrkB 激动剂的所述多核苷酸和 (b) 允许所述 TrkB 激动剂的表达。

87. 如权利要求 83 所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂多核苷酸或者编码所述 TrkB 激动剂的所述多核苷酸被施用于能够表达所述多核苷酸的培养的宿主细胞中。

88. 如权利要求 84 至 87 中任一项所述的方法，其中所述多核苷酸作为表达载体施用。

89. 如权利要求 88 所述的方法，其中所述表达载体是病毒载体。

90. 如权利要求 86 至 89 中任一项所述的方法，其中所述多核苷酸在所述疾病、病症或损伤的部位或附近被引入所述哺乳动物中。

91. 如权利要求 87 所述的方法，其中所述培养的宿主细胞通过包括以下的方法来制备：(a) 用如权利要求 83 所述的 TrkB 激动剂多核苷酸或编码 TrkB 激动剂的多核苷酸或如权利要求 88 或权利要求 89 所述的载体转化或转染受体宿主细胞，和 (b) 培养所述转化或转染的宿主细胞。

92. 如权利要求 87 至 91 中任一项所述的方法，其中所述宿主细胞来源于有待被治疗的哺乳动物。

93. 如权利要求 89 所述的方法，其中所述病毒载体选自由腺病毒载体、甲病毒载体、肠病毒载体、瘟病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、疱疹病毒载体、乳多空病毒载体、痘病毒载体和细小病毒所组成的组。

94. 如权利要求 93 所述的方法，其中所述疱疹病毒载体选自由单纯疱疹病毒载体和埃巴病毒载体所组成的组。

95. 如权利要求 93 所述的方法，其中所述痘病毒载体是牛痘病毒载体。

96. 如权利要求 93 所述的方法，其中所述慢病毒载体是 pLL3.7。

97. 如权利要求 93 所述的方法，其中所述细小病毒载体是腺伴随病毒 (AAV)。

98. 如权利要求 8-10 或 78 中任一项所述的方法，其中所述 TrkB 激动剂通过选自由局部施用、眼内施用、玻璃体内施用、胃肠外施用、鞘内施用、硬膜下施用、皮下施用所组成的组的路线或通过胶囊植入物施用。

99. 如权利要求 98 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂中的至少一种被直接施用至眼中。

100. 如权利要求 98 所述的方法，其中所述 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂中的至少一种通过胶囊植入物被施用。

101. 如权利要求 1-6 或 78 中任一项所述的方法，其中所述细胞或神经元或者所述 CNS 神经元是感觉神经元。

102. 如权利要求 101 所述的方法，其中所述感觉神经元在视网膜神经节细胞 (RGC) 中。

103. 如权利要求 7-10 或 78 中任一项所述的方法，其中所述哺乳动物患有视神经病变。

104. 如权利要求 103 所述的方法，其中所述视神经病变是青光眼。

105. 如权利要求 101 所述的方法，其中所述感觉神经元是毛细胞。

106. 如权利要求 9 或 78 所述的方法，其中所述哺乳动物患有选自由 ALS、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默氏病、帕金森病、糖尿病性神经病变、中风和听力损失所组成的组的疾病或病症。

107. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述 LINGO-1 抗体是 Li33。

LINGO-1 和 TrkB 拮抗剂的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及神经学、神经生物学、分子生物学和药理学。更特别地，本发明涉及使用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂促进神经元存活和再生的方法。此外，本发明涉及使用 LINGO-1 拮抗剂治疗压力诱导的视神经病变的方法。本发明还通常涉及使用 LINGO-1 拮抗剂增加 TrkB 活性并抑制 JNK 通路信号转导的方法。

背景技术

[0002] 视神经病变是包括各种临床表现和病因的一组眼部疾病。青光眼是示例性的视神经病变，其包括在视神经上的病理变化，视神经乳头盘 (optic disk) 可见以及相应的视野减小，如果不治疗会导致失明。青光眼与眼内压增加有关，但也涉及其他因素。

[0003] 目前对青光眼的治疗旨在减少眼内压。医学治疗包括减少眼内液的产生或增加眼内液的流出的局部眼用滴剂或口服药物。然而对于青光眼的这些药物治疗有时伴随显著的副作用，例如头痛、视觉模糊、变应性反应、由心肺并发症导致的死亡以及与其他药物的可能的相互作用。也使用手术治疗，但是它们也具有许多缺点以及并不大的成功率。

[0004] 因此，有对另外的用于压力引起的视神经病变（包括青光眼和由视网膜神经节细胞 (RGC) 的变性表征的其他病况）的治疗方法的需求。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明是以神经元中 LINGO-1 与 TrkB 相互作用并抑制 TrkB 的发现为基础的。眼内高压后，TrkB 配体脑源性神经营养因子 (BDNF) 被上调。BDNF 促进 TrkB 磷酸化和细胞存活信号转导通路的活化。然而在眼内高压后，LINGO-1 也被上调。本文所描述的实验使用 LINGO-1 拮抗剂以显示 LINGO-1 抑制 TrkB 的磷酸化和活化，由此抑制细胞存活信号转导通路。本文描述的实验还显示 LINGO-1 促进与细胞死亡有关的 JNK 信号转导通路的活性。因此 LINGO-1 的拮抗剂和 TrkB 的激动剂促进细胞存活。

[0007] 以这些发现为基础，本发明通常涉及通过施用 LINGO-1 拮抗剂抑制 LINGO-1-TrkB 相互作用的方法。本发明还涉及通过施用 LINGO-1 拮抗剂促进 TrkB 磷酸化和 TrkB 信号转导的方法以及抑制 JNK 磷酸化和 JNK 信号转导的方法。而且，本发明涉及通过施用 LINGO-1 拮抗剂促进视网膜神经节细胞存活或者治疗压力诱导的视神经病变的方法。此外，本发明涉及通过施用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂促进神经元细胞存活的方法。在某些实施方式中，本发明涉及通过施用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂治疗与神经元细胞死亡相关的病况的方法。

[0008] 在某些实施方式中，本发明包括抑制细胞中 LINGO-1 和 TrkB 相互作用的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。在其他的实施方式中，本发明包括促进细胞中 TrkB 磷酸化或 TrkB 通路信号转导的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。在某些其他的实施方式中，本发明包括促进 TrkB 磷酸化的方法，其包括将 CNS 神经元与 LINGO-1 拮抗剂接触。

[0009] 在某些实施方式中，本发明包括促进细胞中 JNK 磷酸化的方法，其包括将表达

LINGO-1 和 JNK 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。在其他实施方式中，本发明提供抑制 JNK 磷酸化的方法，其包括将 CNS 神经元与 LINGO-1 拮抗剂接触。

[0010] 在某些实施方式中，本发明包括促进处于死亡危险的神经元存活的方法，其包括将神经元与有效量的 INGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂接触。

[0011] 在其他的实施方式中，本发明包括促进显示压力诱导的视神经病变的体征或症状的哺乳动物中视网膜神经节细胞存活的方法，其包括向需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂和载体。本发明还包括治疗与神经元细胞死亡相关的疾病或病症的方法，其包括向需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂。在一些实施方式中，哺乳动物已经被确诊为青光眼。

[0012] 在上文的方法的不同实施方式中，TrkB 激动剂可以是增加 TrkB 促进神经元存活的能力的任何分子。在某些实施方式中，TrkB 激动剂选自由 TrkB 激动剂化合物、TrkB 激动剂多肽、TrkB 激动剂抗体或其片段、TrkB 激动剂多核苷酸、TrkB 适体或者两种或更多种 TrkB 激动剂的组合所组成的组。

[0013] 在某些实施方式中，TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂化合物。本发明的某些 TrkB 激动剂化合物包括但不限于 L-783,281 腺苷和 CGS21680。此外，TrkB 激动剂化合物可以是模拟神经营养蛋白的决定 性区域的小分子。例如，小分子可决定性地为 BDNF β-转角环（β-turn loop）的模拟物。可根据本发明使用的小分子模拟物的特定的实例公开于美国公开申请第 2007/0060526A1 号，其通过引用全文引入本文。

[0014] 在某些实施方式中，TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂多肽。本发明的某些 TrkB 激动剂多肽包括但不限于 BDNF、NT-3 和 NT-4/5。在某些实施方式中，TrkB 激动剂多肽包含 SEQ ID NO:4。在一些实施方式中，TrkB 激动剂是包含非 TrkB- 激动剂异源多肽或聚合物的融合多肽或轭合物。在一些实施方式中，非 TrkB- 激动剂多肽或聚合物选自由聚乙二醇、1- 酰基 - 甘油衍生物和抗体 Ig 肽、血清白蛋白肽、靶向肽、报告肽和促进纯化的肽所组成的组。在一些实施方式中，抗体 Ig 肽是铰链和 Fc 肽。

[0015] 在可选择的实施方式中，TrkB 激动剂是与 TrkB 多肽结合的抗体或其片段。本发明的方法中使用的 TrkB 激动剂抗体包括但不限于 6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12、29D7。

[0016] 在其他的实施方式中，TrkB 激动剂是 TrkB 激动剂多核苷酸，例如编码肽或蛋白的多核苷酸，或适体。

[0017] 在另外的实施方式中，TrkB 激动剂是 TrkB 适体。TrkB 适体是结合 TrkB 并促进 TrkB 增加神经元存活的能力的小的多核苷酸。

[0018] 在上文方法的不同实施方式中，LINGO-1 拮抗剂可以是干扰 LINGO-1 负调节神经元存活和 / 或与 TrkB 结合和 / 或抑制或减少 TrkB 磷酸化的能力的任何分子。在某些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂选自由 LINGO-1 拮抗剂多肽、LINGO-1 抗体或其片段、LINGO-1 拮抗剂多核苷酸（例如 RNA 干扰）、LINGO-1 适体或者两种或更多种 LINGO-1 拮抗剂的组合所组成的组。

[0019] 在某些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂多肽是可溶的 LINGO-1 多肽。本发明的某些可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含或缺少下列结构域中的一个或多个的可溶的 LINGO-1 多肽：(i)LINGO-1 富含亮氨酸的重复序列 (LRR) 结构域，(ii)LRR 结构域 C- 端的 LINGO-1 碱性区，和 (iii)LINGO-1 免疫球蛋白 (Ig) 结构域。在一些实施方式中，可溶的 LINGO-1 多

肽缺少 LINGO-1Ig 结构域、LINGO-1LRR 结构域、跨膜结构域和胞质结构域中的一个或多个。本发明的另外的 LINGO-1 可溶多肽包括缺乏跨膜结构域和胞质结构域的多肽。在一些实施方式中，可溶的 LINGO-1 多肽包含 LINGO-1LRR 结构域但缺乏 LINGO-1Ig 结构域、LINGO-1 碱性区、跨膜结构域和胞质结构域。在一些实施方式中，可溶的 LINGO-1 多肽包含 SEQ ID NO：2 的 34-532 或 SEQ ID NO:2 的 36-532 氨基酸残基。

[0020] 在一些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂是包含非 LINGO-1 拮抗剂异源多肽的融合多肽。在一些实施方式中，非 LINGO-1 拮抗剂多肽选自由抗体 Ig 多肽、血清白蛋白多肽、靶向多肽、报告多肽和促进纯化的多肽组成的组。在一些实施方式中，抗体 Ig 多肽是铰链和 Fc 多肽。

[0021] 在可选择的实施方式中，LINGO-1 拮抗剂是与包含下列 LINGO-1 结构域中的一个或多个的 LINGO-1 多肽结合的抗体或其片段：(i)LINGO-1 富含亮氨酸的重复序列 (LRR) 结构域，(ii)LRR 结构域 C- 端的 LINGO-1 碱性区，和 (iii)LINGO-1 免疫球蛋白 (Ig) 结构域。另外，LINGO-1 拮抗剂抗体或其片段特异地结合含有如本文所描述的 LINGO-1 多肽片段的多肽中的表位。在另外的实施方式中，LINGO-1 拮抗剂抗体或其片段选自由 201 ′、3A3、3A6、3B5、1A7、1D5、1G7、2B10、2C11、2F3、3P1B1.1F9、3P1D10.2C3、3P1E11.3B7、3P2C6.3G10.2H7、3P2C9.2G4、3P4A6.1D9、3P4A1.2B9、 3P4C2.2D2、3P4C5.1D8、3P4C8.2G9、6P4F4.1Ds、6P4F4.1F9、7P1D5.1G9、1B6.4、2C7.2、2D6.1、2F7.3、2H3.2、3C11.1、3E3.1、3H11.2、3G8.1、2B8.1、3B5.230-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)、Li13、Li32、Li33、Li34、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)、1968(L1a.13)、3011、3012、3013、3418、3422、3562、D05、D07、D08、D10 和 D11 组成的组。LINGO-1 拮抗剂可以是这些抗体中的任一种的抗原结合片段或者两种或更多种抗体或其片段的组合。

[0022] 在其他的实施方式中，LINGO-1 拮抗剂是 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸，例如反义多核苷酸、适体、核酶、小干扰 RNA(siRNA) 或小发夹 RNA(shRNA)。

[0023] 在另外的实施方式中，LINGO-1 拮抗剂是 LINGO-1 适体。LINGO-1 适体是结合 LINGO-1 和干扰 LINGO-1 与 TrkB 相互作用和 / 或促进或增加 TrkB 磷酸化的小的多肽或多核苷酸。

[0024] 在上文方法的一些实施方式中，TrkB 激动剂和 / 或 LINGO-1 拮抗剂通过包含下列步骤的方法施用：(a) 向 CNS 神经元引入通过与表达控制序列可操作连接的编码 TrkB 激动剂和 / 或 LINGO-1 拮抗剂的多核苷酸；和 (b) 允许所述 TrkB 激动剂和 / 或 LINGO-1 拮抗剂的表达。在一些实施方式中，CNS 神经元是在哺乳动物中并且所述引入包括 (a) 向所述哺乳动物施用通过与表达控制序列可操作连接的编码 TrkB 激动剂和 / 或 LINGO-1 拮抗剂的多核苷酸。在一些实施方式中，培养的宿主细胞来源于有待被治疗的哺乳动物。在某些实 施方式中，多核苷酸通过转染、电穿孔、病毒转导或直接的显微注射被引入宿主细胞或 CNS 神经元。

[0025] 在某些实施方式中，TrkB 激动剂和 / 或 LINGO-1 拮抗剂是可在疾病、病症或损伤的部位或附近向哺乳动物施用的多核苷酸。在一些实施方式中，多核苷酸作为表达载体被施

用。在一些实施方式中，载体是病毒载体，其选自由腺病毒载体、甲病毒载体、肠病毒载体、瘟病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、疱疹病毒载体（例如埃巴病毒载体(Epstein Barr viral vector)或单纯疱疹病毒载体）、乳多空病毒载体、痘病毒载体（例如牛痘病毒载体）和细小病毒组成的组。在一些实施方式中，载体通过选自由局部施用、眼内施用和胃肠外施用（例如静脉内的、动脉内的、肌肉内的、心内的、皮下的、真皮内的、鞘内的、腹膜内的）所组成的组的路线施用。

附图说明

[0026] 图 1A 和 B- 概括实施例中使用的 2 周（图 1A）和 4 周（图 1B）的实验性眼内高压模型的图示。

[0027] 图 2- 显示在视网膜裱片 (flat-mounted retinas) 中定量视网膜神经节细胞 (RGC) 所用的切片的图示。在 200×200 μ m^2 的目镜网格下沿着每一象限的中线从视神经盘 (optic disc) 开始至边缘处以 500 μ m 的间隔定量 RGC。

[0028] 图 3- 激光凝固前（顶部）和之后立即（底部）的房水静脉图像。

[0029] 图 4A 和 B- 正常和受伤的大鼠视网膜切片中 LINGO-1 的表达。

[0030] 图 5- 正常和受伤的大鼠视网膜中 LINGO-1 的蛋白质印迹和其定量。

[0031] 图 6- 用 PBS、对照蛋白、抗 LINGO-1 抗体 (1A7) 或可溶的 LINGO-1(LINGO-1-Fc) 治疗的左眼（正常的）和右眼（受伤的）中的眼内压测量。

[0032] 图 7A 和 B- 受伤并用 PBS、对照蛋白、1A7 或 LINGO-1-Fc 治疗两周和四周后存活的 RGC 的数目（图 7A）和密度（图 7B）的定量。

[0033] 图 8A 和 B- 用 PBS、LINGO-1-Fc 或 1A7 治疗的正常的动物和受伤的动物中 RGC（图 8A）和内网层的细胞（图 8B）中的微结构的图像。

[0034] 图 9- 体外生长并暴露于对照蛋白、LINGO-1-Fc、BDNF 和对照蛋白或 BDNF 和 LINGO-1-Fc 的存活的 RGC 的定量。

[0035] 图 10- 正常视网膜中、受伤但没有治疗的视网膜中和受伤并用 PBS、LINGO-1-Fc 或 1A7 治疗的视网膜中的 BDNF 的蛋白质印迹和其定量。

[0036] 图 11A 和 B- 用 PBS、抗 BDNF 抗体、1A7、1A7 和抗 BDNF 抗体、LINGO-1-Fc 或 LINGO-1-Fc 和抗 BDNF 抗体治疗的受伤的眼睛中 RGC 的数目（图 11A）和密度（图 11B）的定量。

[0037] 图 12A 和 B- 来自共表达 TrkB 和 LINGO-1 的 293 细胞的抗 LINGO-1 免疫沉淀物中 TrkB 和 LINGO-1 的蛋白质印迹（图 12A）。来自具有和不具有 LINGO-1 表达并且具有和不具有 BDNF 刺激的细胞的抗 TrkB 免疫沉淀物中磷酸 -TrkB、总 TrkB 和 LINGO-1 的 蛋白质印迹和其定量（图 12B）。

[0038] 图 13A 和 B- 来自正常的和受伤的视网膜溶解产物的抗 TrkB、抗 LINGO-1 和抗对照蛋白免疫沉淀物中 LINGO-1 的蛋白质印迹（图 13A）。视网膜切片中的 LINGO-1 和磷酸 -TrkB 免疫染色（图 13B）。

[0039] 图 14A 和 B- 用 PBS、LINGO-1-Fc 或 1A7 治疗的正常的眼睛和受伤的眼睛中的磷酸 -TrkB 和总 TrkB 的蛋白质印迹和其定量（图 14A）。用 BDNF、BDNF 和 LINGO-1-Fc 或 BDNF 和 1A7 治疗的正常的眼睛和受伤的眼睛中的磷酸 -TrkB 和总 TrkB 的蛋白质印迹（图 14B）。

[0040] 图 15- 用或不用 LINGO-1-Fc 治疗的正常的眼睛和受伤的眼睛中的磷酸 -Akt 和总 Akt 的蛋白质印迹和其定量。

[0041] 图 16- 视网膜切片中的 pAkt 免疫染色。

[0042] 图 17A 和 B- 用 PBS、LY294002(P13K/Akt 通路的抑制剂)、LINGO-1-Fc 或 LY294002 和 LINGO-1-Fc 治疗的受伤的眼睛中 RGC 的数目 (图 17A) 和密度 (图 17B) 的定量。

[0043] 图 18- 用 LINGO-1-Fc 和 LY294002 或 LY294002 单独治疗的左眼 (正常的) 和右眼 (受伤的) 中的眼内压测量。

[0044] 图 19- 正常的眼睛和用 PBS、LINGO-1-Fc 和 1A7 治疗的受伤的眼睛中的磷酸 -JNK-2、磷酸 -JNK-1、总 JNK-2 和总 JNK-1 的蛋白质印迹和其定量。

[0045] 图 20- 显示建议的分子机制的图示。眼内压的升高导致 LINGO-1 和 BDNF 的水平增加。BDNF 促进 TrkB 的磷酸化和细胞 存活信号转导通路的活化,但是 LINGO-1 抑制这一活性。LINGO-1 拮抗剂例如 1A7 或 LINGO-1-Fc 通过干扰 LINGO-1 阻止响应于 BDNF 信号转导的 TrkB 磷酸化的能力来促进细胞存活。

[0046] 图 21- 用 PBS 或 LINGO-1-Fc 治疗的正常的眼睛和受伤的眼睛中的 GTP-RhoA 和总 RhoA 的蛋白质印迹和其定量。

[0047] 发明详述

[0048] 定义

[0049] 除非另外说明,否则本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同含义。矛盾的情况下,以本申请包括的定义为准。除非内容上另外要求,否则单数的术语将包括复数形式而复数的术语将包括单数形式。本文提及的所有出版物、专利和其他参考文献为所有目的通过引用全文并入本文,如同明确并单独地指示每个单独的出版物或专利申请通过引用并入本文。

[0050] 尽管与本文描述的那些相似或等同的方法和材料可用来实行或检测本发明,但下文描述了适合的方法和材料。材料、方法和实施例仅是示例性的并不意为限制性的。从详细的描述和权利要求书来看本发明的其他特征和优点将是明显的。

[0051] 为了进一步定义本发明,提供了下列术语和定义。

[0052] 应注意术语“一”(a) 或“一”(an) 实体是指一个或多个那种实体 ;例如“免疫球蛋白分子”应理解为代表一个或多个免疫球蛋白分子。像这样,术语“一”(a)(或“一”(an))、“一个或多个”和“至少一个”在本文可互换使用。

[0053] 整个说明书和权利要求中,词语“包含”(comprise) 或其变化形式例如“包含”(comprises) 或“包含”(comprising) 表明包括所叙述的任何整体或整体的组而不排除任何其他的整体或整体的组。术语“包含”是包含的或开放的,并不排除另外的、未叙述的元素或方法步骤。短语“主要由 ..... 构成”表明包括特定的材料或步骤以及不实质上影响权利要求所要求的本发明的基本的和新的特征的那些材料或步骤。如本文所用的,术语“组成”仅指表明的材料或方法步骤。

[0054] 如本文所用的“治疗有效量”是指以必要的剂量和时间段对获得所期望的治疗结果有效的量。治疗结果可以是例如,症状的减轻、延长的存活、改善的活动性以及类似结果。治疗结果不必为“治愈”。

[0055] 如本文所用的,术语“治疗”(treatment) 或“治疗”(treating) 是指向动物施用药

剂以便改善或减轻疾病的症状。此外，术语“治疗”(treatment) 或“治疗”(treating) 是指向动物施用药剂以阻止疾病的发展。

[0056] 如本文所用的，“预防有效量”是指以必要的剂量和时间段对获得所期望的预防结果有效的量。通常，由于预防剂量在疾病之前或疾病的早期用于受治疗者，预防有效量将少于治疗有效量。

[0057] 如本文所用的，“多核苷酸”可包括全长 cDNA 序列的核酸序列并且可包括核酸序列的未翻译的 5’和 3’序列、编码区或者片段或变体。多核苷酸可包括任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸，所述多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或修饰的 RNA 或 DNA。例如，多核苷酸可包括单链或双链 DNA、为单链区和双链区的混合物的 DNA、单链或双链 RNA、和为单链区和双链区的混合物的 RNA、含有 DNA 和 RNA 的杂交分子，所述杂交分子中的 DNA 和 RNA 可以是单链的或通常为双链的或单链区和双链区的混合物。此外，多核苷酸可包括包含 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 两者的三链区。多核苷酸还可含有一种或多种修饰的碱基或为了稳定性或其他原因而修饰的 DNA 或 RNA 主链。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基或不常见碱基例如肌苷。可对 DNA 和 RNA 进行各种修饰；因此“多核苷酸”包括化学修饰、酶促修饰或代谢修饰的形式。

[0058] 在本发明中，“多肽”可包括通过肽键或修饰的肽键即肽电子等排体彼此连接的氨基酸并且可包括 20 种基因编码的氨基酸之外的氨基酸（即非天然存在的氨基酸）。如描述本发明所用的，术语“肽”和“多肽”可互换使用。本发明的多肽可通过天然过程例如翻译后加工或通过本领域中熟知的化学修饰技术来修饰。在教科书、更加详细的专题论文以及大量的研究文献中描述了这种修饰。修饰可在多肽中任何地方发生，包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基端。应当理解的是在给定的多肽中相同类型的修饰可以相同或不同的程度在多个位点存在。并且，给定的多肽可包含许多类型的修饰。多肽可以是支链的，例如作为泛素化的结果，并且它们可以是具有或不具有分支的环状的。环状的、支链的和支链环状的多肽可从翻译后的天然过程获得或通过合成的方法制备。修饰包括乙酰化、酰化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ 羧基化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移 RNA 介导的向蛋白加入氨基酸例如精氨酰化、和泛素化（参见，例如Proteins-Structure and MolecularProperties（蛋白结构和分子特性）第 2 版，T.E.Creighton，W.H. Freeman and Company，New York(1993)；Posttranslational CovalentModification of Proteins（蛋白的翻译后共价修饰），B.C.Johnson 编辑，Academic Press，New York，第 1-12 页 (1983)；Seifter 等人，MethEnzymol 182：626-646(1990)；Rattan 等人，Ann NY Acad Sci 663：48-62(1992)）。

[0059] 术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”在指本发明的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂时包括保持至少一些抑制 LINGO-1 活性或促进 TrkB 活性的能力的任何拮抗剂或激动剂分子。只要 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂仍起到其作用，如本文所描述的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂可无限制地包括片段、变体或衍生物分子。本发明的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽可包括 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂蛋白水解片段、缺失片段、和特别是当递送

至动物时更容易到达作用位点的片段。多肽片段还包括包含天然多肽的抗原表位或免疫表位（包括线性以及三维表位）的多肽的任何部分。本发明的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽可包含变异的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂区（包括如上文所描述的片段），以及由于氨基酸取代、缺失或插入而具有变化的氨基酸序列的多肽。变体可天然存在，例如等位基因变体。通过“等位基因变体”意指占据生物体的染色体上给定的基因座的基因的不同形式。Genes II（基因 II），Lewin，B. 编辑，John Wiley & Sons，New York（1985）。非天然存在的变体可使用领域已知的诱变技术产生。LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽可包含保守的或非保守的氨基酸取代、缺失或添加。本发明的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂还可包括衍生物分子。例如，本发明的 LINGO-1 或 TrkB 激动剂多肽还可包括已被改变的 LINGO-1 或 TrkB 激动剂区以便表现在天然多肽未发现的另外的特征。实例包括融合蛋白和蛋白轭合物。

[0060] 在本发明中，“多肽片段”是指 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽 的短的氨基酸序列。蛋白片段可以是“独立式的”或包含在所述片段形成其部分或区域的更大的多肽中。本发明的多肽片段的代表性的实例包括例如包含长度为约 5 个氨基酸、约 10 个氨基酸、约 15 个氨基酸、约 20 个氨基酸、约 30 个氨基酸、约 40 个氨基酸、约 50 个氨基酸、约 60 个氨基酸、约 70 个氨基酸、约 80 个氨基酸、约 90 个氨基酸和约 100 个氨基酸或者更多的片段。

[0061] 在一些实施方式中，用于本文公开的方法中的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂是“抗体”或“免疫球蛋白”分子或其免疫特异性片段，例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或以与抗体分子类似的方式结合抗原的工程抗体分子或片段。术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文互换使用。此外，用于本发明方法中的免疫球蛋白分子也描述为“免疫特异性”或“抗原特异性”或“抗原结合”分子，并可互换使用以指抗体分子和其片段。抗体或免疫球蛋白包含至少重链的可变结构域并且通常包含至少重链和轻链的可变结构域。脊椎动物系统中基本的免疫球蛋白结构是相对充分理解的。参见例如 Harlow 等人，Antibodies：A Laboratory Manual（抗体实验手册），（Cold Spring Harbor Laboratory Press，第二版 . 1988），其通过引用并入本文。

[0062] 如下文更详细地讨论的，术语“免疫球蛋白”包括生物化学上区分的五大类型的多肽。所有五个类型清楚地在本发明的范围中，下列讨论将通常针对 IgG 类的免疫球蛋白分子。关于 IgG，标准的免疫球蛋白分子包含两个相同的分子量约 23,000 道尔顿的轻链多肽和两个相同的分子量 53,000-70,000 的重链多肽。四个链通常通过二硫键以“Y”构型连接，其中轻链托住起始于“Y”的开口处并且持续整个可变区的重链。

[0063] 重链和轻链分为结构和功能同源的区。就其功能使用术语“恒 定的”和“可变的”。在这一点上，应当理解的是轻链的可变结构域（V_L）和重链的可变结构域（V_H）部分确定抗原识别和特异性。相反，轻链的恒定区（C_L）和重链的恒定结构域（C_H1、C_H2 或 C_H3）赋予重要的生物学特性，例如分泌、经胎盘的移动性、Fc 受体结合、补体结合和类似特性。按照惯例，恒定区结构域的编号随它们变得离抗原结合位点或抗体的氨基端更远而增加。N 端部分是可变区而 C- 端部分是恒定区；C_H3 和 C_L 结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

[0064] 轻链分为 kappa 或 lambda（κ，λ）。每种重链类型可与 κ 或 λ 轻链结合。通常，当免疫球蛋白通过杂交瘤、B 细胞或遗传工程宿主细胞产生时，轻链和重链彼此共价结合并且两个重链的“尾”部通过共价的二硫键合或非共价键合彼此结合。在重链中，氨基酸序列从位于 Y 构型的叉状末端的 N- 端延伸至位于每条链的底部的 C- 端。本领域技术人员将理

解的是，重链分为 gamma、mu、alpha、delta 或 epsilon（γ、μ、α、δ、ε），其中有一些亚类（例如 γ1-γ4）。重链的性质决定抗体的“类型”分别为 IgG、IgM、IgA、IgG 或 IgE。免疫球蛋白亚类（同种型）例如 IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1 等也是充分表征的并且已知赋予功能特化。根据本公开内容，这些类型和同种型中的每一个的修饰形式对本领域技术人员来说是容易辨别的，并且因此在本发明的范围内。

[0065] 如上文所表明的，可变区允许抗体选择性地识别并特异地结合抗原上的表位。也就是说，抗体的 V_L 结构域和 V_H 结构域组合形成定义三维的抗原结合位点的可变区。这一四级抗体结构形成存在于 Y 的每个臂末端的抗原结合位点。更具体地，抗原结合位点由在 V_H 和 V_L 链中的每一个上的三个互补决定区 (CDR) 界定。在一些实例，例如一些来源于骆驼物种的免疫球蛋白分子或以骆驼免疫球蛋白为基础工程化的免疫球蛋白分子中，完整的免疫球蛋白分子可 仅由重链组成，没有轻链。参见例如 Hamers-Casterman 等人，Nature363：446-448(1993)。

[0066] 在天然存在的抗体中，存在于每个抗原结合结构域中的六个“互补决定区”或“CDR”是短的、不连续的氨基酸序列，其当抗体在水环境中呈现其三维构型时特异地放置以形成抗原结合结构域。称为“框架”区的抗原结合结构域中其余的氨基酸显示出较小的分子间变异性。框架区主要采用 β-折叠构型而 CDR 形成连接并且在某些情况下形成部分 β-折叠结构的环。因此框架区起到形成提供通过链间的非共价反应以正确的方向放置 CDR 的支架的作用。通过所放置的 CDR 形成的抗原结合结构域界定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这一互补的表面促进抗体与其同源表位的非共价结合。对于任何给定的重链或轻链可变区来说，分别构成 CDR 和框架区的氨基酸可由本领域的普通技术人员容易地鉴定，因为它们已经被明确地定义（参见“Sequences of Proteins of ImmunologicalInterest（免疫上重要蛋白的序列）”Kabat，E. 等人，U.S.Departmentof Health and Human Services，(1983)； 和 Chothia 和 Lesk，J.Mol.Biol.，196：901-917(1987)，其都通过引用全文并入本文）。

[0067] 然而，在骆驼物种中，称为 V_HH 的重链可变区形成整个 CDR。骆驼 V_HH 可变区和源自普通抗体的可变区 (V_H) 之间的主要差异包括 (a) 与 V_HH 中相应的区相比 V_H 的轻链接触面的疏水氨基酸更多，(b)V_HH 中的 CDR3 较长，以及 (c) 在 V_HH 中的 CDR1 和 CDR3 之间频繁出现二硫键。

[0068] 在一些实施方式中，本发明的方法中使用的抗原结合分子包含抗体分子的至少一个重链或轻链 CDR。在另一个实施方式中，本发明的方法中使用的抗原结合分子包含至少两个来自一个或多个抗体分子的 CDR。在另一个实施方式中，本发明的方法中使用的抗原 结合分子包含至少三个来自一个或多个抗体分子的 CDR。在另一个实施方式中，本发明的方法中使用的抗原结合分子包含至少四个来自一个或多个抗体分子的 CDR。在另一个实施方式中，本发明的方法中使用的抗原结合分子包含至少五个来自一个或多个抗体分子的 CDR。在另一个实施方式中，本发明的方法中使用的抗原结合分子包含至少六个来自一个或多个抗体分子的 CDR。包含可包括在主题抗原结合分子中的至少一个 CDR 的示例性的抗体分子是本领域已知的并且本文描述了示例性分子。

[0069] 本发明的方法中使用的抗体或其免疫特异性片段包括但不限于多克隆的、单克隆、多特异性的、人类的、人源化的、灵长类化的或嵌合的抗体，单链抗体、表位结合片段例

如，Fab、Fab′ 和 F(ab′)2、Fd、Fv、单链 Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fv(sdFv)、包含 VL 或 VH 结构域的片段、由 Fab 表达文库产生的片段和抗个体基因型（抗 Id）抗体（包括例如本文所公开的结合分子的抗 Id 抗体）。ScFv 分子是本领域中已知的并且被描述于例如美国专利 5,892,019 中。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何型（例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY）、类（例如 IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1 和 IgA_2）或亚类。

[0070] 包括单链抗体的抗体片段可包含单独或与下列的整体或部分组合的可变区：铰链区、重链的 C_H1、C_H2 和 C_H3 结构域、或轻链的 C_L。本发明还包括的是还包含可变区与铰链区、C_H1、C_H2、C_H3 或 C_L 结构域的任何组合的抗原结合片段。本文公开的方法中使用的抗体或其免疫特异性片段可来自包括鸟类和哺乳动物的任何动物来源。抗体可以是人类、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马、或鸡抗体。在另一个实施方式中，可变区在来源上可以是 condricthoid（例如来自鲨）。如本文所用的，“人类”抗体包括具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体，并包括从人类免疫球蛋白 文库或从以一种或多种人类免疫球蛋白转基因并且不表达内源免疫球蛋白的动物分离的抗体，如下文描述的并且例如 Kucherlapati 等人的美国专利第 5,939,598 号中的。这种抗体还包括含有一个或多个氨基酸取代的变体。

[0071] 如本文所用的，术语“重链部分”包括来源于免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含下列中的至少一个：C_H1 结构域、铰链（例如上、中和 / 或下铰链区）结构域、C_H2 结构域、C_H3 结构域或其变体或片段。例如，重链部分可包括包含 C_H1 结构域的多肽链；包含 C_H1 结构域、铰链结构域的至少一部分和 C_H2 结构域的多肽链；包含 C_H1 结构域和 C_H3 结构域的多肽链；包含 C_H1 结构域、铰链结构域的至少一部分和 C_H3 结构域的多肽链；或包含 C_H1 结构域、铰链结构域的至少一部分、C_H2 结构域和 C_H3 结构域的多肽链。重链部分也可包括包含含有 C_H3 结构域的多肽链的多肽。此外，本发明中使用的结合多肽可缺少 C_H2 结构域的至少一部分（例如 C_H2 结构域的全部或部分）。如上文所展示的，本领域普通技术人员应理解的是，这些结构域（例如重链部分）可被修饰以便它们在氨基酸序列上不同于天然存在的免疫球蛋白分子。

[0072] 在本文所公开的方法中使用的一些 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段中，多聚体的一个多肽链的重链部分可与多聚体的另一多肽链上的那些相同。可选择地，本发明的方法中使用的含有重链部分的单体是不相同的。例如每个单体可包含不同的靶向结合位点，形成例如双特异性抗体。

[0073] 在本文所公开的方法中使用的结合多肽的重链部分可来源于不同的免疫球蛋白分子。例如，多肽的重链部分可包含来源于 IgG_1 分子的 C_H1 结构域和来源于 IgG_3 分子的铰链区。在另一个实例中，重链部分可包含部分来源于 IgG_1 分子并且部分来源于 IgG_3 分子的铰链区。在另一个实例中，重链部分可包含部分来源于 IgG_1 分子并且部分来源于 IgG_4 分子的嵌合的铰链区。

[0074] 如本文所用的，术语“轻链部分”包括来源于免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。轻链部分可包含 V_L 或 C_L 结构域的至少一个。

[0075] 编码来源于免疫球蛋白（例如免疫球蛋白重链部分或轻链部分）的多肽的非天然变体的分离的核酸分子可通过向免疫球蛋白的核苷酸序列引入一个或多个核酸取代、添加或缺失，以致一个或多个氨基酸取代、添加或缺失被引入编码的蛋白来产生。通过标准技术

例如定点诱变和PCR介导的诱变可引入突变。保守的氨基段取代可在一个多个非必需氨基酸残基进行。

[0076] 还以对本发明的多肽的结合亲和力的方式描述或详细说明本文公开的方法中使用的抗体或其免疫特异性片段。在某些实施方式中，结合亲和力是具有小于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、5×10^{-9}M、10^{-9}M、5×10^{-10}M、10^{-10}M、5×10^{-11}M、10^{-11}M、5×10^{-12}M、10^{-12}M、5×10^{-13}M、10^{-13}M、5×10^{-14}M、10^{-14}M、5×10^{-15}M或10^{-15}M的解离常数或Kd的那些。

[0077] 如本文描述的，本文公开的方法中使用的抗体或其免疫特异性片段作为LINGO-1的拮抗剂或TrkB的激动剂起作用。例如，本发明的方法中使用的抗体可作为阻滞或抑制LINGO-1多肽的抑制活性的拮抗剂或作为促进TrkB的活性的激动剂起作用。

[0078] 如本文所用的，术语“嵌合抗体”将适用于意指其中免疫反应性区或位点获得或来源于一种物种而恒定区（依照本发明其是完整的、部分的或修饰的）获得于另一种物种的任何抗体。在某些实施方式中，靶向结合区或位点将来自非人类来源（例如小鼠或灵长类）而恒定区是人类的。

[0079] 如本文所用的，术语“工程化抗体”是指这样的抗体，其中重链或轻链或者两者中的可变结构域通过来自已知特异性的一个或多个CDR的至少部分替代并且如果必要的话通过部分的框架区替代和序列变化而改变。虽然CDR可来源于与框架区源自的抗体相同类或者甚至亚类的抗体，设想CDR将来源于不同类的抗体或来自来源于不同物种的抗体。其中来自已知特异性的非人类抗体的一个或多个“供体”CDR被嫁接到人类重链或轻链框架区中的工程化抗体在本文称为“人源化抗体”。不必用来自供体可变区的完整CDR替代所有的CDR以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一个。相反地，只需要转移对维持靶向结合位点的活性来说必要的那些残基。考虑到在例如美国专利第5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370中展示的解释，通过进行常规实验或通过试错试验以获得功能性工程化或人源化抗体在本领域技术人员的能力之内。

[0080] 如本文所用的，术语“连接的”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语是指通过包括化学共轭或重组方法的任何方法将两个或更多个元件或成分连接在一起。“框内融合”是指将两个或更多个开放读码框(ORF)以保持原始ORF的正确读码框的方式连接以形成连续的更长的ORF。因此，所得的重组的融合蛋白是含有与由原始ORF编码的多肽（其片段天然不是正常地如此连接的）相符的两个或多个片段的单一的蛋白。尽管整个融合片段中读码框因此为连续的，但片段可以是物理上或空间上由例如框内连接序列分隔的。

[0081] 对于多肽来说，“线性序列”或“序列”是多肽中从氨基端到羧基端方向的氨基酸的顺序，其中序列中彼此相邻的残基在多肽的 一级结构中是连续的。

[0082] 如本文所用的术语“表达”是指DNA序列用于产生生物化学物质例如RNA或多肽的过程。所述过程包括细胞中功能性存在的基因的任何表现，包括但不限于基因敲除以及瞬时表达和稳定表达。其包括但不限于基因转录为信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)或任何其他的RNA产物以及这种mRNA翻译为多肽。如果最终所期望的产物是生物化学物质，表达包括生物化学物质和任何前体的产生。

[0083] “受治疗者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指期望对其诊断、预后或治疗的任何受治疗者，尤其是哺乳动物受治疗者。哺乳动物受治疗者包括但不限于人

类、家畜、农场动物、动物园动物、体育动物 (sport animals)、宠物动物例如犬、猫、豚鼠、仓鼠、兔、大鼠、小鼠 ;灵长类动物例如猿、猴、猩猩和黑猩猩 ;犬科动物例如狐狸和狼 ;猫科动物例如狮子和老虎 ;马科动物例如马、驴和斑马 ;食用动物例如牛、猪和绵羊 ;有蹄动物例如鹿和长颈鹿 ;熊等等。在一些实施方式中,哺乳动物是人类受治疗者。

[0084] 术语“RNA 干扰”或“RNAi”是指通过 siRNA 沉默或减少基因表达。其是在动物和植物中序列特异性的转录后的基因沉默过程,由在双链区与所沉默的基因同源的 siRNA 起始。基因可以是生物体内源或异源的,整合在染色体中或存在于没有整合至基因组中的转染载体中。基因的表达可以被完全或部分抑制。还可认为 RNAi 抑制了靶 RNA 的功能 ;靶 RNA 的功能可以是完全或部分的。

[0085] LINGO-1(Sp35/LRRN6)

[0086] 天然存在的人类 LINGO-1 是糖基化的神经系统特异的蛋白, 其由 614 个氨基酸 (SEQ ID NO :2) 组成。人类 LINGO-1 多肽含有由 14 个富含亮氨酸的重复序列组成的 LRR 结构域 (包括 N- 端帽和 C- 端帽)、Ig 结构域、跨膜区和胞质结构域。胞质结构域含有标准的酪氨酸磷酸化位点。此外,天然存在的 LINGO-1 蛋白含有信号序列、LRRCT 和 Ig 结构域之间的短的碱性区以及 Ig 结构域和胞质结构域之间的跨膜区。人类 LINGO-1 含有可选的翻译起始密码子,以致六种另外的氨基酸 (MQVSKR ;SEQ ID NO :7) 可在 LINGO-1 信号序列的 N- 端存在或不存在。根据氨基酸残基数目,以 SEQ IDNO :2 的序列为基础,表 1 列出了 LINGO-1 结构域和其他区。如本领域技术人员应理解的,下文所列的结构域的起始残基和终止残基可取决于确定结构域所使用的计算机建模程序或所使用的方法而变化。LINGO-1 多肽被更详细地表征于 PCT 公开第 WO2004/085648 号和美国公开专利申请第 2006/0009388A1 号中,其通过引用全文并入本文。

[0087] 表 1

[0088]

结构域或区	起始残基	终止残基
信号序列	1	33 或 35
LRRNT	34 或 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 或 416
碱性	415 或 417	424

[0089]

Ig	419	493

连接序列	494	551
跨膜	552	576
胞质	577	614

[0090] 已经在人类和大鼠中研究了 LINGO-1 的组织分布和发育中的表达。已经在实验动物（大鼠）模型中研究了 LINGO-1 生物学。如通过 RNA 印迹和免疫组化染色所测定的，大鼠 LINGO-1 的表达局限于神经系统神经元和脑少突胶质细胞。大鼠 LINGO-1mRNA 表达水平是发育上调节的，出生后不久即大约出生后第一天达到峰值。在大鼠脊索横切损伤模型中，如通过 RT-PCR 所测定的，在受伤的部位 LINGO-1 被上调。此外已经显示 LINGO-1 与 Nogo66 受体（Nogo 受体）相互作用。参见例如国际专利申请第 PCT/US2004/00832 号、PCT 公开第 WO2004/08564 号。

[0091] LINGO-1 是 Nogo 受体 -1-p75-Taj 神经营养蛋白受体络合物的另外的成分。参见 Mi 等人，Nat Neurosci. 7 :221-228(2004)，其通过引用并入本文。不像 Nogo 受体 1，当脊索中的成熟神经细胞暴露于外伤时，LINGO-1 基因表达增加，表明 LINGO-1 对 CNS 神经系统功能具有重要的生物学作用。同上（Id.）

[0092] 全长人类 LINGO-1 分子的核苷酸序列如下：

[0093] ATGCTGGCGGGGGGCGTGAGGAGCATGCCCAGCCCCCTCCTG

[0094] GCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTG

[0095] CTGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCCGCTGCGAGTGC

[0096] TCCGCCCAGGACCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTT

[0097] GTGGCAGTCCCCGAGGGCATCCCCACCGAGACGCGCCTGCTG

[0098] GACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCAACCAGGACGA

[0099] GTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA

[0100] GAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCCGGCGCCTTCAACAACCT

[0101] CTTCAACCTCCGGACGCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCCTGAA

[0102] GCTCATCCCGCTAGGCGTCTTCACTGGCCTCAGCAACCTGAC

[0103] CAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGTTATCCTGCTGGA

[0104] CTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGGT

[0105] TGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAG

[0106] CGGCCTCAACAGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCA

[0107] ACCTGACCTCCATCCCCACCGAGGCGCTGTCCCACCTGCACG

[0108] GCCTCATCGTCCTGAGGCTCCGGCACCTCAACATCAATGCCA

[0109] TCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCT

[0110] TGGAGATCTCCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCA

[0111] ACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACAC

[0112] ACTGCAATCTGACCGCTGTGCCCTACCTGGCCGTCCGCCACC

[0113] TAGTCTATCTCCGCTTCCTCAACCTCTCCTACAACCCCATCAG

[0114] CACCATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCA

[0115] GGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGC

[0116] CCTATGCCTTCCGCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGT

[0117] CTCTGGCAACCAGCTGACCACACTGGAGGAATCAGTCTTCCA

[0118] CTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCTGGACTCCAACCC

[0119] GCTGGCCTGCGACTGTCGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCCG

[0120] CTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCCACGTGCGCCAC

[0121] GCCCGAGTTTGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGA

[0122] TGTGCTACTGCCCAACTACTTCACCTGCCGCCGCGCCCGCAT

[0123] CCGGGACCGCAAGGCCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGGGCC

[0124] ACACGGTGCAGTTTGTGTGCCGGGCCGATGGCGACCCGCCGC

[0125] CCGCCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAG

[0126] CCAAGAGCAATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGC

[0127] TGGAGGTGCGCTACGCCCAGGTACAGGACAACGGCACGTAC

[0128] CTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAACGACTCCATGCCC

[0129] GCCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCGACTGGCCCCAT

[0130] CAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGC

[0131] GAGGGAGAGGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCCC

[0132] TTCGACATCAAGACCCTCATCATCGCCACCACCATGGGCTTC

[0133] ATCTCTTTCCTGGGCGTCGTCCTCTTCTGCCTGGTGCTGCTGT

[0134] TTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAACATC

[0135] GAGATCGAGTATGTGCCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAG

[0136] CTCCGCCGACGCGCCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATG

[0137] A(SEQ ID NO:1)。

[0138] 全长人类 LINGO-1 多肽的多肽序列如下：

[0139] MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLVLGSVLSGSATGCPPRCECSA

[0140] QDRAVLCHRKRFVAVPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF

[0141] PHLEELELNENIVSAVEPGAFNNLFNLRTLGLRSNRLKLIPLGVF

[0142] TGLSNLTKLDISENKIVILLDYMFQDLYNLKSLEVGDNDLVYISH

[0143] RAFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTEALSHLHGLIVLRLRHLNINAI

[0144] RDYSFKRLYRLKVLEISHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSITHCN

[0145] LTAVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSMLHELLRLQEIQLV

[0146] GGQLAVVEPYAFRGLNYLRVLNVSGNQLTTLEESVFHSVGNLE

[0147] TLILDSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFNRQQPTCATPEFVQGK

[0148] EFKDFPDVLLPNYFTCRRARIRDRKAQQVFVDEGHTVQFVCRA

[0149] DGDPPPAILWLSPRKHLVSAKSNGRLTVFPDGTLEVRYAQVQD

[0150] NGTYLCIAANAGGNDSMPAHLHVRSYSPDWPHQPNKTFAFISN

[0151] QPGEGEANSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVVLFCLVLLF

[0152] LWSRGKGNTKHNIEIEYVPRKSDAGIS SADAPRKFNMKMI(SEQ

[0153] ID NO:2)。

[0154] TrkB(NTRK2)

[0155] 神经营养蛋白是负责神经元的分化、存活和功能的高同源性生长因子小家族。在

哺乳动物中，已知的神经营养蛋白是神经生长因子 (NGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经营养因子 -3(NT-3)、神经营养因子 -4(NT-4)，还称为 NT-4/5 或 NT-5、神经营养因子 -6(NT-6) 和神经营养因子 -7(NT-7)(Barbacid，J.of Neurobiol.25 :1386-1403(1994) 和 Nilsson 等人 FEBS 424 :285-290(1998))。神 经营养蛋白结合两种受体类型，p75 神经营养蛋白受体 (p75NTR) 和酪氨酸激酶的 Trk 受体家族的三个成员 (哺乳动物中)(TrkA、TrkB 和 TrkC)。神经营养蛋白与 Trk 受体胞外结构域的结合起始信号传导通路。神经营养蛋白的结合导致受体的二聚化和自磷酸化。TrkB 的自磷酸化导致包括细胞分裂素活化的蛋白激酶 (MAPK)、磷脂酶 C- γ (PLC- γ) 和磷脂酰肌醇 -3 激酶 (PI3-K) 的信号转导通路的活化 (Yamada，J.Pharmacol.Sci.91 :267-270(2003))。

[0156] 下列核苷酸序列报道为人类 TrkB 受体的 mRNA 并且在 Genbank 中登录号为 NM_006180。

[0157] AAGACGGATTCTCAGACAAGGCTTGCAAATGCCCCGCAGCC

[0158] ATCATTTAACTGCACCCGCAGAATAGTTACGGTTTGTCACCC

[0159] GACCCTCCCGGATCGCCTAATTTGTCCCTAGTGAGACCCCGA

[0160] GGCTCTGCCCGCGCCTGGCTTCTTCGTAGCTGGATGCATATC

[0161] GTGCTCCGGGCAGCGCGGGCGCAGGGCACGCGTTCGCGCAC

[0162] ACCCTAGCACACATGAACACGCGCAAGAGCTGAACCAAGCA

[0163] CGGTTTCCATTTCAAAAAGGGAGACAGCCTCTACCGCGATTG

[0164] TAGAAGAGACTGTGGTGTGAATTAGGGACCGGGAGGCGTCG

[0165] AACGGAGGAACGGTTCATCTTAGAGACTAATTTTCTGGAGTT

[0166] TCTGCCCCTGCTCTGCGTCAGCCCTCACGTCACTTCGCCAGCA

[0167] GTAGCAGAGGCGGCGGCGGCGGCTCCCGGAATTGGGTTGGA

[0168] GCAGGAGCCTCGCTGGCTGCTTCGCTCGCGCTCTACGCGCTC

[0169] AGTCCCCGGCGGTAGCAGGAGCCTGGACCCAGGCGCCGCCG

[0170] GCGGGCGTGAGGCGCCGGAGCCCGGCCTCGAGGTGCATACC

[0171] GGACCCCCATTCGCATCTAACAAGGAATCTGCGCCCCAGAGA

[0172] GTCCCGGGAGCGCCGCCGGTCGGTGCCCGGCGCGCCGGGCC

[0173] ATGCAGCGACGGCCGCCGCGGAGCTCCGAGCAGCGGTAGCG

[0174] CCCCCCTGTAAAGCGGTTCGCTATGCCGGGGCCACTGTGAAC

[0175] CCTGCCGCCTGCCGGAACACTCTTCGCTCCGGACCAGCTCAG

[0176] CCTCTGATAAGCTGGACTCGGCACGCCCGCAACAAGCACCGA

[0177] GGAGTTAAGAGAGCCGCAAGCGCAGGGAAGGCCTCCCCGCA

[0178] CGGGTGGGGGAAAGCGGCCGGTGCAGCGCGGGGACAGGCAC

[0179] TCGGGCTGGCACTGGCTGCTAGGGATGTCGTCCTGGATAAGG

[0180] TGGCATGGACCCGCCATGGCGCGGCTCTGGGGCTTCTGCTGG

[0181] CTGGTTGTGGGCTTCTGGAGGGCCGCTTTCGCCTGTCCCACGT

[0182] CCTGCAAATGCAGTGCCTCTCGGATCTGGTGCAGCGACCCTT

[0183] CTCCTGGCATCGTGGCATTTCCGAGATTGGAGCCTAACAGTG

[0184] TAGATCCTGAGAACATCACCGAAATTTTCATCGCAAACCAGA

[0185] AAAGGTTAGAAATCATCAACGAAGATGATGTTGAAGCTTATG

[0186] TGGGACTGAGAAATCTGACAATTGTGGATTCTGGATTAAAAT

[0187] TTGTGGCTCATAAAGCATTTCTGAAAAACAGCAACCTGCAGC

[0188] ACATCAATTTTACCCGAAACAAACTGACGAGTTTGTCTAGGA

[0189] AACATTTCCGTCACCTTGACTTGTCTGAACTGATCCTGGTGGG

[0190] CAATCCATTTACATGCTCCTGTGACATTATGTGGATCAAGAC

[0191] TCTCCAAGAGGCTAAATCCAGTCCAGACACTCAGGATTTGTA

[0192] CTGCCTGAATGAAAGCAGCAAGAATATTCCCCTGGCAAACCT

[0193] GCAGATACCCAATTGTGGTTTGCCATCTGCAAATCTGGCCGC

[0194] ACCTAACCTCACTGTGGAGGAAGGAAAGTCTATCACATTATC

[0195] CTGTAGTGTGGCAGGTGATCCGGTTCCTAATATGTATTGGGA

[0196] TGTTGGTAACCTGGTTTCCAAACATATGAATGAAACAAGCCA

[0197] CACACAGGGCTCCTTAAGGATAACTAACATTTCATCCGATGA

[0198] CAGTGGGAAGCAGATCTCTTGTGTGGCGGAAAATCTTGTAGG

[0199] AGAAGATCAAGATTCTGTCAACCTCACTGTGCATTTTGCACC

[0200] AACTATCACATTTCTCGAATCTCCAACCTCAGACCACCACTG

[0201] GTGCATTCCATTCACTGTGAAAGGCAACCCCAAACCAGCGCT

[0202] TCAGTGGTTCTATAACGGGGCAATATTGAATGAGTCCAAATA

[0203] CATCTGTACTAAAATACATGTTACCAATCACACGGAGTACCA

[0204] CGGCTGCCTCCAGCTGGATAATCCCACTCACATGAACAATGG

[0205] GGACTACACTCTAATAGCCAAGAATGAGTATGGGAAGGATG

[0206] AGAAACAGATTTCTGCTCACTTCATGGGCTGGCCTGGAATTG

[0207] ACGATGGTGCAAACCCAAATTATCCTGATGTAATTTATGAAG

[0208] ATTATGGAACTGCAGCGAATGACATCGGGGACACCACGAAC

[0209] AGAAGTAATGAAATCCCTTCCACAGACGTCACTGATAAAACC

[0210] GGTCGGGAACATCTCTCGGTCTATGCTGTGGTGGTGATTGCG

[0211] TCTGTGGTGGGATTTTGCCTTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTTA

[0212] AGTTGGCAAGACACTCCAAGTTTGGCATGAAAGATTTCTCAT

[0213] GGTTTGGATTTGGGAAAGTAAAATCAAGACAAGGTGTTGGCC

[0214] CAGCCTCCGTTATCAGCAATGATGATGACTCTGCCAGCCCAC

[0215] TCCATCACATCTCCAATGGGAGTAACACTCCATCTTCTTCGG

[0216] AAGGTGGCCCAGATGCTGTCATTATTGGAATGACCAAGATCC

[0217] CTGTCATTGAAAATCCCCAGTACTTTGGCATCACCAACAGTC

[0218] AGCTCAAGCCAGACACATTTGTTCAGCACATCAAGCGACATA

[0219] ACATTGTTCTGAAAAGGGAGCTAGGCGAAGGAGCCTTTGGA

[0220] AAAGTGTTCCTAGCTGAATGCTATAACCTCTGTCCTGAGCAG

[0221] GACAAGATCTTGGTGGCAGTGAAGACCCTGAAGGATGCCAG

[0222] TGACAATGCACGCAAGGACTTCCACCGTGAGGCCGAGCTCCT

[0223] GACCAACCTCCAGCATGAGCACATCGTCAAGTTCTATGGCGT

[0224] CTGCGTGGAGGGCGACCCCCTCATCATGGTCTTTGAGTACAT

[0225] GAAGCATGGGGACCTCAACAAGTTCCTCAGGGCACACGGCC

[0226] CTGATGCCGTGCTGATGGCTGAGGGCAACCCGCCCACGGAAC

[0227] TGACGCAGTCGCAGATGCTGCATATAGCCCAGCAGATCGCCG

[0228] CGGGCATGGTCTACCTGGCGTCCCAGCACTTCGTGCACCGCG

[0229] ATTTGGCCACCAGGAACTGCCTGGTCGGGGAGAACTTGCTGG

[0230] TGAAAATCGGGGACTTTGGGATGTCCCGGGACGTGTACAGCA

[0231] CTGACTACTACAGGGTCGGTGGCCACACAATGCTGCCCATTC

[0232] GCTGGATGCCTCCAGAGAGCATCATGTACAGGAAATTCACGA

[0233] CGGAAAGCGACGTCTGGAGCCTGGGGGTCGTGTTGTGGGAG

[0234] ATTTTCACCTATGGCAAACAGCCCTGGTACCAGCTGTCAAAC

[0235] AATGAGGTGATAGAGTGTATCACTCAGGGCCGAGTCCTGCAG

[0236] CGACCCCGCACGTGCCCCCAGGAGGTGTATGAGCTGATGCTG

[0237] GGGTGCTGGCAGCGAGAGCCCCACATGAGGAAGAACATCAA

[0238] GGGCATCCATACCCTCCTTCAGAACTTGGCCAAGGCATCTCC

[0239] GGTCTACCTGGACATTCTAGGCTAGGGCCCTTTTCCCCAGAC

[0240] CGATCCTTCCCAACGTACTCCTCAGACGGGCTGAGAGGATGA

[0241] ACATCTTTTAACTGCCGCTGGAGGCCACCAAGCTGCTCTCCTT

[0242] CACTCTGACAGTATTAACATCAAAGACTCCGAGAAGCTCTCG

[0243] AGGGAAGCAGTGTGTACTTCTTCATCCATAGACACAGTATTG

[0244] ACTTCTTTTTGGCATTATCTCTTTCTCTCTTTCCATCTCCCTTG

[0245] GTTGTTCCTTTTTCTTTTTTTAAATTTTCTTTTTCTTTTTTTTTT

[0246] CGTCTTCCCTGCTTCACGATTCTTACCCTTTCTTTTGAATCAAT

[0247] CTGGCTTCTGCATTACTATTAACTCTGCATAGACAAAGGCCTT

[0248] AACAAACGTAATTTGTTATATCAGCAGACACTCCAGTTTGCC

[0249] CACCACAACTAACAATGCCTTGTTGTATTCCTGCCTTTGATGT

[0250] GGATGAAAAAAAGGGAAAACAAATATTTCACTTAAACTTTGT

[0251] CACTTCTGCTGTACAGATATCGAGAGTTTCTATGGATTCACTT

[0252] CTATTTATTTATTATTATTACTGTTCTTATTGTTTTTGGATGGC

[0253] TTAAGCCTGTGTATAAAAAAGAAAACTTGTGTTCAATCTGTG

[0254] AAGCCTTTATCTATGGGAGATTAAAACCAGAGAGAAAGAAG

[0255] ATTTATTATGAACCGCAATATGGGAGGAACAAAGACAACCA

[0256] CTGGGATCAGCTGGTGTCAGTCCCTACTTAGGAAATACTCAG

[0257] CAACTGTTAGCTGGGAAGAATGTATTCGGCACCTTCCCCTGA

[0258] GGACCTTTCTGAGGAGTAAAAAGACTACTGGCCTCTGTGCCA

[0259] TGGATGATTCTTTTCCCATCACCAGAAATGATAGCGTGCAGT

[0260] AGAGAGCAAAGATGGCTTCCGTGAGACACAAGATGGCGCAT

[0261] AGTGTGCTCGGACACAGTTTTGTCTTCGTAGGTTGTGATGAT

[0262] AGCACTGGTTTGTTTCTCAAGCGCTATCCACAGAACCTTTGTC

[0263] AACTTCAGTTGAAAAGAGGTGGATTCATGTCCAGAGCTCATT

[0264] TCGGGGTCAGGTGGGAAAGCCAAGAACTTGGAAAAGATAAG

[0265] ACAAGCTATAAATTCGGAGGCAAGTTTCTTTTACAATGAACT

[0266] TTTCAGATCTCACTTCCCTCCGACCCCTAACTTCCATGCCCAC

[0267] CCGTCCTTTTAACTGTGCAAGCAAAATTGTGCATGGTCTTCGT

[0268] CGATTAATACCTTGTGTGCAGACACTACTGCTCCAGACGTCG

[0269] TTTCCCTGATAGGTAGAGCAGATCCATAAAAAGGTATGACTT

[0270] ATACAATTAGGGGAAGCTAATGGAGTTTATTAGCTGAGTATC

[0271] AATGTCTCTGCGTTGTACGGTGGTGATGGGTTTTAATGAATA

[0272] TGGACCCTGAAGCCTGGAAATCCTCATCCACGTCGAACCCAC

[0273] AGGACTGTGGGAAGGGCAGAATCAATCCCTAAGGGAAAGGA

[0274] AACCTCACCCTGAGGGCATCACATGCACTCATGTTCAGTGTA

[0275] CACAGGTCAAGTCCCTTGCTCTGGGCTCTAGTTGGGAGAGTG

[0276] GTTTCATTCCAAGTGTACTCCATTGTCAGTATGCTGTTTTTGT

[0277] TTCCTTCACTCCATTCAAAAAGTCAAAATACAAAATTTGGCA

[0278] CAGCATGCCAACGGGAGGCTGTGCCCAGACCAAGCACTGGA

[0279] AGTGTGCTTCTAGGCATAGTCATTGGTTTTGCAAAAAGAGGG

[0280] CTCAAATTTAAATAGAAATTTACAGCTATTTGAATGGTCAGA

[0281] TATACCAAGAAAGAAAAATATTTCTGTTCCTCAAGAAAACTT

[0282] GCTACCCTCTGTGAGGGGAATTTTGCTAAACTTGACATCTTTA

[0283] TAACATGAGCCAGATTGAAAGGGAGTGATTTTCATTCATCTT

[0284] AGGTCATGTTATTTCATATTTGTTTCTGAAGGTGCGATAGCTC

[0285] TGTTTTAGGTTTTGCTTGCGCCTGTTAATTACTGGAACACCTT

[0286] ATTTTTCATTAAAGGCTTTGAAAGCCAATTCTCAAAAATTCA

[0287] AAAGTGCAAATTAACAGAACAAAAGGAAATCCAGTAGCAAC

[0288] TGCAGTCAAGCGAGGGAGTTGACAAGATAAACCTTACGTCC

[0289] ATTCAAGTTATATGCTGGCCTATGAGAGATGAGAGTTGGGTC

[0290] GTTTGTTCTCTTTGTTGATGATTT(SEQ ID NO:3)

[0291] 下列多肽序列报道为人类TrkB多肽序列（由SEQ ID NO:3的核苷酸939-3455编码）并且在Genbank中登录号为NP_006171。

[0292] MSSWIRWHGPAMARLWGFCWLVVGFWRAAFACPTSCKCSAS

[0293] RIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITEIFIANQKRLEIINEDDVE

[0294] AYVGLRNLTIVDSGLKFVAHKAFLKNSNLQHINFTRNKLTSLSR

[0295] KHFRHLDLSELILVGNPFTCSCDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCL

[0296] NESSKNIPLANLQIPNCGLPSANLAAPNLTVEEGKSITLSCSVAG

[0297] DPVPNMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSLRITNISSDDSGKQISC

[0298] VAENLVGEDQDSVNLTVHFAPTITFLESPTSDHHWCIPFTVKGN

[0299] PKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVTNHTEYHGCLQLDNPTH

[0300] MNNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPGIDDGANPNYPDVI

[0301] YEDYGTAANDIGDTTNRSNEIPSTDVTDKTGREHLSVYAVVVIA

[0302] SVVGFCLLVMLFLLKLARHSKFGMKDFSWFGFGKVKSRQGVG

[0303] PASVISNDDDSASPLHHISNGSNTPSSSEGGPDAVIIGMTKIPVIEN

[0304] PQYFGITNSQLKPDTFVQHIKRHNIVLKRELGEGAFGKVFLAEC

[0305] YNLCPEQDKILVAVKTLKDASDNARKDFHREAELLTNLQHEHI

[0306] VKFYGVCVEGDPLIMVFEYMKHGDLNKFLRAHGPDAVLMAEG

[0307] NPPTELTQSQMLHIAQQIAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVG

[0308] ENLLVKIGDFGMSRDVYSTDYYRVGGHTMLPIRWMPPESIMYR

[0309] KFTTESDVWSLGVVLWEIFTYGKQPWYQLSNNEVIECITQGRVL

[0310] QRPRTCPQEVYELMLGCWQREPHMRKNIKGIHTLLQNLAKASP

[0311] VYLDILG(SEQ ID NO:4)。

[0312] 下列核苷酸序列报道为大鼠 TrkB 受体的 mRNA 并且在 Genbank 中登录号为 NM_012731。

[0313] ATCTGTGTGCGAGTGCGTGTGCGTGCGTGTGTGTGTGTGT

[0314] GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGCGTGTGTGTTTTTGGATT

[0315] TCATACTAATTTTCTGGAGTTTCTGCCCCTGCTCTGCGTCAGC

[0316] CCTCACGTCACTTCGCCAGCAGTAGCAGAGGCGGCGGCGGCC

[0317] GCCGGTTAGAGCCCAGTCGCTGCTTCAGCTGCTGTTGCTGCTT

[0318] CTGCGGCGCTCTGCTCCCTGCGCTGGCTACGGGAGGCCGGGG

[0319] GAGCCGCGCCGACAGTCCTCTGTGGCCAGGGCCGGCACTGTC

[0320] CTGCTACCGCAGTTGCTCCCCAGCCCTGAGGTGCGCACCGAT

[0321] ATCGATATCCGTGCCGGTTTAGCGGTTCTGCGACCCAAAGAG

[0322] TCCAGGGAGAGCCACCGAGTGGCGCCTGGCGTATAGGACCA

[0323] TGCAGCCGCCTTGTGGCTTGGAGCAGCGGCCCGTGATGTTCC

[0324] AGCCACTGTGAACCATTTGGTCAGCGCCAACCTGCTCAGCCC

[0325] CAGCACCGACAGGCTCAGCCTCTGGTACGCTCCTCTCGGCGG

[0326] GAGGCCATCAGCACCAAGCAGCAAGAGGGCTCAGGGAAGGC

[0327] CTCCCCCCTCCGGCGGGGGACGCCTGGCTCAGCGTAGGGACA

[0328] CGCACTCTGACTGACTGGCACTGGCAGCTCGGGATGTCGCCC

[0329] TGGCCGAGGTGGCATGGACCCGCCATGGCGCGGCTCTGGGG

[0330] CTTATGCTTGCTGGTCTTGGGCTTCTGGAGGGCTTCTCTTGCC

[0331] TGCCCCATGTCCTGCAAATGCAGCACCACTAGGATTTGGTGT

[0332] ACCGAGCCTTCTCCTGGCATCGTGGCATTTCCGAGGTTGGAA

[0333] CCTAACAGCATTGACCCAGAGAACATCACCGAAATTCTCATT

[0334] GCAAACCAGAAAAGGTTAGAAATCATCAATGAAGATGATGT

[0335] CGAAGCTTACGTGGGGCTGAAAAACCTTACAATTGTGGATTC

[0336] CGGCTTAAAGTTTGTGGCTTACAAGGCGTTTCTGAAGAACGG

[0337] CAACCTGCGGCACATCAATTTCACTCGAAACAAGCTGACGAG

[0338] TTTGTCCAGGAGACATTTCCGCCACCTTGACTTGTCTGACCTG

[0339] ATCCTGACGGGTAATCCGTTCACGTGTTCCTGTGACATCATGT

[0340] GGCTCAAGACTCTCCAGGAGACGAAATCCAGCCCCGACACTC

[0341] AGGATTTGTATTGCCTCAATGAGAGCAGCAAGAATACCCCTC

[0342] TGGCGAACCTGCAGATTCCCAATTGTGGTCTGCCGTCTGCAC

[0343] GTCTGGCCGCTCCTAACCTCACGGTGGAGGAAGGGAAGTCTG

[0344] TGACCATTTCCTGCAGCGTCGGGGGTGACCCGCTCCCCACCT

[0345] TGTACTGGGACGTTGGGAATTTGGTTTCCAAACACATGAATG

[0346] AAACAAGCCACACACAGGGCTCCTTAAGGATAACAAACATT

[0347] TCATCGGATGACAGTGGGAAACAAATCTCTTGTGTGGCAGAA

[0348] AACCTCGTCGGAGAAGATCAAGACTCTGTGAACCTCACTGTG

[0349] CATTTTGCACCAACCATCACATTTCTCGAATCTCCAACCTCAG

[0350] ACCACCACTGGTGCATCCCATTCACTGTGAGAGGCAACCCCA

[0351] AGCCAGCACTTCAGTGGTTCTACAACGGAGCCATACTGAATG

[0352] AATCCAAGTACATCTGTACCAAAATACACGTCACCAATCACA

[0353] CGGAGTACCACGGCTGCCTCCAGCTGGATAACCCCACTCATA

[0354] TGAATAATGGAGACTACACCCTAATGGCCAAGAATGAATAT

[0355] GGGAAGGACGAGAGACAGATTTCTGCTCACTTCATGGGCCG

[0356] GCCTGGAGTTGACTATGAGACAAACCCAAATTACCCTGAAGT

[0357] CCTCTATGAAGACTGGACCACGCCAACTGACATCGGGGATAC

[0358] TACAAACAAAAGTAATGAGATCCCCTCCACGGATGTTGCTGA

[0359] CCAAACCAATCGGGAGCATCTCTCGGTCTATGCTGTGGTGGT

[0360] GATTGCCTCTGTGGTAGGATTCTGCCTGCTGGTGATGCTGCTT

[0361] CTGCTCAAGTTGGCGAGACATTCCAAGTTTGGCATGAAAGGC

[0362] CCAGCTTCCGTCATCAGCAACGACGATGACTCTGCCAGCCCT

[0363] CTCCACCACATCTCCAACGGGAGCAACACTCCGTCTTCTTCG

[0364] GAGGGCGGGCCCGATGCTGTCATCATTGGGATGACCAAGATC

[0365] CCTGTCATTGAAAACCCCCAGTACTTCGGTATCACCAACAGC

[0366] CAGCTCAAGCCGGACACATTTGTTCAGCACATCAAGAGACAC

[0367] AACATCGTTCTGAAGAGGGAGCTTGGAGAAGGAGCCTTTGG

[0368] GAAAGTTTTCCTAGCGGAGTGCTATAACCTCTGCCCCGAGCA

[0369] GGATAAGATCCTGGTGGCCGTGAAGACGCTGAAGGACGCCA

[0370] GCGACAATGCTCGCAAGGACTTTCATCGCGAAGCCGAGCTGC

[0371] TGACCAACCTCCAGCACGAGCACATTGTCAAGTTCTACGGTG

[0372] TCTGTGTGGAGGGCGACCCACTCATCATGGTCTTTGAGTACA

[0373] TGAAGCACGGGGACCTCAACAAGTTCCTTAGGGCACACGGG

[0374] CCAGATGCAGTGCTGATGGCAGAGGGTAACCCGCCCACCGA

[0375] GCTGACGCAGTCGCAGATGCTGCACATCGCTCAGCAAATCGC

[0376] AGCAGGCATGGTCTACCTGGCATCCCAACACTTCGTGCACCG

[0377] AGACCTGGCCACCCGGAACTGCTTGGTAGGAGAGAACCTGCT

[0378] GGTGAAAATTGGGGACTTCGGGATGTCCCGGGATGTATACAG

[0379] CACCGACTACTACCGGGTTGGTGGCCACACAATGTTGCCCAT

[0380] CCGATGGATGCCTCCAGAGAGCATCATGTACAGGAAATTCAC

[0381] CACCGAGAGTGACGTCTGGAGCCTGGGAGTTGTGTTGTGGGA

[0382] GATCTTCACCTACGGCAAGCAGCCCTGGTATCAGCTATCAAA

[0383] CAACGAGGTGATAGAATGCATCACCCAGGGCAGAGTCCTTC

[0384] AGCGGCCTCGCACGTGTCCCCAGGAGGTGTACGAGCTGATGC

[0385] TGGGATGCTGGCAGCGGGAACCACACACAAGGAAGAACATC

[0386] AAGAACATCCACACACTCCTTCAGAACTTGGCGAAGGCGTCG

[0387] CCCGTCTACCTGGACATCCTAGGCTAGACTCCCTCTTCTCCCA

[0388] GACGGCCCTTCCCAAGGCACCCCTCAGACCTCTTAACTGCCG

[0389] CTGATGTCACCACCTTGCTGTCCTTCGCTCTGACAGTGTTAAC

[0390] AAGACAAGGAGCGGCTCTCCGGGGTGAGGCAGTGCGCACTT

[0391] CCCCATCCACAGACAGTATCGACTCGCTTCTGGCTTTGTCGCT

[0392] TTCTCTCCCTTTGGTTTGTTTCTTTCTTTTGCCCATTCTCCATTT

[0393] ATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA

[0394] TCTATCTATCTATCTATTTATTTATTTATTTATTGGTCTTCACT

[0395] GCTTCATGGTCCTCGGCCTCTCTCCTTGACCGATCTGGCTTCT

[0396] GTACTCCTATTCACTGTACATAGACAAAGGCCTTAACAAACC

[0397] TGATTTGTTATATCAGCAGACACTCCAGTTTGCCCACCACAA

[0398] CTAACAATGCCTTGTTGTATTCCTGCCTTTGATGTGGATGAAA

[0399] AAAAGGGAAAAAAAATAATCAAACATCTGACTTAAACCGTC

[0400] ACTTCCGATGTACAGACACGGGGCGTTTCTATGGATTCACTT

[0401] CTATCTATCTATTTATTTATTTATCTATTTATTTATTTCTCTTCT

[0402] TTGTTGTTTTCCGGTGGTTTTAGCCTGTGTATGAGAAGGGAA

[0403] AGTCATGTACAGTCTGGGAAAACTTTATCTGTGGGAAATGGA

[0404] AACCAGAAGGGGAAAGAAGCTTTACCATAAAGCACAGCAGG

[0405] AGTGAGACACAGAAAAGCCATTGGATCAGCCAGAGTCCGTC

[0406] CTGCATAGGAAAACCCAGCAGCCATCAGGCTGGAGGATCAT

[0407] GTTCGGCACTGACCCCCGAGGACCTTTCTGAGGAGGACACAG

[0408] AATGTTAAACTCTGCATCATGGACACAGTTTCCGATCACAGA

[0409] TACTGGCCTTCAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAGAT

[0410] AGTTCTTGTGAGACCTGGACAGCACGTCCAACATCCAGACAT

[0411] TGTGGTCGGGCACAGTGACAGAGTTGATGCATTTCTCACGGG

[0412] TTATTCTACAGAGCTTTTGTCAAGTCCAATGGAAGGAGGTAG

[0413] ATTCTTGTTCAGATATGATTTCGGGAAAAACCGAGTCCTTGA

[0414] CAAAGACAGGAGACACCCTCAGTTGGGAGGCAAGTTTCTCTT

[0415] ACCTTGGACTTTCTCACACAGCAATTCTCACCCCCACCCCCTC

[0416] CACTCTCACCTGTCTTGTAACTGTGCAAACAAAAGTGTGCAT

[0417] GGTCTTTGTCAGTTGATACCTTTGTGCACCTCTGTGCAGAAAC

[0418] TGCTGTCTGTCCCGGCTGTGGTACCCGATCAGTGGGGTAGAT

[0419] CCACGAAAGGTCTCATTTTAGGCCGCTTTGGGAAGGTAACCA

[0420] GATCGGTAGCTGGAAGCACTCTCCAGTAGGTGGCGAAGGGT

[0421] GAGTGGGTCTGCTGAAGCCTGCATATCTTCACCCACCTCAAA

[0422] CCCACCGGGCTGCACAGGGGACAGGCACAGGCCACCCCTGA

[0423] GGGACAGGGAAGCTCTCTTGGGATACCACCTGAGTTTACATT

[0424] CAGTGTGCTCAGGTCAAGTCTCTCGCTCGGGGCTCTGTTTCG

[0425] GGGAGAATGGTTTCATTCCAACGCACTCATTATCAGGATTCT

[0426] GTTTTC(SEQ ID NO:5)。

[0427] 下列多肽序列报道为大鼠 TrkB 多肽序列（由 SEQ ID NO:5 的核苷酸 665-3130 编码）并且在 Genbank 中登录号为 NP_036863。

[0428] MSPWPRWHGPAMARLWGLCLLVLGFWRASLACPMSCKCSTTR

[0429] IWCTEPSPGIVAFPRLEPNSIDPENITEILIANQKRLEIINEDDVEA

[0430] YVGLKNLTIVDSGLKFVAYKAFLKNGNLRHINFTRNKLTSLSRR

[0431] HFRHLDLSDLILTGNPFTCSCDIMWLKTLQETKSSPDTQDLYCL

[0432] NESSKNTPLANLQIPNCGLPSARLAAPNLTVEEGKSVTISCSVGG

[0433] DPLPTLYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSLRITNISSDDSGKQISC

[0434] VAENLVGEDQDSVNLTVHFAPTITFLESPTSDHHWCIPFTVRGN

[0435] PKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVTNHTEYHGCLQLDNPTH

[0436] MNNGDYTLMAKNEYGKDERQISAHFMGRPGVDYETNPNYPEV

[0437] LYEDWTTPTDIGDTTNKSNEIPSTDVADQTNREHLSVYAVVVIA

[0438] SVVGFCLLVMLLLLKLARHSKFGMKGPASVISNDDDSASPLHHI

[0439] SNGSNTPSSSEGGPDAVIIGMTKIPVIENPQYFGITNSQLKPDTFV

[0440] QHIKRHNIVLKRELGEGAFGKVFLAECYNLCPEQDKILVAVKTL

[0441] KDASDNARKDFHREAELLTNLQHEHIVKFYGVCVEGDPLIMVF

[0442] EYMKHGDLNKFLRAHGPDAVLMAEGNPPTELTQSQMLHIAQQI

[0443] AAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKIGDFGMSRDVY

[0444] STDYYRVGGHTMLPIRWMPPESIMYRKFTTESDVWSLGVVLWE

[0445] IFTYGKQPWYQLSNNEVIECITQGRVLQRPRTCPQEVYELMLGC

[0446] WQREPHTRKNIKNIHTLLQNLAKASPVYLDILG(SEQ ID NO:6)。

[0447] 根据氨基酸残基数目，以 SEQ ID NO:4 的序列为基础，表 2 列出了 TrkB 结构域和其他区。如本领域技术人员应理解的，下文所列的结构域的起始残基和终止残基可取决于确定结构域所使用的计算机建模程序或所使用的方法而变化。

[0448] 表 2

[0449]

结构域或区	起始残基	终止残基
信号肽	1	31
富含半胱氨酸 1	32	67
LRR	68	139

富含半胱氨酸 2	140	195
Ig- 样 1	214	270
Ig- 样 2	301	365
跨膜	434	454
酪氨酸激酶 催化结构域	552	828

[0450] 使用 LINGO-1 的拮抗剂的方法

[0451] 本发明的一个实施方式提供了用于抑制细胞中 LINGO-1 和 TrkB 相互作用的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。用于本发明的目的的 LINGO-1 拮抗剂可以是 LINGO-1 拮抗剂多肽、LINGO-1 抗体、LINGO-1 拮抗剂多核苷酸、LINGO-1 适体或两种或更多种 LINGO-1 拮抗剂的组合。

[0452] 本发明的另外的实施方式包括用于相对于 LINGO-1 拮抗剂不存在的情况下的 TrkB 磷酸化水平，促进细胞中 TrkB 磷酸化的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。相似地，本发明还提供了用于促进 TrkB 信号传导的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 TrkB 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。本发明还包括促进 TrkB 磷酸化的方法，其包括将 CNS 神经元与 LINGO-1 拮抗剂接触。

[0453] 本发明的另外的实施方式包括用于抑制细胞中 JNK 磷酸化的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 JNK 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂 接触，以及用于抑制 JNK 通路信号转导传导的方法，其包括将共表达 LINGO-1 和 JNK 的细胞与 LINGO-1 拮抗剂接触。根据本发明，抑制 JNK 磷酸化包括抑制 JNK-1 磷酸化、抑制 JNK-2 磷酸化或抑制 JNK-1 和 JNK-2 磷酸化。根据本发明，抑制 JNK 磷酸化可包括降低磷酸化的 JNK 蛋白的总量或降低 JNK 蛋白保持磷酸化的时间长度。本发明还包括用于抑制 JNK 磷酸化的方法，其包括将 CNS 神经元与 LINGO-1 拮抗剂接触。

[0454] 本发明的另外的实施方式提供了在显示压力引起的视神经病变的体征或症状的哺乳动物中促进视网膜神经节细胞存活的方法，包括向需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂和运载体。在一个实施方式中，压力引起的视神经病变是青光眼。

[0455] 使用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的方法

[0456] 在本发明的某些方法中，使用了 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂两者。例如，本发明的一个实施方式包括用于促进处于死亡危险的神经元存活的方法，包括将神经元与有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的组合接触。在使用了 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂两者的本发明的实施方式中，术语“有效量“是指足以产生所期望的结果的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的组合的量。在一些实例中，单独使用 LINGO-1 拮抗剂时产生期望的作用的 LINGO-1 拮抗剂的量可大于与 TrkB 激动剂组合使用时的量。相似地，在某些实例中，单独使用 TrkB 激动剂时产生期望的作用的 TrkB 激动剂的量可大于与 LINGO-1 拮抗剂组合使用时的量。

[0457] 本发明的另一个实施方式提供了用于治疗与神经元细胞死亡有关的疾病或病症的方法，包括向需要这种治疗的动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的组合。在某些特定的实施方式 中，所述疾病或病症可以是压力引起的视神经病变。本发明的另外的实施方式包括用于在显示包括神经元细胞死亡的体征、症状或病况的哺乳动物中促进 CNS 神经元的再生或存活的方法，包括向哺乳动物施用有效量的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的组合。在本发明的某些实施方式中，疾病或病症是 ALS、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默氏

病、帕金森病、糖尿病性神经病变、中风或听力损失。在另一个特定的实施方式中，CNS 神经元是感觉神经元，例如视网膜神经节细胞或毛细胞。

[0458] 在涉及使用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂的组合的本发明的实施方式中，LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂可以以单一的组合物施用或分别施用。此外，LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂可同时或顺序地施用。

[0459] LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂化合物

[0460] 本发明的方法中的 LINGO-1 拮抗剂包括任何化学品或合成的化合物，与拮抗剂化合物不存在的情况下 LINGO-1 的活性相比，其抑制或降低 LINGO-1 的活性。

[0461] 本发明的方法中的 TrkB 激动剂包括任何化学品或合成的化合物，与激动剂化合物不存在的情况下 TrkB 的状态相比，其促进或增加 TrkB 的活性或促进或增加 TrkB 的磷酸化。

[0462] TrkB 激动剂化合物包括但不限于神经营养蛋白模拟物。TrkB 激动剂化合物还包括但不限于 L-783,281、腺苷、CGS 21680 等等，如 Pollack 等人 Curr.Drug Targ-CNS and Neurol.Disorders 1 :59-80(2002) 中所综述的，其通过引用全文并入本文。在某些实施方式中，TrkB 激动剂化合物是对 TrkB 选择性的并且比 TrkA 和 TrkC 活化 TrkB 至更大的程度。在某些实施方式中，TrkB 激动剂化合物是对 TrkB 特异性的并且不活化 TrkA 和 TrkC。此外，TrkB 激动剂化合物还可是模拟神经营养蛋白的关键区的小分子。例如小分子可以是 BDNF β-转角环的模拟物。根据本发明可使用的小分子模拟物的特定的实例公开于美国公开专利申请第 2007/0060526A1 号，其通过引用全文并入本文。

[0463] 本领域的普通技术人员将知道如何筛选和检测将可用于本发明的方法中的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂化合物，例如通过使用本文其他地方描述的测定筛选改变神经元存活的化合物。

[0464] 可溶的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂多肽

[0465] 可溶的 LINGO-1 多肽

[0466] 将在本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂包括阻滞、抑制或干扰天然存在的 LINGO-1 的生物学功能的那些多肽。特别地，本发明的可溶的 LINGO-1 多肽包括可溶的 LINGO-1 多肽的片段、变体或其衍生物。上文表 1 描述了 LINGO-1 多肽的不同结构域。可溶的 LINGO-1 多肽缺少跨膜结构域并且通常缺少 LINGO-1 多肽的胞内结构域。例如，某些可溶的 LINGO-1 多肽缺少包含 LINGO-1 的跨膜结构域的氨基酸 552-576 和 / 或包含 LINGO-1 的胞内结构域的氨基酸 577-614。此外，某些可溶的 LINGO-1 多肽包含 LINGO-1 多肽的 LRR 结构域、Ig 结构域、碱性区和 / 或整个胞外结构域 (相应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 34 至 532)。如本领域技术人员将理解的，LINGO-1 的整个胞外结构域可在胞外结构域多肽的 C- 端或 N- 端包含添加的或较少的氨基酸。

[0467] 像这样，用于本发明的方法中的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 41 至 525、SEQ ID NO :2 的 40 至 526、SEQ ID NO :2 的 39 至 527、SEQ ID NO :2 的 38 至 528、SEQ ID NO :2 的 37 至 529、SEQ ID NO :2 的 36 至 530、SEQ ID NO :2 的 35 至 531、SEQ IDNO :2 的 34 至 531、SEQ ID NO :2 的 46 至 520、SEQ ID NO :2 的 45 至 521、SEQ ID NO :2 的 44 至 522、SEQ ID NO :2 的 43 至 523 和 SEQ ID NO :2 的 42 至 524、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。LINGO-1 多肽拮

抗剂可包括如表 1 中所描述的结构域的任何组合。

[0468] 用于本发明的方法中的另外的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 1 至 33、SEQ ID NO :2 的 1 至 35、SEQ ID NO :2 的 34 至 64、SEQ ID NO :2 的 36 至 64、SEQ ID NO :2 的 66 至 89、SEQ IDNO :2 的 90 至 113、SEQ ID NO :2 的 114 至 137、SEQ ID NO :2 的 138 至 161、SEQ ID NO :2 的 162 至 185、SEQ ID NO :2 的 186 至 209、SEQ ID NO :2 的 210 至 233、SEQ ID NO :2 的 234 至 257、SEQID NO :2 的 258 至 281、SEQ ID NO :2 的 282 至 305、SEQ ID NO :2 的 306 至 329、SEQ ID NO :2 的 330 至 353、SEQ ID NO :2 的 363 至 416、SEQ ID NO :2 的 417 至 424、SEQ ID NO :2 的 419 至 493 和 SEQ ID NO :2 的 494 至 551、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0469] 用于本发明的方法的另外的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 1 至 33、SEQ ID NO :2 的 1 至 35、SEQ ID NO :2 的 1 至 64、SEQ ID NO :2 的 1 至 89、SEQ ID NO :2 的 1 至 113、SEQ ID NO :2 的 1 至 137、SEQ ID NO :2 的 1 至 161、SEQ ID NO :2 的 1 至 185、SEQ ID NO :2 的 1 至 209、SEQ ID NO :2 的 1 至 233、SEQ ID NO :2 的 1 至 257、SEQ ID NO :2 的 1 至 281、SEQ ID NO :2 的 1 至 305、SEQ ID NO :2 的 1 至 329、SEQ ID NO :2 的 1 至 353、SEQ ID NO :2 的 1 至 416、SEQ ID NO :2 的 1 至 424、SEQ ID NO :2 的 1 至 493、 SEQ ID NO :2 的 1 至 551、SEQ ID NO :2 的 1 至 531 和 SEQ ID NO :2 的 1 至 532、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0470] 用于本发明的方法中的另外的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 34 至 64、SEQ ID NO :2 的 34 至 89、SEQ ID NO :2 的 34 至 113、SEQ ID NO :2 的 34 至 137、SEQ ID NO :2 的 34 至 161、SEQID NO :2 的 34 至 185、SEQ ID NO :2 的 34 至 209、SEQ ID NO :2 的 34 至 233、SEQ ID NO :2 的 34 至 257、SEQ ID NO :2 的 34 至 281、SEQ ID NO :2 的 34 至 305、SEQ ID NO :2 的 34 至 329、SEQ IDNO :2 的 34 至 353、SEQ ID NO :2 的 34 至 416、SEQ ID NO :2 的 34 至 424、SEQ ID NO :2 的 34 至 493 和 SEQ ID NO :2 的 34 至 551、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0471] 用于本发明的方法中的另外的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 34 至 530、SEQ ID NO :2 的 34 至 531、SEQ ID NO :2 的 34 至 532、SEQ ID NO :2 的 34 至 533、SEQ ID NO :2 的 34 至 534、SEQ ID NO :2 的 34 至 535、SEQ ID NO :2 的 34 至 536、SEQ IDNO :2 的 34 至 537、SEQ ID NO :2 的 34 至 538、SEQ ID NO :2 的 34 至 539、SEQ ID NO :2 的 30 至 532、SEQ ID NO :2 的 31 至 532、SEQID NO :2 的 32 至 532、SEQ ID NO :2 的 33 至 532、SEQ ID NO :2 的 34 至 532、SEQ ID NO :2 的 35 至 532、SEQ ID NO :2 的 36 至 532、SEQ ID NO :2 的 30 至 531、SEQ ID NO :2 的 31 至 531、SEQ IDNO :2 的 32 至 531、SEQ ID NO :2 的 33 至 531、SEQ ID NO :2 的 34 至 531、SEQ ID NO :2 的 35 至 531 和 SEQ ID NO :2 的 36 至 531、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0472] 用于本发明的方法中的另外的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不 限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 36 至 64、SEQ ID NO :2 的 36 至 89、SEQ ID NO :2 的 36 至 113、SEQ ID NO :2 的 36 至 137、SEQ ID NO :2 的 36 至 161、SEQID NO :2 的 36 至 185、SEQ ID NO :2 的 36 至 209、SEQ ID NO :2 的 36 至 233、SEQ ID NO :2 的 36 至 257、SEQ ID NO :2 的 36 至 281、SEQ ID NO :2 的 36 至 305、SEQ ID NO :2 的 36 至 329、SEQ

IDNO :2 的 36 至 353、SEQ ID NO :2 的 36 至 416、SEQ ID NO :2 的 36 至 424、SEQ ID NO :2 的 36 至 493 和 SEQ ID NO :2 的 36 至 551、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0473] 用于本发明的方法中的另外的可溶的 LINGO-1 多肽包括但不限于包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 36 至 530、SEQ ID NO :2 的 36 至 531、SEQ ID NO :2 的 36 至 532、SEQ ID NO :2 的 36 至 533、SEQ ID NO :2 的 36 至 534、SEQ ID NO :2 的 36 至 535、SEQ ID NO :2 的 36 至 536、SEQ IDNO :2 的 36 至 537、SEQ ID NO :2 的 36 至 538 和 SEQ ID NO :2 的 36 至 539、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0474] 另外的可溶的 LINGO-1 多肽、其片段、变体或衍生物包括包含 LINGO-1 的 Ig 结构域的多肽。例如，包含、主要由或由以下组成的 LINGO-1 多肽 :SEQ ID NO :2 的氨基酸 417 至 493 ;SEQ IDNO :2 的 417 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 495 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 496 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 497 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 498 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 499 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 500 ;SEQ IDNO :2 的 417 至 492 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 491 ;SEQ ID NO :2 的 412 至 493 ;SEQ ID NO :2 的 413 至 493 ;SEQ ID NO :2 的 414 至 493 ;SEQ ID NO :2 的 415 至 493 ;SEQ ID NO :2 的 416 至 493 ;SEQ IDNO :2 的 411 至 493 ;SEQ ID NO :2 的 410 至 493 ;SEQ ID NO :2 的 410 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 411 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 412 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 413 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 414 至 494 ;SEQ IDNO :2 的 415 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 416 至 494 ;SEQ ID NO :2 的 417 至 494 ;和 SEQ ID NO :2 的 418 至 494、或者这样的多肽的片段、变体或衍生物。

[0475] 用于本发明的方法中的可溶的 LINGO-1 多肽还包括本文公开的两种或更多种可溶 LINGO-1 多肽的组合。用于本发明的方法中的两种或更多种可溶的 LINGO-1 多肽可融合在一起以形成包含本文所公开的多个 LINGO-1 可溶多肽的单一的多肽，或可以是单独的可溶 LINGO-1 多肽，组成用于本发明的方法中的组合物。

[0476] 用于实行本发明的不同的示例性可溶 LINGO-1 多肽和获得这些分子的方法和材料描述于下文和 / 或可在例如 PCT 公开第 WO2004/085648、WO 2006/002437、WO 2007/0059793、WO2007/008547、WO 2007/056161 和 WO 2007/064882 号和美国公开专利申请第 2006/017673 号中找到，其通过引用全文并入本文。

[0477] TrkB 激动剂多肽

[0478] 本发明的方法中使用的 TrkB 激动剂多肽包括可促进、放大、增强或增加 TrkB 活性的任何多肽。这种蛋白包括但不限于包括神经营养蛋白例如 BDNF、NT-3 和 NT-4/5 的 TrkB 配体。此外，本发明的 TrkB 激动剂多肽还包括 TrkB 配体的片段、变体或衍生物以及嵌合的神经营养蛋白分子。在某些实施方式中，TrkB 配体多肽、其片段、变体或衍生物是二聚化或多聚化的。本发明的 TrkB 激动剂多肽可作为同源二聚体或异源二聚体起作用。本发明的 TrkB 激动剂多肽还包括泛 - 神经生长素，例如在 Ibanez 等人 EMBO12 :12 :2281-2293(1993) 中所公开的那些。尤其是，本发明的 TrkB 激动剂多肽包括结合至 TrkB 的 TrkB 配体的结构域或者这种多肽的 变体。在本发明的特定的实施方式中，TrkB 激动剂是脑源性神经营养因子 (BDNF) 或其片段、变体或衍生物。

[0479] 如美国专利第 7,205,387 号中所公开的，本发明的 TrkB 激动剂多肽可以是 TrkB 配体的发夹基序。另外地，TrkB 配体多肽、其片段、变体或衍生物可融合至其他的蛋白或肽序列和 / 或可如美国专利第 5,770,577 号中所描述的连接至包括聚乙二醇的水溶性的聚合

物，或可如美国专利第 6,800,607 号中所描述的连接至 1- 酰基 - 甘油衍生物。此外或可选择地，如美国专利第 6,723,701 号中所描述的，TrkB 配体、其片段或变体可被改变以便增加施用时的稳定性，例如通过使用具有较低的等电点的变体。如 Williams 等人 JBC 280 : 5862-5869(2004) 中所描述的，TrkB 配体，以及其片段或变体可串联布置并环化，例如以形成“小神经营养蛋白”，诸如 BAG。

[0480] 此外，用于本发明的方法中的 TrkB 激动剂多肽包括但不限于 TrkB 多肽、其片段、变体或衍生物。用于本发明的方法中的 TrkB 多肽、其片段、变体或衍生物还包括包含、主要由或由融合至免疫球蛋白结构域的全长的 TrkB 蛋白组成的 TrkB 多肽，例如包含、主要由或由融合至 IgG 结构域的 SEQ ID NO :4 的氨基酸 1 至 828、SEQID NO :4 的 32 至 828 组成的 TrkB 多肽。本文描述的另外的 TrkB 多肽、其片段、变体或衍生物也可融合至免疫球蛋白结构域。在某些实施方式中，本发明的 TrkB 多肽被二聚化或多聚化。本发明的 TrkB 多肽还包括与 SEQ ID NO :4 的多肽相比，不与 LINGO-1 相互作用、具有增加的二聚化和多聚化的倾向、具有对内源或非内源配体的增加的亲和性和 / 或具有增加的激酶活性的 TrkB 片段、变体、同种型或衍生物。

[0481] 此外，用于本发明的方法中的另外的 TrkB 激动剂多肽还包括本文公开的两种或更多种 TrkB 激动剂多肽的组合。用于本发明的 方法中的两种或更多种 TrkB 激动剂多肽可融合在一起以形成含有多个本文公开的 TrkB 激动剂多肽的单一的多肽，或可以是单独的 TrkB 激动剂多肽，组成用于本发明的方法中的组合物。

[0482] 可溶的 LINGO-1 拮抗剂和 / 或 trkB 激动剂多肽

[0483] 用于本文描述的本发明方法中的可溶的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂多肽可以是环状的。可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽的环化减少了线性肽的构象自由度并产生结构上更受限的分子。肽环化的许多方法是本领域中已知的，例如通过肽的 N- 端和 C 端氨基酸残基之间的酰胺键的形成的“主链对主链”环化。

[0484] “主链对主链”环化方法包括两个 ω- 硫代氨基酸残基（例如半胱氨酸、高半胱氨酸）之间形成二硫桥。本发明的一些可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽包括对肽的 N- 端和 C- 端的修饰以形成环状的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽。这种修饰包括但不限于半胱氨酸残基、乙酰化的半胱氨酸残基、具有 NH_2 部分和生物素的半胱氨酸残基。肽环化的其他方法描述于 Li & Roller, Curr. Top. Med. Chem. 3 :325-341(2002)，其通过引用全文并入本文。

[0485] 本文描述的可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽可具有不同的变化例如取代、插入或缺失。例如，取代包括但不限于下列取代 :SEQ ID NO :2 的 LINGO-1 多肽的位置 6 的缬氨酸取代为甲硫氨酸 ;SEQ ID NO :2 的 LINGO-1 多肽的位置 294 的丝氨酸取代为甘氨酸 ;SEQ ID NO :2 的 LINGO-1 多肽的位置 348 的缬氨酸取代为丙氨酸 ;SEQ ID NO :2 的 LINGO-1 多肽的位置 419 的精氨酸取代为组氨酸 ;位置 456 的精氨酸取代为谷氨酸 ;和 SEQ ID NO :2 的位置 458 的组氨酸取代为缬氨酸。

[0486] 预期可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽的相应的片段 与本文描述的 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4 的多肽具有至少 70％、75％、80％、85％、90％或 95％的同一性。

[0487] 如本领域中已知的，两个多肽之间的“序列同一性”是通过将一个多肽的氨基酸序列与另一个多肽的序列对比来确定的。当在本文讨论时，可使用本领域中已知的方法和计

算机程序 / 软件例如但不限于 BESTFIT 程序 (Wisconsin 序列分析软件包，用于 Unix 的版本 8，Genetics Computer Group，University Research Park，575ScienceDrive，Madison，WI 53711) 来确定任何具体多肽是否是与另一种多肽至少约 70％、75％、80％、85％、90％或 95％相同。BESTFIT 使用 Smith 和 Waterman，Advances in Applied Mathematics 2：482-489(1981) 的局部同源性算法，以找到两个序列之间的最佳同源性部分。当使用 BESTFIT 或任何其他的序列比对程序以确定特定的序列是否是例如与根据本发明的参考序列 95％相同时，当然设置参数以使同一性的百分比是对参考多肽序列的全长计算的，并且允许参考序列中的氨基酸总数的多达 5％的同源性差异。

[0488] 用于本发明的方法中的可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽可包括两种或更多种可溶 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽的任意组合。

[0489] 抗体或其抗原结合片段

[0490] 在一个实施方式中，用于本发明的方法中的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂包括为 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。例如某些 LINGO-1 或 TrkB 抗体与如 CNS 神经元所表达的 LINGO-1 或 TrkB 的结合促进神经元存活。

[0491] 在某些实施方式中，LINGO-1 抗体是 1A7 抗体。1A7 抗体已被描述于 2006 年 7 月 7 日提交的国际申请 PCT/US06/26271 中，其 通过引用全文并入本文。1A7 抗体的序列示于下文表格中。

[0492] 表 3-1A7 抗体序列

[0493]

	多肽序列	SEQ ID NO:
VH	QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGKGLKWMGW INTDTGEPTYTEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTA TYFCAREGVHF DYWGQGTTVTVSS	8
VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIK	9

[0494] 本发明的抗体还可是包括 1A7 抗体的一个或多于一个 CDR 的抗体。下列分别是 1A7 抗体的 VH CDR1、CDR2 和 CDR3 区的序列：NYGMN(SEQ ID NO：10)、WINTDTGEPTYTEDFQG(SEQID NO：11) 和 EGVHFDY(SEQ ID NO：12)。下列分别是 1A7 抗体的 VL CDR1、CDR2 和 CDR3 区的序列：SASSSVSYMH(SEQ IDNO：13)、DTSKLAS(SEQ ID NO：14) 和 QQWSSNPFT(SEQ IDNO：15)。

[0495] 在某些实施方式中，LINGO-1 抗体是单克隆抗体 3B5.2(也称为 3B5)，其可从杂交瘤 2.P3B5.2 生产。2.P3B5.2 杂交瘤于 2006 年 12 月 27 日保藏于 Mannasssas，VA 的美国典型培养物保藏中心 (ATCC)，3B5 抗体已被描述于 2007 年 1 月 9 日提交的美国临时申请第 60/879,324 号中，其通过引用全文并入本文。3B5 抗体的序列示于下文表格中。

[0496] 表 4-3B5 抗体序列

[0497]

	多肽序列	SEQ ID NO :
VH	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCRASGYTFTSYWMH WVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKFRGKATL TVDTSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARPYYGSHWF FDVWGTGTTVTVSS	16
VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSRVSYVHWYQ QKSGTSPKRWLYDTSNLASGVPARFGGNGSGTSYSL TISSMEAEDAATYYCQQW STNPPTFGGGTKLEIK	17

[0498] 本发明的抗体还可是包括3B5抗体的一个或多于一个CDR的抗体。下列分别是3B5抗体的VH CDR1、CDR2和CDR3区的序列:SYWMH(SEQ ID NO:18)、VIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQID NO:19)和PYYGSHWFFDV(SEQ ID NO:20)。下列分别是3B5抗体的VL CDR1、CDR2和CDR3区的序列:SASSRVSYVH(SEQID NO:21)、DTSNLAS (SEQ ID NO:22)和QQWSTNPPT(SEQID NO:23)。

[0499] 在某些实施方式中,LINGO-1抗体是单克隆抗体L133。L133抗体已被描述于2007年1月9日提交的美国临时申请第60/879,324号中,其通过引用全文并入本文。LI33抗体的序列示于下文表格中。

[0500] 表5-LI33抗体序列

[0501]

	多肽序列	SEQ ID NO :
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYPMF WVRQAPGKGLEWVSWIGPSGGITKYADSVKGRF TI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT ATYYCAREGH NDWYFDLWGRGTLVTVSS	24
VL	DIQMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYD KWPLTFGGGT KVEIK	25

[0502] 本发明的抗体还可是包括LI33抗体的一个或多于一个CDR的抗体。下列分别是LI33抗体的VH CDR1、CDR2和CDR3区的序列:IYPMF(SEQ ID NO:26)、WIGPSGGITKYADSVKG(SEQ IDNO:27)和EGHNDWYFDL(SEQ ID NO:28)。下列分别是LI33抗体的VL CDR1、CDR2和CDR3区的序列:RASQSVSSYLA(SEQID NO:29)、DASNRAT(SEQ ID NO:30)和QQYDKWPLT(SEQID NO:31)。

[0503] 在另一个实施方式中,LINGO-1抗体是单克隆抗体7P1D5.1G9,其可从杂交瘤7.P1D5.1.G9产生。7.P1D5.1.G9杂交瘤于2006年12月27日保藏于Mannasssas,VA的美国典型培养物保藏中心(ATCC)而7.P1D5.1.G9抗体被描述于

[0504] 用于本文所描述的方法中的某些LINGO-1拮抗剂抗体特异或优先地与特定的LINGO-1多肽片段或结构域结合。这种LINGO-1多肽片段包括但不限于包含下列氨基酸序列、主要由下列氨基酸序列组成或由下列氨基酸序列组成的LINGO-1多肽:SEQ ID NO:2的氨基酸34至532;34至417、34至425、34至493、66至532、66至417(LRR结构域)、66至426、66至493、66至532、417至532、417至425(LINGO-1碱性区)、417至424(LINGO-1碱性区)、417至493、417至532、419至493(LINGO-1Ig区)、或SEQ ID NO:2的425至532、或者与SEQ ID NO:2的氨基酸34至532;34至417、34至425、34至493、66至532、66至417、66至426、66至493、66至532、417至532、417至425(LINGO-1碱性区)、417至493、417至532、419至493(LINGO-1Ig区)或425至532至少70%、75%、80%、85%、90%或95%相同的LINGO-1变体多肽。

[0505] 本发明的方法中使用的某些LINGO-1特异性抗体或其抗原结 合片段、变体或衍生物结合的另外的LINGO-1肽片段包括但不限于包含LINGO-1的一个或多个富含亮氨酸的重复序列(LRR),主要由LINGO-1的一个或多个富含亮氨酸的重复序列(LRR)组成或由LINGO-1的一个或多个富含亮氨酸的重复序列(LRR)组成的那些片段。这些片段包括例如,

包含下列氨基酸序列、主要由下列氨基酸序列组成或由下列氨基酸序列组成的片段：SEQ ID NO：2 的氨基酸 66 至 89、66 至 113、66 至 137、90 至 113、114 至 137、138 至 161、162 至 185、186 至 209、210 至 233、234 至 257、258 至 281、282 至 305、306 至 329 或 330 至 353。也预期与 SEQ ID NO：2 的氨基酸 66 至 89、66 至 113、90 至 113、114 至 137、138 至 161、162 至 185、186 至 209、210 至 233、234 至 257、258 至 281、282 至 305、306 至 329、或 330 至 353 至少 70％、75％、80％、85％、90％或 95％相同的变体 LINGO-1 多肽的相应片段。

[0506] 本发明的某些抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物结合的另外的 LINGO-1 肽片段包括但不限于包含 LINGO-1 的 LRR 旁侧的富含半胱氨酸的区域、主要由 LINGO-1 的 LRR 旁侧的富含半胱氨酸的区域组成或由 LINGO-1 的 LRR 旁侧的富含半胱氨酸的区域组成的那些片段。这些片段包括例如包含 SEQ ID NO：2 的氨基酸 34 至 64(N 端的 LRR 旁侧区 (LRRNT))、主要由 SEQ ID NO：2 的氨基酸 34 至 64(N 端的 LRR 旁侧区 (LRRNT)) 组成或由 SEQ ID NO：2 的氨基酸 34 至 64(N 端的 LRR 旁侧区 (LRRNT)) 组成的片段，或者包含 SEQ ID NO：2 的氨基酸 363 至 416(C 端的 LRR 旁侧区 (LRRCT))、主要由 SEQ ID NO：2 的氨基酸 363 至 416(C 端的 LRR 旁侧区 (LRRCT)) 组成或由 SEQ ID NO：2 的氨基酸 363 至 416(C 端的 LRR 旁侧区 (LRRCT)) 组成的片段。也预期与 SEQID NO：2 的氨基酸 34 至 64 和 363 至 416 至少 70％、75％、80％、85％、90％或 95％相同的变体 LINGO-1 多肽的相应的片段。

[0507] 在其它实施方式中，有待被用于本文所描述的方法中的 LINGO-1 拮抗剂包括特异或优先地与 LINGO-1 的至少一个表位结合的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，其中所述表位包含下列氨基酸、主要由下列氨基酸组成或由下列氨基酸组成：SEQ IDNO：2 的至少四至五个氨基酸，SEQ ID NO：2 的至少七个、至少九个或至少约 15 至约 30 个之间的氨基酸。如本文描述的 SEQ ID NO：2 的给定表位的氨基酸可以是但不必须是连续或线性的。在某些实施方式中，LINGO-1 的至少一个表位包含下列表位、主要由下列表位组成或由下列表位组成：由在细胞表面上表达或为可溶片段（例如与 IgG Fc 区融合的）的 LINGO-1 的胞外结构域形成的非线性的表位。因此，在某些实施方式中，LINGO-1 的至少一个表位包含下列氨基酸、主要由下列氨基酸组成或由下列氨基酸序列组成：SEQ IDNO：2 的至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、至少约 15 至约 30 个之间、或至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 个连续或不连续的氨基酸，其中不连续的氨基酸通过蛋白折叠形成表位。

[0508] 用于本文所描述的方法中的某些 TrkB 激动剂抗体特异或优先地与特定的 TrkB 多肽片段或结构域结合。例如，本发明的抗体可结合 TrkB 的 IgG-1 或 IgG-2 区中的表位并且可结合 IgG-1 和 / 或 IgG-2 结构域的环区中的序列。本发明的抗体还包括增加 TrkB 自体磷酸化的那些。TrkB 激动剂抗体的某些非限制性实例还包括但不限于阻滞配体例如 BDNF 与 TrkB 受体结合的单克隆抗体、部分地阻滞配体例如 BDNF 与 TrkB 受体结合的单克隆抗体、不阻滞配体例如 BDNF 与 TrkB 受体结合的单克隆抗体和促进或增加配体例如 BDNF 与 TrkB 受体结合的单克隆抗体。本发明的 TrkB 激动剂抗体还包括不影响配体例如 BDNF 与 TrkB 受体结合的单克隆抗体。TrkB 激动剂抗体的某些非限制性实例包括 6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12、29D7（其描述于美国公开专利申请第 2007/0059304 号和 Quin 等人，Jour. of Neuroscience. 26：9394-9403(2006) 中，其通过引用并入本文）以及与这些抗体结合相同表位的抗体或抗原结合片段。在本发明的方法中使用的示例性 TrkB 激动剂抗体还包括与

上文列出的 TrkB 激动剂抗体特异性结合相同的 TrkB 表位的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0509] 在本发明的方法中使用的示例性的抗体或其片段包括但不限于分离的抗体或其抗原结合片段，其与选自由下列单克隆抗体所组成的组的参考单克隆抗体特异性结合相同的 LINGO-1 表位：201′、3A3、3A6、3B5、1A7、1D5、1G7、2B10、2C11、2F3、3P1B1.1F9、3P1D10.2C3、3P1E11.3B7、3P2C6.3G10.2H7、3P2C9.2G4、3P4A6.1D9、3P4A1.2B9、3P4C2.2D2、3P4C5.1D8、3P4C8.2G9、6P4F4.1Ds、6P4F4.1F9、7P1D5.1G9、1B6.4、2C7.2、2D6.1、2F7.3、2H3.2、3C11.1、3E3.1、3H11.2、3G8.1、2B8.1、3B5.230-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)、Li13、Li32、Li33、Li34、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)、1968(L1a.13)、3011、3012、3013、3418、3422、3562、D05、D07、D08、D10 和 D11，如 Mi 等人 2006 年 7 月 7 日提交的题目为“Sp35 Antibodies and UsesThereof(Sp35 抗体和其用途)”的国际申请 PCT/US06/26271 中所描述的，其通过引用全文并入本文。

[0510] 在其他的实施方式中，有待用于本发明的方法中的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂包括与 LINGO-1 或 TrkB 的至少一个表位特异或优先地结合的 LINGO-1 或 TrkB 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，其中表位分别包含下列氨基酸、分别主要由下列氨基酸组成或分别由下列氨基酸组成：分别如上所述的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个连续的或不连续的氨基酸，和修饰蛋白的另外的部分，例如可包括糖部分以使 LINGO-1 或 TrkB 抗体以比其与未修饰版本的蛋白更高的亲和力与修饰的靶蛋白结合。可选择地，LINGO-1 或 TrkB 抗体根本不与未修饰版本的蛋白结合。

[0511] 在某些实施方式中，有待用于本发明的方法中的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂包括本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，其与上文描述的 LINGO-1 或 TrkB 或片段或变体的至少一个表位特异性结合，即与不相关的或随机的表位相比更容易地与这样的表位结合；优先地与上文描述的 LINGO-1 或 TrkB 或片段或变体的至少一个表位结合，即与相关的、相似的、同源的或类似的表位相比更容易地与这样的表位结合；竞争性抑制自身与上文描述的 LINGO-1 或 TrkB 或片段或变体的某个表位特异或优先地结合的参考抗体的结合；或以由低于约 5×10^{-2}M、约 10^{-2}M、约 5×10^{-3}M、约 10^{-3}M、约 5×10^{-4}M、约 10^{-4}M、约 5×10^{-5}M、约 10^{-5}M、约 5×10^{-6}M、约 10^{-6}M、约 5×10^{-7}M、约 10^{-7}M、约 5×10^{-8}M、约 10^{-8}M、约 5×10^{-9}M、约 10^{-9}M、约 5×10^{-10}M、约 10^{-10}M、约 5×10^{-11}M、约 10^{-11}M、约 5×10^{-12}M、约 10^{-12}M、约 5×10^{-13}M、约 10^{-13}M、约 5×10^{-14}M、约 10^{-14}M、约 5×10^{-15}M 或约 10^{-15}M 的解离常数 K_D 表征的亲和力与上文描述的 LINGO-1 或 TrkB 或片段或变体的至少一个表位结合。在特定的方面，相对于鼠 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段，抗体或其片段优先地与人类 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段结合。

[0512] 如抗体结合解离常数的上下文中所用的，术语“约”允许用于测量抗体亲和力的方法中本身固有的程度的变化。例如取决于所使用的仪器的精确度的水平，基于所测量的样品数目的标准误差和舍入误差，术语“约 10^{-2}M”可包括例如从 0.05M 至 0.005M。

[0513] 在特定的实施方式中，本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂包括本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，其以小于或等于 5×10^{-2} 秒 $^{-1}$、10^{-2} 秒 $^{-1}$、

5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 或 10^{-3} 秒 $^{-1}$ 的解离速率 ((k(off)) 与 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段或变体结合。可选择地，本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以小于或等于 5×10^{-4} 秒 $^{-1}$、10^{-4} 秒 $^{-1}$、5×10^{-5} 秒 $^{-1}$ 或 10^{-5} 秒 $^{-1}$、5×10^{-6} 秒 $^{-1}$、10^{-6} 秒 $^{-1}$、5×10^{-7} 秒 $^{-1}$ 或 10^{-7} 秒 $^{-1}$ 的解离速率 ((k(off)) 与 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段或变体结合。

[0514] 在其他的实施方式中，本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂包括本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，其以大于或等于 $10^{3}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$、$5\times10^{3}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$、$10^{4}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 或 $5\times10^{4}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 的结合速率 (k(on)) 与 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段或变体结合。可选择地，本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以大于或等于 $10^{5}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$、$5\times10^{5}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$、$10^{6}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 或 $5\times10^{6}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 或 $10^{7}M^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 的结合速率 (k(on)) 与 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段或变体结合。

[0515] 在一个实施方式中，本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体是抗体分子或其免疫特异性片段。除非特别指出，否则如本文所用的，关于抗体的“其片段”是指免疫特异性片段，即抗原特异性片段。在一个实施方式中，本发明方法中所使用的抗体是双特异性的结合分子、结合多肽或抗体，例如具有对多于一个表位，例如具有对多于一种抗原或相同抗原上的多于一个表位的结合特异性的双特异性抗体、微型抗体、结构域缺失的抗体、或 融合蛋白。在一个实施方式中，双特异性抗体具有对 LINGO-1 或 TrkB 的至少一个表位特异性的至少一个结合结构域。双特异性抗体可以是四价抗体，其具有对 LINGO-1 或 TrkB 的表位特异性的两个靶结合结构域和对另一个靶特异性的两个靶结合结构域。因此，四价双特异性抗体可以是对每一个特异性二价的。

[0516] 本发明的某些方法包括施用 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段，其中一个或多个恒定区结构域中的至少一部分缺失或者以其它方式改变以提供所需要的生物化学特征，例如与具有几乎相同的免疫原性的完整的未改变的抗体相比，减少的效应子功能、非共价二聚化的能力、增加的定位于所期望的位点的能力、减少的血清半衰期或增加的血清半衰期。例如，本文描述的方法中所使用的某些抗体是结构域缺失的抗体，其包含与免疫球蛋白重链相似但是缺少一个或多个重链结构域的至少一部分的多肽链。例如，在某些抗体中，修饰的抗体的恒定区的一个完整的结构域将缺失，例如 C_H2 结构域的全部或部分将缺失。

[0517] 在本文所描述的方法中使用的某些 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段中，可使用本领域中已知的技术将 Fc 部分突变以降低效应子功能。例如，恒定区结构域的缺失或失活（通过点突变或其他方法）将降低循环中的修饰的抗体的 Fc 受体结合，从而增加在所期望的作用位点的定位。在其他的实例中，可以是根据本发明的恒定区修饰调节补体结合并且由此降低了轭合的细胞毒素的血清半衰期和非特异性结合。其他所期望的对恒定区的修饰包括设计以改变糖基化（例如以减少糖基化）以便影响效力、安全性、抗原结合、Fc 效应子功能、稳定性和 / 或抗体产物一致性的突变。另外可期望的修饰包括改变抗体溶解度的修饰，例如通过已知或预期参与多聚体形成的残基的修饰。恒定区的其他的修饰可被用于修饰二硫键或寡糖部分，其允许由增加的抗原特异性或抗体柔性 所导致的增强的定位。所产生的生理谱、生物可利用率和修饰的其他生物化学影响例如定位、生物分布或血清半衰期可使用熟知的免疫技术容易地被测量并且定量而无需过多的实验。

[0518] 可使用本领域中已知的技术从完整的前体或母体抗体制备本文公开的方法中所

使用的抗体或其免疫特异性片段的修饰的形式。本文更详细地讨论了示例性技术。

[0519] 在某些实施方式中，本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段的可变区或恒定区是完全人类的。可使用本领域已知的技术并如本文所描述的制备完全人类的抗体。例如，抗特异性抗原的完全人类的抗体可通过向已被修饰以响应于抗原性攻击产生这种抗体但其内源基因座已不可用的转基因动物施用抗原来制备。可用来制备这种抗体的示例性技术描述于美国专利 6,150,584、6,458,592、6,420,140 中。其他技术是本领域中已知的。同样地，完全人类的抗体可通过不同的展示技术例如噬菌体展示或其他的病毒展示系统来生产，如本文其他地方更详细地描述的。

[0520] 可使用本领域已知的技术来制备或制造本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段。在某些实施方式中，抗体分子或其片段是“重组产生的”，即，是使用重组 DNA 技术产生的。在本文其他地方更详细地讨论了用于制备抗体分子或其片段的示例性的技术。

[0521] 本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂抗体或其片段可通过本领域中已知的任何适当的方法来产生。

[0522] 可通过本领域中熟知的多种程序来生产多克隆抗体。例如可向不同的宿主动物包括但不限于兔、小鼠、大鼠等施用 LINGO-1 或 TrkB 免疫特异性片段以诱导含有对抗原特异性的多克隆抗体的血清的产生。取决于宿主物种，可使用不同的佐剂以增加免疫响应并且佐剂包括但不限于弗氏佐剂（完全的和不完全的）、矿物胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、聚醚多元醇、聚阴离子、肽、油性乳液、钥孔戚血蓝素、二硝基苯酚和可能有用的人类佐剂例如 BGG（卡介苗）和短小棒状杆菌 (Corynebacterium parvum)。这种佐剂也是本领域中熟知的。

[0523] 可使用本领域已知的各种各样的技术包括杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合的使用来制备单克隆抗体。例如，可使用包括本领域已知的以及在例如 Harlow 等人，Antibodies:A LaboratoryManual（抗体：实验室手册），Cold Spring Harbor Laboratory Press，第 2 版 .(1988);Hammerling 等人，在 :Monoclonal Antibodies and T-CellHybridomas（单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤）Elsevier,N.Y.,563-681(1981)（所述文献通过引用全文并入）中教导的那些的杂交瘤技术来生产单克隆抗体。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单一克隆包括真核、原核或噬菌体克隆的抗体，而不是产生其的方法。因此，术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。可使用本领域已知的各种各样的技术包括杂交瘤和重组和噬菌体展示的使用来制备单克隆抗体。

[0524] 在一个实例中，使用本领域认可的方案，通过多次的皮下或腹腔内注射相关抗原（例如纯化的 LINGO-1 或 TrkB 抗原或包含这种抗原的细胞或细胞提取物）和佐剂来在哺乳动物中产生抗体。这一免疫接种通常导致免疫响应，包括从活化的脾细胞或淋巴细胞产生抗原反应性抗体。尽管可以从动物血清收集所得的抗体以提供多克隆的制剂，但常常期望的是从脾、淋巴结或外周血分离单一的淋巴细胞以提供单克隆抗体 (mAb) 的同源制品。淋巴细胞可以例如从 脾获得。

[0525] 在这一熟知的过程 (Kohler 等人，Nature 256 :495(1975)) 中，将来自已经用抗原注射的哺乳动物的相对短寿命的或必死的淋巴细胞与不死的肿瘤细胞系（例如骨髓瘤细

胞系）融合，由此产生杂交细胞或“杂交瘤”，其既是不死的并且能够产生B细胞的遗传编码的抗体。所得的杂交物通过每种单独的含有对于单一抗体的形成来说特异的基因的株的筛选、稀释和再生而被分离为单一的遗传株。它们产生抗所期望的抗原的同质的抗体并且就它们的纯的遗传来源来说是所谓的“单克隆的”。

[0526] 通常，接种由此制备的杂交瘤细胞并且培养在含有抑制未融合的母本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质的适当培养基中。本领域技术人员应理解的是，用于杂交瘤的形成、筛选和培养的试剂、细胞系和培养基是可商业上从多个来源获得的并且标准流程是已建立的。通常，为了产生抗所期望的抗原的单克隆抗体而测定在其中培养杂交瘤细胞的培养基。杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性可通过体外测定例如免疫沉淀、放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来确定。杂交瘤细胞被鉴定为产生具有所期望的特异性、亲和力和 / 或活性的抗体之后，可将克隆通过有限的稀释程序来亚克隆并通过标准方法来培养 (Goding，Monoclonal A ntibodies :Principles and Practice（单克隆抗体 :原理和实践），Academic Press，第 59-103 页 (1986))。还应理解的是，由亚克隆分泌的单克隆抗体可通过常规的纯化程序例如蛋白 -A、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水液或血清分离。

[0527] 识别特异抗原的抗体片段可通过已知的技术产生。例如 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段可使用酶例如木瓜蛋白酶（以产生 Fab 片段）或胃蛋白 酶（以产生 $F(ab')_2$ 片段）通过免疫球蛋白分子的蛋白水解性裂解来产生。$F(ab')_2$ 片段含有可变区、轻链恒定区和重链的 C_H1 结构域。

[0528] 本领域技术人员还应当理解的是，编码抗体或抗体片段（例如抗原结合位点）的 DNA 也可衍生自抗体噬菌体文库。尤其是，这种噬菌体可用来展示从全部或组合的抗体文库（例如人类或小鼠的）表达的抗原结合结构域。可用抗原，例如使用标记的抗原或结合或捕获至固体表面或小珠的抗原来筛选或鉴定表达结合所感兴趣的抗原的抗原结构域的噬菌体。这些方法中所用的噬菌体通常是包含从具有重组融合至噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白的 Fab、Fv 或二硫化物稳定的 Fv 抗体结构域的噬菌体表达的 fd 和 M13 结合结构域的丝状噬茵体。示例性的方法展示于例如 EP 368 684 B1 ;美国专利 5,969,108、Hoogenboom，H.R. 和 Chames，Immunol.Today 21 :371(2000) ;Nagy 等 人 Nat.Med.8 :801(2002) ;Huie 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98 :2682(2001) ;Lui 等人，J.Mol.Biol.315 :1063(2002) 中，其每一个通过引用并入本文。若干出版物（例如 Marks 等人，Bio/Technology 10 :779-783(1992)）已经描述了通过作为用于构建大的噬菌体文库的策略的链改组以及组合感染和体内重组来产生高亲和性的人类抗体。在另一个实施方式中，核糖体展示可用来代替噬菌体作为展示的平台（参见例如 Hanes 等人，Nat.Biotechnol.18 :1287(2000) ；Wilson 等 人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98 :3750(2001) ；或 Irving 等 人，J.Immunol.Methods 248 :31(2001))。在还有另外的实施方式中，可对细胞表面文库筛选抗体 (Boder 等 人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97 :10701(2000) ;Daugherty 等 人，J.Immunol.Methods 243 :211(2000))。这种程序提供了用于分离和随后克隆单克隆抗体的传统杂交瘤技术的替代技术。

[0529] 在噬菌体展示方法中，功能性抗体结构域被展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。尤其是，编码 V_H 和 V_L 区的 DNA 序列是从动物 eDNA 文库（例如淋

巴组织的人类或鼠 cDNA 文库）或者合成的 cDNA 文库扩增的。在某些实施方式中，编码 VH 和 VL 区的 DNA 通过 PCR 由 scFV 接头连接在一起并且克隆至噬菌粒载体（例如 p CANTAB 6 或 pComb 3HS S）中。载体被电穿孔至大肠杆菌 (E.coli) 中并且用辅助噬菌体感染大肠杆菌。这些方法中所用的噬菌体通常是包含 fd 和 M13 的丝状噬菌体，并且 V_H 和 V_L 区通常与噬菌体基因 III 或基因 VIII 重组融合。可使用抗原例如使用标记的抗原或结合或捕获至固体表面或小珠的抗原筛选或鉴定表达结合所感兴趣的抗原（例如 LINGO-1 或 TrkB 多肽或其片段）的抗原结合结构域的噬菌体。

[0530] 可用来制备抗体的噬菌体展示方法的另外的实例包括 Brinkman 等人，J.Immunol.Methods 182:41-50(1995)；Ames 等 人，J.Immunol.Methods 184:177-186(1995)；Kettleborough 等人，Eur.J.Immunol.24:952-958(1994)；Persic 等人，Gene 187:9-18(1997)；Burton 等人，Advances in Immunology 57:191-280(1994)；PCT 申请第 PCT/GB91/01134 号；PCT 公开 WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO95/20401 和美国专利第 5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743 和 5,969,108 中公开的那些，其每一个都通过引用全文并入本文。

[0531] 如上文参考文献中所描述的，在噬菌体筛选后，可分离来自噬菌体的抗体编码区并用于产生整个抗体，包括人类抗体或任何其他所期望的抗原结合片段，并在任何所期望的宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌中表达。例如，使用本领域已知的方法例如 PCT 公开 WO 92/22324；Mullinax 等人，BioTechniques 12(6):864-869(1992)；和 Sawai 等人，AJRI 34:26-34 (1995) 和 Better 等人，Science 240:1041-1043(1988)（所述参考文献通过引用全文并入本文）中描述的那些，也可使用重组产生 Fab、Fab' 和 $F(ab')_2$ 片段的技术。

[0532] 在另一个实施方式中，使用常规程序（例如通过使用能够与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）可容易地分离并测序编码本发明的方法中所使用的期望的单克隆抗体的 DNA。分离并亚克隆的杂交瘤细胞作为这种 DNA 的可能的来源。分离后，DNA 可被放入表达载体中，其之后被转染至不另外产生免疫球蛋白的原核或真核宿主细胞例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞中。更特别地，如 Newman 等人 1995 年 1 月 25 日提交的美国专利第 5,658,570 号中描述的，分离的 DNA（其可以是如本文所描述的合成的）可用于克隆恒定区和可变区序列以便制造抗体。必然地，这使得从所筛选的细胞提取 RNA、转化为 cDNA 并且通过使用 Ig 特异性引物的 PCR 扩增成为必需。用于这一目的的适合的引物也描述于美国专利第 5,658,570 号中。如下文中将更详细地讨论的，可以相对大的量培养表达所期望的抗体的转化的细胞以提供免疫球蛋白的临床和商业供应。

[0533] 在特定的实施方式中，可通过本领域熟知的方法例如通过与已知的其他重链和轻链可变区的氨基酸序列相比较以确定序列高可变性的区域来检查重链和 / 或轻链的可变结构域的氨基酸序列以鉴定互补决定区 (CDR) 的序列。使用常规的重组 DNA 技术，可将一个或多个 CDR 插入框架区，例如插入人类框架区以使非人类抗体人源化。框架区可以是天然存在的或通用的框架区，并且可以是人类框架区（参见例如 Chothia 等人，J.Mol.

Biol.278 :457-479(1998) 的人类框架区的列表)。通过将框架区和 CDR 组合产生的多核苷酸可编码与所期望的多肽例如 LINGO-1 的至少一个表位特异性结 合的抗体。可在框架区中进行一个或多个氨基酸取代并且氨基酸取代可改善抗体与其抗原的结合。此外,这种方法可用于对参与链内二硫键的一个或多个可变区半胱氨酸残基进行氨基酸取代或缺失以产生缺少一个或多个链内二硫键的抗体分子。对多核苷酸的其他改变也被本发明包括并且在本领域技术的范围内。

[0534] 在某些实施方式中,本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段将不会在有待被治疗的动物例如人类中导致有害的免疫响应。在一个实施方式中,可使用本领域公认的技术修饰本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段以减少它们的免疫原性。例如抗体可被人源化、灵长源化、去免疫化,或可使用嵌合抗体。这些类型的抗体来自非人类抗体,通常是鼠或灵长类抗体,其保留或基本保留母本抗体的抗原结合特性,但是其在人类中免疫原性较低。这可通过不同的方法实现,所述方法包括 (a) 将整个非人类可变结构域嫁接到人类恒定区上以产生嵌合抗体 ;(b) 将一个或多个非人类互补决定区 (CDR) 的至少一部分嫁接到保留或不保留关键框架残基的人类框架和恒定区中 ;或 (c) 移植整个非人类可变结构域,但是通过替换表面残基将它们用类人类的部分“遮蔽”。这些方法公开于 Morrison 等 人,Proc.Natl.Acad.Sci.81 :6851-6855(1984) ;Morrison 等 人,Adv.Immunol.44 :65-92(1988) ;Verhoeyen 等人,Science 239 :1534-1536(1988) ;Padlan,Molec.Immun.28 :489-498(1991) ;Padlan,Molec.Immun.31 :169-217(1994) 和美国专利第 5,585,089、5,693,761、5,693,762 和 6,190,370 号中,其所有都通过引用全文并入本文。

[0535] 去免疫化还可用于减少抗体的免疫原性。如本文所用的,术语“去免疫化”包括改变抗体以修饰 T 细胞表位 (参见例如 WO9852976A1、WO0034317A2)。例如,分析来自起始抗体的 V_H 和 V_L 序列并且将人类 T 细胞表位从每个 V 区“作图”,显示表位相对于互补决定区 (CDR) 和序列中其他关键残基的定位。分析 T 细胞表位图的单独的 T 细胞表位以便鉴定具有改变最终抗体的活性的低风险的可选择的氨基酸取代。设计可选择的 V_H 和 V_L 序列的范围,包括氨基酸取代的组合,并且这些序列随后被并入至本文所公开的方法中使用的结合多肽例如 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其免疫特异性片段的范围中,之后检测其功能。通常产生并检测 12 至 24 个变体抗体。之后将包含修饰的 V 区和人类 C 区的完整的重链和轻链基因克隆至表达载体中并且随后将质粒引入细胞系中以便产生整个抗体。之后将抗体在适当的生物化学和生物学测定中比较并鉴定最佳的变体。

[0536] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分来自不同动物物种的分子,例如具有来自小鼠单克隆抗体的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的抗体。用于产生嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见例如 Morrison, Science 229 :1202(1985) ;Oi 等人,BioTechniques 4 :214(1986) ;Gillies 等人,J.Immunol.Methods 125 :191-202(1989) ;美国专利第 5,807,715、4,816,567 和 4,816397 号,其通过引用全文并入本文。人源化抗体是来自结合所期望的抗原的非人类物种的抗体的抗体分子,具有来自非人类物种的一个或多个抗原决定区 (CDR) 和来自人类免疫球蛋白分子的框架区。常常,人类框架区中的框架残基将被来自 CDR 供体抗体的相应的残基取代以改变并且可能地改善抗原结合。这些框架取代通过本领域中熟知的方法来鉴定,例如通过 CDR 和框架残基的相互作用的建模来鉴定对抗原结

合来说重要的框架残基，以及通过序列比较来鉴定在特定位置的罕见的框架残基（参见例如 Queen 等人，美国专利第 5,585,089 号；Riechmann 等人，Nature 332：323(1988)，其通过引用全文并入本文）。可使用本领域已知的各种技术来将抗体人源化，包括例如 CDR 嫁接 (EP239,400；PCT 公开 WO 91/09967；美国专利第 5,225,539、5,530,101 和 5,585,089 号）、镶饰 (veneering) 或重塑 (EP 592,106；EP 519,596；Padlan，Molecular Immunology 28(4/5)：489-498(1991)；Studnicka 等人，Protein Engineering 7(6)：805-814(1994)；Roguska. 等人，PNAS91：969-973(1994)) 和链改组（美国专利第 5,565,332 号）。

[0537] 用于产生重组抗体的另一个高效的方法由 Newman，Biotechnology 10：1455-1460(1992) 公开。特别地，这一技术导致含有猴可变结构域和人类恒定序列的灵长源化抗体的产生。这一参考文献通过引用全文并入本文。而且这一技术还描述于共同受让的美国专利第 5,658,570、5,693,780 和 5,756,096 号中，其每一个都通过引用全文并入本文。

[0538] 对于人类患者的治疗处理来说，完全人类的抗体是尤其期望的。人类抗体可通过本领域已知的各种方法来制备，其包括使用来自人类免疫球蛋白序列的抗体文库的上文所描述的噬菌体展示法。也参见美国专利第 4,444,887 和 4,716,111 号以及 PCT 公开 WO98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO96/34096、WO 96/33735 和 WO 91/10741，其每一个通过引用全文并入本文。

[0539] 还可使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但是可表达人类免疫球蛋白的转基因小鼠产生人类抗体。例如，人类重链和轻链免疫球蛋白基因络合物可随机地或通过同源重组被引入小鼠胚胎干细胞中。可选择地，除了人类重链和轻链基因以外，人类可变区、恒定区和多变区可被引入小鼠胚胎干细胞中。可通过通过同源重组引入人类免疫球蛋白基因座分别或同时使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因无功能。特别地，JH 区的纯合缺失阻止了内源抗体的产生。修饰的胚胎干细胞可被扩展并微注射至胚泡中以产生嵌合小鼠。之后繁殖嵌合小鼠以产生表达人类抗体的纯合后代。用选择的抗原例 如所期望的靶多肽的全部或一部分以通常的方式将转基因小鼠免疫。可使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得抗抗原的单克隆抗体。由转基因小鼠携带的人类免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化期间重排并且随后经历类别转换和体细胞突变。因此，使用这样的技术，可能产生治疗上有用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。对于用来生产人类抗体的这一技术的综述，参见 Lonberg 和 Huszar Int.Rev.Immunol.13：65-93(1995)。对于这一用于产生人类抗体和人类单克隆抗体的技术和产生这种抗体的方案的详细讨论，参见例如 PCT 公开 WO 98/24893、WO 96/34096、WO 96/33735；美国专利第 5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318 和 5,939,598 号，其通过引用并入本文。此外，可雇用公司例如 Abgenix，Inc.(Freemont，Calif.) 和 GenPharm(San Jose，Calif.) 以使用与本文描述相似的技术提供抗所选择的抗原的人类抗体。

[0540] 另一种使用 SCID 小鼠产生人类抗体的方法公开于美国专利第 5,811,524 号中，其通过引用并入本文。可以理解的是，可如本文所描述的分离和操作与这些人类抗体相关的遗传物质。

[0541] 可使用也称为“定向选择”的技术产生识别所选择的表位的完全的人类抗体。在这一方法中，所选择的非人类单克隆抗体例如小鼠抗体被用于定向选择识别相同抗原的

完全人类抗体 (Jespers 等人，Bio/Technology 12 :899-903(1988))。也参见美国专利第 5,565,332 号。

[0542] 可选择地，为了产生单链抗体所描述的技术（美国专利第 4,694,778 号；Bird，Science 242 :423-442(1988) ;Huston 等 人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85 : 5879-5883(1988) 和 Ward 等人，Nature334 :544-554(1989)) 可被适用于产生单链抗体。单链抗体通过将 Fv 区的重链和轻链片段通过氨基酸桥连接产生单链抗体来形成。也可 使用用于组装大肠杆菌中功能性 Fv 片段的技术 (Skerra 等人，Science 242 : 1038-1041(1988))。可用来产生单链 Fv 和抗体的技术的实例包括公开于美国专利第 4,946,778 和 5,258,498 号 ;Huston 等人，Methods in Enzymology 203 :46-88(1991) ;Shu 等人，PNAS90 :7995-7999(1993) 和 Skerra 等人，Science 240 :1038-1040(1988) 中的那些。对于某些用途（尤其是包括人类中抗体的体内使用和体外检测测定）来说，可使用嵌合的、人源化的或人类抗体。

[0543] 此外，可使用为了通过将来自适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自适当生物活性的人类抗体分子的基因剪接在一起产生“嵌合抗体”所开发的技术 (Morrison 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.81 :851-855(1984) ;Neuberger 等人，Nature 312 : 604-608(1984) ;Takeda 等人，Nature 314 :452-454(1985))。如本文所用的，嵌合抗体是其中不同部分来自不同动物物种的分子，例如具有来自小鼠单克隆抗体的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的那些，诸如人源化抗体。

[0544] LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体还可以是在不能产生内源免疫球蛋白的转基因动物（例如小鼠）中产生的人类或基本上人类的抗体（参见例如美国专利第 6,075,181、5,939,598、5,591,669 和 5,589,369 号，其每一个通过引用并入本文）。例如，已经描述了嵌合和胚系突变小鼠中抗体重链连接区的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人类免疫球蛋白基因阵列转移至这一胚系突变小鼠将导致在抗原攻击后产生人类抗体。

[0545] 在另一个实施方式中，可通过显微操作来选择淋巴细胞并分离可变基因。例如，可从免疫的哺乳动物分离外周血单核细胞并体外培养约 7 天。可筛选培养物中符合筛选标准的特异性 IgG。可分离来自阳性孔的细胞。可通过 FACS 来分离单独的产生 Ig 的 B 细胞，或通过在补体介导的溶血斑测定中鉴定单独的产生 Ig 的 B 细胞而分离。可将产生 Ig 的 B 细胞显微操作至试管中并且可使用例如 RT-PCR 扩增 V_H 和 V_L 基因。可将 V_H 和 V_L 基因克隆至抗体表达载体中并转染至细胞（例如真核或原核细胞）中以便表达。

[0546] 可选择地，可使用本领域技术人员熟知的技术选择和培养产生抗体的细胞系。这种技术描述于各种实验室手册和基础出版物中。在这一方面，如下文所描述的适于在本发明中使用的技术描述于 Current Protocols in Immunology，Coligan 等人编辑，Green PublishingAssociates and Wiley-Interscience，John Wiley and Sons，New York(1991) 中，其通过引用全文包括增补并入本文。

[0547] 本文所公开的方法中使用的抗体可通过本领域中已知的用于合成抗体的任何方法，尤其是通过化学合成或通过本文所描述的重组表达技术来产生。

[0548] 还应理解的是，本发明的范围还涵盖抗原结合 DNA 序列的所有等位基因、变体和突变体。

[0549] 正如所熟知的，可通过标准技术例如异硫氰酸胍提取和沉淀之后离心或层析从原

始的杂交瘤细胞或从其他转化的细胞分离 RNA。期望的话，可通过标准技术例如寡聚脱氧胸苷纤维素上的层析从总 RNA 分离 mRNA。适合的技术是本领域中熟知的。

[0550] 在一个实施方式中，可根据熟知的方法使用逆转录酶和 DNA 聚合酶同时或分别制备编码本发明的方法中所使用的抗体的重链和轻链的 cDNA。可通过通用的恒定区引物或通过基于公开的重链和轻链 DNA 和氨基酸序列的更特异的引物来起始 PCR。如上文所讨论的，还可使用 PCR 以分离编码抗体轻链和重链的 DNA 克隆。在这一实例中，可通过通用的引物或较大的同源探针例如小鼠恒定 区探针来筛选文库。

[0551] DNA，通常是质粒 DNA，可使用本领域已知的技术从细胞分离，根据详细地在例如前文的与重组 DNA 技术相关的参考文献中展示的标准的熟知的技术进行限制性作图并测序。当然，可根据本发明在分离过程或随后的分析过程中的任何点合成 DNA。

[0552] 抗体或其片段、衍生物或类似物例如为 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的抗体的重链或轻链的重组表达需要构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。获得编码本发明的抗体分子或抗体的重链或轻链或其部分（其可含有重链或轻链可变结构域）的多核苷酸后，用于产生抗体分子的载体可使用本领域熟知的技术通过重组 DNA 技术来产生。因此，本文描述了通过表达含有抗体编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白的方法。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有抗体编码序列和适合的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括，例如，体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。因此本发明提供了可操作地连接至启动子的包含编码本发明的抗体分子或者其重链或轻链或者重链或轻链可变结构域的核苷酸序列的可复制载体。这种载体可包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列（参见例如 PCT 公开 WO 86/05807、PCT 公开 WO 89/01036 和美国专利第 5,122,464 号），并且抗体的可变结构域可被克隆至这样的载体中以便表达整个重链或轻链。

[0553] 通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞中并且之后通过常规技术培养转染的细胞以产生本文所描述的方法中所使用的抗体。因此，本发明包括含有可操作地连接至异源启动子的编码本发明的抗体或者其重链或轻链的多核苷酸的宿主细胞。在表达双链抗体的某些实施方式中，如下文所详细描述的，编码重链和轻链两者的载体可在宿主细胞中共表达以便表达整个免疫球蛋白分子。

[0554] 各种宿主表达载体系统可用来表达在本文其他地方描述的方法中使用的抗体分子。

[0555] 可用本发明的两个表达载体，编码衍生重链的多肽的第一载体和编码衍生轻链的多肽的第二载体，共转染宿主细胞。两个载体可含有同一可选择的标记，其能够使重链和轻链相等表达。可选择地，可使用编码重链和轻链多肽两者的单个载体。在这种情况下，轻链被有利地置于重链之前以避免有毒的自由重链过量 (Proudfoot, Nature 322 :52(1986) ; Kohler, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 :2197(1980))。重链和轻链的编码序列可包含 cDNA 和基因组 DNA。

[0556] 本发明的抗体分子被重组表达后，其可通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化，例如通过层析（例如，离子交换层析、亲和层析、特别是在蛋白 A 之后通过对特异抗原的亲和层析和分级柱层析）、离心、差异溶解或通过纯化蛋白的任何其他的标准技术。可选择地，用于增加本发明的抗体的亲和力的另一种方法公开于美国 2002 0123057A1 中，其通过引用并入本文。

[0557] 在一个实施方式中，本发明的方法中使用的结合分子或抗原结合分子包含合成的恒定区，其中缺失一个或多个结构域的部分或全部（“缺失结构域的抗体”）。在某些实施方式中，相容的修饰的抗体将包含缺失结构域的构建体或变体，其中整个 C_H2 结构域被去除（ΔC_H2 构建体）。对于另外的实施方式，可用短的连接肽取代所缺失的结构域以提供可变区的运动的柔性和自由度。本领域技术人员应理解的是，由于 C_H2 结构域对抗体的代谢速度的调节特性所以这种构建体是特别有用的。

[0558] 在某些实施方式中，本文所公开的方法中所使用的修饰的抗体是微型抗体。可使用本领域中描述的方法来制备微型抗体（参见， 例如美国专利 5,837,821 或 WO 94/09817A1）。

[0559] 在另一个实施方式中，本文所公开的方法中所使用的修饰的抗体是本领域已知的缺失 C_H2 结构域的抗体。可使用编码 IgG_1 人类恒定区结构域的载体（例如来自 Biogen IDEC Incorporated）产生缺失结构域的构建体（参见例如 WO 02/060955A2 和 WO02/096948A2，其通过引用并入本文）。这一示例性载体被工程化以缺失 C_H2 结构域并提供表达缺失结构域的 IgG_1 恒定区的合成的载体。

[0560] 在一个实施方式中，本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体或其片段包含具有几个甚至单个氨基酸缺失或取代的免疫球蛋白重链，只要其允许单体亚基之间的结合。相似地，可能所期望的是仅缺失控制有待被调节的效应子功能（例如补体结合）的一个或多个恒定区结构域的一部分。这种恒定区的部分缺失可改善抗体的所选择的特征（血清半衰期）而将其与主题恒定区结构域有关的其它期望的功能保留完整。而且，如上文所提及的，所公开的抗体的恒定区可以是通过增强所得的构建体的概况 (profile) 的对一个或多个氨基酸的突变或取代来合成的。在这一方面，破坏由保守的结合位点提供的活性（例如 Fc 结合）而大致上维持所修饰的抗体的构象和免疫原性概况是可能的。还有其他的实施方式包括向恒定区加入一个或多个氨基酸以增强所期望的特征例如效应子功能或提供更多的细胞毒素或糖类连接。在这种实施方式中，可能所期望的是插入或复制衍生自所选择的恒定区结构域的特定序列。

[0561] 本发明还提供了抗体的用途，所述抗体包含下列、主要由下列组成或由下列组成：本文所描述的抗体分子（例如 V_H 区和 / 或 V_L 区）的变体（包括衍生物），其中抗体或其片段免疫特异地与 LINGO-1 或 TrkB 多肽结合。本领域技术人员已知的标准技术可用来将突变引入编码结合分子的核苷酸序列中，其包括但不限于产生氨基酸取代的定点诱变和 PCR 介导的诱变。变体（包括衍生物）可编码相对于参考的 V_H 区、V_HCDR1、V_HCDR2、V_HCDR3、V_L 区、V_LCDR1、V_LCDR2 或 V_LCDR3 来说少于 50 个氨基酸的取代、少于 40 个氨基酸的取代、少于 30 个氨基酸的取代、少于 25 个氨基酸的取代、少于 20 个氨基酸的取代、少于 15 个氨基酸的取代、少于 10 个氨基酸的取代、少于 5 个氨基酸的取代、少于 4 个氨基酸的取代、少于 3 个氨基酸的取代、或少于 2 个氨基酸的取代。“保守的氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有带有相似电荷的侧链的氨基酸残基取代的取代。在本领域中具有带有相似电荷的侧链的氨基酸残基的家族已经被定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），具有酸性侧链的氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸），具有不带电荷的极性侧链的氨基酸（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸），具有非极性侧链的氨基酸（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨

酸），具有 β 支链侧链的氨基酸（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和具有芳香族侧链的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。可选择地，可随机地沿全部或部分编码序列引入突变，例如通过饱和诱变，并且可筛选所得到的突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。

[0562] 例如，仅向抗体分子的框架区或仅向抗体分子的 CDR 区引入突变是可能的。所引入的突变可以是沉默或中性的错义突变，即对抗体结合抗原的能力没有影响或仅有极少影响。这些类型的突变对优化密码子选择或改善杂交瘤的抗体生产来说可能是有用的。可选择地，非中性的错义突变可改变抗体结合抗原的能力。大多数沉默或中性的错义突变的定位倾向于在框架区中，而大多数非中性的错义突变的定位倾向于在 CDR 中，尽管这不是绝对的要求。本领域 技术人员应当能够设计并检测具有所期望的特性的突变分子，例如抗原结合活性上没有改变或结合活性上有改变（例如抗原结合活性上的改善或抗体特异性上的变化）。诱变之后，所编码的蛋白可被常规地表达并且可使用本文所描述的技术或通过本领域已知的常规的修饰技术确定所编码的蛋白的功能和 / 或生物活性。

[0563] 本发明的方法中使用的另外的拮抗剂和激动剂和其组合

[0564] 除了之前描述的激动剂和拮抗剂，本发明的方法中使用的另外的 TrkB 激动剂包括其将促进、增加或增强 TrkB 的活性的任何多肽、抗体、化合物或核苷酸。这种激动剂包括多肽、抗体、化合物或核苷酸，其干扰或促进 TrkB 配体例如脑来源的神经营养因子 (BDNF) 与 TrkB 受体的结合并且因此也被称为 BDNF 激动剂。这种分子包括但不限于扰乱配体和 TrkB 之间的相互作用的抗体、TrkB 的肽模拟激动剂和配体类似物，例如 5,770,577、6,077,829、6,723,701、和 6,800,607 中所描述的那些，其通过引用全文并入本文。

[0565] 本发明的方法中使用的本文所描述的拮抗剂和激动剂可作为组合物而以不同组合施用。例如，不同的 TrkB 激动剂可用来与 LINGO-1 拮抗剂组合。在本发明的方法中使用的组合物还可包括多种 TrkB 激动剂和 / 或 LINGO-1 拮抗剂。

[0566] 另外，在本发明中使用的组合物可包括在 CNS 中表达的蛋白（例如 Nogo 受体 1(NgR1)、LINGO-1(LINGO-1)、TAJ 或少突胶质细胞 - 髓鞘质糖蛋白 (OMgp)) 的其它拮抗剂或激动剂。NgR1 的拮抗剂描述于美国公开第 2002/0077295 和 2005/0271655A1 号和国际申请公开第 WO 01/51520、WO 03/031462、WO 2004/014311 和 WO 2005/016955 号中，其通过引用全文并入本文。LINGO-1(LINGO-1) 的拮抗剂可在美国公开第 2006/0009388A1 号和国际申请公开第 WO 2004/085648 号中找到，其通过引用全文并入本文。TAJ 拮抗剂的实例描述于美国公开第 2006/0058223A1 号中，其通过引用全文并入本文。OMgp 拮抗剂描述于美国临时申请第 60/730,357 和 60/735,170 号中，其通过引用全文并入本文。在本发明的方法中使用的组合物还可包括任何数目和组合的 TrkB、LINGO-1、NgR1、TAJ 和 OMgp 拮抗剂。

[0567] 适体

[0568] 在另一个实施方式中，本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂是适体。适体可以是具有独特序列、具有特异性地与所期望的靶（例如多肽）特异结合的特性并且是给定的靶的特异配体的核苷酸或多肽。本发明的核苷酸适体包括与 LINGO-1 或 TrkB 结合的双链 DNA 和单链 RNA 分子。

[0569] 可使用本领域已知的方法例如通过通过指数富集的配体的系统进化 (SELEX) 过程来选择核酸适体。SELEX 是用于具有与靶分子的高特异性结合的核酸分子的体外进

化方法，如例如美国专利第5,475,096、5,580,737、5,567,588、5,707,796、5,763,177、6,011,577和6,699,843号中所描述的，其通过引用全文并入本文。鉴定适体的另一种筛选方法描述在美国专利第5,270,163号（也通过引用并入本文）。SELEX过程是以核酸形成各种二维或三维结构的能力、以及在核苷酸单体中可获得的作为实际上任何化合物的配体（形成特异结合对）的化学多功能为基础的，所述化合物无论是单体或聚合的，包括任何其它核酸分子和多肽。任何大小的分子或组合物都可作为靶。

[0570] SELEX方法包括从候选寡核苷酸的混合物选择并且使用相同的总选择方案逐步重复结合、分离和扩增以达到所期望的结合亲和 力和选择性。从含有随机化的序列的片段的核酸混合物开始，SELEX方法包括下列步骤：在适于结合的条件下将混合物与靶混合；将未结合的核酸与已经与靶分子特异性结合的那些核酸分离；解离核酸-靶络合物；扩增从核酸-靶络合物解离的核酸以产生富集配体的核酸混合物。将结合、分离、解离和扩增的步骤如所需的重复许多个循环以产生靶分子的高特异性的高亲和力核酸配体。

[0571] 核苷酸适体可用作例如诊断工具或用作分析细胞内信号转导和运输途径的特异性抑制剂。参见James Curr.Opin.Pharmacol.1:540-546(2001)。核苷酸适体的高亲和力和特异性使得它们成为药物开发的良好候选者。例如，蓖麻毒素的适体拮抗剂已经被分离并且具有纳摩尔范围内的IC50值。参见Hesselberth JR等人J BiolChem 275:4937-4942(2000)。核苷酸适体还可被用来抗感染性疾病、恶性肿瘤和病毒表面蛋白以减少细胞传染力。

[0572] 如本文中对其它多核苷酸所描述的，本发明的方法中使用的核苷酸适体可以被修饰（例如通过修饰主链或碱基或与肽轭合）。

[0573] 使用LINGO-1或TrkB的蛋白结构，使用SELEX过程筛选对LINGO-1或TrkB起作用的适体将允许鉴定抑制LINGO-1介导的或促进TrkB-介导的过程（例如LINGO-1或TrkB-介导的细胞存活的促进）的适体。

[0574] 本发明的方法中使用的多肽适体是从它们与LINGO-1结合并阻滞LINGO-1作用的能力选择的随机多肽。多肽适体可包括在两个末端与蛋白支架相连的短的可变肽结构域。这一双重的结构上的约束将肽适体的结合亲和力大大增加至可与抗体相比的水平（纳摩尔范围）。参见例如Hoppe-Seyler F等人J.Mol.Med.78(8):426-430(2000)。短的可变肽的长度通常为约10至20个氨基酸，并且支架 可以是具有良好的溶解性和紧凑度特性的任何蛋白。支架蛋白的一个非限制性实例是细菌蛋白硫氧还蛋白-A。参见例如Cohen BA等人PNAS 95(24):14272-14277(1998)。本发明的方法中使用的多肽适体的另外的非限制性的实例是配体调节的肽适体(LiRPA)。LiRPA支架可包括三个蛋白结构域：FK506结合蛋白(FKBP)、FRBP-雷帕霉素结合结构域(FRB)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。参见例如Binkowski BF等人，Chem & Biol 12(7):847-855(2005)，其通过引用并入本文。

[0575] 多肽适体是作为蛋白功能的主要抑制剂起作用的肽或小的多肽。肽适体与靶蛋白特异结合，阻滞它们的起作用的能力。Kolonin等人Proc.Natl.Acad.Sci.95:14,266-14,271(1998)。以高亲和力和特异性与靶蛋白结合的肽适体可通过本领域已知的多种方法来分离。可通过酵母双杂交筛选(Xu，C.W. 等人Proc.Natl.Acad.Sci.94:12,473-12,478(1997))或通过核糖体展示(Hanes等人Proc.Natl.Acad.Sci.94:4937-4942(1997))从随机的肽文库分离肽适体。还可从噬菌体文库(Hoogenboom,H.R. 等

人 Immunotechnology 4 :1-20(1998)) 或者化学生成的肽文库分离它们。尽管合成肽适体的困难方法使得它们的使用比多核苷酸适体更加复杂，但是它们具有无限制的化学多样性。

[0576] 如本文其他地方对其他多肽所描述的，本发明的方法中使用的肽适体可以被修饰（例如被轭合至多聚体或与蛋白融合）。

[0577] 融合蛋白和轭合的多肽、适体、化合物和抗体

[0578] 本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物和抗体还可在 N- 或 C- 端与异源多肽重组融合或者与多肽或其他分化学轭合（包括共价和非共价轭合）。例如，LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物和抗体可与在检测测定中用作标签的分子和效应子分子例如异源多肽、药物、放射性核素或毒素重组融合或轭合。参见例如 PCT 公开 WO92/08495、WO 91/14438、WO 89/12624 ;美国专利第 5,314,995 号和 EP 396,387。

[0579] 本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物和抗体包括被修饰（即通过共价连接任何类型的分子以致共价连接不阻止 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物或抗体抑制 LINGO-1 或 TrkB 的生物学功能）的衍生物。例如，但是以非限制性的方式，本发明的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物和抗体可被修饰，例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、膦酸化 (phosphylation)、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护或封闭基团的衍生化、蛋白水解性裂解、与细胞配体或其他蛋白结合等。可通过已知的技术实现许多化学修饰中的任一种，包括但不限于特异化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，衍生物可包含一个或多个非典型的氨基酸。

[0580] 本文所公开的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体和抗体可包括通过肽键或修饰的肽键即肽电子等排体彼此结合的氨基酸，并且可含有除了 20 种基因编码的氨基酸之外的氨基酸。可通过自然过程例如翻译后加工或通过本领域熟知的化学修饰技术来修饰 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体和抗体。这种修饰详细描述于基础教科书以及更详细地描述于专题论文以及大量的研究文献中。修饰可在 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽或抗体中的任何地方发生，包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基端或在例如糖的部分上。可以理解的是，相同类型的修饰可以相同或不同的程度存在于给定的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体中的多个位点。而且，给定的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体可包含许多类型的修饰。LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体可以是支链的，例如作为泛素化的结果，并且它们可以是环状的，具有或不具有支链。环状、支链和支链环状的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体和抗体可从翻译后的自然过程获得或者可通过合成方法制备。修饰包括乙酰化、酰化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ- 羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移 RNA 介导的向蛋白加入氨基酸例如精氨酸化 (arginylation) 和泛素化（参见例如 Proteins-Structure and Molecular Properties（蛋白 - 结构和分子特性），T.E.Creighton，W.H.Freeman 和 Company，New York 第 2 版 .，(1993) ；

Posttranslational Covalent Modification Of Proteins(蛋白的翻译后共价修饰)，B.C.Johnson 编辑，Academic Press，New York，第 1-12 页 (1983)；Seifter 等人，Meth Enzymol 182：626-646(1990)；Rattan 等人，Ann NYAcad Sci 663：48-62(1992))。

[0581] 本发明还提供了融合蛋白，其包含下列、主要由下列组成或由下列组成：抑制或降低 LINGO-1 或者增加或促进 TrkB 功能的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体融合物。在一些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体与之融合的异源多肽对功能是有用的，或者对靶向 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽或抗体是有用的。在本发明的某些实施方式中，可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽，例如包含 LRR 结构域、Ig 结构域或整个胞外结构域（对应于 SEQ ID NO：2 的氨基酸 34 至 532）的 LINGO-1 多肽被融合至异源多肽部分以形成 LINGO-1 拮抗剂融合多肽或 TrkB- 激动剂多肽，例如 BDNF 多肽被融合至异源多肽部分以形成 TrkB 激动剂融合多肽。LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂融合蛋白、适体和抗体可用于实现不同目的，例如增加的血清半衰期、改善的生物可利用率、体内靶向特定的器官或组织类型、改善的重组表达效力、改善的宿主细胞分泌、容易纯化和高亲合力。取决于有待实现的目的，异源部分可是惰性或是生物学上活性的。同样，可以选择稳定融合至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体或者是体内或体外可裂解的。达到这些另外的目的的异源部分是本领域已知的。

[0582] 作为表达 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂融合多肽、适体或抗体的替代，选择的异源部分可被预先形成并且化学地与 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体轭合。在大多数情况下，无论融合还是轭合至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体，所选择的异源部分将相似地起作用。因此，在下列异源氨基酸序列的讨论中，除非以另外的方式说明，否则应当理解的是，异源序列可以融合蛋白形式或作为化学轭合物连接至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体。

[0583] 药理上有活性的多肽例如 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体常常表现出迅速在体内清除，于是被迫使用大剂量以在体内达到治疗上有效的浓度。此外，小于约 60kDa 的多肽可能经历肾小球过滤，其有时导致肾毒性。可使用相对小的多肽例如 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体的融合或轭合以减少或避免这种肾毒性的风险。用于增加治疗性多肽的体内稳定性（即血清半衰期）的不同异源氨基酸序列（即多肽部分或“载体”）是已知的。

[0584] 由于其长的半衰期、广泛的体内分布和酶促功能或免疫功能的 缺乏，大致上全长的人类血清白蛋白 (HSA) 或 HSA 片段通常被用作异源部分。通过使用例如 Yeh 等人，Proc. Natl.Acad.Sci.USA89：1904-08(1992) 和 Syed 等人，Blood 89：3243-52(1997) 中所教导的那些方法和材料，HSA 可用来形成由于 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分而表现出生理活性并表现体内稳定性上的显著增加例如高 10 倍至 100 倍的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂融合多肽、适体、抗体或多肽 / 抗体轭合物。HSA 的 C- 端可融合至可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的 N- 端。由于 HSA 是天然分泌蛋白，当融合蛋白在真核例如哺乳动物表达系统中产生时，HSA 信号序列可用于获得可溶 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂融合蛋白向细胞培养基中的分泌。

[0585] 在某些实施方式中，本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体和其抗体片段还包含靶向部分。靶向部分包括指导定位至身体的某部

分，例如定位至脑或其中的室的蛋白或肽。在某些实施方式中，本发明的方法中使用的LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体和其抗体片段连接或融合至脑靶向部分。脑靶向部分被共价连接（例如直接的、翻译融合或者通过直接或通过任选地可是可裂解的间隔分子的化学连接）或非共价连接（例如通过可逆反应例如抗生物素蛋白、生物素、蛋白 A、IgG 等）。在另外的实施方式中，本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体或其抗体片段被连接至一个或多个脑靶向部分。在另外的实施方式中，脑靶向部分连接至本发明的方法中使用的多个 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体或其抗体片段。

[0586] 与 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体或其抗体片段结合的脑靶向部分增强了这种 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体或其抗体片段的脑递送。已经描述了被融合至蛋白或治疗剂，递送蛋白或治疗剂穿过血脑屏障 (BBB) 的许多蛋白。非限制的实例包括单结构域抗体 FC5(Abulrob 等人 J. Neurochem. 95, 1201-1214(2005)) ;mAB 83-14，人类胰岛素受体的单克隆抗体 (Pardridge 等人 Pharmacol. Res. 12,807-816(1995)) ；与人类铁传递蛋白受体 (hTfR) 结合的 B2、B6 和 B8 肽 (Xia 等人 J. Virol. 74,11359-11366(2000)) ；铁传递蛋白受体的 OX26 单克隆抗体 (Pardridge 等人 J. Pharmacol. Exp. Ther. 259,66-70(1991)) 和美国专利第 6,306,365 号的 SEQ ID NO :1-18。上述参考文献的内容通过引用全文并入本文。

[0587] 通过本领域已良好建立的许多方法确定 LINGO-1 或 TrkB 组合物的增强的脑递送。例如，向动物施用与脑靶向部分连接的放射性标记、酶促标记或荧光标记的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体或其抗体片段 ；确定脑定位 ；和与未与脑靶向部分连接的等量放射标记的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物、抗体或其抗体片段的定位比较。确定增强的靶向的另外的方法描述于上文参考文献中。

[0588] 信号序列是编码启动蛋白穿过内质网膜的运输的氨基酸序列的多核苷酸。对于构建免疫融合物来说有用的信号序列包括抗体轻链信号序列，例如抗体 14.18(Gillies 等人，J. Immunol. Meth. 125 :191-202(1989))、抗体重链信号序列，例如 MOPC141 抗体重链信号序列 (Sakano 等人，Nature 286 :5774(1980))。可选择地，可使用其他的信号序列。参见例如 Watson，Nucl. Acids Res. 12 :5145(1984)。信号肽通常在内质网的腔内被信号肽酶裂解。这导致分泌含有 Fc 区和可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的免疫融合蛋白。

[0589] 在某些实施方式中，DNA 序列可编码分泌盒和 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分之间的蛋白水解裂解位点。这种裂解位点可提供例如所编码的融合蛋白的蛋白水解裂解，由此从靶蛋白分离 Fc 结 构域。有用的蛋白水解裂解位点包括由蛋白水解酶例如胰蛋白酶、纤维蛋白溶酶、凝血酶、凝血因子 Xa 或肠激酶 K 识别的氨基酸序列。

[0590] 分泌盒可被结合至可复制的表达载体中。有用的载体包括线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒和类似物。示例性表达载体是 pdC，其中免疫融合物 DNA 的转录被置于人类巨细胞病毒的增强子和启动子的控制下。参见例如 Lo 等人，Biochim. Biophys. Acta 1088 : 712(1991) ；和 Lo 等人，Protein Engineering 11 :495-500(1998)。可用编码可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽的 DNA 转化或转染适当的宿主细胞，并将所述宿主细胞用于可溶 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽的表达和分泌。通常使用的宿主细胞包含不死的杂交瘤细胞、骨髓瘤细胞、239 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞和 COS 细胞。

[0591] 在一个实施方式中，可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂多肽融合至铰链区和 Fc 区，即 Ig 重链恒定区的 C- 端部分。LINGO-1-Fc 或 (of)TrkB- 激动剂 -Fc 融合物的潜在的优点包括溶解性、体内稳定性和多价例如二聚化。所用的 Fc 区可以是 IgA、IgD 或 IgG Fc 区（铰链 -C_H2-C_H3）。可选择地，其可是 IgE 或 IgM Fc 区（铰链 -C_H2-C_H3-C_H4）。通常使用 IgG Fc 区，例如 IgG_1Fc 区或 IgG_4Fc 区。在一个实施方式中，开始于铰链区、恰在化学上定义 IgG Fc 的木瓜蛋白酶裂解位点的上游的序列（即残基 216，假定重链恒定区的第一个残基是根据 Kabat 系统的残基 114）或其他免疫球蛋白的类似位点被用于融合。进行融合的准确位点并不是关键的，特定的位点是熟知的并且可被选择以便优化分子的生物学活性、分泌或结合特征。用于构建和表达编码 Fc 融合物的 DNA 的材料和方法是本领域已知的，并且可被用于获得可溶的 LINGO-1- 拮抗剂或 TrkB 激动剂融合物而无需过多的实验。本发明的一些实施方式使用 LINGO-1- 拮抗剂或 TrkB 激动剂融合蛋白例如 Capon 等人，美国专利第 5,428,130 和 5,565,335 号中描述的那些。

[0592] 完全完整的野生型的 Fc 区表现出通常在本发明的方法中所用的 Fc 融合蛋白中不是必须的并且不期望的功能子效应。因此，在构建分泌盒的过程中通常从 Fc 区去除某些结合位点。例如，由于与轻链的共表达是不必须的，从 IgE 的 Fc 区的 C_H2 结构域除去重链结合蛋白的结合位点 Bip(Hendershot 等人，Immunol.Today8 :111-14(1987))，以便这一位点不会干扰免疫融合物的有效分泌。跨膜结构域序列例如 IgM 中存在的那些也通常被除去。

[0593] 最常使用的是 IgG_1Fc 区。可选择地，免疫球蛋白 γ 的其他亚类（γ-2、γ-3 或 γ-4）的 Fc 区可用于分泌盒。免疫球蛋白 γ-1 的 IgG_1Fc 区通常被用于分泌盒并且包括铰链区、C_H2 区和 C_H3 区的至少一部分。在某些实施方式中，免疫球蛋白 γ-1 的 Fc 区是 C_H2 缺失的 Fc，其包括铰链区和 C_H3 区的一部分但是没有 C_H2 区。C_H2 缺失的 Fc 已通过 Gillies 等人 Hum.Antibod.Hybridomas 1 :47(1990) 描述。在某些实施方式中，使用 IgA、IgD、IgE 或 IgM 中的一个的 Fc 区。

[0594] 可以几种不同的构象构建 LINGO-1 拮抗剂 -Fc 或 TrkB- 激动剂 -Fc 融合蛋白。在一种构象中，可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的 C- 端直接融合至 Fc 铰链部分的 N- 端。在稍微不同的构象中，短的多肽例如 2-10 个氨基酸在可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的 N- 端和 Fc 部分的 C- 端之间被结合至融合物。这种接头提供构象上的柔性，在某些情况下其可改善生物学活性。如果铰链区的足够的部分被保留在 Fc 部分中，LINGO-1-Fc 或 TrkB- 激动剂 -Fc 融合物将二聚化，由此形成二价分子。单体 Fc 融合的均质群将产生单特异性的双价的二聚体。每一个具有不同特异性的两种单体 Fc 融合物的混合物将产生双特异性的二价的二聚体。

[0595] 含有相应的氨基反应性基团和硫醇反应性基团的许多交联剂中的任一个可用于将 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽连接至血清白蛋白。适合的接头的实例包括插入硫醇反应性的马来酰亚胺的胺反应性的交联剂，例如 SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS 和 GMBS。其他适合的接头插入硫醇反应性的卤代乙酸酯基团，例如 SBAP、SIA、SIAB。提供用于与巯基基团反应以产生可还原的键的保护的或非保护的硫醇的接头包括 SPDP、SMPT、SATA 和 SATP。这些试剂是商业上可得的（例如 Pierce Chemicals）。

[0596] 轭合并不一定涉及可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽的 N- 端或血清白蛋白上的硫醇部分。例如，可溶的 LINGO-1- 白蛋白或 TrkB- 激动剂 - 白蛋白融合物可使用遗传工

程技术来获得，其中所述可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分在其 N- 端、C- 端或两端融合至血清白蛋白基因。

[0597] 可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽可在 N- 或 C- 端融合至异源肽以便促进可溶 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的纯化或鉴定。例如，组氨酸标签可被融合至可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽以促进使用商业上可得的色谱介质进行纯化。此外，表位标签可使可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂融合多肽能够通过使用抗标签抗体或与表位标签结合的另一种类型的亲合力基质的亲和纯化而被容易地纯化。这种纯化标签的许多实例是本领域已知的并且包括但不限于：多聚 - 组氨酸（聚 -his）或多聚 - 组氨酸 - 甘氨酸（聚 -his-gly）标签；流感病毒血凝素 (HA) 标签多肽和其抗体 12CA5(Field 等人，Mol. Cell. Biol，8：2159-2165(1988))；c-myc 标签和其结合的 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体 (Evan 等人，Mol. Cell. Bio. 5：3610-3616(1985))；以及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签和其抗体 (Paborsky 等人，Protein Engineering 3(6)：547-553(1990))。另 外的标签多肽包括 Flag- 肽 (Hopp 等人，BioTechnology 6：1204-1210(1988))、KT3 表位肽 (Martin 等人，Science 255：192-194(1992))、α - 微管蛋白表位肽 (Skinner 等人，J. Biol. Chem. 266：15163-15166(1991)) 和 T7 基因 10 蛋白肽标签 (Lutz-Freyermuth 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，87：6393-6397(1990))。标签可以是由抗体识别并且不干扰可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽功能的任何肽表位。

[0598] 在本发明的某些实施方式中，可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂融合物构建体用来增强细菌中可溶 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的产生。在这样的构建体中，通常以高水平表达和 / 或分泌的细菌蛋白被用作可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽的 N- 端融合配体。参见例如 Smith 等人，Gene 67：31(1988)；Hopp 等人，Biotechnology6：1204(1988)；La Vallie 等人，Biotechnology 11：187(1993)。

[0599] 通过在适合的融合配体的氨基或羧基端融合可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分，可获得可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽的二价或四价形式。例如，可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分可融合至 Ig 部分的氨基端和羧基端以产生含有两个可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分的二价单体多肽。当这些单体中的两个借助 Ig 部分二聚化时，获得可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂蛋白的四价形式。这种多价形式可被用于获得对靶的增强的结合亲和力。可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂的多价形式也可通过将可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂部分成串排列以形成串联体来获得，其可单独使用或融合至融合配体例如 Ig 或 HSA。

[0600] 轭合的聚合物（除了多肽以外）

[0601] 本发明的某些实施方式涉及可溶 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽、LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂适体、TrkB 激动剂化合物或者 拮抗性 LINGO-1 或激动性 TrkB 抗体，其中一种或多种聚合物被轭合（共价连接）至本发明的方法中使用的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽、化合物、适体或抗体。适于这种轭合的聚合物的实例包括多肽（上文所讨论的）、适体、糖聚合物和聚亚烷基二醇链。通常但不必须地，聚合物被轭合至可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽、适体、TrkB 激动剂化合物或者 LINGO-1 或 TrkB 抗体以便改善下列中的一个或多个：溶解度、稳定性或生物可利用率。

[0602] 通常用来与 LINGO-1 拮抗剂多肽、化合物、适体或抗体或与 TrkB 激动剂多肽、化合

物、适体或抗体轭合的聚合物的类型是聚亚烷基二醇。聚乙二醇 (PEG) 是最常用的。PEG 部分例如 1、2、3、4 或 5 个 PEG 聚合物可被轭合至每个 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体或者 TrkB 激动剂化合物以与单独的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物或抗体相比增加血清半衰期。PEG 部分是非抗原性的并且基本是生物学上惰性的。本发明的实施中所使用的 PEG 部分可是支链或非支链的。

[0603] 连接至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体、化合物或抗体的 PEG 部分的数目和各个 PEG 链的分子量可变化。通常聚合物的分子量越大，结合至多肽的聚合物链越少。通常，结合至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、化合物、适体或抗体的总聚合物量为 20kDa 至 40kDa。因此，如果一个聚合物链被连接，每个链的分子量通常是 20-40kDa。如果两个链被连接，每个链的分子量通常是 10-20kDa。如果三个链被连接，分子量通常是 7-14kDa。

[0604] 聚合物例如 PEG 可通过多肽上任何适合的暴露的反应性基团被连接至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体。暴露的反应性基团可以是例如内部赖氨酸残基的 N- 端氨基基团或 ε 氨基或两者。活化的聚合物可在 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体上的任何自由氨基基团上反应并共价连接。LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体的自由的羧基基团、适当活化的羰基基团、羟基、胍基、咪唑、氧化的糖部分和巯基基团（如果可得）也可用作聚合连接的反应性基团。

[0605] 在轭合反应中，取决于多肽浓度，通常使用每摩尔多肽从约 1.0 至约 10 摩尔的活化的聚合物。通常，所选择的比例代表将反应最大化同时将可损害 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽或抗体的所期望的药理活性的副反应（常常是非特异性的）最小化之间的平衡。在一些实施方式中，保留 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体的至少 50％的生物活性（如所证实的，例如在本文所描述的或本领域已知的测定中的任一个中），而在一些实施方式中，保留近 100％。

[0606] 可使用常规的化学反应将聚合物轭合至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体。例如，可将聚亚烷基二醇部分偶联至 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体的赖氨酸 ε 氨基基团。可使用 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活性酯例如 PEG 琥珀酰亚胺琥珀酸酯 (SS-PEG) 和琥珀酰亚胺丙酸酯 (SPA-PEG) 进行与赖氨酸侧链的连接。适合的聚亚烷基二醇部分包括例如羧甲基 -NHS 和正亮氨酸 -NHS、SC。这些试剂是商业上可得的。另外的胺反应性的 PEG 接头可取代琥珀酰亚胺基部分。这些包括例如异硫氰酸酯、硝基苯基碳酸酯 (PNP)、环氧化物、碳酸苯并三唑、SC-PEG、三氟乙基磺酸酯、醛、环氧化物、羰基二咪唑和 PNP 碳酸酯。通常优化条件以将反应的选择性和程度最大化。这种反应条件的优化在本领域技术人员的能力范围内。

[0607] 聚乙二醇化可通过本领域已知的聚乙二醇化反应中的任一种来实现。参见例如 Focus on Growth Factors 3 :4-10(1992) 和欧洲专利 申请 EP 0 154 316 和 EP 0 401 384。可利用反应性聚乙二醇分子（或类似的反应性的水溶性聚合物）的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。

[0608] 通过酰化的聚乙二醇化通常包括将聚乙二醇的活性酯衍生物反应。任何反应性的 PEG 分子可被用于聚乙二醇化中。酯化为 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的 PEG 是通常所使用的活化的 PEG 酯。如本文所用的“酰化”包括但不限于治疗性蛋白和水溶性聚合物如 PEG

之间的下列类型的键：酰胺、氨基甲酸酯、氨基甲酸乙酯和类似键。参见例如 Bioconjugate Chem. 5：133-140，1994。通常选择反应参数以避免损害或使可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽、适体或抗体失活的温度、溶剂和 pH 条件。

[0609] 通常，连接的键是酰胺并且通常至少 95％的所得产物是单 -、双 - 或三 - 聚乙二醇化的。然而，取决于所使用的特定的反应条件，也可形成一定数量的具有更高程度的聚乙二醇化的一些物质。任选地，可通过常规纯化方法从混合物，尤其是未反应的物质分离纯化的聚乙二醇化的物质，所述方法包括但不限于例如透析、盐析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤层析、疏水交换层析和电泳。

[0610] 通过烷基化的聚乙二醇化通常包括在还原剂存在的条件下将 PEG 的末端醛衍生物与 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体反应。此外，可操纵反应条件以有利于基本上仅在 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体的 N 端氨基基团上聚乙二醇化，即单聚乙二醇化的蛋白。无论在单聚乙二醇化还是多聚乙二醇化的实例中，PEG 基团通常通过 CH_2-NH- 基团连接至蛋白。当特别地提及 -CH_2- 基团时，这一类型的键被称为“烷基”键。

[0611] 通过还原性烷基化以产生 N 端靶向的单聚乙二醇化产物的衍 生化利用了衍生化可用的不同类型的伯氨基基团（赖氨酸对 N 端）的不同反应性。反应在允许利用赖氨酸残基的 ε 氨基基团和蛋白的 N 端氨基基团之间的 pKa 差异的 pH 进行。通过这种选择性的衍生化，含有反应性基团例如醛的水溶性聚合物与蛋白的连接被控制：与聚合物的轭合大部分在蛋白的 N- 端发生并且没有其他反应性基团例如赖氨酸侧链氨基基团的显著的修饰发生。

[0612] 在酰化和烷基化方法中所用的聚合物分子选自水溶性聚合物。所选择的聚合物通常被修饰以具有单一的反应性基团例如用于酰化的活性酯或用于烷基化的醛，以便可如本方法中所提供的控制聚合物化的程度。示例性的反应性 PEG 醛是水稳定性的聚乙二醇丙醛或其单 C1-C10 烷氧基或芳氧基衍生物（参见例如 Harris 等人，美国专利第 5,252,714 号）。聚合物可以是支链或非支链的。对于酰化反应，所选择的聚合物通常具有单一的反应性酯基团。对于还原性烷基化，所选择的聚合物通常具有单一的反应性醛基团。通常，不从天然存在的糖基残基选择水溶性聚合物，因为这些通常通过哺乳动物重组表达系统更方便地制备。

[0613] 制备聚乙二醇化的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂多肽、适体或抗体的方法通常包括步骤：(a) 将 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体与聚乙二醇（例如 PEG 的反应性酯或醛衍生物）在由此分子被连接至一个或多个 PEG 基团的条件下反应和 (b) 获得反应产物。通常，酰化反应的优化的反应条件将以已知的参数和所期望的结果为基础视具体情况确定。例如较大比例的 PEG 比蛋白通常产生更大百分比的多聚乙二醇化产物。

[0614] 产生单 - 聚合物 / 可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂多肽、LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂适体或者拮抗性 LINGO-1 抗体或激动性 TrkB 抗体的大致上均质的群体的还原性烷基化通常包括步骤：(a) 将 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂蛋白或多肽与反应性 PEG 分子在还原性烷基化条件下在适于多肽或抗体的 N 端氨基基团的挑剔的 (pen-nit) 选择性修饰的 pH 反应和 (b) 获得反应产物。

[0615] 对单 - 聚合物 / 可溶的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂多肽、LINGO-1 拮抗剂或

TrkB 激动剂适体或者拮抗性 LINGO-1 抗体或激动性 TrkB 抗体的大致上均质的群体来说，还原性烷基化反应的条件是允许水溶性聚合物部分与多肽或抗体的 N- 端选择性连接的条件。这样的反应条件通常提供了赖氨酸侧链氨基基团和 N- 端氨基基团之间的 pKa 差。为了本发明的目的，pH 通常在 3-9，典型地 3-6 的范围内。

[0616] LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂多肽、适体或抗体可包括标签，例如可随后通过蛋白水解释放的部分。因此，赖氨酸部分可通过首先将修饰的 His- 标签与将与赖氨酸和 N- 端两者反应的低分子量的接头例如 Traut 试剂 (Pierce) 反应，并且之后释放 His 标签来选择性修饰。之后多肽将包含自由的 SH 基团，其可被包含硫醇反应性头部基团例如马来酰亚胺基团、乙烯砜基团、卤代乙酸酯基团或自由或受保护的 SH 的 PEG 选择性修饰。

[0617] 可用将建立 PEG 连接的特异性位点的任何接头代替 Traut 试剂。例如，可用 SPDP、SMPT、SATA 或 SATP(Pierce) 代替 Traut 试剂。相似地，可将蛋白与插入马来酰亚胺 (例如 SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS 或 GMBS)、卤代乙酸酯基团 (SBAP、SIA、SIAB) 或乙烯基砜基团的胺反应性的接头反应并且将所得的产物与含有自由 SH 的 PEG 反应。

[0618] 在一些实施方式中，聚亚烷基二醇部分被偶联至本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多肽、适体或抗体的半胱 氨酸基团。可使用例如马来酰亚胺基团、乙烯基砜基团、卤代乙酸酯基团或硫醇基团实现偶联。

[0619] 任选地，LINGO-1 拮抗剂或 TrkB- 激动剂多肽、适体或抗体通过不稳定的键被轭合至聚乙二醇部分。不稳定的键可在例如生物化学水解、蛋白水解或巯基裂解中被裂解。例如，键可在体内 (生理) 条件下被裂解。

[0620] 如果反应性基团在 N 端的 α 氨基基团上，反应可通过用于将生物活性材料与惰性聚合物通常在约 pH 5-8，例如 pH 5、6、7 或 8 反应的任何适合的方法进行。通常过程包括制备活化的聚合物并且之后将蛋白与活化的聚合物反应以产生适于制剂的可溶的蛋白。

[0621] LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂多核苷酸

[0622] LINGO-1 拮抗剂多核苷酸

[0623] 本发明方法中的 LINGO-1 拮抗剂包括包含与编码 LINGO-1 的多核苷酸特异性结合的核酸分子的 LINGO-1 拮抗剂多核苷酸。LINGO-1 多核苷酸拮抗剂通常阻止 LINGO-1 的表达 (敲低)。LINGO-1 拮抗剂包括但不限于反义分子、核酶、siRNA、shRNA、RNAi。通常，这种结合分子被分别施用于动物 (参见例如 O' Connor, J. Neurochem. 56 :560(1991))，但是这种结合分子也可从由宿主细胞获得的多核苷酸体内表达和体内表达。还参见 Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression(作为基因表达的反义抑制剂的寡聚脱氧核苷酸)，CRC Press, BocaRaton, FL(1988)。

[0624] RNAi 是指干扰靶向的 mRNA 的表达的 RNA 的表达。特别地，RNAi 通过通过 siRNA(短的干扰 RNA) 的与特定的 mRNA(例如 LINGO-1 或 TrkB) 相互作用而沉默靶向的基因。之后 dsRNA 络合物被靶向以便被细胞降解。另外的 RNAi 分子包括短的发夹 RNA(shRNA)，也称为短的干扰发夹。shRNA 分子包含来自靶基因的由环连接的有义和反义序列。shRNA 被从核运输至细胞质，其随 mRNA 一起被降解。Pol III 或 U6 启动子可用来表达用于 RNAi 的 RNA。在本发明的一些实施方式中，从慢病毒载体 (例如 pLL3.7) 表达 shRNA。

[0625] RNAi 是由具有与它们的“靶”mRNA 的序列特异性同源性的双链 RNA(dsRNA) 分子介导的 (Caplen 等人，Proc Natl Acad SciUSA 98 :9742-9747(2001))。果蝇 (Drosophila)

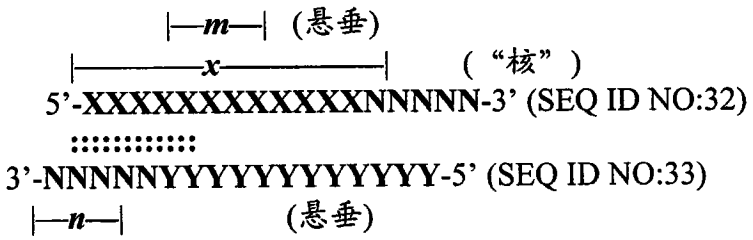
的无细胞溶解产物的生物化学研究表明，RNA 依赖性基因沉默的介质是 21-25 个核苷酸的“小干扰”RNA 双链体 (siRNA)。因此，siRNA 分子被有利地用于本发明的方法中。siRNA 来自被称为 DICER 的核糖核酸酶的 dsRNA 加工 (Bernstein 等人，Nature 409 :363-366(2001))。看起来 siRNA 双链产物被补充至称为 RISC(RNA 诱导的沉默复合体) 的多蛋白 siRNA 复合体中。不希望被任何特定的理论束缚，据信 RISC 被引导以靶向 mRNA，其中 siRNA 双链体序列特异性地相互作用以介导催化方式的裂解 (Bernstein 等人，Nature 409 :363-366(2001) ；Boutla 等人，Curr Biol 11 :1776-1780(2001))。

[0626] RNAi 已经被用来在哺乳动物细胞中分析基因功能和鉴定必需基因 (Elbashir 等人，Methods 26 :199-213(2002) ；Harborth 等 人，J CellSci 114 :4557-4565(2001))，所述细胞非限制性示例地包括神经元 (Krichevsky 等人，Proc Natl Acad Sci USA 99 :11926-11929(2002))。RNAi 还作为治疗模式而被评估，例如抑制或阻滞病毒的感染、复制和 / 或生长和减少致癌基因的表达 (例如 bcr-abl 基因，Scherr 等人，Blood 101(4) :1566-9(2002))，所述病毒包括但不限于脊髓灰质炎病毒 (Gitlin 等人，Nature 418 :379-380(2002)) 和 HIV(Capodici 等人，J Immunol 169 :5196-5201(2002))。RNAi 还已用来调节哺乳动物 (小鼠) 和两栖动物 (非洲爪蟾 (Xenopus)) 胚胎 (分别地，Calegari 等人，Proc Natl Acad Sci USA 99 :14236-14240(2002) ；和 Zhou 等人，Nucleic Acids Res 30 :1664-1669(2002)) 中以及新生小鼠中的基因表达 (Lewis 等人，Nat Genet 32 :107-108(2002)) 并且用于减少成年转基因小鼠中的转基因表达 (McCaffrey 等人，Nature418 :38-39(2002))。已经描述了用于确定在细胞培养中和体内确定 siRNA 的效力和特异性的方法 (参见例如 Bertrand 等人，BiochemBiophys Res Commun 296 :1000-1004(2002) ；Lassus 等 人，Sci STKE2002(147) :PL 13(2002) 和 Leirdal 等 人，Biochem Biophys Res Commun295 :744-748(2002))。

[0627] 介导 RNAi 的分子 (包括但不限于 siRNA) 可通过化学合成 (Hohioh，FEBS Lett 521 :195-199(2002))，dsRNA 的水解 (Yang 等人，Proc Natl Acad Sci USA 99 :9942-9947(2002))，通过使用 T7RNA 聚合酶的体外转录 (Donzeet 等人，Nucleic Acids Res 30 :e46，(2002) ；Yu 等人，Proc Natl Acad Sci USA 99 :6047-6052(2002)) 和通过使用核酸酶例如大肠杆菌核糖核酸酶 III 水解双链 RNA(Yang 等人，Proc Natl Acad Sci USA 99 :9942-9947(2002)) 在体外产生。

[0628] siRNA 分子还可通过将两个寡核苷酸对彼此退火来形成，通常具有下列结构，其包括双链和单链部分 :

[0629]



[0630] 其中 N、X 和 Y 是核苷酸 ；X 氢与 Y 键合 ；“ : ”表示两个碱 基之间的氢键 ；x 是具有 1 和约 100 之间的值的自然数 ；并且 m 和 n 是各自独立地具有 0 和约 100 之间的值的整数。在一些实施方式中，N、X 和 Y 彼此独立地为 A、G、C 和 T 或 U。非天然存在的碱基和核

苷酸可存在，尤其是在合成的 siRNA（即退火两个寡核苷酸的产物）的情况下。双链的中心部分被称为“核”并且具有作为测量单位的碱基对 (bp)；单链的部分是悬垂，具有作为测量单位的核苷酸 (nt)。所显示的悬垂为 3’ 悬垂，但是具有 5’ 悬垂的分子也在本发明的范围内。同样在本发明的范围内的是没有悬垂（即 m = 0 和 n = 0）和在核的一侧具有悬垂而另一侧没有悬垂（例如 m = 0 和 n ≥ 1 或反过来）的 siRNA 分子。

[0631] 起初，RNAi 技术没有表现出容易被应用至哺乳动物系统。这是因为在哺乳动物中，dsRNA 活化 dsRNA 活化的蛋白激酶 (PKR)，导致细胞凋亡级联和细胞死亡 (Der 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA94 :3279-3283(1997))。此外，很早以前就知道 dsRNA 活化哺乳动物细胞中的干扰素级联，其还可引起细胞生理的改变 (Colby 等人，Annu. Rev. Microbiol. 25 : 333(1971) ;Kleinschmidt 等人，Annu. Rev. Biochem. 41 :517(1972) ;Lampson 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA58L782(1967) ;Lomniczi 等人，J. Gen. Virol. 8 :55(1970) 和 Younger 等人，J. Bacteriol. 92 :862(1966))。然而，dsRNA 介导的 PKR 和干扰素级联的活化需要比约 30 个碱基对更长的 dsRNA。相反，长度上小于 30 个碱基对的 dsRNA 已经被证实在哺乳动物细胞中引起 RNAi(Caplen 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :9742-9747(2001))。因此，预料与较长的 dsRNA 分子相关的不期望的非特异性的作用可通过制备基本上不含较长的 dsRNA 的短的 RNA 来避免。

[0632] 关于 siRNA 的参考文献 :Bernstein 等人，Nature 409 :363-366(2001) ;Boutla 等人，Curr Biol 11 :1776-1780(2001) ;Cullen，NatImmunol. 3 :597-599(2002) ;Caplen 等人，Proc Natl Acad Sci USA 98 :9742-9747(2001) ;Hamilton 等人，Science 286 : 950-952(1999) ;Nagase 等人，DNA Res. 6 :63-70(1999) ;Napoli 等人，Plant Cell2 : 279-289(1990) ;Nicholson 等人，Mamm. Genome 13 :67-73(2002) ;Parrish 等人，Mol Cell 6 :1077-1087(2000) ;Romano 等人，MolMicrobiol 6 :3343-3353(1992) ;Tabara 等人，Cell 99 :123-132(1999) 和 Tuschl，Chembiochem. 2 :239-245(2001)。

[0633] Paddison 等人 (Genes & Dev. 16 :948-958(2002)) 已经使用折叠为发夹的小的 RNA 分子作为实现 RNAi 的工具。相应地，这种短的发夹 RNA(shRNA) 分子还被有利地用于本发明的方法。功能性 shRNA 的茎和环的长度是变化的；茎长度可大概从约 25nt 变化至约 30nt，而环的大小可在 4nt 至约 25nt 之间变化而不影响沉默活性。不希望被任何特定的理论所束缚，据信这些 shRNA 类似于 DICER 核糖核酸酶的 dsRNA 产物，并且无论在什么情况下，具有抑制特定基因表达的相同能力。

[0634] 反义技术可用于通过反义 DNA 或 RNA 或通过三螺旋形成来控制基因表达。反义技术在例如 Okano，J. Neurochem. 56 :560(1991) ;Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression（作为基因表达的反义抑制剂的寡聚脱氧核苷酸），CRC Press，BocaRaton，FL(1988) 中被讨论。三螺旋形成在例如 Lee 等人，NucleicAcids Research 6 :3073(1979) ;Cooney 等人，Science 241 :456(1988) 和 Dervan 等人，Science 251 :1300(1991) 中讨论。所述方法是以多核苷酸与互补的 DNA 或 RNA 的结合为基础的。

[0635] 例如，编码 LINGO-1 的多核苷酸的 5’编码部分可用于设计长度上从约 10 至 40 个碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。DNA 寡核苷酸被设计以与参与转录的基因的区互补，由此阻止转录和靶蛋白的产生。反义 RNA 寡核苷酸与 mRNA 体内杂交并且阻滞 mRNA 分子翻 译为靶多肽。

[0636] 在一个实施方式中，对 LINGO-1 基因特异的反义核酸通过从外源序列的转录而胞内生成。例如，载体或其部分被转录，产生反义核酸 (RNA)。这种载体可保持为附加体或与染色体整合，只要其可被转录以产生所期望的反义 RNA。这种载体可通过本领域中标准的重组 DNA 技术方法来构建。载体可以是用于在脊椎动物细胞中复制并表达的质粒、病毒或本领域已知的其他载体。反义分子的表达可以通过本领域中已知的任何启动子以在脊椎动物，尤其是人类细胞（例如本文其他地方所描述的那些）中起作用。

[0637] 并不要求反义分子的完全互补性。与编码 LINGO-1 的 RNA 的至少一部分互补的序列意指具有足以能够与 RNA 杂交以形成稳定的双链体的互补性的序列；或可测定三链体的形成。杂交的能力将取决于互补性的程度和反义核酸的长度。通常，杂交的核酸越大，其可含有的错配碱基越多但仍形成稳定的双链体（或视情况而定的三链体）。本领域技术人员可通过使用确定杂交复合体的熔点的标准程序来确定错配的可接受程度。

[0638] 与信使 RNA 的 5’端例如整个 5’非翻译序列并包括 AUG 起始密码子互补的寡核苷酸应对抑制翻译最有效。然而，与 mRNA 的 3’非翻译序列互补的序列已经显示出同样对抑制 mRNA 的翻译有效。参见，通常 Wagner，R.，Nature 372：333-335(1994)。因此，与无论 5’还是 3’非翻译的非编码区互补的寡核苷酸都可被用于抑制 LINGO-1 的翻译的反义方法中。与 mRNA 的 5’非翻译区互补的寡核苷酸应包括 AUG 起始密码子的互补部分。与编码区 mRNA 互补的反义寡核苷酸是较不有效的翻译抑制剂，但是根据本发明可被使用。反义核酸可以是长度上至少六个核苷酸，并且在一些实施方式中寡核苷酸长度从 6 个变化至约 50 个核苷酸。在特定的方面，寡 核苷酸是至少 10 个核苷酸、至少 17 个核苷酸、至少 25 个核苷酸或至少 50 个核苷酸。

[0639] 在还有另一个实施方式中，本文所公开的方法中使用的反义寡核苷酸是 α－端基异构寡核苷酸。α－端基异构寡核苷酸与互补的 RNA 形成特异的双链杂交物，其中与一般的情况相反，链彼此平行 (Gautier 等人，Nucl.Acids Res.15：6625-6641(1987))。寡核苷酸是 2’-O- 甲基核糖核苷酸 (Inoue 等人，Nucl.Acids Res.15：6131-6148(1987)) 或嵌合的 RNA-DNA 类似物 (Inoue 等人，FEBSLett.215：327-330(1987))。

[0640] 本文所公开的方法中所使用的多核苷酸组合物还包括催化性 RNA 或核酶（参见例如 1990 年 10 月 4 日公开的 PCT 国际公开 WO90/11364；Sarver 等人，Science 247：1222-1225(1990))。在本发明的某些实施方式中，使用了锤头状核酶。锤头状核酶在由与靶 mRNA 形成互补碱基对的旁侧区所指示的位置裂解 mRNA。唯一的要求是靶 mRNA 具有下列两个碱基的序列：5’-UG-3’。锤头状核酶的构建和产生是本领域中熟知的并且更全面地描述于 Haseloff 和 Gerlach，Nature 334：585-591(1988) 中。核酶可被工程化以便裂解识别位点位于靠近靶 mRNA 的 5’端；即以增加效力并将非功能的 mRNA 转录物的胞内积累最小化。

[0641] 如在反义方法中一样，本文所公开的方法中使用的核酶可包括修饰的寡核苷酸（例如为了改善的稳定性，靶向等），并且可被体内递送至表达 LINGO-1 的细胞。编码核酶的 DNA 构建体可以如上文所描述的相同的方式被引入细胞中以便引入反义的编码 DNA。递送的一个方法包括使用在强的组成型启动子（例如诸如 pol III 或 pol II 启动子）控制下的“编码”核酶的 DNA 构建体，以便所转染的细胞将产生足以破坏内源 LINGO-1 信使并抑制翻译的量的核酶。 由于核酶与反义分子不同，是催化性的，因此效力需要较低的胞内浓

度。

[0642] TrkB 激动剂多核苷酸

[0643] 本发明的方法中使用的 TrkB 激动剂包括包含编码 TrkB 多肽、其片段、同种型或变体的核酸分子的 TrkB 激动剂多核苷酸。本发明的 TrkB 激动剂多核苷酸还包括编码 TrkB 配体多肽、其片段、同种型或变体的核酸分子。在一些实施方式中，TrkB 激动剂多核苷酸编码 BDNF。TrkB 激动剂多核苷酸包括编码本发明的 TrkB 激动剂多肽的任何多核苷酸。

[0644] LINGO-1 拮抗剂和 / 或 TrkB 激动剂多核苷酸

[0645] 本文公开的方法中使用的多核苷酸（包括上文描述的适体）可以是 DNA 或 RNA 或其嵌合混合物或衍生物或修饰的版本，可为单链或双链的。可在碱基部分、糖部分或磷酸主链修饰多核苷酸例如以改善分子的稳定性、杂交等。多核苷酸可包括其他的附加的基团例如肽（例如用于体内靶向宿主细胞受体）或促进跨细胞膜（参见，例如 Letsinger 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :6553-6556(1989) ;Lemaitre 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. 84 :648-652(1987)) ;1988 年 12 月 15 日公开的 PCT 公开第 WO88/09810 号）或血脑屏障（参见，例如 1988 年 4 月 25 日公开的 PCT 公开第 WO89/10134 号）运输的剂、杂交促发的裂解剂（参见例如 Krol 等人，BioTechniques 6 :958-976(1988)）或嵌入剂（参见例如 Zon, Pharm. Res. 5 :539-549(1988)）。为此，多核苷酸可轭合至另一个分子例如肽、杂交促发的交联剂、运输剂、杂交促发的裂解剂等。

[0646] 本文公开的方法中使用的多核苷酸（包括适体）可包含选自下列组的至少一个修饰的碱基部分，所述组包括但不限于 5- 氟尿嘧 啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4- 乙酰胞嘧啶、5-（羧基羟基甲基）尿嘧啶、5- 羧基甲基氨基甲基 -2- 硫尿核苷、5- 羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β -D- 半乳糖基 Q 核苷、肌苷、N-6- 异戊烯腺嘌呤、1- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基肌苷、2,2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、3- 甲基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、N-6- 腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、5- 甲基氨基甲基尿嘧啶、5- 甲基氨基甲基 -2- 硫尿嘧啶、β -D- 甘露糖基 Q 核苷、5’甲基羧基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基尿嘧啶、2- 甲基硫代 -N-6- 异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶 -5- 羟乙酸 (v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q 核苷、2- 硫胞嘧啶、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、尿嘧啶 -5- 羟乙酸甲酯、尿嘧啶 -5- 羟乙酸 (v)、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、3(3- 氨基 -3-N2 羧基丙基）尿嘧啶、(acp3)w 和 2,6- 二氨基嘌呤。

[0647] 本文公开的方法中使用的多核苷酸（包括适体）还可包含选自下列组的至少一个修饰的糖部分，所述组包括但不限于阿拉伯糖、2- 氟代阿拉伯糖、木酮糖和己糖。

[0648] 在还有另一个实施方式中，本文公开的方法中使用的多核苷酸（包括适体）还可包含选自下列组的至少一个修饰的磷酸主链，所述组包括但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、烷基磷酸三酯和甲缩醛或其类似物。

[0649] 本文公开的方法中使用的多核苷酸（包括适体）可通过本领域已知的标准方法合成，例如通过使用 DNA 自动合成仪（例如可从 Biosearch, Applied Biosystems 等商业上获得的）。例如，硫代磷酸酯寡核苷酸可通过 Stein 等人，Nucl. Acids Res. 16 :3209(1988) 的方法合成，甲基膦酸酯寡核苷酸可通过使用可控多孔玻璃聚合物支持物 (Sarin 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :7448-7451(1988)) 等制 备。

[0650] 载体和宿主细胞

[0651] 宿主表达系统代表通过其产生并随后纯化所感兴趣的编码序列的载体，但是也代表其在用适当的核苷酸编码序列转化或转染时原位表达本发明的抗体分子的细胞。这些包括但不限于微生物，例如用包含抗体编码序列的重组的噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌（例如大肠杆菌、枯草杆菌 (B.subtilis))、用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母（例如酵母 (Saccharomyces)、毕赤酵母 (Pichia))，用含有抗体编码序列的重组的病毒表达载体（例如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统、用包含抗体编码序列的重组的病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒，CaMV ；烟草花叶病毒，TMV) 感染的或用包含抗体编码序列的重组的质粒表达载体（例如 Ti 质粒）转化的植物细胞系统、或包含含有来源于哺乳动物细胞基因组的启动子（例如金属硫蛋白启动子）或来自哺乳动物病毒的启动子（例如，腺病毒后期启动子、牛痘病毒 7.5K 启动子）的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（例如 COS、CHO、BLK、293、3T3 细胞）。细菌细胞（例如大肠杆菌）或真核细胞（特别用于完整重组抗体分子的表达）被用于重组抗体分子的表达。例如，与载体例如来自人类巨细胞病毒的主要的中早期基因 (intermediate early gene) 启动子元件联合的哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 是有效的抗体表达系统 (Foecking 等人，Gene 45 ：101(1986) ；Cockett 等人，Bio/Technology 8 ：2(1990))。

[0652] 在细菌系统中，依赖于被表达的抗体分子的预期用途而有利地选择许多表达载体。例如，当为了产生抗体分子的药物组合物而将生产大量的这种蛋白时，期望的是指导容易被纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。这种载体包括但不限于，大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruther 等人，EMBO J. 2 ：1791(1983))，其中抗体编码序列可分别在 lacZ 编码区的框内连接于载体以便产生融合蛋白 ；pIN 载体 (Inouye & Inouye，Nucleic Acids Res. 13 ：3101-3109(1985) ；VanHeeke & Schuster，J. Biol. Chem. 24 ：5503-5509(1989)) 和类似载体。pGEX 载体也可用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 的融合蛋白。通常，这种融合蛋白是可溶的并且可通过吸附并与基质谷胱甘肽 - 琼脂糖微珠结合之后在游离的谷胱甘肽存在的情况下洗脱而容易地从裂解的细胞纯化。pGEX 载体被设计以包括凝血酶或凝血因子 Xa 蛋白酶裂解位点以便可从 GST 部分释放克隆的靶基因产物。

[0653] 在昆虫系统中，苜蓿银纹夜蛾 (Autographa californica) 核型多角体病毒 (AcNPV) 常常被用作载体以表达外源基因。病毒在草地夜蛾 (Spodoptera frugiperda) 中生长。抗体编码序列被分别克隆至病毒的非必需区（例如多角体蛋白基因）中并置于 AcNPV 启动子（例如多角体蛋白启动子）的控制下。

[0654] 在哺乳动物宿主细胞中，许多基于病毒的表达载体可被使用。当腺病毒被用作表达载体的情况下，所感兴趣的抗体编码序列可被连接至腺病毒转录 / 翻译控制复合物，例如晚期启动子和三联前导序列。这一嵌合的基因之后可通过体外或体内重组被插入腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区（例如区 E1 或 E3) 中插入将产生有活力并且能够在所感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒。（参见例如 Logan & Shenk，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 ：355-359(1984))。插入的抗体编码序列的有效翻译还需要特定的起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和相邻的序列。而且起始密码子必须与所期望的编码序列的读码框同相以确保整个插入物的翻译。这些外源的翻译控制信号和起始密码子可具有不同的来源，可为天然和合成的。表达的效力可通过包含适当的转录增强元件、转录终止 子等

来增强（参见，Bittner 等人，Methods in Enzymol. 153 :51-544(1987)）。

[0655] 此外，可选择调节插入的序列的表达或以所期望的特定的方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白产物的这种修饰（例如糖基化）和加工（例如裂解）对蛋白的功能来说可能是重要的。不同的宿主细胞具有对蛋白和基因产物的特有的和特定的翻译后加工和修饰的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确的修饰和加工。为此，可使用具有用于正确加工初级转录物和将基因产物糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这种哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38 以及特别地，乳腺癌细胞系例如 BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D 以及正常的乳腺细胞系例如诸如 CRL7030 和 Hs578Bst。

[0656] 对于重组蛋白的长期的高产量的生产来说，可使用稳定的表达。例如稳定表达抗体分子的细胞系可被工程化。不同于使用含有病毒复制起点的表达载体，可用由适当的表达控制元件（例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等）控制的 DNA 和可选择的标记转化宿主细胞。引入外源 DNA 之后，可使工程化的细胞在富集培养基中生长 1-2 天，之后将其转换至选择培养基。重组质粒中的可选择的标记提供对选择的抗性并且允许细胞将质粒稳定地整合至它们的染色体中并生长以形成焦点 (foci)，其反过来可被克隆并扩展至细胞系中。可有利地使用这一方法以将稳定表达抗体分子的细胞系工程化。

[0657] 许多选择系统可被使用，包括但不限于可分别用于 tk- 细胞、hgprt- 细胞或 aprt- 细胞的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler 等人，Cell11 :223(1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 :202(1992)) 和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Lowy 等人，Cell 22 :817(1980)) 基因。同样，抗代谢物抗性可被用作下列基因选择的基础 :dhfr，其提供对氨甲喋呤的抗性 (Wigler 等人，Natl. Acad. Sci. USA 77 :357(1980 ;O′ Hare 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :1527(1981)) ;gpt，其提供对麦考酚酸的抗性 (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :2072(1981)) ;neo，其提供对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Clinical Pharmacy12 :488-505 ;Wu 和 Wu，Biotherapy 3 :87-95(1991) ;Tolstoshev，Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 :573-596(1993) ; Mulligan，Science260 :926-932(1993) 和 Morgan 和 Anderson，Ann. Rev. Biochem. 62 : 191-217(1993) ;TIB TECH 11(5) :155-215(May, 1993)) 和 hygro，其提供对潮霉素的抗性 (Santerre 等人，Gene 30 :147(1984))。可使用的重组 DNA 技术领域中通常已知的方法描述于 Ausubel 等人（编辑），Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学中的最新实验方案），John Wiley & Sons, NY(1993) ;Kriegler, Gene Transferand Expression, A Laboratory Manual（基因转移和表达的实验手册），Stockton Press, NY(1990) 和 Dracopoli 等人（编辑），Current Protocolsin Human Genetics（人类遗传学中的最新实验方案），John Wiley &Sons, NY(1994) 的第 12 和 13 章中 ;Colberre-Garapin 等人，J. Mol. Biol. 150 :1(1981)，其通过引用全文引入本文。

[0658] 抗体分子的表达水平可通过载体扩增来增加（综述，参见 Bebbington 和 Hentschel, The use of vectors based on geneamplification for the expression of cloned genes in mammalian cells inDNA cloning（在 DNA 克隆中用于在哺乳动物细胞中表达克隆基因的以基因扩增为基础的载体的应用），Academic Press, New York，第 3 卷 .(1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时，宿主细胞培养基中存在的抑

制剂的水平的增加将增加标记基因的拷贝数目。因为扩增的区与抗体基因有关，抗体的产生也将增加 (Crouse 等人，Mol.Cell.Biol.3 :257(1983))。

[0659] 包含编码 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的核酸的载体也可用于产生本发明的方法中使用的多核苷酸或多肽。这些核酸可操作地连接的载体和表达控制序列的选择取决于所期望的功能特性，例如蛋白表达和有待转化的宿主细胞。

[0660] 用于调节可操作地连接的编码序列的表达的表达控制元件是本领域已知的。实例包括但不限于可诱导的启动子、组成型启动子、分泌信号和其他调节元件。当使用可诱导的启动子时，其可通过例如宿主细胞培养基中营养条件上的变化或温度上的变化来控制。

[0661] 载体可包括原核复制子，即具有在细菌宿主细胞中指导自主复制并且维持染色体外的重组的 DNA 分子的能力的 DNA 序列。这种复制子是本领域中熟知的。此外，包括原核复制子的载体也可包括其表达提供可检测的标记例如药物抗性的基因。细菌药物抗性基因是提供对氨苄青霉素或四环素的抗性的那些。

[0662] 包括原核复制子的载体也可包括在细菌宿主细胞中指导编码基因序列的表达的原核或噬菌体启动子。与细菌宿主相容的启动子序列通常在包含用于插入有待表达的 DNA 片段的方便的限制性位点的质粒载体中提供。这种质粒载体的实例是 pUC8、pUC9、pBR322 和 pBR329(BioRad)、pPL 和 pKK223(Pharmacia)。任何适合的原核宿主可用于表达编码在本发明的方法中使用的蛋白的重组 DNA 分子。

[0663] 为了本发明的目的，可使用许多表达载体系统。例如，一个类型的载体利用来自于动物病毒例如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒 (RSV、MMTV 或 MOMLV) 或 SV40 病毒的 DNA 元件。其他的包括具有内部核糖体结合位点 的多顺反子系统的使用。此外，可通过引入允许选择转染的宿主细胞的一个或多个标记来选择已经将 DNA 整合至它们的染色体的细胞。标记可为营养缺陷型宿主提供原营养、提供杀生物剂抗性（例如抗生素）或对重金属例如铜的耐受性。可选择的标记基因可直接与有待表达的 DNA 序列连接或通过共转化被引入同一细胞。新霉素磷酸转移酶 (neo) 基因是可选择的标记基因的实例 (Southern 等人，J.Mol. Anal.Genet.1 :327-341(1982))。mRNA 的最佳合成还可能需要其他的元件。这些元件可包括信号序列或剪接序列以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0664] 在一个实施方式中，可使用称为 NEOSPLA（美国专利 6,159,730，通过引用并入本文）的表达载体。这一载体包含巨细胞病毒启动子 / 增强子、小鼠 β 球蛋白主要启动子、SV40 复制起点、牛生长激素多腺苷酸化序列、新霉素磷酸转移酶外显子 1 和外显子 2、二氢叶酸还原酶基因和引导序列。已经发现这一载体当在 CHO 细胞中转染，之后在含有 G418 的培养基上选择和甲氨喋呤扩增时产生非常高水平的表达。当然，能够在真核细胞中引起表达的任何表达载体可用于本发明。适合的载体的实例包括但不限于质粒 pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1 和 pZeoSV2（可从 Invitrogen，San Diego，CA 获得）以及质粒 pCI（可从 Promega，Madison，WI 获得）。其他的真核细胞表达载体是本领域已知的并且是商业上可得的。通常，这种载体包括用于插入所期望的 DNA 片段的方便的限制性载体。示例性载体包括 pSVL 和 pKSV-10(Pharmacia)、pBPV-1、pml2d(Intemational B iotechnologies)、pTDT1(ATCC 31255)、逆转录病毒表达载体 pMIG 和 pLL3.7、腺病毒穿梭载体 pDC315、和 AAV 载体。其他

的示例性载体系统描述于例如美国专利 6,413,777 中。

[0665] 通常，筛选大量的表达适当高的水平的拮抗剂的转化细胞是由例如机器人系统进行的常规实验。

[0666] 经常使用的用于哺乳动物宿主细胞表达的调节序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平的蛋白表达的病毒元件，例如来源于逆转录病毒 LTR、巨细胞病毒 (CMV)（例如 CMV 启动子 / 增强子）、猿病毒 (SV40)（例如 SV40 启动子 / 增强子）、腺病毒（例如腺病毒主要晚期启动子 (Adm1P)）的启动子和增强子，多瘤和强的哺乳动物启动子例如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。病毒调节元件和其序列的进一步的描述参见例如美国专利第 5,168,062 号 ;Bell，美国专利第 4,510,245 号和 Schaffner，美国专利第 4,968,615 号。

[0667] 重组表达载体可携带在宿主细胞中调节载体复制的序列（例如复制起点）和可选择的标记基因。可选择的标记基因有利于选择已将载体引入其中的宿主细胞（参见例如 Axel，美国专利第 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017 号）。例如，通常可选择的标记基因为已将载体引入其中的宿主细胞赋予对药物例如 G418、潮霉素或氨甲喋呤的抗性。常用的可选择的标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因（用于在具有氨甲喋呤选择 / 扩增的 dhfr- 宿主细胞中使用）和 neo 基因（用于 G418 选择）。

[0668] 编码 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的载体可用于转化适当的宿主细胞。转化可以通过任何适合的方法。用于将外源 DNA 引入哺乳动物细胞的方法是本领域中熟知的，并且包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、通过在脂质体中包封多核苷酸的转染和将 DNA 直接微注射至细胞核中。此外，核酸分子可通过病毒载体被引入哺乳动物细胞中。哺乳动物细胞还可通过包含有待被引入哺乳动物细胞中的外源 DNA 的 重组病毒来转导。

[0669] 用于表达在本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的宿主细胞可以是原核或真核的。示例性的真核宿主细胞包括但不限于酵母和哺乳动物细胞，例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (ATCC 登记号 CCL61)、NIH 瑞士小鼠胚胎细胞 NIH-3T3(ATCC 登记号 CRL1658) 和幼仓鼠肾细胞 (BHK)。其他可用的真核宿主细胞包括昆虫细胞和植物细胞。示例性的原核宿主细胞是大肠杆菌和链霉菌。

[0670] 宿主细胞的转化可通过适于所使用的载体和宿主细胞的常规方法来完成。对于真核宿主细胞的转化，可使用电穿孔和盐处理法 (Cohen 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69 : 2110-14(1972))。对于脊椎动物细胞的转化，可使用电穿孔、阳离子脂质或盐处理法，参见例如 Graham 等人，Virology 52 :456-467(1973) ;Wigler 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 :1373-76(1979)。

[0671] 在某些实施方式中，用于蛋白表达的宿主细胞系可为哺乳动物来源 ;相信本领域技术人员具有确定对于有待在其中表达的所期望的基因产物来说最适合的特定的宿主细胞系的能力。示例性的哺乳动物宿主细胞系包括但不限于 NSO、SP2 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人类肝细胞癌细胞（例如 Hep G2)、A549 细胞 DG44 和 DUXB11（中国仓鼠卵巢细胞系、DHFR 阴性）、HELA（人类宫颈癌）、CVI（猴肾细胞系）、COS（具有 SV40T 抗原的 CVI 衍生物）、R1610（中国仓鼠成纤维细胞）、BALBC/3T3（小鼠成纤维细胞）、HAK（仓鼠肾细胞系）、SP2/0（小鼠骨髓瘤）、P3x63-Ag3.653（小鼠骨髓瘤）、BFA-1c1BPT（牛内皮细胞）、RAJI（人类淋巴细胞）和 293（人类肾细胞）。用于表达在本发明的方法中使用的 LINGO-1

拮抗剂或 TrkB 激动剂的宿主细胞还可以 是原核的。示例性的原核宿主细胞是大肠杆菌和链霉菌。宿主细胞系通常可从商业机构、American Tissue Culture Collection(美国典型培养物保藏中心)或从公开的文献获得。

[0672] 可使用已知的技术增强来自生产细胞系的多肽的表达。例如,谷氨酰胺合成酶(GS)系统常被用于在某些情况下增强表达。参见例如欧洲专利第 0216846、0256055 和 0323997 号和欧洲专利申请第 89303964.4 号。

[0673] 基因治疗

[0674] 使用治疗与神经元退化、死亡或缺乏再生有关的疾病、病症或损伤的基因治疗方法,可在哺乳动物例如人类患者中体内产生 LINGO-1 和某些 TrkB 激动剂(例如多核苷酸、多肽、抗体和适体)。这包括施用编码适合的 LINGO-1 拮抗剂和 / 或 TrkB 激动剂的可操作地连接至适合的表达控制序列的核酸。通常这些序列被并入至病毒载体中。适合于这种基因治疗的病毒载体包括腺病毒载体、α 病毒载体、肠病毒载体、瘟病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、疱疹病毒载体(例如,埃巴病毒载体或单纯疱疹病毒载体)、乳多空载体病毒、痘病毒载体(例如牛痘病毒载体)和细小病毒。病毒载体可以是复制缺陷型病毒载体。通常所用的是在它们的 E1 基因或 E3 基因中有缺失的腺病毒载体。当使用腺病毒载体时,载体通常不具有可选择的标记基因。

[0675] 药物组合物和施用方法

[0676] 本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂可被配制在用于向哺乳动物包括人类施用的药物组合物中。本发明的方法中使用的药物组合物包括药学上可接受的载体,包括例如离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人类血清白蛋白)、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和的植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、以纤维素为基础的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯 - 聚丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0677] 本发明的方法中使用的组合物可通过任何适合的方法来施用,例如胃肠外地、心室内地、口服地、通过吸入喷雾、局部地、直肠地、经鼻地、向颊地、阴道地或通过植入型药盒。如本文使用的,术语“胃肠外的”包括皮下的、静脉内的、肌肉内的、关节内的、滑膜内的、胸骨内的、鞘内的、肝内的、病灶内的或颅内的注射或输注技术。如之前所描述的,本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂在神经系统中起作用以促进神经元的存活。相应地,在本发明的方法中,LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂以使其穿过血脑屏障的方式施用。这一穿过可源于 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂分子本身固有的物化特性,源于药物制剂中的其他成分,或源于突破血脑屏障的机械装置例如针、插管或手术工具的使用。当 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂是本身并不穿过血脑屏障的分子时,例如与有利于穿过的部分的融合物,适当的施用途径是例如鞘内或颅内的,例如直接至 MS 的慢性损伤中。当 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂是本身穿过血脑屏障的分子时,施用的途径可以是通过下文描述的不同途径中的一种或多种。

[0678] 本发明的方法中使用的组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性悬浮液。这些悬浮液可根据本领域已知的技术使用适合的分散剂或增湿剂和悬浮剂来配制。无菌的可注射的制剂还可以是溶于无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌的可注射的溶液或

悬浮液，例如为溶于 1,3- 丁二醇中的悬浮液。可接受的可使用的介质和溶剂是水、林格溶液和等渗的氯化钠溶液。此外，无菌的不挥 发的油通常可被用作溶剂或悬浮介质。为了这一目的，可使用任何温和的不挥发的油，包括合成的单 - 或双 - 甘油二酯。脂肪酸例如油酸和其甘油酯衍生物作为天然的药学上可接受的油在可注射的制剂中是有用的，例如橄榄油或蓖麻油，尤其是以其聚氧乙烯化形式。这些油性溶液或悬浮液还可含有长链醇稀释剂或分散剂，例如羧甲基纤维素或通常在药学上可接受的剂型（包括乳液和悬浮液）的配制中所用的相似的分散剂。也可为配制的目的使用通常用于制备药学上可接受的固体、液体或其他制剂形式的其他常用的表面活性剂例如吐温、司盘和其他乳化剂或生物利用率增强剂。

[0679] 胃肠外剂型可以是单一的弹丸注射剂量，输注或加载的弹丸注射剂量，以及之后的维持剂量。这些组合物可以特定的固定的或可变的间隔例如每天一次或基于“根据需要”的间隔施用。

[0680] 本发明的方法中所使用的某些药物组合物可以可接受的剂型包括例如胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液口服施用。某些药物组合物还可通过经鼻的喷雾或吸入施用。使用苯甲醇或其他适合的防腐剂、增强生物利用率的吸收促进剂，和 / 或其他常规的增溶剂或分解剂，这种组合物可被配制为溶于盐水的溶液。

[0681] 可与运载体材料组合以产生单一剂型的 LINGO-1 拮抗剂和 / 或 TrkB 激动剂的量将取决于所治疗的宿主、所使用的拮抗剂的类型和施用的特定的形式而变化。组合物可作为单一剂量、多个剂量或一段确定的时间的输注而施用。给药方案还可被调整以提供最佳的所期望的响应（例如治疗或预防响应）。

[0682] 本发明的方法使用“治疗有效量”或“预防有效量”的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂。这种治疗有效量或预防有效量可根据因素例如个体的疾病状况、年龄、性别和体重而变化。治疗有效量或预 防有效量还可以是治疗上有益的作用超过任何有毒或有害的作用的量。

[0683] 用于任何特定的患者的特定的剂量和治疗方案将取决于各种因素，包括所使用的特定的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食以及施用的时间、排泄的速度、药物组合和所治疗的特定的疾病的严重度。通过医疗看护者判断这些因素在本领域技术人员的能力范围之内。量还将取决于有待治疗的个体患者、施用的途径、制剂的类型、所使用的化合物的特性、疾病的严重度和所期望的作用。所使用的量可通过本领域中熟知的药理学和药物动力学原理来确定。

[0684] 在本发明的方法中，通常可直接向神经系统、脑室内地或鞘内地向例如 MS 的慢性损伤施用 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂。根据本发明的方法施用的组合物可被配制以致施用每天 0.001-10mg/kg 体重的 LINGO-1 拮抗剂多肽。在本发明的一些实施方式中，剂量是每天 0.01-1.0mg/kg 体重。在某些实施方式中，剂量是每天 0.001-0.5mg/kg 体重。

[0685] 为了用 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂抗体治疗，剂量的范围可从约 0.0001 至 100mg/kg 宿主体重，和更通常地 0.01 至 5mg/kg（例如，0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 等）宿主体重。例如，剂量可以是 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1-10mg/kg 范围内，任选地至少 1mg/kg。上文范围中的剂量中间值也意为在本发明的范围内。受治疗者可被每天、隔天、每周或根据通过经验分析确定的任何其他的时间表施用

这样的剂量。示例性的治疗要求以一段长时间例如至少六个月的多次剂量的施用。另外的示例性治疗方案要求每两周施用一次或每月施用一次或每 3 至 6 个月施用一次。示例性的剂量方案包括连续每 天 1-10mg/kg 或 15mg/kg，隔天 30mg/kg 或每周 60mg/kg。在一些方法中，同时施用具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体，在这种情况下所施用的每种抗体的剂量在所指示的范围内。

[0686] 在某些实施方式中，可用编码 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂多核苷酸的核酸分子治疗受治疗者。核酸的剂量在每位患者从约 10ng 至 1g、100ng 至 100mg、1μg 至 10mg 或 30-300μg DNA 的范围内。感染性病毒载体的剂量为每剂量 10-100 或更多病毒粒子。

[0687] 在某些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂可以有效量施用以与 LINGO-1 拮抗剂不存在时 LINGO-1 和 TrkB 的相互作用相比，阻滞 LINGO-1 和 TrkB 相互作用的至少 5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100%，如由竞争性测定或免疫沉淀测定测量的。

[0688] 在某些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂可以有效量施用以与 LINGO-1 拮抗剂不存在时的磷酸化的 TrkB 的量相比促进至少 5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 的 TrkB 的磷酸化。

[0689] 在某些实施方式中，LINGO-1 拮抗剂可以有效量施用以与 LINGO-1 拮抗剂不存在时的磷酸化的 JNK 的量相比减少至少 5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 的 JNK 的磷酸化。

[0690] 在某些实施方式中，TrkB 激动剂和 LINGO-1 拮抗剂可以有效量施用以与未治疗的 CNS 神经元或哺乳动物中的存活的神经元数目相比促进 CNS 神经元的存活，存活的神经元数目增加至少 5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、 170%、180%、190%、200%、250 %、300 %、350 %、400 %、450 %、500 %、550 %、600 %、650 %、700 %、750 %、800 %、850%、900%、950% 或 1000%。

[0691] 补充的活性化合物也可被掺入至本发明的方法中所使用的组合物中。例如，可溶的 LINGO-1 或 TrkB- 激动剂多肽或融合蛋白可与一种或多种另外的治疗剂共配制和 / 或共施用。

[0692] 本发明涵盖将 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂递送至所选择的靶组织的任何适合的方法，包括含水溶液的弹丸注射或可控制释放的系统的植入。可控制释放的植入的使用减少了对多次注射的需要。

[0693] 本发明的方法中使用的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂可直接输注至脑中。用于化合物的直接脑部输注的不同的植入物是已知的并且对向患有神经学病症的人类患者递送治疗化合物是有效的。这些包括使用泵向脑的慢性输注、立体排列地植入、临时的间质导管、永久的颅内导管植入物和手术植入生物可降解的植入物。参见例如 Gill 等人，如上文；Scharfen 等人，“High Activity Iodine-125Interstitial Implant For Gliomas（用于神经胶质瘤的高活性碘 -125 间质植入物），”Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24(4)：583-591(1992)；Gaspar 等 人，“Permanent 125I Implants for RecurrentMalignant Gliomas（用于复发的恶性神经胶质瘤的永久性 125I 植入物），”Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 43(5)：977-982(1999)； 第 66 章， 第 577-580 页，

Bellezza 等人,“Stereotactic InterstitialBrachytherapy(立体排列的间质短程疗法),”在Gildenberg等人,Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery(立体排列和功能性神经外科教科书),McGraw-Hill(1998);和 Brem 等人,“TheSafety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly DiagnosedMalignant Gliomas:Phase I Trial(新诊断的恶性神经胶质瘤的治疗中使用加载 BCNU 的聚合物的间质化学治疗和之后的放射治疗的安全性),”J.Neuro-Oncology 26:111-23(1995)。

[0694] 组合物还可包含分散在起到化合物的适合的递送或支持系统的作用的生物相容的载体材料中的 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂。缓释载体的适合的实例包括成型的制品(例如栓剂或胶囊)形式的半透性的聚合物基质。可植入的或微胶囊缓释基质包括聚交酯(美国专利第 No.3,773,319 号;EP 58,481)、L- 谷氨酸和 γ- 乙基 -L 谷氨酸酯的共聚物(Sidman 等人,Biopolymers 22:547-56(1985));聚 (2- 羟乙基 - 甲基丙烯酸酯)、乙烯基醋酸乙烯酯 (Langer 等人,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277(1981);Langer,Chem.Tech.12:98-105(1982)) 或聚 -D-(-)-3 羟基丁酸 (EP 133,988)。

[0695] 在本发明的一些实施方式中,LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂通过向脑的适合的区域的直接输注而施用至患者。参见例如 Gill 等人,“Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factorin Parkinson disease(帕金森病中神经胶质细胞系来源的神经营养因子的直接脑输注),”Nature Med.9:589-95(2003)。替代技术是可得的并且可被应用以根据本发明施用 LINGO-1 拮抗剂。例如,可使用 Riechert-Mundinger 装置和 ZD(Zamorano-Dujovny) 多用途定位装置来完成导管或植入物的立体排列的放置。注射 120ml 的欧乃派克、350mg 碘 /ml,具有 2mm 的层厚的反差增强的计算机 X 线断层摄影术 (CT) 扫描可允许三维的多面的治疗设计 (STP,Fischer,Freiburg,Germany)。这一设备允许以磁共振成像研究为基础的设计,为了清晰的靶确认而合并 CT 和 MRI 靶信息。

[0696] 为了这一目的可使用为了与 GE CT 扫描仪 (General Electric Company,Milwaukee,WI) 一起使用而改进的 Leksell 立体定向系统 (Downs Surgical,Inc.,Decatur,GA) 以及 Brown-Roberts-Well(BRW) 立体定向系统 (Radionics,Burlington,MA)。因此,在植入的早上,BRW 立体定向框的环形的基区环可被连接至患者的颅骨。系列的 CT 切片可以 3mm 的间隔获得,尽管(靶组织)区以石墨棒定位框固定至基区板。使用石墨棒成像的 CT 坐标以在 CT 空间和 BRW 空间之间作图,可在 VAX 11/780 计算机 (DigitalEquipment Corporation,Maynard,Mass.) 上运行计算机化的治疗设计程序。

[0697] 为了所期望的治疗活性或预防活性,在于人类中使用之前,如本文所描述的病症的治疗方法通常被体外检测,并且之后在可接受的动物模型中体内检测。适合的动物模型(包括转基因动物)是本领域技术人员熟知的。例如证实 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的存活作用的体外测定描述于本文。最后,体内检测可通过通过产生表达 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂的转基因小鼠或向本文描述的模型中的小鼠或大鼠施用 LINGO-1 拮抗剂或 TrkB 激动剂来进行。

[0698] 除非另外说明,否则本发明的实践将使用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,其在本领域的技术范围内。这种技术被充分阐述于文献中。参见,例如 Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子

克隆实验手册)(3- 卷集),J.Sambrook,D.W.Russell,Cold SpringHarbor Laboratory Press(2001) ;Genes VIII(基因 VIII),B.Lewin,Prentice Hall(2003) ;PCR Primer(PCR 引 物),C.W.Dieffenbach 和 G.S.Dveksler,CSHL Press(2003) ;DNA Cloning(DNA 克隆),D.N.Glover 编辑,第 I 和 II 卷 (1985) ;Oligonucleotide Synthesis :Methodsand Applications(寡核苷酸合成 :方法和应用)(Methods in MolecularBiology(分子生物学中的方法)),P.Herdewijn(编辑),Humana Press (2004) ;Culture of Animal cell :A Manual of B asic Technique(动物细胞的培养 :基础技术手册),第 4 版,R.I.Freshney,Wiley-Liss(2000) ;Oligonucleotide Synthesis(寡核苷酸合成),M.J.Gait(编辑),(1984) ;Mullis 等人,美国专利第 4,683,195 号 ;Nucleic AcidHybridization(核酸杂交),B.D.Hames & S.J.Higgins 编辑 (1984) ;Nucleic Acid Hybridization(核酸杂交),M.L.M.Anderson,Springer(1999) ;Animal Cell Culture and Technology(动物细胞培养和技术),第 2 版,M.Butler,BIOS Scientific Publishers(2004) ;Immobilized celland Enzymes :A Practical Approach(固定的细胞和酶 :实用方法)(Practical Approach Series(实用方法系列)),J.Woodward,Irl Pr(1992) ;Transcription and Translation(转录和翻译),B.D.Hames &S.J.Higgins(编辑)(1984) ;Culture Of Animal cell(动物细胞的培养),R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,(1987) ;Immobilized cell andEnzymes(固定的细胞和酶),IRL Press,(1986) ;A Practical Guide toMolecular Cloning(分子克隆的实用指南),第 3 版,B.Perbal,JohnWiley & Sons Inc.(1988) ;专著,Methods In Enzymology(酶学中的方法),Academic Press,Inc.,N.Y. ;Gene Transfer Vectors ForMammalian cell(用于哺乳动物细胞的基因转移载体),J.H.Miller 和 M.P.Calos 编辑,Cold Spring Harbor Laboratory(1987) ;MethodsIn Enzymology(酶学中的方法),第 154 和 155 卷,Wu 等人(编辑) ;Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology(细胞和分子生物学中的免疫化学方法),Mayer 和 Walker,(编辑),AcademicPress,London(1987) ;Handbook Of Experimental Immunology(实验免疫学手册),第 I-IV 卷,D.M.Weir 和 C.C.Blackwell(编辑),(1986) ;Immunology Methods Manual :The ComprehensiveSourcebook of Techniques(免疫方法手册 :技术的全面资料)(4 卷集),第 1 版,I.Lefkovits,Academic Press(1997) ;Manipulating theMouse Embryo :A Laboratory Manual(小鼠胚胎操作 :实验手册), 第 3 版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(2002) 和在 Ausubel 等人,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学中的最新实验方案),John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989) 中。

[0699] 抗体工程化的一般原理阐述于 Antibody Engineering :Methodsand Protocols(抗体工程化 :方法和实验方案)(Methods in MolecularBiology(分子生物学中的方法)),B.L.Lo(编辑),Humana Press(2003) ;Antibody engineering(抗体工程化),R.Kontermann 和 S.Dubel(编辑),Springer Verlag(2001) ;Antibody Engineering(抗体工程化),第 2 版,C.A.K.Borrebaeck(编辑),Oxford Univ.Press(1995) 中。蛋白工程化的一般原理阐述于 Protein Engineering,APractical Approach(蛋白工程化实用方法),Rickwood,D. 等人(编辑),IRL Press at Oxford Univ.Press,Oxford,Eng.(1995) 中。抗体和抗体 - 半抗原结合的一般原理阐述于 :Antibodies :A LaboratoryManual(抗

体实验手册），E.Harlow 和 D.Lane，Cold Spring HarborLaboratory Press(1988)；Nisonoff，A.，Molecular Immunology（分子免疫学），第 2 版，Sinauer Associates，Sunderland,MA(1984)；和 Steward,M.W.,Antibodies,Their Structure and Function（抗体、它们的结构和功能），Chapman 和 Hall，New York，NY(1984) 中。此外，本领域已知的免疫学中的并且未特别描述的标准方法一般为下列中的：Current Protocols in Immunology（免疫学最新实验方案），JohnWiley & Sons,New York；Stites 等人（编辑），ImmunochemicalProtocols（免疫化学实验方案）(Methods in Molecular Biology（分子生物学中的方法）)，第 2 版，J.D.Pound（编辑），Humana Press(1998)，Weir′ s Handbook of ExperimentalImmunology（实验免疫学的 Weir 手册），第 5 版，D.M.Weir（编辑），Blackwell Publishers(1996)，Methods in Cellular Immunology（细胞免疫学中的方法），第 2 版，R.Fernandez-Botran，CRC Press(2001)；Basic and ClinicalImmunology（基础和临床免疫学），第 8 版，Appleton & Lange， Norwalk，CT(1994) 和 Mishell 和 Shiigi（编辑），Selected Methods inCellular Immunology（分子免疫学中的精选方法），W.H.Freeman andCo.，New York(1980) 中。

[0700] 阐述免疫学的一般原理的标准参考工具书包括 CurrentProtocols in Immunology（免疫学最新实验方案），John Wiley & Sohs，New York；Klein，J.；Kuby Immunology(Kuby 免疫学)， 第 4 版，R.A.Goldsby 等 人，H.Freeman & Co.(2000)；Basic and ClinicalImmunology（基础和临床免疫学），M.Peakman 等人，ChurchillLivingstone(1997)；Immunology（免疫学），第 6 版，I.Roitt 等人，Mosby，London(2001)；Cellular and Molecular Immunology（细胞和分子免疫学），第 5 版；A.K.Abbas，A.H.Lichtman，Elsevier-HealthSciences Division(2005)；Immunology Methods Manual：TheComprehensive Sourcebook of Techniques（免疫学方法手册：技术的全面资料）(4 卷集），第 1 版，I.Lefkovits，Academic Press(1997)；Immunology（免疫学），第 5 版，R.A.Goldsby 等人，W.H.Freeman(2002)；Monoclonal Antibodies：Principles and Practice（单克隆抗体：原理和实践），第 3 版，J.W.Goding，Academic Press(1996)；Immunology：The Science of Self-Nonself Discrimination（免疫学：辨别自我和非自我的科学），John Wiley & Sohs，New York(1982)；Kennett，R. 等人（编辑），Monoclonal Antibodies，Hybridoma：A NewDimension in Biological Analyses（单克隆抗体、杂交瘤：在生物分析中的新维度），Plenum Press，New York(1980)；Campbell，A.，“Monoclonal Antibody Technology（单克隆抗体技术）”于 Burden，R. 等人（编辑），Laboratory Techniques in Biochemistry and MolecularBiology（生物化学和分子生物学中的实验技术）中，第 13 卷，Elsevere，Amsterdam(1984)。

[0701] 上文引用的所有的参考文献以及本文引用的所有参考文献通 过引用全文并入本文。

具体实施方式

[0702] 材料和方法

[0703] 重组 LINGO-1-Fc 和抗 LINGO-1 单克隆抗体的产生

[0704] 如先前所描述的制备 LINGO-1-Fc(LINGO-1-Fc 蛋白）(Mi 等人，Nat.Neurosci.7：

221-228(2004)。人类 LINGO-1 的残基 1-532 被融合至人类 IgG1 的铰链和 Fc 区并在 CHO 细胞中表达。从 ProtosImmunoresearch(San Francisco,CA) 购得人类 IgG1(对照蛋白)。在用 LINGO-1-Fc 免疫的小鼠中产生抗 LINGO-1mab 1A7。杂交瘤细胞系在 DMEM 中培养并且通过蛋白 A 琼脂糖凝胶纯化抗体。从 Protos Immunoresearch(San Francisco,CA) 购得 MOPC21Mouse IgG(对照蛋白)。

[0705] 眼内高压模型

[0706] 实验根据 1996 年修订的美国国立卫生研究院关于实验室动物的护理和使用的指南 (NIH 出版号 80-23) 进行并得到 the UniversityofHong Kong Animal Ethics Committee(香港大学动物伦理委员会) 批准。使用重约 250g 的成年雌性 Sprague-Dawley(SD) 大鼠。每标准实验笼 3 只饲养它们并且维持无限制的食物和水以及维持 12 小时黑暗 / 光照循环 (上午 7:00/ 下午 7:00)。在用克他命 (80mg/kg) 和甲苯噻嗪 (8mg/kg) 腹膜内注射麻醉的动物中进行所有操作。在所有操作前将 0.5% 盐酸丙关卡因 (Alcon-Couvreur,Belgium) 用于眼部并且在处理后将无菌的眼部滴液 (Tobres[托普霉素 (Tobramycin)0.3%],Alcon-Couvreur,Belgium) 用来防止感染。手术后持续 7 天,溶于饮用水的力莫敌 (Rimadyl)(0.025mg/ml) 被用来 缓解疼痛。

[0707] 使用慢性高血压模型诱导实验性青光眼。SD 大鼠在右眼受到 1000mW 功率、500-100μm 点大小和 0.1s 持续时间的巩膜上静脉和角膜缘静脉的氩激光凝固 (Ji 等人,Eur.J.Neurosci.19 :265-272(2004) ;WoldeMussie 等 人,Invest.Ophthalmol.42 :2849-2855(2001))。约 90 个点被使用于三个巩膜上静脉而 70 个点在角膜缘静脉周围。七天后进行第二次激光手术以阻止重新连接的血管流。动物的左眼被用作对侧对照并且没有被手术。在第一次激光暴露后动物被处死前允许动物存活 2 或 4 周。使用 Tonopen XL 压力计在激光手术后不同的时间点测量右眼和左眼的 IOP。获得每个眼的十次测量的平均值。处死之前四天进行 RGC 的 FG 标记。在除去一小片颅骨和皮层后暴露两个上丘 (SC),并将用 FG(6% v/v,Fluorochrome,Denver,CO) 浸泡的明胶海绵 (Pharmacia & Upjohn) 放在 SC 的表面上。FG 退行地标记完整的 RGC。用 PBS 处理十二只动物并且允许它们在第一次激光暴露后存活 4 周。在所有其他的实验组中使用十只动物。青光眼模型的流程总结于图 1 中。

[0708] 第一次激光处理后,动物立即接受溶于 PBS 的 2μgLINGO-1-Fc、2μg 1A7 或 2μg 对照蛋白的玻璃体内注射。在 4 周的青光眼模型中,一周再注射一次蛋白。掩饰处理以避免实验者在 RGC 的计数过程中的偏向。用过量的麻醉将所有动物安乐死。

[0709] 在预定的时间,用过量的麻醉处死大鼠。每只动物的两眼被摘出并且用 4% 多聚甲醛固定 60 分钟。如所描述的 (Cheung 等人,Mol.Cell.Neurosci.25 :383-393(2004) ;Ji 等人,Eur.J.Neurosci.19 :265-272(2004)) 将视网膜制备为裱片并且使用紫外滤光片在荧光显微镜下对 FG 标记的 RGC 计数 (激发波长 = 330-380nm)。在 200×200 μm^2 目镜网格下沿每个象限的中线从视神经盘开始至边 缘以 500μm 间隔定量 RGC(图 2)。将每个象限八个显微场和每个视网膜四个象限总共 32 个显微场计数,相当于每个视网膜区域大约 3-3.2%。测量 RGC 的百分比损失以检查不同处理的存活作用。以与对测完整的眼睛相比受损的眼睛中 RGC 损失的相对百分比的形式表示数据 (% 对测,平均 + 标准平均误差)。

[0710] 用于透射电子显微镜的组织加工

[0711] 从正常组和用 PBS、可溶的 LINGO-1 或 1A7 处理的 2 周青光眼组获得 2mm 的视网膜

切片。将它们于4℃放置在Kamovsky电子显微镜(EM)固定剂中2-4小时。在0.1M磷酸盐缓冲液(PB)中清洗后,将组织样品后固定在溶于0.1M PB的1%四氧化锇中,之后在乙醇中脱水并且包埋于环氧树脂(Epon)中。使用具有在LKB玻璃刀制造器上制作的玻璃刀的Reichert-Jung超微切片机从每个块获得半薄(1μm)切片。用甲苯胺蓝将切片染色。获得具有银干扰色的超薄切片,用Reynolds柠檬酸铅和乙酸铀酰染色并用电子显微镜检查。

[0712] 原代RGC培养

[0713] 将P7Long-Evans大鼠的眼睛摘除并放在分离介质中(DM;90mM Na_2SO_4、30mM K_2SO_4、5.8mM $MgCl_2$、0.25mM $CaCl_2$、1mMHEPES、0.001%酚红)(Furshpan和Potter,1989)。从眼摘除视网膜并且于37℃在含有15U/ml木瓜蛋白酶(Worthington,NJ)、1mM L-半胱氨酸、0.5mM EDTA、0.005%DNA酶I的2ml DM中孵育30分钟。将视网膜在DM中漂洗两次,重悬于含有10mg/ml卵类粘蛋白蛋白酶抑制剂、10mg/ml牛血清白蛋白(都来自Worthington)的2ml DM中并使用2ml血清移液管轻柔地粉碎10-15次。将分离的细胞于1000rpm成团(pellet)5分钟,重悬于从Meyer-Franke等人(Meyer-Franke等人Neuron 15:805-819(1995))改良的2ml生长培养基(神经基质、来自Invitrogen的1x B27、5μM毛喉素、60nM T3、1mM丙酮酸盐、2mM谷氨酰胺)中并用血球计计数。在用聚-D-赖氨酸和层粘连蛋白包被的BD Biocoat 96-孔组织培养板(BD Biosciences,Bedford,MA)中以50,000细胞/cm^2的密度将细胞铺平板并在CO_2孵育器中培养3天。在铺平板时,将细胞在一式四份孔中用人类IgG1(10μtg/ml)、LINGO-1-Fc(10μg/ml)单独、人类IgG1和25ng/ml BDNF或LINGO-1Fc和BDNF处理。

[0714] 将细胞于-20℃在甲醇中固定15分钟,在PBS中漂洗两次并且在溶于PBS的5%正常的山羊血清中封闭1小时。将细胞于4℃在Thy1.1抗体(Serotec,克隆OX-7,1∶40溶于PBS)中孵育过夜,在PBS中漂洗3次每次5分钟,在与Alexa 594轭合的山羊抗小鼠IgG(Molecular Probes,Eugene,OR;1∶1000)中孵育1小时并在PBS中清洗3次每次5分钟。

[0715] 在用Zeiss axiovert倒置显微镜的表面荧光显微镜法下鉴定RGC。每个孔的整个表面在表面荧光下被视觉扫描以计数存活的RGC。仅对具有神经元形态并且具有最小长度3倍于细胞体直径的至少一个突起(process)的Thy 1.1阳性细胞计数。

[0716] LINGO-1和p-TrkB的免疫组织化学

[0717] 在处死前4天用FG退行地标记RGC。在用0.9%盐水经心脏(transcardial)灌注损伤后2周摘除眼并随后在4% PFA中后固定4小时。将十微米厚的冰冻切片与小鼠抗LINGO-1(Biogen)、兔抗磷酸-TrkB(Tyr785)(来自B.Sun博士,上海生物科学研究所,中国上海的赠物)抗体孵育(Ji等人,Nat.Neurosci.8:164-172(2005)),之后用Alexa标记的第二抗体处理。清洗后,用荧光封固介质(fluorescent mounting medium,DakoCytomation)封固切片并在CarlZeiss LSM 510META共聚焦显微镜下分析。

[0718] 蛋白质印迹

[0719] 为了测量视网膜中的LINGO-1、BDNF或p-TrkB,激光凝固后2周将动物安乐死。为了测定Akt磷酸化的时间概况,在激光凝固后6小时、1天和5天将用LINGO-1-Fc或PBS处理的动物安乐死。为了测量损伤、BDNF和LINGO-Fc或1A7对TrkB磷酸化的作用,我们在激光凝固的同时玻璃体内注射BDNF(5μg/眼,重组的人类BDNF;Regeneron

Pharmaceutical，Tarrytown，NY）或与 LINGO-1-Fc 或 1A7（2μg/眼）组合的 BDNF，然后在 5 天后将动物安乐死。将视网膜解剖并且在补充有来自 Sigma 的 10％蛋白酶抑制剂混合物和 1％磷酸酶抑制剂混合物的细胞溶解缓冲液（10mM Tris pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA）中均质化。于 13,000rpm 离心 30 分钟以除去细胞残渣之后，使用 Bio-Rad DC 蛋白测定试剂盒（Bio-Rad Laboratories，CA，USA）测量上清液的蛋白浓度。将来自单个动物的 40-80μg 等份的蛋白经受 6-12.5％ SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移到 PVDF 膜上。将膜于室温用溶于含有 0.1％吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水（TBST）中的 5％无脂奶粉和 2％牛血清白蛋白（BSA）封闭 1 小时。使用小鼠抗 LINGO-1（Biogen）、兔抗 BDNF（Chemicon）、小鼠抗磷酸 -Akt（1 ： 1000）、兔总 Akt（1 ： 1000）、抗磷酸 -JNK（1 ： 1000）、总 -JNK（Cell Signaling Technology）、兔抗磷酸 -TrkB（Tyr785）（1 ： 1000）（来自 B.Sun 博士，上海生物科学研究所，中国上海的赠物）（Ji 等人，Nat.Neurosci.8 ：164-172（2005））和鸡 IgY 总 TrkB（Promega）（1 ： 100）抗体的孵育于 4℃进行过夜。清洗之后，用溶于含有 5％无脂奶粉和 2％ BSA 的 TBST 的轭合辣根过氧化物酶的第二抗体于室温孵育膜 1 小时。使用增强的化学发光法（ECL，Amersham）检测免疫活性的蛋白。使用抗肌 动蛋白的单克隆山羊抗体（1 ： 1000，C-11，Santa Cruz Biotechnology）控制蛋白上样。每条带的强度通过使用 Labworks 凝胶成像（UVP，Inc，Upland，CA）的光密度扫描来定量。用每组 3-5 只动物进行蛋白质印迹的所有实验并且在凝胶上运行单个动物的样品。蛋白水平最终表达为与正常视网膜的总蛋白相比的相对值。

[0720] LINGO-1 和 TrkB 的免疫沉淀和蛋白质印迹

[0721] 用 HA 标签化的全长人类 LINGO-1、myc 标签化的全长人类 TrkB 或 LINGO-1/TrkB 的组合转染 293T 细胞（100mm 盘）。48 小时后收获细胞并于 4℃在 1ml RIPA 缓冲液（50mM Tris、pH 7.2，1％ Triton X-100、0.5％去氧胆酸钠、0.1％ SDS、150mM NaCl、10mM $MgCl_2$、5％甘油）中溶解 30 分钟。于 14,000xg 离心 15 分钟后，将上清液于 4℃用加上蛋白 A/G 的琼脂糖凝胶珠（ProteinA/G plus-Sepharose beads，Santa Cruz Biotechnology，CA）孵育 1 小时。之后用抗 LINGO-1 抗体（Biogen Idec）于 4℃孵育预澄清的溶解产物 1 小时之后加入蛋白 A/G- 琼脂糖凝胶珠 1 小时。将小珠用 1％ Triton 缓冲液（50mM HEPES，pH 7.5、150mM NaCl、1.5mM $MgCl_2$、lmM EGTA、1％ Triton X-100 和 10％甘油）清洗 3 次，在 Laemmli 样品缓冲液中煮沸，经受 4-20％ SDS-PAGE 并且通过使用抗 TrkB 抗体（Myc，Roche）或抗 LINGO-1 抗体（HA，Roche）的蛋白质印迹分析。将来自正常或 2 周眼内高压的大鼠的视网膜溶解产物也用抗 TrkB 抗体（Chemicon）、抗 LINGO-1 抗体（Upstate）或非特异性抗体于 4℃免疫沉淀过夜并且通过使用抗 LINGO-1 抗体（Upstate）的蛋白质印迹分析。

[0722] 将具有过表达的稳定 HA-LINGO1 的 Neuroscreen-1 细胞（PC12 细胞的亚克隆系，Cellomics）或 Neuroscreen 细胞用慢病毒感染 2 天。在细胞于无血清培养基中经受 BDNF 0 或 30 分钟前将 它们血清饥饿过夜。将细胞溶解产物用 pan-Trk 抗体（Santa Cruz，sc-139）免疫沉淀并且之后通过使用磷酸 -TrkB 的抗磷酸 -Tyr 抗体或总 TrkB 的抗 TrkB 抗体（Santa Cruz）的蛋白质印迹的进行评估。还通过蛋白质印迹来评估细胞溶解产物的 LINGO-1 表达（HA，Roche）。

[0723] 统计

[0724] 对于两组之间的比较，使用学生 t 检验进行统计分析，或对于多于两组之间的比

较，使用单向方差分析 (ANOVA) 以及之后的事后检验 (Student-Neuman-Keuls) 进行统计分析。

[0725] 实施例 1

[0726] 大鼠青光眼模型中 LINGO-1 的增加的表达

[0727] 在大鼠青光眼模型中检查 LINGO-1 的表达。在这一模型中，氩激光被用于通过角膜缘和巩膜引流管的激光凝固阻止房水的外流，导致眼内压 (IOP) 的可靠的增加 (参见图 1)。

[0728] 为了产生眼内高压状态，使用氩激光以 7 天的间隔将角膜缘静脉和三个巩膜上静脉激光凝固两次。如图 3 中所示，激光凝固之前和之后立即进行的房水静脉的检查显示静脉血流的显著下降。

[0729] 在正常和受损的大鼠视网膜切片中检查 LINGO-1 表达。正常视网膜神经节细胞 (RGC) 表现出低水平的 LINGO-1 染色，但是对 LINGO-1 的强得多的免疫反应性发生在激光凝固后 2 周的 RGC 中。标记的 RGC 的数目和标记的强度都增加 (参见图 4)。(术语“激光凝固后”意指“第一次激光凝固后”)

[0730] 这些发现被蛋白质印迹证实，其显示 LINGO-1 表达在正常视网膜中是低的并且在损伤后 2 周增加至 1.6 倍 ($P < 0.05$)(参见图 5)。

[0731] 实施例 2

[0732] LINGO-1 拮抗剂起神经元保护剂的作用但没有影响眼内压

[0733] 实验性眼内高压可通过测量压力上的变化或神经元存活来监测。因此，检查了 LINGO-1 拮抗剂对眼内压和 RGC 存活的作用。如上文所描述的，动物经受激光处理，并且之后立即接受 LINGO-1-Fc、1A7 或对照蛋白的玻璃体内注射。

[0734] 监测处理和未处理的眼中的眼内压 (IOP)。处理的动物的对侧左眼中的 IOP 为约 13mmHg(参见图 6) 并在整个实验中保持在相同的水平。在所有四组中，在第一次激光手术后激光处理的右眼的 IOP 增加，达到约 22mmHg 并且保持在这一水平直到处死。在这些实验条件下，使用 LINGO-1-Fc 和中和性抗 LINGO-1 抗体，mAb 1A7 的处理没有降低 IOP(参见图 6)。

[0735] LINGO-1 拮抗剂对神经元存活具有影响。首先，在激光损伤后 2 周对存活的 RGC 定量。制备来自两个眼的视网膜并且将存活的 RGC 计数。激光凝固后两周 PBS 和对照蛋白处理组中的 RGC 损失分别是 13.93±1.44％和 12.37±1.84％ (参见图 7A)。注射 LINGO-1-Fc 防止了 RGC 损失。LINGO-1-Fc 处理的视网膜仅有 0.09±1.47％ RGC 损失 ($P < 0.001$，与 PBS 和人类 IgG 对照组相比)。相似地，mAb 1A7 处理将 RGC 损失限制到 1.46±1.32％ ($P < 0.001$，与对照组相比)。

[0736] 为了研究 LINGO-1 拮抗剂对 RGC 的长期存活的影响，每周一 次玻璃体内注射 LINGO-1-Fc 和中和性 LINGO-1 抗体 1A7 并且允许动物存活 4 周。结果 (参见图 7A) 显示用 LINGO-1-Fc 拮抗剂处理将激光凝固后 4 周损伤的 RGC 的损失从 20.09±1.36％ (PBS 对照) 显著降低至 5.98±0.83％ ($P < 0.001$)(对于 LINGO-1-Fc 来说) 和 4.73±1.72％ ($P < 0.001$)(对于 1A7 来说)。

[0737] RGC 存活的数据同样显示为每组的平均密度 (细胞的数目 /mm^2)(参见图 7B)。在我们的大鼠青光眼模型中在激光凝固后 2、4、8 和 12 周进行的 RGC 死亡的先前研究

显示在4周后RGC的损失达到最大水平(Li等人，Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.47：2951-2958(2006))。相反，在激光凝固后4周观察到LINGO-1-Fc和1A7的显著的神经保护。与睫状神经营养因子(CNTF)处理不同(数据未显示)，无论LINGO-1-Fc还是抗LINGO-1抗体都未在长期存活实验中导致白内障。

[0738] 电子显微术也被用于估计LINGO-1拮抗剂的影响。如图8A中显示的，眼内高压后两周，PBS处理的RGC中的一些具有不规则的或者甚至破裂的细胞核以及膨胀并溶解的线粒体。一些还显示出粗糙内质网(ER)和高尔基细胞器的损失。相反，用可溶的LINGO-1和1A7处理的眼保持具有正常的ER和高尔基细胞器的典型的视网膜神经节细胞的特征。还检测了RGC、无长突细胞和双极细胞在其中发生连接的内网层(IPL)中的细胞的细胞器。与保持差不多正常的轴突和树突的LINGO-1或1A7处理的动物相比，PBS处理的动物中的细胞在更膨胀的轴突和树突内部具有较少的细胞器(参见图8B)。此外，PBS处理的动物中的突触变窄但是还是保持未分离，而接受LINGO-1-Fc或1A7的处理的视网膜维持了突触的正常的特征。

[0739] 实施例3

[0740] 单独的LINGO-1拮抗剂没有促进体外视网膜神经节细胞的存活

[0741] 为了进一步研究LINGO-1-Fc对RGC存活的影响，使用了RGC原代培养体系(Meyer-Franke等人，Neuron，15：805-819(1995))。在对照蛋白或LINGO-1-Fc存在的情况下使分离的视网膜培养物生长3天。通过RGC的标志物Thy 1.1免疫染色来鉴定原代RGC并且对原代RGC计数。与体内明显的神经保护活性不一样，在这些实验条件下，单独的LINGO-1-Fc处理没有促进培养的RGC的存活(参见图9)。

[0742] 实施例4

[0743] LINGO-1对BDNF通路起作用

[0744] 还检查了在脑源性神经营养因子(BDNF)存在的条件下LINGO-1拮抗剂对体外RGC的存活的影响。在BDNF存在的条件下，LINGO-1拮抗剂能够促进RGC的存活。将RGC如实施例3中培养并且用BDNF和对照蛋白或BDNF和LINGO-1-Fc处理。在BDNF存在的条件下，用LINGO-1-Fc处理的细胞中存活的细胞的百分比明显高于用对照蛋白处理的细胞中的。除了体内动物视网膜被暴露于内源BDNF而RGC培养物没有任何BDNF的事实之外，这一结果证明LINGO-1-Fc通过调节RGC对BDNF的响应来拯救RGC和/或LINGO-1-Fc通过增强神经营养蛋白受体而间接增加存活。

[0745] 因此，为了研究视网膜中LINGO-1-Fc和BDNF的关系，使用蛋白质印迹测量了眼内高压大鼠的视网膜中的BDNF。之前的研究显示正常的大鼠视网膜表达BDNF(Rudzinski等人，J.Neurobiol.58：341-351(2004))。结果显示正常视网膜中的低水平的BDNF($P < 0.05$，图10)。然而，BDNF水平在激光凝固后2周增加超过3倍($P < 0.05$)，与之前报道的结果(Rudzinski等人，J.Neurobiol.58：341-351(2004))一致。因此，激光凝固活化内源的神经营养蛋白响应。然而，这一响应不足以完全地针对神经元损伤进行保护，如图7中所示。眼内高压之后使用LINGO-1-Fc和1A7的处理与PBS对照组相比没有改变BDNF的高水平($P < 0.05$，与正常的相比，图10)。这些结果和体外数据表明LINGO-1-Fc或1A7调节对BDNF的响应并加强青光眼的视网膜中内源BDNF的神经保护活性。

[0746] 在LINGO-1-Fc和1A7的存在下，也注射中和性抗BDNF抗体。在这些实验中，激光

凝固后 0、3、7 和 10 天将 3μg 的抗 BDNF 抗体 (Chemicon) 玻璃体内地注射至实验用眼和 / 或在 0 天施用 2μgLINGO-1-Fc 或 1A7 一次。在 2 周时将大鼠安乐死并且对 FG 标记的 RGC 计数。

[0747] 激光凝固后 2 周时抗 BDNF 抗体显著逆转了 LINGO-1-Fc(P = 0.002) 或 1A7(P = 0.004) 的保护功能。在 PBS 和抗 BDNF 抗体组或与 LINGO-1-Fc 或 1A7 组合的抗 BDNF 抗体组之间 RGC 损失没有差异 (图 11A)。数据还被表示为 RGC 的平均密度 (细胞的数目 /mm^2) (图 11B)。每组中的蛋白对眼内压没有影响。这些结果还证实 LINGO-1-Fc 或 1A7 通过加强视网膜中的增加的内源 BDNF 拯救了受损的 RGC。

[0748] 实施例 5

[0749] LINGO-1 与 TrkB 结合并负调节 TrkB

[0750] 如实施例 4 中所示,LINGO-1-Fc 通过调节对 BDNF 的响应发挥其神经保护活性。使用免疫沉淀和免疫印迹的方法检查 LINGO-1 和 BDNF 受体 TrkB 的关系。神经营养蛋白活化依次活化许多下游 信号转导通路的两种不同类型的受体,受体酪氨酸激酶的 TrK 家族和 $p75^{NTR}$。TrK 受体包括 TrkA、B 和 C。BDNF 活化 TrkB(Huang 和 Reichardt,2003, Annu. Rev. Biochem. 72 :609-642 ;Huang 和 Reichardt,2001, Annu. Rev. Neurosci. 24 :677-736)。 之前已经证实视网膜中的主要 Trk 受体是 TrkB(Cui 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43 : 1954-1964(2002))。

[0751] 为了确定 LINGO-1 是否与 TrkB 直接相互作用,检查了来自共表达 TrkB 和 LINGO-1 的转染的 293T 细胞的细胞溶解产物。用抗 LINGO-1 抗体免疫沉淀溶解产物并且将抗 TrkB 抗体或抗 LINGO-1 抗体用于蛋白质印迹。我们的结果显示 TrkB 与抗 LINGO-1 抗体从共表达 TrkB 和 LINGO-1 的 293T 细胞免疫沉淀 (图 12A)。这显示 LINGO-1 结合 TrkB。此外,用 TrkB 慢病毒转染 LINGO-1 表达细胞系两天并且用 BDNF 处理细胞。使用全 -Trk 抗体免疫沉淀溶解产物并且之后通过蛋白质印迹估计磷酸 -TrkB(p-TrkB) 和总 TrkB 的水平。在所有的组中总 TrkB 保持在大约相同的水平 (图 12B)。在 LINGO-1 不存在的情况下, BDNF 刺激导致磷酸化的 TrkB 的增加 (图 12B 的泳道 3 和 4)。然而,在 LINGO-1 存在的条件下,BDNF 刺激后 p-TrkB 的水平较低 (图 12B 的泳道 7 和 8, P < 0.05)。这些结果显示 LINGO-1 结合 TrkB 并且在 TrkB 与神经营养蛋白结合后限制 TrkB 的活化。LINGO-1 因此调节 TrkB 受体的功能,起到 BDNF-TrkB 系统的神经保护活性的负调节剂的作用。

[0752] 为了确定在体内 LINGO-1 和 TrkB 是否从 RGC 免疫共沉淀,用抗 TrkB 抗体、抗 LINGO-1 抗体或非特异性抗体免疫沉淀来自正常的或 2 周眼内高压的大鼠的视网膜溶解产物,并且抗 LINGO-1 抗体被用于蛋白质印迹。用抗 TrkB 抗体从视网膜溶解产物免疫共沉淀 LINGO-1,指示正常的视网膜中 LINGO-1 与 TrkB 相互作用。 此外,眼内高压诱导后 2 周 LINGO-1 组成性地结合至 TrkB(图 13)。还检查了 RGC 中 LINGO-1 和 TrkB 的共定位。在用 FG 退行地标记的 RGC 中 LINGO-1 和 p-TrkB 共表达。图 13B 显示眼内高压的诱导并用 1A7 处理后两周 LINGO-1 和 p-TrkB 的共定位的代表性显微成像。

[0753] 为了进一步评估眼内高压模型中 LINGO-1-Fc 和 1A7 的机制,用蛋白质印迹评估 LINGO-1-Fc 和 1A7 对 TrkB 活化的作用。正常的大鼠视网膜表达高水平的总 TrkB(图 14A)。眼内高压诱导后 2 周对照组和 LINGO-1-Fc 组或 1A7 组之间的总 TrkB 水平没有差异 (图 14A)。然而,激光处理后 2 周 LINGO-1-Fc 或 1A7 施用比对照蛋白更显著地上调了 p-TrkB 水

平（图 14A），证明 LINGO-1-Fc 和 1A7 处理在内源水平的 BDNF 存在的条件下允许 TrkB 的活化。在激光凝固后注射 BDNF。无论单独用 BDNF 或用 BDNF 和 LINGO-1-Fc 或 1A7 的组合处理眼，总 TrkB 水平保持在相同的水平直到激光凝固视网膜后 5 天（图 14B）。单独的 BDNF 处理增加了 p-TrkB 水平但是变化在处理 5 天后并不是统计学上显著的。然而与 LINGO-1-Fc 或与 1A7 组合的 BDNF 显著增加视网膜中 p-TrkB 的水平（图 14B）。

[0754] 这些发现显示单独的 BDNF 刺激仅产生 TrkB 受体的限制性的活化。甚至当加入外源 BDNF 时也是如此。然而使用 LINGO-1-Fc 或 1A7 的处理缓解了这一限制。这些结果与显示 LINGO-1 与 TrkB 结合并且在 TrkB 与 BDNF 结合后负调节 TrkB 活化的体外结果一致。LINGO-1-Fc 和 1A7 处理通过增加 TrkB 受体的 BDNF 活化促进神经保护活性。

[0755] 实施例 6

[0756] LINGO-1 拮抗剂增加眼内高压后的 Akt 活化

[0757] TrkB 受体的 BDNF 活化起始几种下游的信号转导通路，包括 PI-3 激酶 (PI3K)。通过 PI3K 的丝氨酸 473 和苏氨酸 308 的磷酸化是神经元的重要的存活信号 (Brazil 等人，Cell 111 :293-303(2002))。如实施例 4 和 5 中所示，LINGO-1-Fc 和 1A7 调节 BDNF 和其同源受体 TrkB 的功能。此外，通过在激光凝固手术后不同时间测量总 Akt 和 pAkt(Akt 的活性形式）来检查 LINGO-1-Fc 对 PI3K/Akt 信号转导通路的作用。蛋白质印迹分析表明总 Akt 水平保持不变直到激光凝固后 5 天（图 15)。pAkt 水平在正常对照视网膜中是低的但在激光凝固后 6 小时增加 5 倍并且之后从激光凝固后 1 天至 5 天下降。之前已经报道在视神经横断后 pAkt 水平上相似的钟形反应 (Cheung 等人，Mol.CellNeurosci.25 :383-393(2004))。在 LINGO-1-Fc 处理的视网膜中，在 pAkt 的水平遵照相似的模式，激光凝固后 6 小时达到峰值并且之后下降持续 5 天。然而 5 天时 LINGO-1-Fc 处理的视网膜中 pAkt 的水平显著高于用 PBS 处理的对照视网膜中的水平 ($P < 0.05$，图 15)。因此，使用 LINGO-1-Fc 的处理影响 Akt 信号。

[0758] 为了证实在 RGC 而不是在视网膜的其他细胞中发生 pAkt 水平上的改变，通过视网膜的免疫组织化学研究来检查 pAkt 定位。pAkt 免疫反应性仅在用 FG 退行性标记的 RGC 中，而在激光损伤和用 LINGO-1-Fc. 处理后 pAkt 定位没有改变。图 16 显示在激光凝固和用 LINGO-1-Fc 处理后 6 小时，pAkt 免疫标记视网膜的代表性显微成像。

[0759] 为了进一步检查损伤后 pAkt 在 LINGO-1-Fc 的神经保护活性中的作用，观察 PI3K/Akt 通路的抑制剂 LY294002(LY，Calbiochem) 的作用。在这些实验中，将 10mM LY294002 溶解在 100％二甲亚 砜 (DMSO ;Sigma) 中并且随后用无菌的 PBS 稀释至 2mM。在右眼上进行第一次激光凝固后 0、3、7 和 10 天时玻璃体内注射 2mMLY294002 或 2μl 载体（溶于 PBS 的 20％ DMSO)。在 14 天将动物安乐死并且对 FG 标记的 RGC 计数。

[0760] LINGO-1-Fc 在眼内高压后 2 周促进 RGC 存活，而将 LINGO-1-Fc 与 LY294002 组合消除了神经保护作用（图 17A)。RGC 的损失从用 LINGO-1-Fc 处理的眼中的 0.09±1.47％增加至用 LINGO-1-Fc 和 LY294002 处理的眼中的 9.0±1.6％ ($P = 0.004$)。数据还通过 RGC 的密度来表示（图 17B)。无论 LY294002 单独还是与 LINGO-1-Fc 组合都不降低眼内压（图 18)。

[0761] 实施例 7

[0762] LINGO-1 拮抗剂降低眼内高压后的 c-Jun N- 端激酶活化

[0763] JNK 通路可由不同的细胞应激活化。最近，在人类和实验大鼠青光眼视网膜中检测了磷酸化的 JNK，并且 JNK 的活化与 RGC 的死亡在时间上相关 (Tezel 等人 Invest. Opthamol. Vis. Sci. 44 :3025-3033(2003))。最新的发现还证实 IOP 升高后磷酸化的 JNK 定位于 RGC 中。总 JNK-1 和 JNK-2 水平保持不变直到眼内高压后 5 天 (图 19)。磷酸化的 JNK-1，2 在正常的视网膜中是低的，之后 5 天后升高至超过 8 倍。大鼠青光眼模型中 IOP 升高后 p-JNK 水平的相似的反应之前已通过免疫组织化学法报道。用 LINGO-1-Fc 或 1A7 处理后，JNK 的活化几乎降低至正常水平 ((P ＜ 0.01)(图 19)。这些结果表明 LINGO-1 拮抗剂可通过抑制 JNK 信号转导通路的活化拯救受损的 RGC。

[0764] 实施例 8

[0765] LINGO-1 拮抗剂降低眼内高压后的 RhoA 活化

[0766] 由于 Rho 在 NgR1-LINGO-1-p75/TROY 复合体下游起作用并且作为 Rho 活化的下游结果 JNK 被磷酸化，因此还进行实验以确定 LINGO-1 拮抗剂是否对眼内高压后的 Rho 的活性有影响。Rho 活性可通过评价 GTP-RhoA 水平来评估，其中 GTP-RhoA 水平的增加与 Rho 活性的增加有关。在正常的视网膜中观察到低水平的 GTP-RhoA 并且激光凝固后五天 GTP-RhoA 水平增加差不多两倍 (p ＜ 0.05，与正常组相比)(图 21)。相反，LINGO-1-Fc 处理的视网膜将高水平的 GTP-RhoA 显著降低至基础水平 (p ＜ 0.05，与 PBS 组相比)(图 21)。这些结果显示 LINGO-1-Fc 通过抑制 RhoA 活化发挥神经保护活性。

[0767] ***

[0768] 本发明的范围不受所描述的具体实施方式的限制，所述具体实施方式意图作为本发明的个体方面的单独说明，并且功能相同的任何组合物或方法在本发明的范围内。实际上，除了本文所显示和描述的那些之外，从前文的描述和附图，本发明的不同的修饰对本领域技术人员来说将变得明显。这种修饰意图在所附的权利要求的范围内。

[0769] 这一说明书中提及的所有出版物和专利申请通过引用并入本文，引用程度就如同将每一个体出版物或专利申请特定且单独地表明通过引用并入。

[0770] 应理解的是发明详述部分而非概述和摘要部分意图用来说明权利要求。概述和摘要可展示发明人考虑的本发明的一个或多个但不是全部的示例性实施方式，并且因此不意图以任何方式限制本发明和所附的权利要求。

序列表

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司

<120> 通过施用 LINGO-1 拮抗剂和 TrkB 激动剂治疗压力诱导的视神经病变、阻止神经元变性和促进神经元细胞存活的方法

<130>2159.173PC01/EJH/CLD

<140> 待分配
<141>2008-10-10

<150>60/979,338
<151>2007-10-11

<160>34

<170> 专利版本 3.3

<210>1
<211>1845
<212>DNA
<213> 智人

<400>1
atgctggcgg ggggcgtgag gagcatgccc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc 60
ctcctgctgg tgctgggctc agtgctgtca ggctcggcca cgggctgccc gccccgctgc 120
gagtgctccg cccaggaccg cgctgtgctg tgccaccgca agcgctttgt ggcagtcccc 180
gagggcatcc ccaccgagac gcgcctgctg gacctaggca agaaccgcat caaaacgctc 240
aaccaggacg agttcgccag cttcccgcac ctggaggagc tggagctcaa cgagaacatc 300
gtgagcgccg tggagcccgg cgccttcaac aacctcttca acctccggac gctgggtctc 360
cgcagcaacc gcctgaagct catcccgcta ggcgtcttca ctggcctcag caacctgacc 420
aagctggaca tcagcgagaa caagattgtt atcctgctgg actacatgtt tcaggacctg 480
tacaacctca agtcactgga ggttggcgac aatgacctcg tctacatctc tcaccgcgcc 540
ttcagcggcc tcaacagcct ggagcagctg acgctggaga aatgcaacct gacctccatc 600
cccaccgagg cgctgtccca cctgcacggc ctcatcgtcc tgaggctccg gcacctcaac 660
atcaatgcca tccgggacta ctccttcaag aggctctacc gactcaaggt cttggagatc 720
tcccactggc cctacttgga caccatgaca cccaactgcc tctacggcct caacctgacg 780

tccctgtcca tcacacactg caatctgacc gctgtgccct acctggccgt ccgccaccta 840
gtctatctcc gcttcctcaa cctctcctac aaccccatca gcaccattga gggctccatg 900
ttgcatgagc tgctccggct gcaggagatc cagctggtgg gcgggcagct ggccgtggtg 960
gagccctatg ccttccgcgg cctcaactac ctgcgcgtgc tcaatgtctc tggcaaccag 1020
ctgaccacac tggaggaatc agtcttccac tcggtgggca acctggagac actcatcctg 1080
gactccaacc cgctggcctg cgactgtcgg ctcctgtggg tgttccggcg ccgctggcgg 1140
ctcaacttca accggcagca gcccacgtgc gccacgcccg agtttgtcca gggcaaggag 1200
ttcaaggact tccctgatgt gctactgccc aactacttca cctgccgccg cgcccgcatc 1260
cgggaccgca aggcccagca ggtgtttgtg gacgagggcc acacggtgca gtttgtgtgc 1320
cgggccgatg gcgacccgcc gcccgccatc ctctggctct caccccgaaa gcacctggtc 1380
tcagccaaga gcaatgggcg gctcacagtc ttccctgatg gcacgctgga ggtgcgctac 1440
gcccaggtac aggacaacgg cacgtacctg tgcatcgcgg ccaacgcggg cggcaacgac 1500
tccatgcccg cccacctgca tgtgcgcagc tactcgcccg actggcccca tcagcccaac 1560
aagaccttcg ctttcatctc caaccagccg ggcgagggag aggccaacag cacccgcgcc 1620
actgtgcctt tccccttcga catcaagacc ctcatcatcg ccaccaccat gggcttcatc 1680
tctttcctgg gcgtcgtcct cttctgcctg gtgctgctgt ttctctggag ccggggcaag 1740
ggcaacacaa agcacaacat cgagatcgag tatgtgcccc gaaagtcgga cgcaggcatc 1800
agctccgccg acgcgccccg caagttcaac atgaagatga tatga 1845

<210>2
<211>614
<212>PRT
<213> 智人

<400>2

Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
1 5 10 15
Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
20 25 30
Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
35 40 45
Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
50 55 60
Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
65 70 75 80
Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
85 90 95
Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu

100 105 110

Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile
115 120 125

Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile
130 135 140

Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu
145 150 155 160

Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile
165 170 175

Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu
180 185 190

Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu
195 200 205

His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile
210 215 220

Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile
225 230 235 240

Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly
245 250 255

Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val
260 265 270

Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu
275 280 285

Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu
290 295 300

Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val
305 310 315 320

Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val
325 330 335

Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Val Phe His Ser Val
340 345 350

Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp
355 360 365

Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn
370 375 380

Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu
385 390 395 400

Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg
405 410 415

Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu
420 425 430
Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro
435 440 445
Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser
450 455 460
Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr
465 470 475 480
Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala
485 490 495
Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser
500 505 510
Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn
515 520 525
Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe
530 535 540
Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile
545 550 555 560
Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
565 570 575
Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
580 585 590
Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
595 600 605
Phe Asn Met Lys Met Ile
610

<210>3
<211>5608
<212>DNA
<213> 智人

<400>3
aagacggatt ctcagacaag gcttgcaaat gccccgcagc catcatttaa ctgcacccgc 60
agaatagtta cggtttgtca cccgaccctc ccggatcgcc taatttgtcc ctagtgagac 120
cccgaggctc tgcccgcgcc tggcttcttc gtagctggat gcatatcgtg ctccgggcag 180
cgcgggcgca gggcacgcgt tcgcgcacac cctagcacac atgaacacgc gcaagagctg 240
aaccaagcac ggtttccatt tcaaaaaggg agacagcctc taccgcgatt gtagaagaga 300
ctgtggtgtg aattagggac cgggaggcgt cgaacggagg aacggttcat cttagagact 360

aattttctgg agtttctgcc cctgctctgc gtcagccctc acgtcacttc gccagcagta 420
gcagaggcgg cggcggcggc tcccggaatt gggttggagc aggagcctcg ctggctgctt 480
cgctcgcgct ctacgcgctc agtccccggc ggtagcagga gcctggaccc aggcgccgcc 540
ggcgggcgtg aggcgccgga gcccggcctc gaggtgcata ccggaccccc attcgcatct 600
aacaaggaat ctgcgcccca gagagtcccg ggagcgccgc cggtcggtgc ccggcgcgcc 660
gggccatgca gcgacggccg ccgcggagct ccgagcagcg gtagcgcccc cctgtaaagc 720
ggttcgctat gccggggcca ctgtgaaccc tgccgcctgc cggaacactc ttcgctccgg 780
accagctcag cctctgataa gctggactcg gcacgcccgc aacaagcacc gaggagttaa 840
gagagccgca agcgcaggga aggcctcccc gcacgggtgg gggaaagcgg ccggtgcagc 900
gcggggacag gcactcgggc tggcactggc tgctagggat gtcgtcctgg ataaggtggc 960
atggacccgc catggcgcgg ctctggggct tctgctggct ggttgtgggc ttctggaggg 1020
ccgctttcgc ctgtcccacg tcctgcaaat gcagtgcctc tcggatctgg tgcagcgacc 1080
cttctcctgg catcgtggca tttccgagat tggagcctaa cagtgtagat cctgagaaca 1140
tcaccgaaat tttcatcgca aaccagaaaa ggttagaaat catcaacgaa gatgatgttg 1200
aagcttatgt gggactgaga aatctgacaa ttgtggattc tggattaaaa tttgtggctc 1260
ataaagcatt tctgaaaaac agcaacctgc agcacatcaa ttttacccga aacaaactga 1320
cgagtttgtc taggaaacat ttccgtcacc ttgacttgtc tgaactgatc ctggtgggca 1380
atccatttac atgctcctgt gacattatgt ggatcaagac tctccaagag gctaaatcca 1440
gtccagacac tcaggatttg tactgcctga atgaaagcag caagaatatt cccctggcaa 1500
acctgcagat acccaattgt ggtttgccat ctgcaaatct ggccgcacct aacctcactg 1560
tggaggaagg aaagtctatc acattatcct gtagtgtggc aggtgatccg gttcctaata 1620
tgtattggga tgttggtaac ctggtttcca aacatatgaa tgaaacaagc cacacacagg 1680
gctccttaag gataactaac atttcatccg atgacagtgg gaagcagatc tcttgtgtgg 1740
cggaaaatct tgtaggagaa gatcaagatt ctgtcaacct cactgtgcat tttgcaccaa 1800
ctatcacatt tctcgaatct ccaacctcag accaccactg gtgcattcca ttcactgtga 1860
aaggcaaccc caaaccagcg cttcagtggt tctataacgg ggcaatattg aatgagtcca 1920
aatacatctg tactaaaata catgttacca atcacacgga gtaccacggc tgcctccagc 1980
tggataatcc cactcacatg aacaatgggg actacactct aatagccaag aatgagtatg 2040
ggaaggatga gaaacagatt tctgctcact tcatgggctg gcctggaatt gacgatggtg 2100
caaacccaaa ttatcctgat gtaatttatg aagattatgg aactgcagcg aatgacatcg 2160
gggacaccac gaacagaagt aatgaaatcc cttccacaga cgtcactgat aaaaccggtc 2220
gggaacatct ctcggtctat gctgtggtgg tgattgcgtc tgtggtggga ttttgccttt 2280
tggtaatgct gtttctgctt aagttggcaa gacactccaa gtttggcatg aaagatttct 2340
catggtttgg atttgggaaa gtaaaatcaa gacaaggtgt tggcccagcc tccgttatca 2400
gcaatgatga tgactctgcc agcccactcc atcacatctc caatgggagt aacactccat 2460
cttcttcgga aggtggccca gatgctgtca ttattggaat gaccaagatc cctgtcattg 2520
aaaatcccca gtactttggc atcaccaaca gtcagctcaa gccagacaca tttgttcagc 2580
acatcaagcg acataacatt gttctgaaaa gggagctagg cgaaggagcc tttggaaaag 2640
tgttcctagc tgaatgctat aacctctgtc ctgagcagga caagatcttg gtggcagtga 2700

agaccctgaa ggatgccagt gacaatgcac gcaaggactt ccaccgtgag gccgagctcc 2760
tgaccaacct ccagcatgag cacatcgtca agttctatgg cgtctgcgtg gagggcgacc 2820
ccctcatcat ggtctttgag tacatgaagc atggggacct caacaagttc ctcagggcac 2880
acggccctga tgccgtgctg atggctgagg gcaacccgcc cacggaactg acgcagtcgc 2940
agatgctgca tatagcccag cagatcgccg cgggcatggt ctacctggcg tcccagcact 3000
tcgtgcaccg cgatttggcc accaggaact gcctggtcgg ggagaacttg ctggtgaaaa 3060
tcgggggactt tgggatgtcc cgggacgtgt acagcactga ctactacagg gtcggtggcc 3120
acacaatgct gcccattcgc tggatgcctc cagagagcat catgtacagg aaattcacga 3180
cggaaagcga cgtctggagc ctgggggtcg tgttgtggga gattttcacc tatggcaaac 3240
agccctggta ccagctgtca aacaatgagg tgatagagtg tatcactcag ggccgagtcc 3300
tgcagcgacc ccgcacgtgc ccccaggagg tgtatgagct gatgctgggg tgctggcagc 3360
gagagcccca catgaggaag aacatcaagg gcatccatac cctccttcag aacttggcca 3420
aggcatctcc ggtctacctg gacattctag gctagggccc ttttccccag accgatcctt 3480
cccaacgtac tcctcagacg ggctgagagg atgaacatct tttaactgcc gctggaggcc 3540
accaagctgc tctccttcac tctgacagta ttaacatcaa agactccgag aagctctcga 3600
gggaagcagt gtgtacttct tcatccatag acacagtatt gacttctttt tggcattatc 3660
tctttctctc tttccatctc ccttggttgt tccttttttct ttttttaaat tttctttttc 3720
ttttttttttt cgtcttccct gcttcacgat tcttaccctt tcttttgaat caatctggct 3780
tctgcattac tattaactct gcatagacaa aggccttaac aaacgtaatt tgttatatca 3840
gcagacactc cagtttgccc accacaacta acaatgcctt gttgtattcc tgcctttgat 3900
gtggatgaaa aaaagggaaa acaaatattt cacttaaact ttgtcacttc tgctgtacag 3960
atatcgagag tttctatgga ttcacttcta tttatttatt attattactg ttcttattgt 4020
ttttggatgg cttaagcctg tgtataaaaa agaaaacttg tgttcaatct gtgaagcctt 4080
tatctatggg agattaaaac cagagagaaa gaagatttat tatgaaccgc aatatgggag 4140
gaacaaagac aaccactggg atcagctggt gtcagtccct acttaggaaa tactcagcaa 4200
ctgttagctg ggaagaatgt attcggcacc ttcccctgag gacctttctg aggagtaaaa 4260
agactactgg cctctgtgcc atggatgatt cttttcccat caccagaaat gatagcgtgc 4320
agtagagagc aaagatggct tccgtgagac acaagatggc gcatagtgtg ctcggacaca 4380
gttttgtctt cgtaggttgt gatgatagca ctggtttgtt tctcaagcgc tatccacaga 4440
acctttgtca acttcagttg aaaagaggtg gattcatgtc cagagctcat ttcggggtca 4500
ggtgggaaag ccaagaactt ggaaaagata agacaagcta taaattcgga ggcaagtttc 4560
ttttacaatg aacttttcag atctcacttc cctccgaccc ctaacttcca tgcccacccg 4620
tccttttaac tgtgcaagca aaattgtgca tggtcttcgt cgattaatac cttgtgtgca 4680
gacactactg ctccagacgt cgtttccctg ataggtagag cagatccata aaaaggtatg 4740
acttatacaa ttaggggaag ctaatggagt ttattagctg agtatcaatg tctctgcgtt 4800
gtacggtggt gatgggtttt aatgaatatg gaccctgaag cctggaaatc ctcatccacg 4860
tcgaacccac aggactgtgg gaagggcaga atcaatccct aagggaaagg aaacctcacc 4920
ctgagggcat cacatgcact catgttcagt gtacacaggt caagtccctt gctctgggct 4980
ctagttggga gagtggtttc attccaagtg tactccattg tcagtatgct gttttgtttt 5040

ccttcactcc attcaaaaag tcaaaataca aaatttggca cagcatgcca acgggaggct 5100
gtgcccagac caagcactgg aagtgtgctt ctaggcatag tcattggttt tgcaaaaaga 5160
gggctcaaat ttaaatagaa atttacagct atttgaatgg tcagatatac caagaaagaa 5220
aaatatttct gttcctcaag aaaacttgct accctctgtg aggggaattt tgctaaactt 5280
gacatcttta taacatgagc cagattgaaa gggagtgatt ttcattcatc ttaggtcatg 5340
ttatttcata tttgtttctg aaggtgcgat agctctgttt taggttttgc ttgcgcctgt 5400
taattactgg aacaccttat ttttcattaa aggctttgaa agccaattct caaaaattca 5460
aaagtgcaaa ttaacagaac aaaaggaaat ccagtagcaa ctgcagtcaa gcgagggagt 5520
tgacaagata aaccttacgt ccattcaagt tatatgctgg cctatgagag atgagagttg 5580
ggtcgtttgt tctctttgtt gatgattt 5608

<210>4
<211>838
<212>PRT
<213> 智人
<400>4

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
1 5 10 15
Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys
20 25 30
Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro
35 40 45
Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp
50 55 60
Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu
65 70 75 80
Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu
85 90 95
Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu
100 105 110
Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr
115 120 125
Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile
130 135 140
Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys
145 150 155 160
Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
180 185 190
Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
195 200 205
Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
210 215 220
Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
225 230 235 240
Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
245 250 255
Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
260 265 270
Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
275 280 285
Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
290 295 300
Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
305 310 315 320
Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
325 330 335
Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
340 345 350
His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
355 360 365
Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
370 375 380
Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
385 390 395 400
Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
405 410 415
Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser
420 425 430
Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
435 440 445
Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
450 455 460
Lys Asp Phe Ser Trp Phe Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln Gly
465 470 475 480
Val Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro

485 490 495

Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly

500 505 510

Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu

515 520 525

Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr

530 535 540

Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu

545 550 555 560

Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu

565 570 575

Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp

580 585 590

Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu

595 600 605

Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val

610 615 620

Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp

625 630 635 640

Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala

645 650 655

Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile

660 665 670

Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe

675 680 685

Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu

690 695 700

Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr

705 710 715 720

Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met

725 730 735

Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val

740 745 750

Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln

755 760 765

Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln

770 775 780

Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu

785 790 795 800

Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile
805 810 815
Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
820 825 830
Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
835

<210>5
<211>4757
<212>DNA
<213> 家鼠属

<400>5
atctgtgtgc gagtgcgtgt gcgtgcgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 60
gtgtgagcgt gtgtgttttt ggatttcata ctaattttct ggagtttctg cccctgctct 120
gcgtcagccc tcacgtcact tcgccagcag tagcagaggc ggcggcggcc gccggttaga 180
gcccagtcgc tgcttcagct gctgttgctg cttctgcggc gctctgctcc ctgcgctggc 240
tacgggaggc cgggggagcc gcgccgacag tcctctgtgg ccagggccgg cactgtcctg 300
ctaccgcagt tgctccccag ccctgaggtg cgcaccgata tcgatatccg tgccggttta 360
gcggttctgc gacccaaaga gtccagggag agccaccgag tggcgcctgg cgtataggac 420
catgcagccg ccttgtggct tggagcagcg gcccgtgatg ttccagccac tgtgaaccat 480
ttggtcagcg ccaacctgct cagccccagc accgacaggc tcagcctctg gtacgctcct 540
ctcggcggga ggccatcagc accaagcagc aagagggctc agggaaggcc tccccccctcc 600
ggcgggggac gcctggctca gcgtagggac acgcactctg actgactggc actggcagct 660
cgggatgtcg ccctggccga ggtggcatgg acccgccatg gcgcggctct ggggcttatg 720
cttgctggtc ttgggcttct ggagggcttc tcttgcctgc cccatgtcct gcaaatgcag 780
caccactagg atttggtgta ccgagccttc tcctggcatc gtggcatttc cgaggttgga 840
acctaacagc attgacccag agaacatcac cgaaattctc attgcaaacc agaaaaggtt 900
agaaatcatc aatgaagatg atgtcgaagc ttacgtgggg ctgaaaaacc ttacaattgt 960
ggattccggc ttaaagtttg tggcttacaa ggcgtttctg aagaacggca acctgcggca 1020
catcaatttc actcgaaaca agctgacgag tttgtccagg agacatttcc gccaccttga 1080
cttgtctgac ctgatcctga cgggtaatcc gttcacgtgt tcctgtgaca tcatgtggct 1140
caagactctc caggagacga aatccagccc cgacactcag gatttgtatt gcctcaatga 1200
gagcagcaag aataccctc tggcgaacct gcagattccc aattgtggtc tgccgtctgc 1260
acgtctggcc gctcctaacc tcacggtgga ggaagggaag tctgtgacca tttcctgcag 1320
cgtcgggggt gacccgctcc ccaccttgta ctgggacgtt gggaatttgg tttccaaaca 1380
catgaatgaa acaagccaca cacagggctc cttaaggata acaaacattt catcggatga 1440
cagtgggaaa caaatctctt gtgtggcaga aaacctcgtc ggagaagatc aagactctgt 1500
gaacctcact gtgcattttg caccaaccat cacatttctc gaatctccaa cctcagacca 1560

ccactggtgc atcccattca ctgtgagagg caaccccaag ccagcacttc agtggttcta 1620
caacggagcc atactgaatg aatccaagta catctgtacc aaaatacacg tcaccaatca 1680
cacggagtac cacggctgcc tccagctgga taaccccact catatgaata atggagacta 1740
caccctaatg gccaagaatg aatatgggaa ggacgagaga cagatttctg ctcacttcat 1800
gggccggcct ggagttgact atgagacaaa cccaaattac cctgaagtcc tctatgaaga 1860
ctggaccacg ccaactgaca tcggggatac tacaaacaaa agtaatgaga tcccctccac 1920
ggatgttgct gaccaaacca atcgggagca tctctcggtc tatgctgtgg tggtgattgc 1980
ctctgtggta ggattctgcc tgctggtgat gctgcttctg ctcaagttgg cgagacattc 2040
caagtttggc atgaaaggcc cagcttccgt catcagcaac gacgatgact ctgccagccc 2100
tctccaccac atctccaacg ggagcaacac tccgtcttct tcggagggcg ggcccgatgc 2160
tgtcatcatt gggatgacca agatccctgt cattgaaaac ccccagtact tcggtatcac 2220
caacagccag ctcaagccgg acacatttgt tcagcacatc aagagacaca acatcgttct 2280
gaagagggag cttggagaag gagcctttgg gaaagttttc ctagcggagt gctataacct 2340
ctgccccgag caggataaga tcctggtggc cgtgaagacg ctgaaggacg ccagcgacaa 2400
tgctcgcaag gactttcatc gcgaagccga gctgctgacc aacctccagc acgagcacat 2460
tgtcaagttc tacggtgtct gtgtggaggg cgacccactc atcatggtct ttgagtacat 2520
gaagcacggg gacctcaaca agttccttag ggcacacggg ccagatgcag tgctgatggc 2580
agagggtaac ccgcccaccg agctgacgca gtcgcagatg ctgcacatcg ctcagcaaat 2640
cgcagcaggc atggtctacc tggcatccca acacttcgtg caccgagacc tggccacccg 2700
gaactgcttg gtaggagaga acctgctggt gaaaattggg gacttcggga tgtcccggga 2760
tgtatacagc accgactact accgggttgg tggccacaca atgttgccca tccgatggat 2820
gcctccagag agcatcatgt acaggaaatt caccaccgag agtgacgtct ggagcctggg 2880
agttgtgttg tgggagatct tcacctacgg caagcagccc tggtatcagc tatcaaacaa 2940
cgaggtgata gaatgcatca cccagggcag agtccttcag cggcctcgca cgtgtcccca 3000
ggaggtgtac gagctgatgc tgggatgctg gcagcgggaa ccacacacaa ggaagaacat 3060
caagaacatc cacacactcc ttcagaactt ggcgaaggcg tcgcccgtct acctggacat 3120
cctaggctag actccctctt ctcccagacg gcccttccca aggcacccct cagacctctt 3180
aactgccgct gatgtcacca ccttgctgtc cttcgctctg acagtgttaa caagacaagg 3240
agcggctctc cggggtgagg cagtgcgcac ttccccatcc acagacagta tcgactcgct 3300
tctggctttg tcgctttctc tccctttggt ttgtttcttt cttttgccca ttctccattt 3360
atttatttat ttatttattt atttatttat ttatttattt atttatctat ctatctatct 3420
atttatttat ttatttattg gtcttcactg cttcatggtc ctcggcctct ctccttgacc 3480
gatctggctt ctgtactcct attcactgta catagacaaa ggccttaaca aacctgattt 3540
gttatatcag cagacactcc agtttgccca ccacaactaa caatgccttg ttgtattcct 3600
gcctttgatg tggatgaaaa aaagggaaaa aaaataatca aacatctgac ttaaaccgtc 3660
acttccgatg tacagacacg gggcgtttct atggattcac ttctatctat ctatttattt 3720
atttatctat ttatttattt ctcttctttg ttgttttccg gtggttttag cctgtgtatg 3780
agaagggaaa gtcatgtaca gtctgggaaa actttatctg tgggaaatgg aaaccagaag 3840
gggaaagaag ctttaccata aagcacagca ggagtgagac acagaaaagc cattggatca 3900

gccagagtcc gtcctgcata ggaaaaccca gcagccatca ggctggagga tcatgttcgg 3960
cactgacccc cgaggacctt tctgaggagg acacagaatg ttaaactctg catcatggac 4020
acagtttccg atcacagata ctggccttca atggaaaaaa aaaaaaaaaa aacccagata 4080
gttcttgtga gacctggaca gcacgtccaa catccagaca ttgtggtcgg gcacagtgac 4140
agagttgatg catttctcac gggttattct acagagcttt tgtcaagtcc aatggaagga 4200
ggtagattct tgttcagata tgatttcggg aaaaaccgag tccttgacaa agacaggaga 4260
caccctcagt tgggaggcaa gtttctctta ccttggactt tctcacacag caattctcac 4320
ccccacccc tccactctca cctgtcttgt aactgtgcaa acaaaagtgt gcatggtctt 4380
tgtcagttga tacctttgtg cacctctgtg cagaaactgc tgtctgtccc ggctgtggta 4440
cccgatcagt ggggtagatc cacgaaaggt ctcattttag gccgctttgg gaaggtaacc 4500
agatcggtag ctggaagcac tctccagtag gtggcgaagg gtgagtgggt ctgctgaagc 4560
ctgcatatct tcacccacct caaacccacc gggctgcaca ggggacaggc acaggccacc 4620
cctgagggac agggaagctc tcttgggata ccacctgagt ttacattcag tgtgctcagg 4680
tcaagtctct cgctcggggc tctgtttcgg ggagaatggt ttcattccaa cgcactcatt 4740
atcaggattc tgttttc 4757

<210>6
<211>821
<212>PRT
<213> 家鼠属

<400>6

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

Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu Ile
130 135 140
Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu Lys
145 150 155 160
Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
165 170 175
Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Thr Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
180 185 190
Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
195 200 205
Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Ile Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp Pro
210 215 220
Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
225 230 235 240
Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
245 250 255
Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
260 265 270
Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
275 280 285
Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
290 295 300
Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
305 310 315 320
Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
325 330 335
Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
340 345 350
His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
355 360 365
Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly Val
370 375 380
Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp Trp
385 390 395 400
Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu Ile
405 410 415
Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Thr Asn Arg Glu His Leu Ser Val
420 425 430
Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val

435 440 445

Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys

450 455 460

Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu

465 470 475 480

His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly

485 490 495

Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn

500 505 510

Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe

515 520 525

Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly

530 535 540

Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys

545 550 555 560

Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala

565 570 575

Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr

580 585 590

Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu

595 600 605

Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu

610 615 620

Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu

625 630 635 640

Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala

645 650 655

Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val

660 665 670

His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu

675 680 685

Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp

690 695 700

Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro

705 710 715 720

Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp

725 730 735

Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro

740 745 750

Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly
755 760 765
Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu
770 775 780
Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys
785 790 795 800
Asn Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr
805 810 815
Leu Asp Ile Leu Gly
820

<210>7
<211>6
<212>PRT
<213> 智人

<400>7

Met Gln Val Ser Lys Arg
1 5

<210>8
<211>116
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VH 序列

<400>8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Phe Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210>9
<211>106
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VL 序列

<400>9

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

<210>10
<211>5
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VH CDR1 序列

<400>10

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210>11
<211>17
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VH CDR2 序列

<400>11

Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210>12
<211>7
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VH CDR3 序列

<400>12

Glu Gly Val His Phe Asp Tyr
1 5

<210>13
<211>10
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VL CDR1 序列

<400>13

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210>14
<211>7
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VL CDR2 序列

<400>14

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210>15
<211>9
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>1A7 抗体的 VL CDR3 序列

<400>15

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
1 5

<210>16
<211>120
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VH 序列

<400>16

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

<210>17
<211>106
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VL 序列
<400>17

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Leu Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Asn

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210>18
<211>5
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VH CDR1 序列
<400>18

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210>19
<211>17
<212>PRT
<213> 未知
<220>
<223>3B5 抗体的 VH CDR2 序列
<400>19

Val Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15
Gly

<210>20
<211>10
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VH CDR3 序列

<400>20

Pro Tyr Tyr Gly Ser His Trp Phe Phe Asp
1 5 10

<210>21
<211>10
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VL CDR1 序列

<400>21

Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Val His
1 5 10

<210>22
<211>7
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VL CDR2 序列

<400>22

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210>23
<211>9
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>3B5 抗体的 VL CDR3 序列

<400>23

Gln Gln Trp Ser Thr Asn Pro Pro Thr
1 5

<210>24
<211>119
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VH 序列

<400>24

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

<210>25
<211>107
<212>PRT
<213> 未知

<220>

<223>LI33 抗体的 VL 序列

<400>25

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

<210>26
<211>5
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VH CDR1 序列

<400>26

Ile Tyr Pro Met Phe
1 5

<210>27
<211>17
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VH CDR2 序列

<400>27

Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210>28
<211>10
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VH CDR3 序列

<400>28

Glu Gly His Asn Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210>29
<211>11
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VL CDR1 序列

<400>29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210>30
<211>7
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VL CDR2 序列

<400>30

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210>31
<211>9
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223>LI33 抗体的 VL CDR3 序列

<400>31

Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Leu Thr
1 5

<210>32
<211>200
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>siRNA 分子制备中使用的寡核苷酸的一般合成结构

<220>
<221> 其他特征
<222>(1)..(200)
<223>n 为 a,g,c,t 或 u

<220>
<221> 其他特征
<222>(2)..(200)
<223> 核苷酸可能缺失
<400>32
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 200

<210>33
<211>200
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>siRNA 分子制备中使用的寡核苷酸的一般合成结构

<220>
<221> 其他特征
<222>(1)..(200)
<223>n 为 a,g,c,t 或 u

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

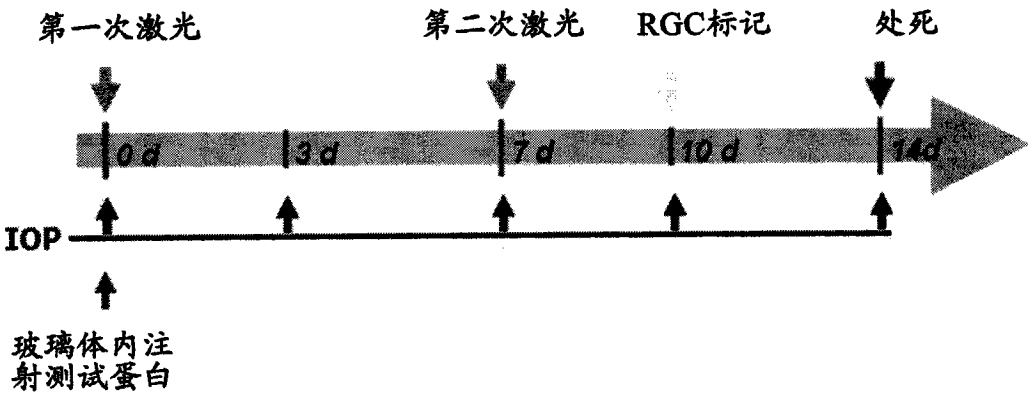
<400>33
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 200

<210>34
<211>55
<212>RNA
<213> 未知

<220>
<223>LINGO-1 拮抗剂多核苷酸的 shRNA 序列

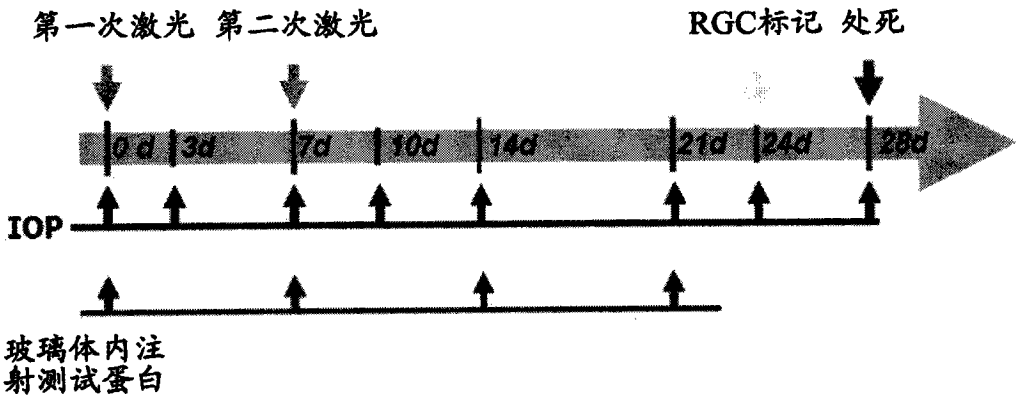
<400>34
ugaucgucau ccugcuagac uucaagagag ucuagcagga ugacgaucuu uuuuc 55

A



2周眼内高压模型

B



4周眼内高压模型

图 1

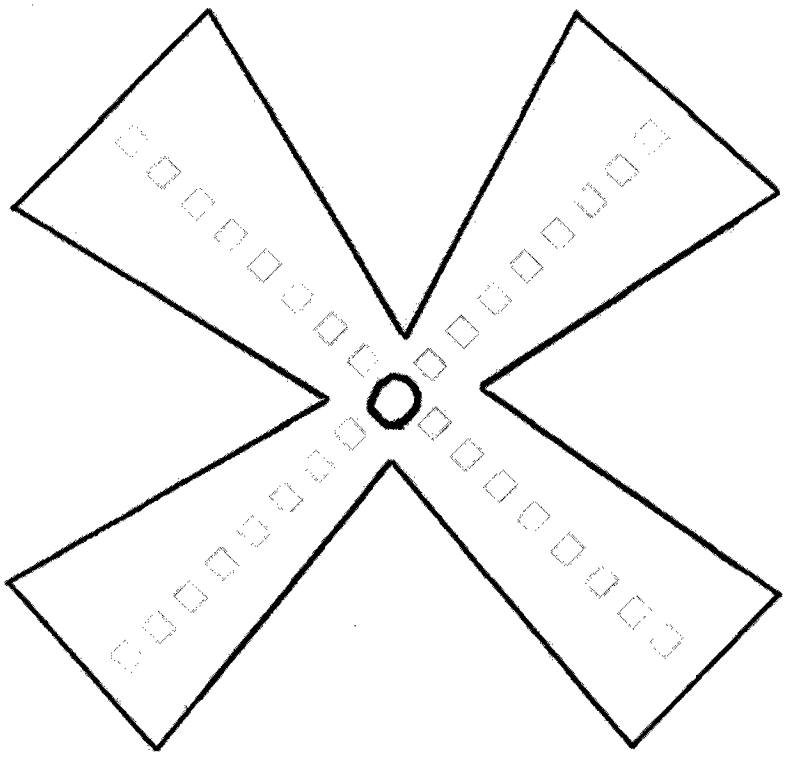
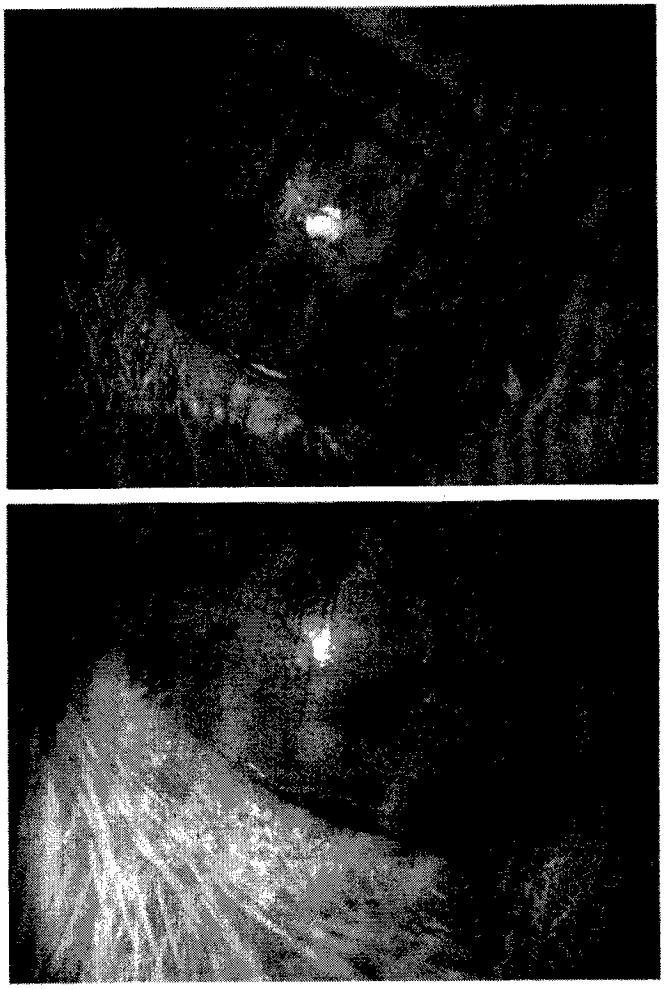


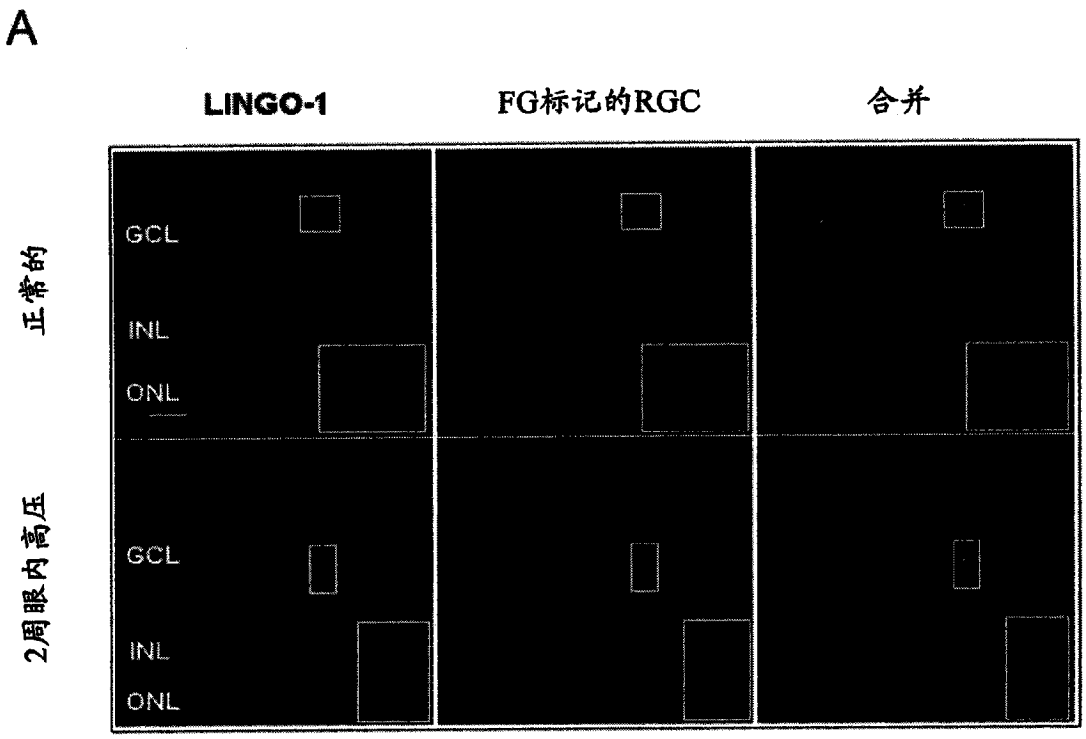
图 2



A：激光处理前

B：激光处理后

图 3


A
LINGO-1
FG标记的RGC
合并
正常的
2周眼内高压
GCL
INL
ONL
GCL
INL
ONL

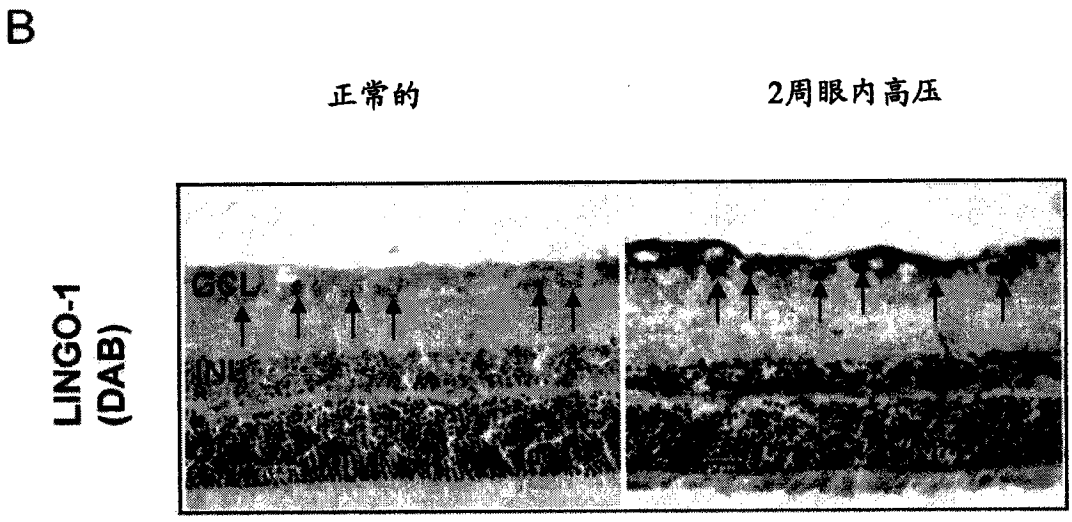

B
正常的
2周眼内高压
LINGO-1
(DAB)
GCL
INL

图 4

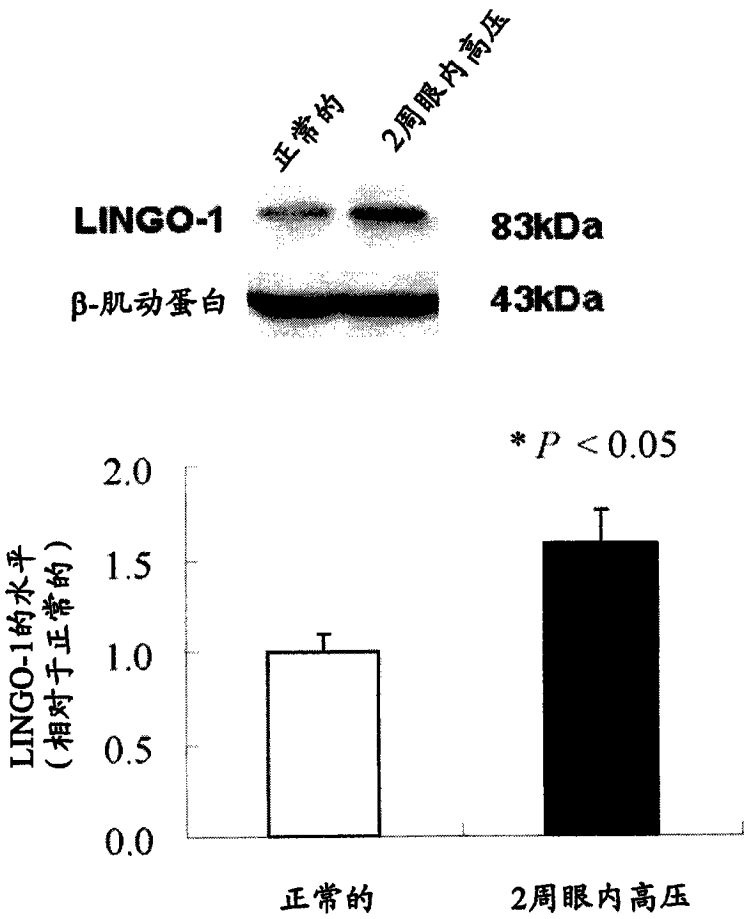

正常的
2周眼内高压
LINGO-1
83kDa
β-肌动蛋白
43kDa
* P < 0.05
LINGO-1的水平
（相对于正常的）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
正常的
2周眼内高压

图 5

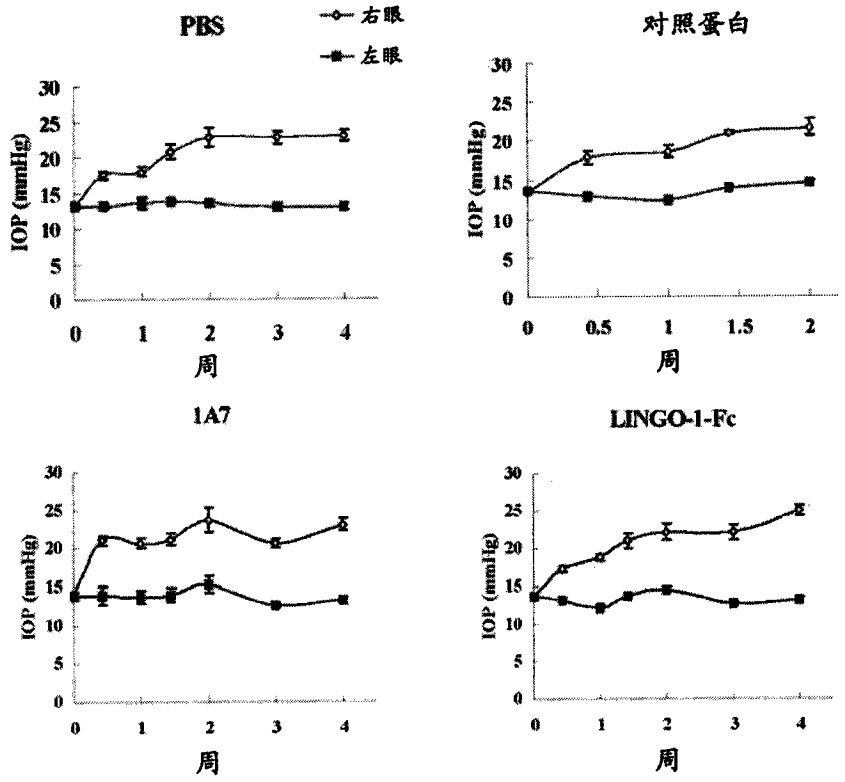


图 6

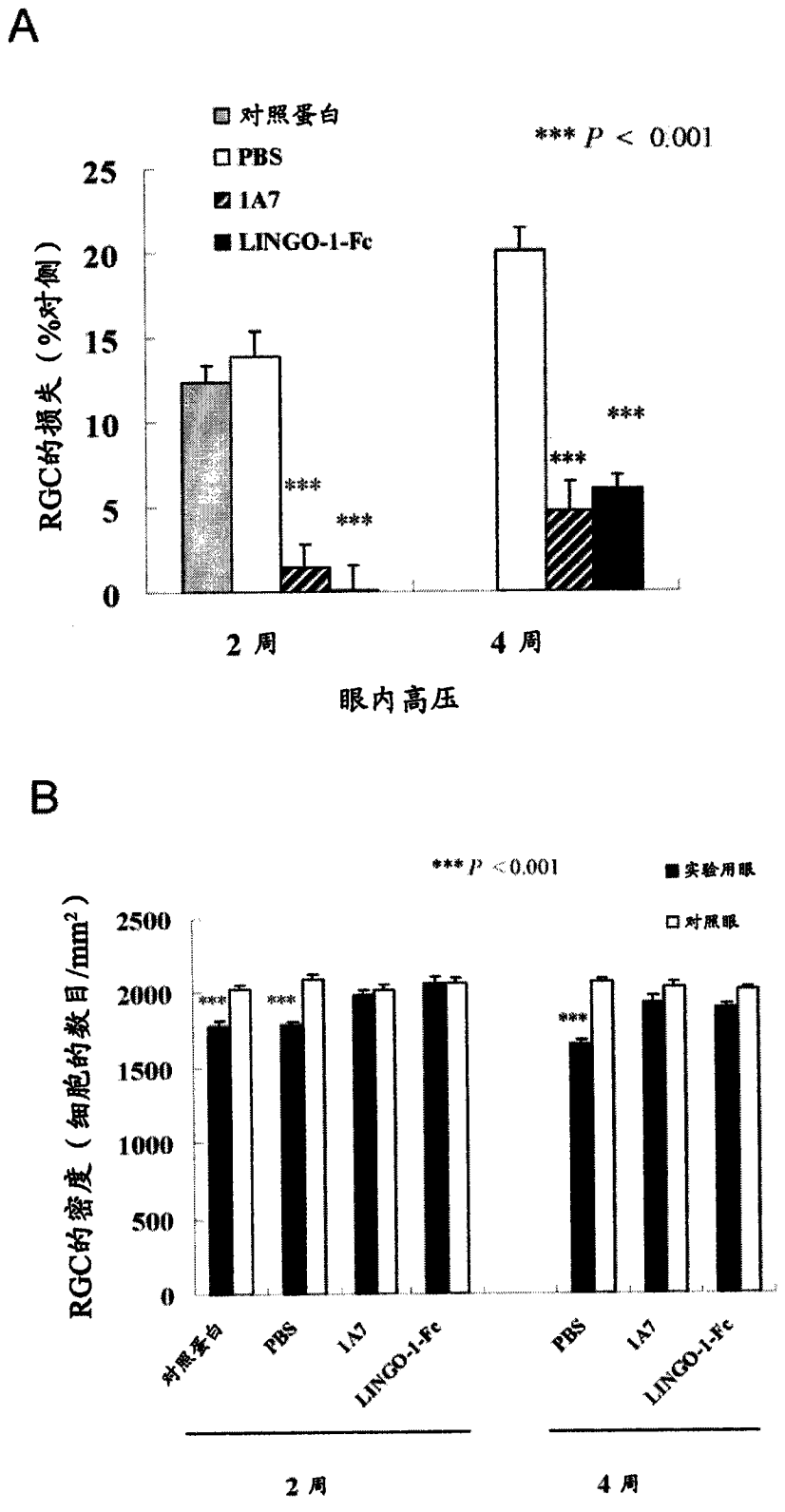

A
对照蛋白
PBS
1A7
LINGO-1-Fc
*** P < 0.001
RGC的损失（%对侧）
25
20
15
10
5
0
***
***
***
***
2 周
4 周
眼内高压
B
*** P < 0.001
实验用眼
对照眼
RGC的密度（细胞的数目/mm²）
2500
2000
1500
1000
500
0
***
***
***
对照蛋白
PBS
1A7
LINGO-1-Fc
PBS
1A7
LINGO-1-Fc
2 周
4 周

图 7

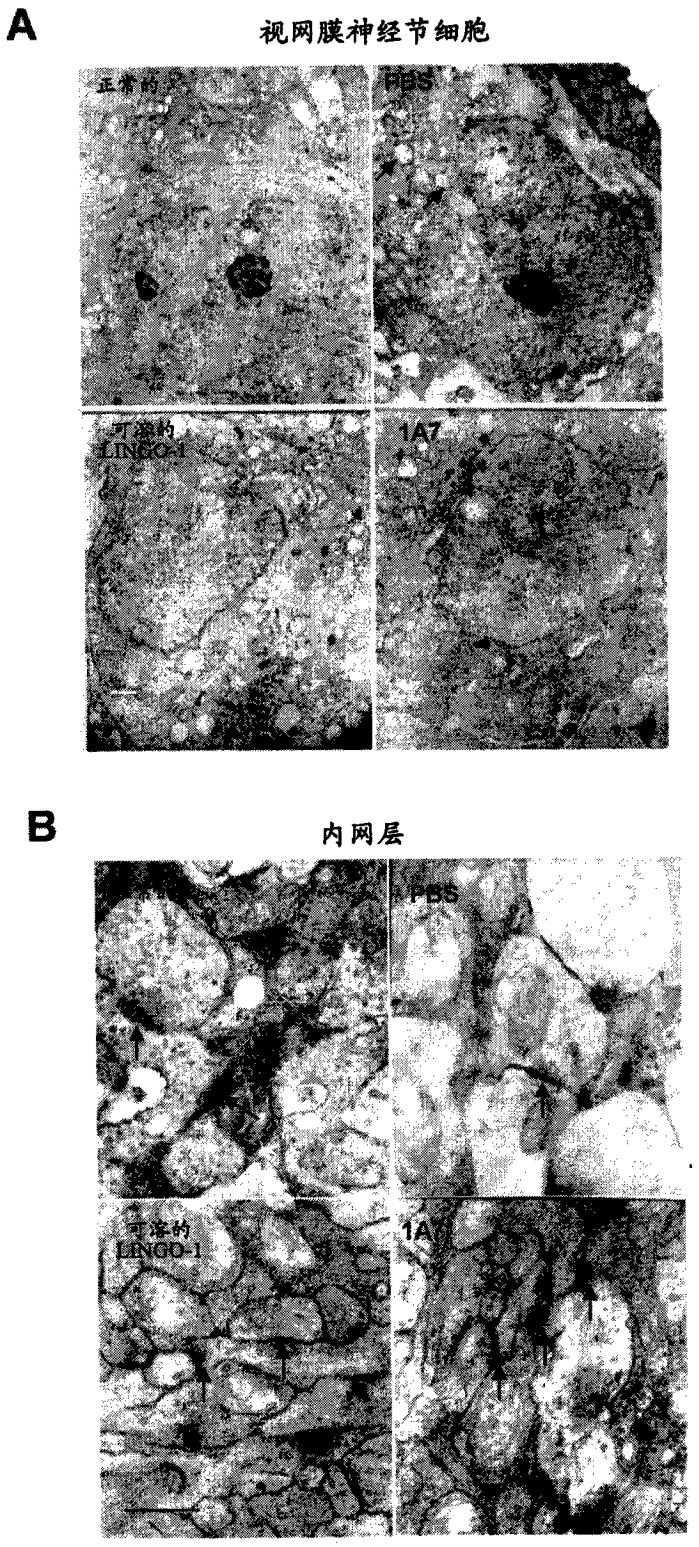


图 8

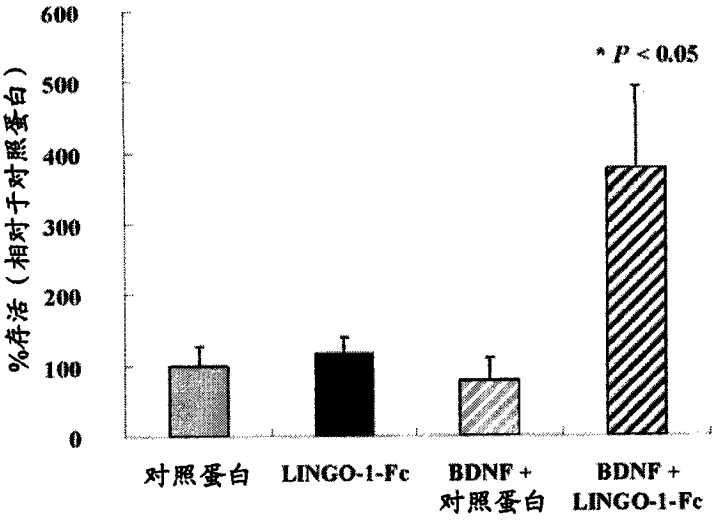

600
500
400
300
200
100
0
%存活（相对于对照蛋白）
* P < 0.05
对照蛋白
LINGO-1-Fc
BDNF + 对照蛋白
BDNF + LINGO-1-Fc

图 9

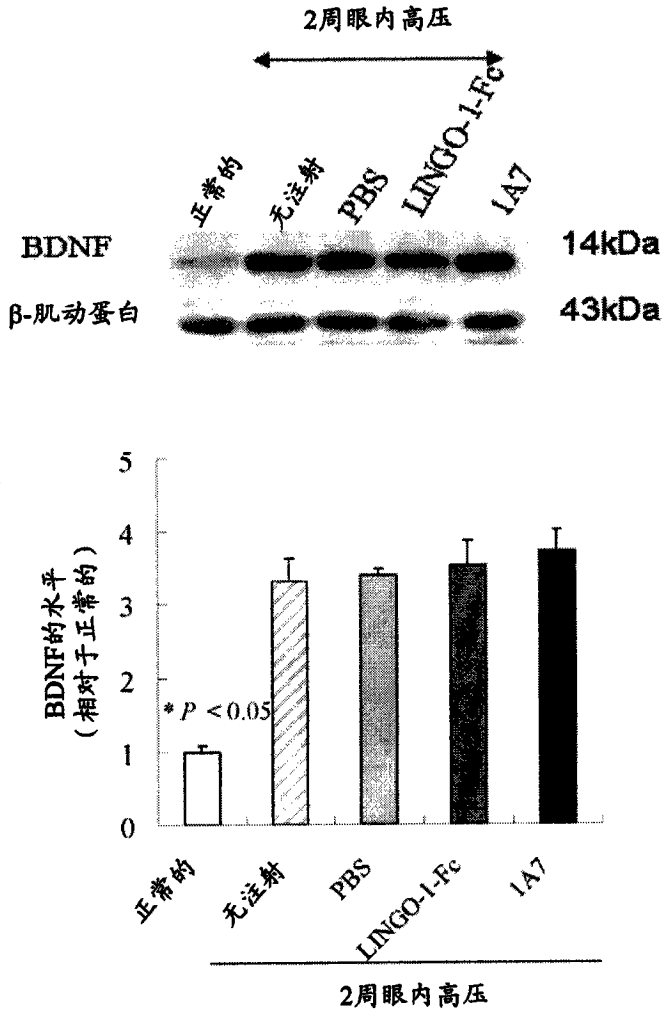
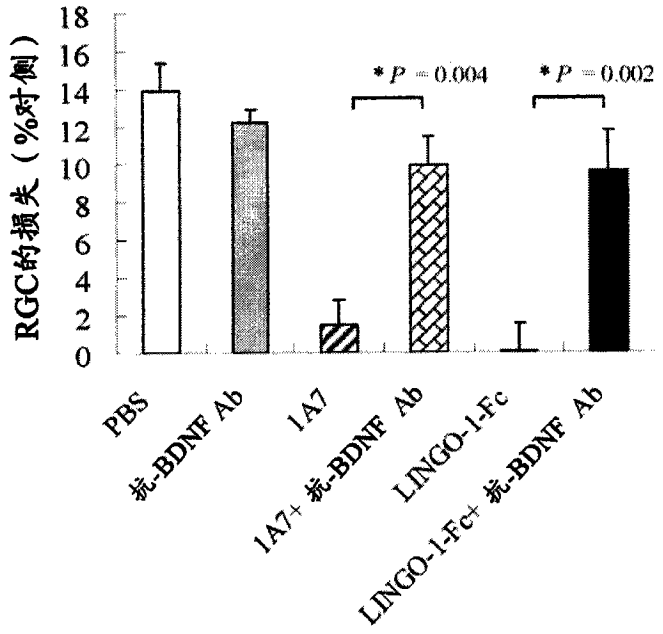

2周眼内高压
正常的
无注射
PBS
LINGO-1-Fc
1A7
BDNF
14kDa
β-肌动蛋白
43kDa
BDNF的水平（相对于正常的）
5
4
3
2
1
0
* P < 0.05
正常的
无注射
PBS
LINGO-1-Fc
1A7
2周眼内高压

图 10

A


RGC的损失（%对侧）
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*P = 0.004
*P = 0.002
PBS
抗-BDNF Ab
1A7
1A7+ 抗-BDNF Ab
LINGO-1-Fc
LINGO-1-Fc+ 抗-BDNF Ab

B

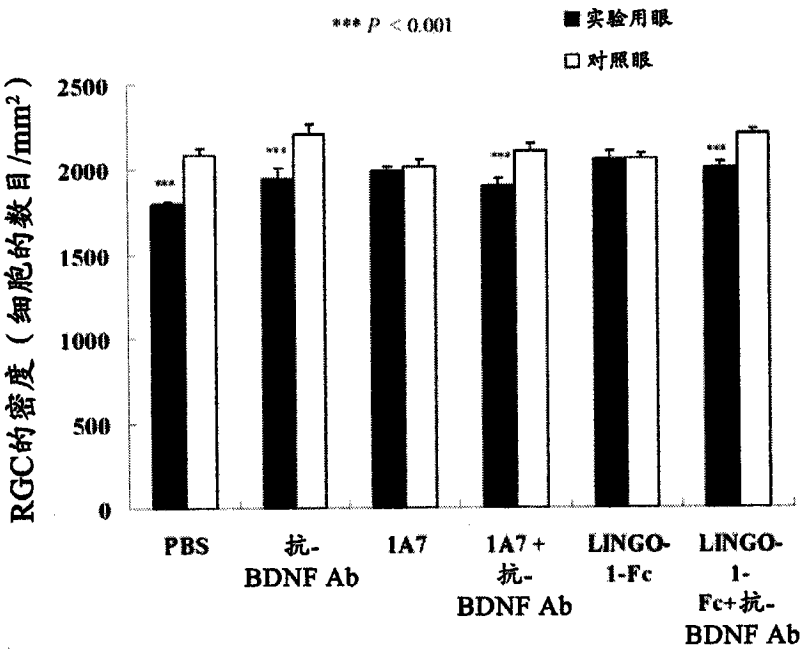
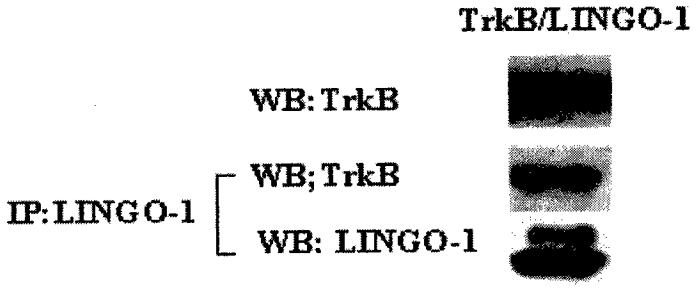
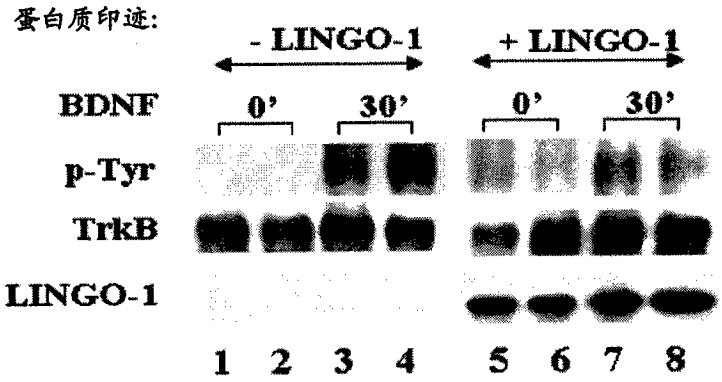

*** P < 0.001
实验用眼
对照眼
RGC的密度（细胞的数目/mm²）
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
抗-BDNF Ab
1A7
1A7 + 抗-BDNF Ab
LINGO-1-Fc
LINGO-1-Fc+抗-BDNF Ab

图 11

A


TrkB/LINGO-1
WB: TrkB
IP: LINGO-1
WB; TrkB
WB: LINGO-1

B


蛋白质印迹:
- LINGO-1
+ LINGO-1
BDNF
0'
30'
0'
30'
p-Tyr
TrkB
LINGO-1
1 2 3 4 5 6 7 8

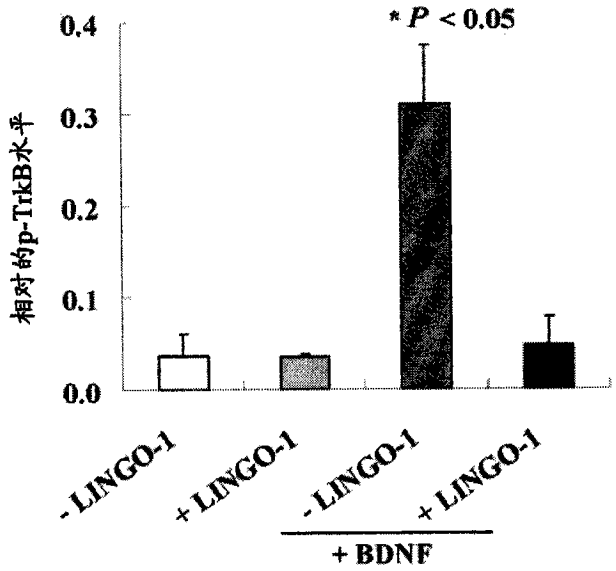

* P < 0.05
相对的p-TrkB水平
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
- LINGO-1
+ LINGO-1
- LINGO-1
+ LINGO-1
+ BDNF

图 12

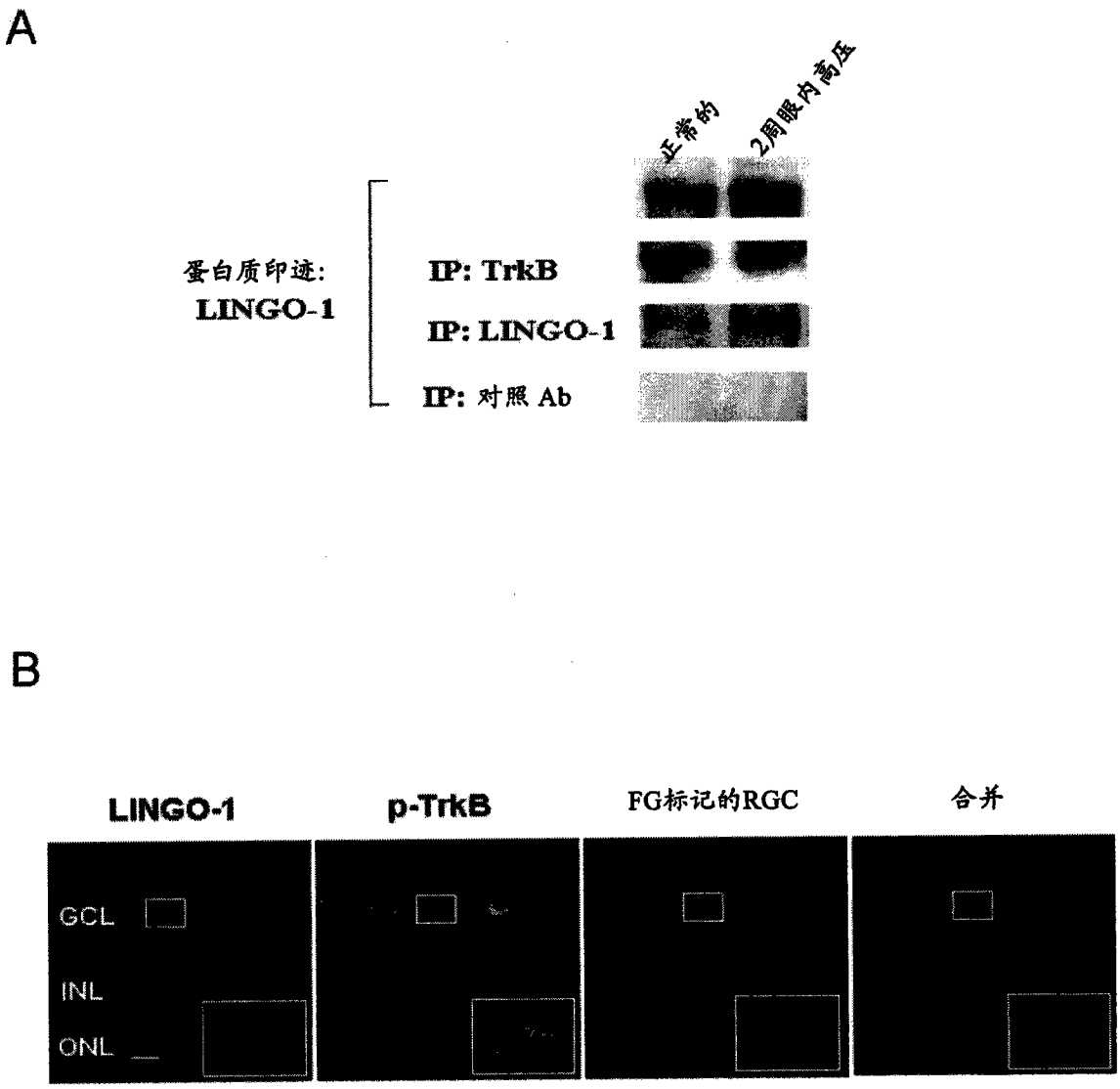
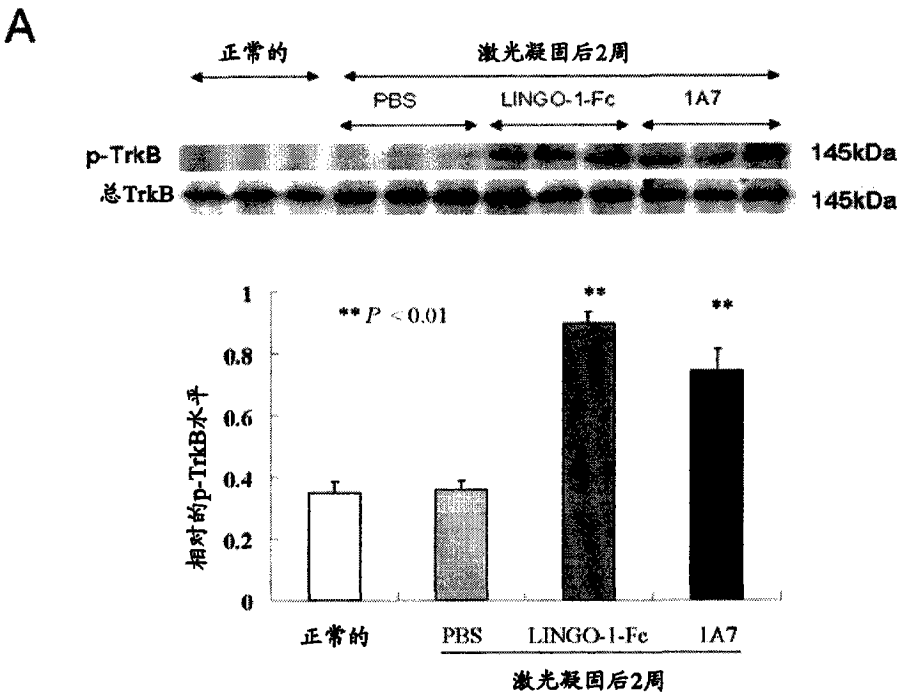

A
正常的
2周眼内高压
蛋白质印迹:
LINGO-1
IP: TrkB
IP: LINGO-1
IP: 对照 Ab
B
LINGO-1
p-TrkB
FG标记的RGC
合并
GCL
INL
ONL

图 13


A
正常的
激光凝固后2周
PBS
LINGO-1-Fc
1A7
p-TrkB
总TrkB
145kDa
145kDa
** P < 0.01
相对的p-TrkB水平
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
正常的
PBS
LINGO-1-Fc
1A7
激光凝固后2周

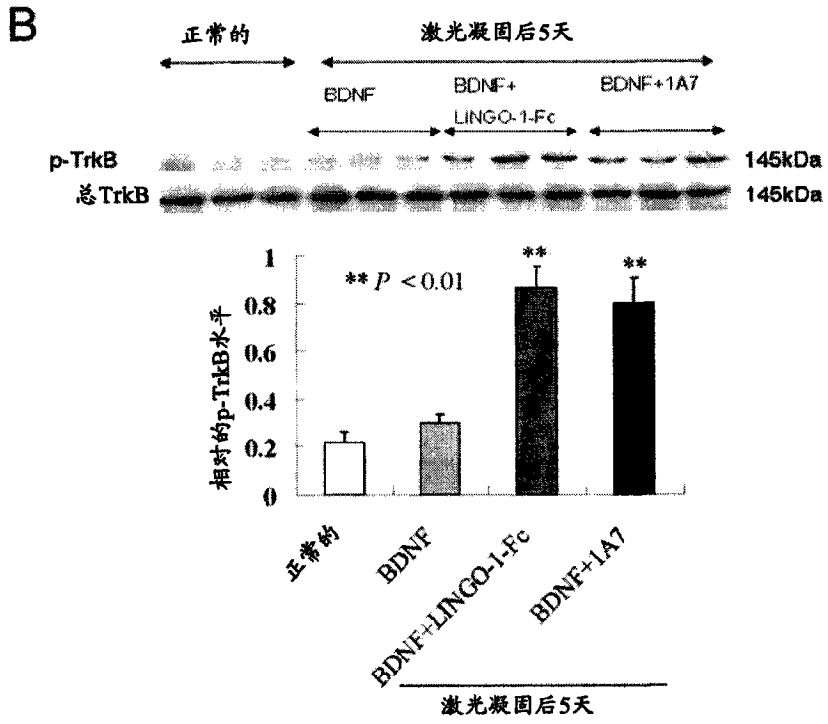

B
正常的
激光凝固后5天
BDNF
BDNF+
LINGO-1-Fc
BDNF+1A7
p-TrkB
总TrkB
145kDa
145kDa
** P < 0.01
相对的p-TrkB水平
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
正常的
BDNF
BDNF+LINGO-1-Fc
BDNF+1A7
激光凝固后5天

图 14

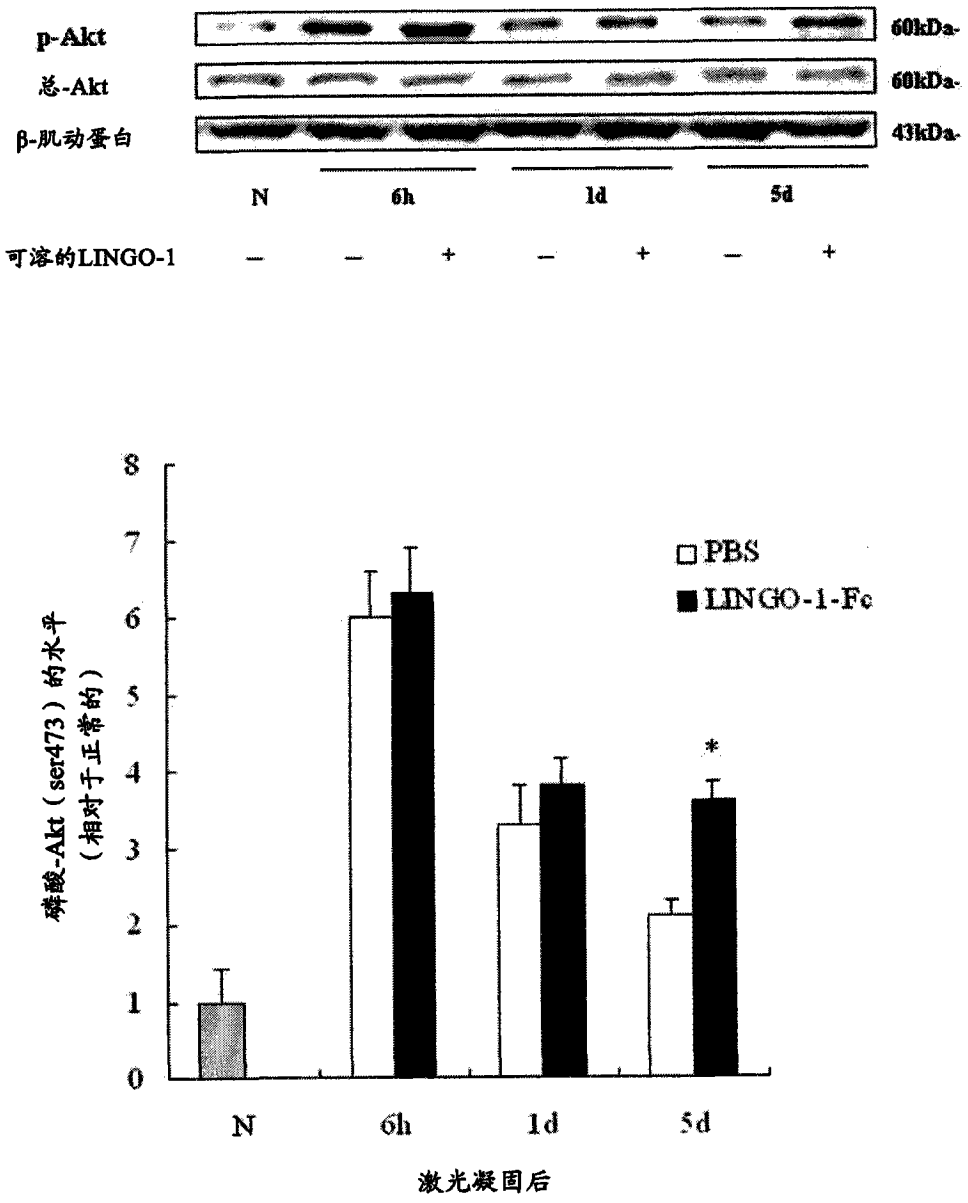

p-Akt
总-Akt
β-肌动蛋白
60kDa-
60kDa-
43kDa-
N
6h
1d
5d
可溶的LINGO-1 – – + – + – +
磷酸-Akt（ser473）的水平
（相对于正常的）
0
1
2
3
4
5
6
7
8
PBS
LINGO-1-Fc
*
N
6h
1d
5d
激光凝固后

图 15

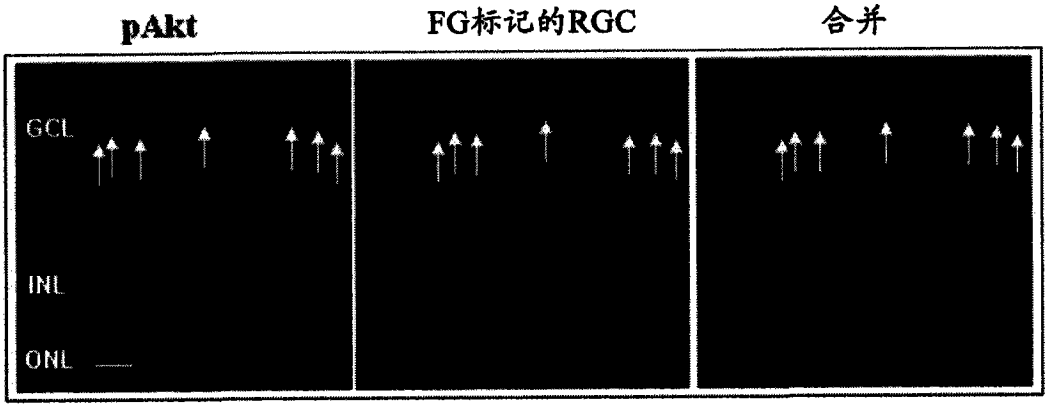
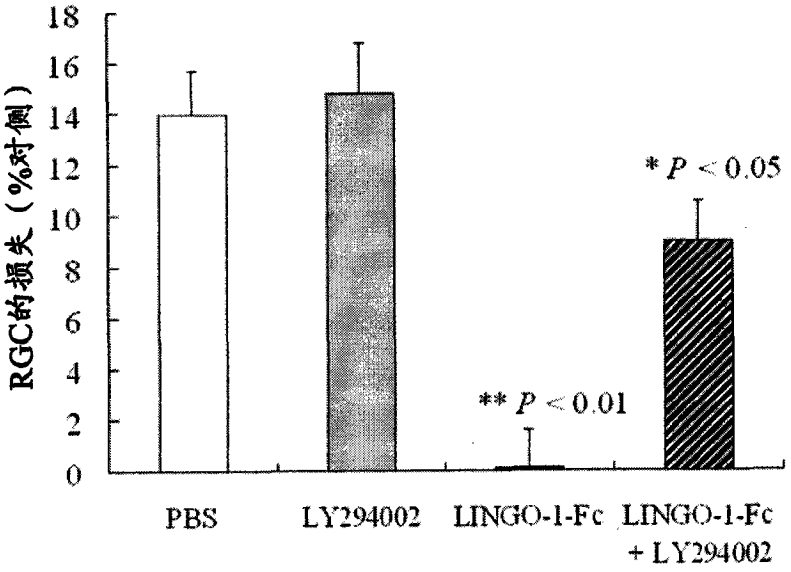

pAkt
FG标记的RGC
合并
GCL
INL
ONL

图 16

A


RGC的损失（%对侧）
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
* P < 0.05
** P < 0.01
PBS
LY294002
LINGO-1-Fc
LINGO-1-Fc
+ LY294002

B

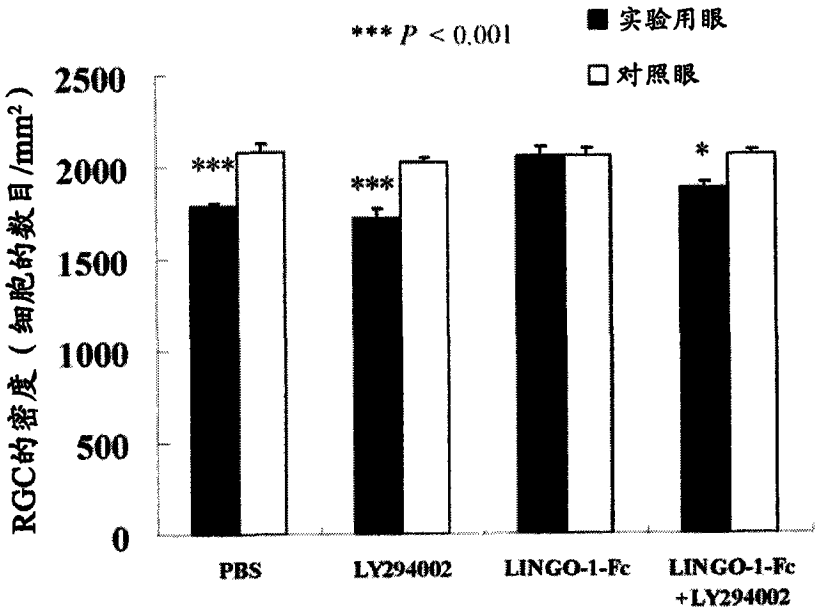

*** P < 0.001
实验用眼
对照眼
RGC的密度（细胞的数目/mm²）
2500
2000
1500
1000
500
0
***
***
*
PBS
LY294002
LINGO-1-Fc
LINGO-1-Fc
+LY294002

图 17

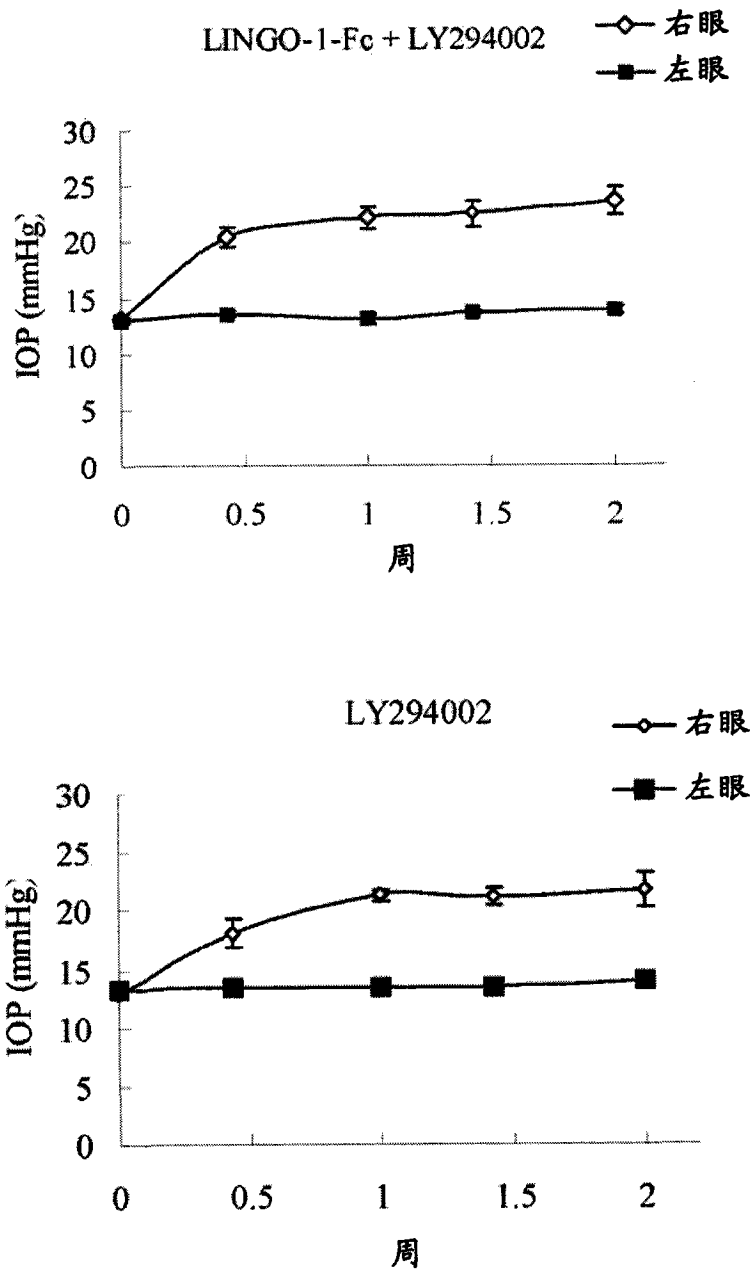

LINGO-1-Fc + LY294002
右眼
左眼
IOP (mmHg)
30
25
20
15
10
5
0
0
0.5
1
1.5
2
周
LY294002
右眼
左眼
IOP (mmHg)
30
25
20
15
10
5
0
0
0.5
1
1.5
2
周

图 18

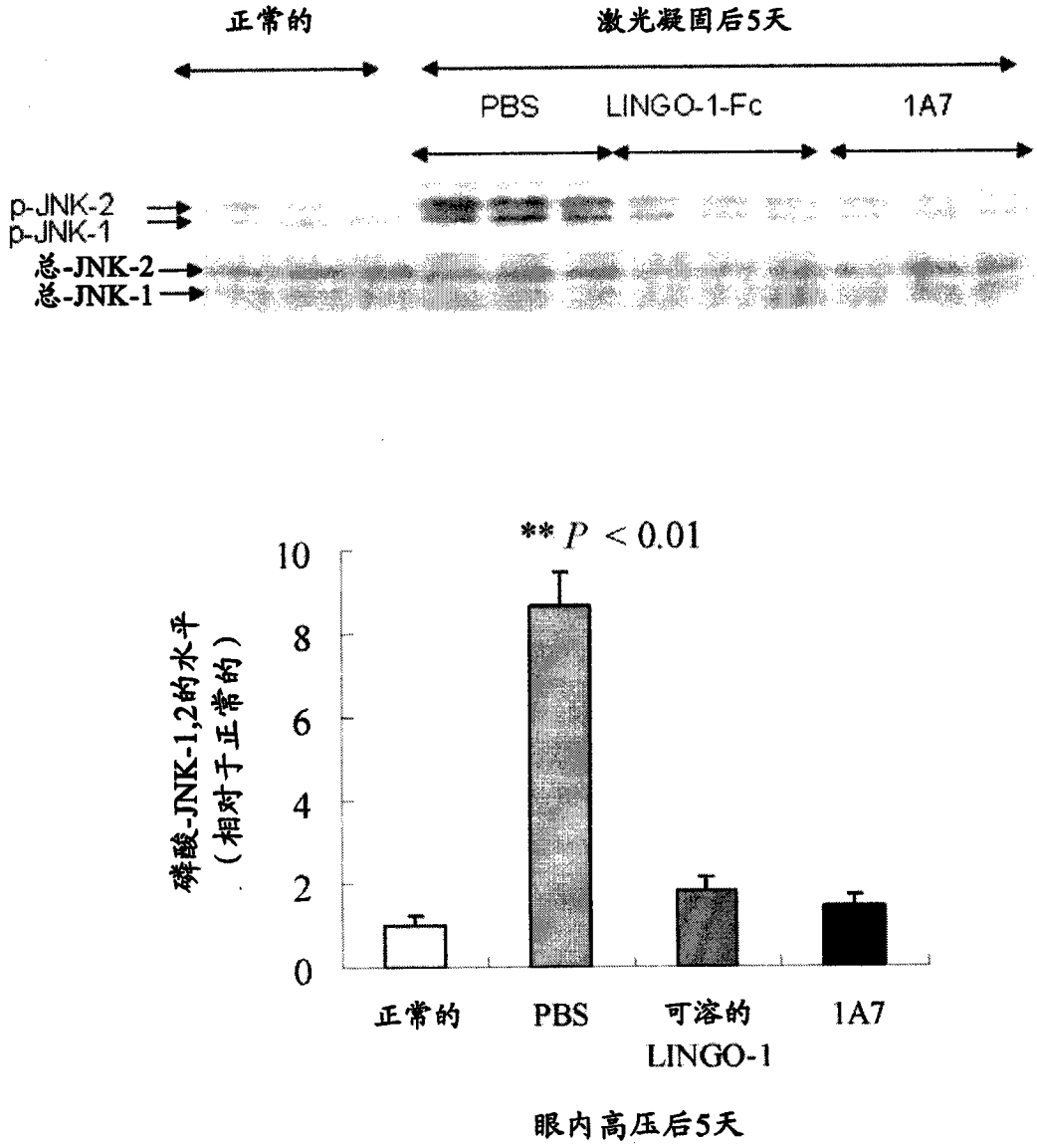

正常的
激光凝固后5天
PBS
LINGO-1-Fc
1A7
p-JNK-2
p-JNK-1
总-JNK-2
总-JNK-1
** P < 0.01
磷酸-JNK-1,2的水平
（相对于正常的）
10
8
6
4
2
0
正常的
PBS
可溶的
LINGO-1
1A7
眼内高压后5天

图 19

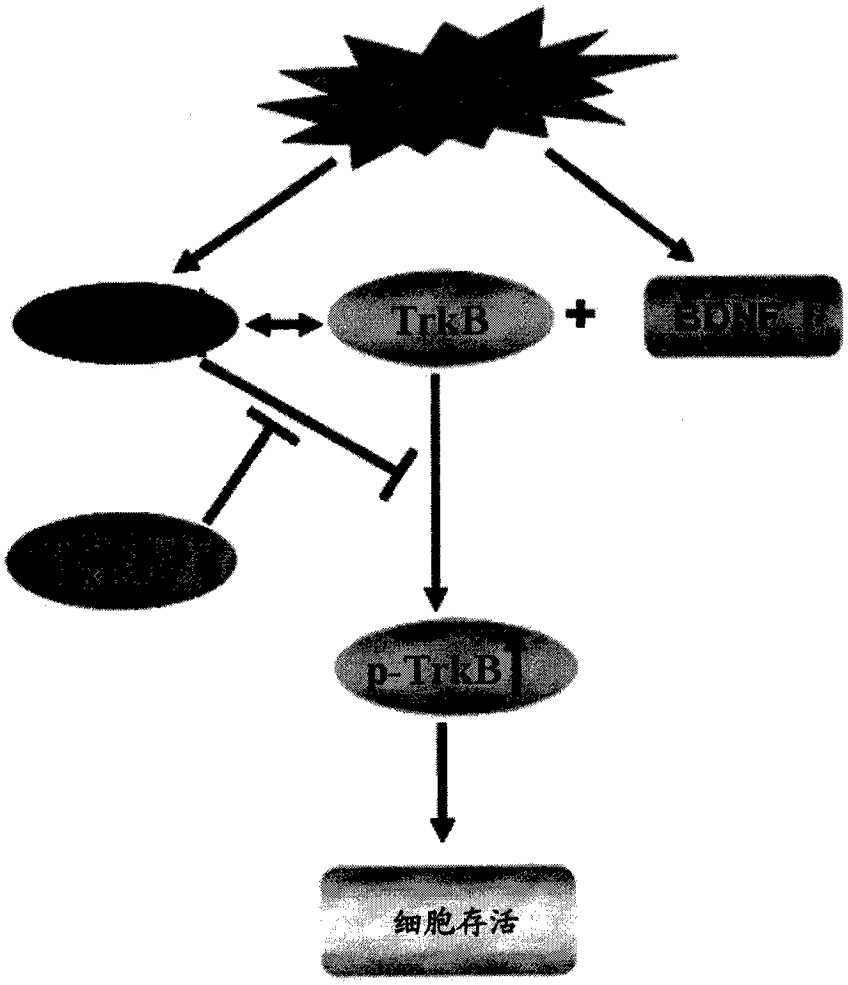


图 20

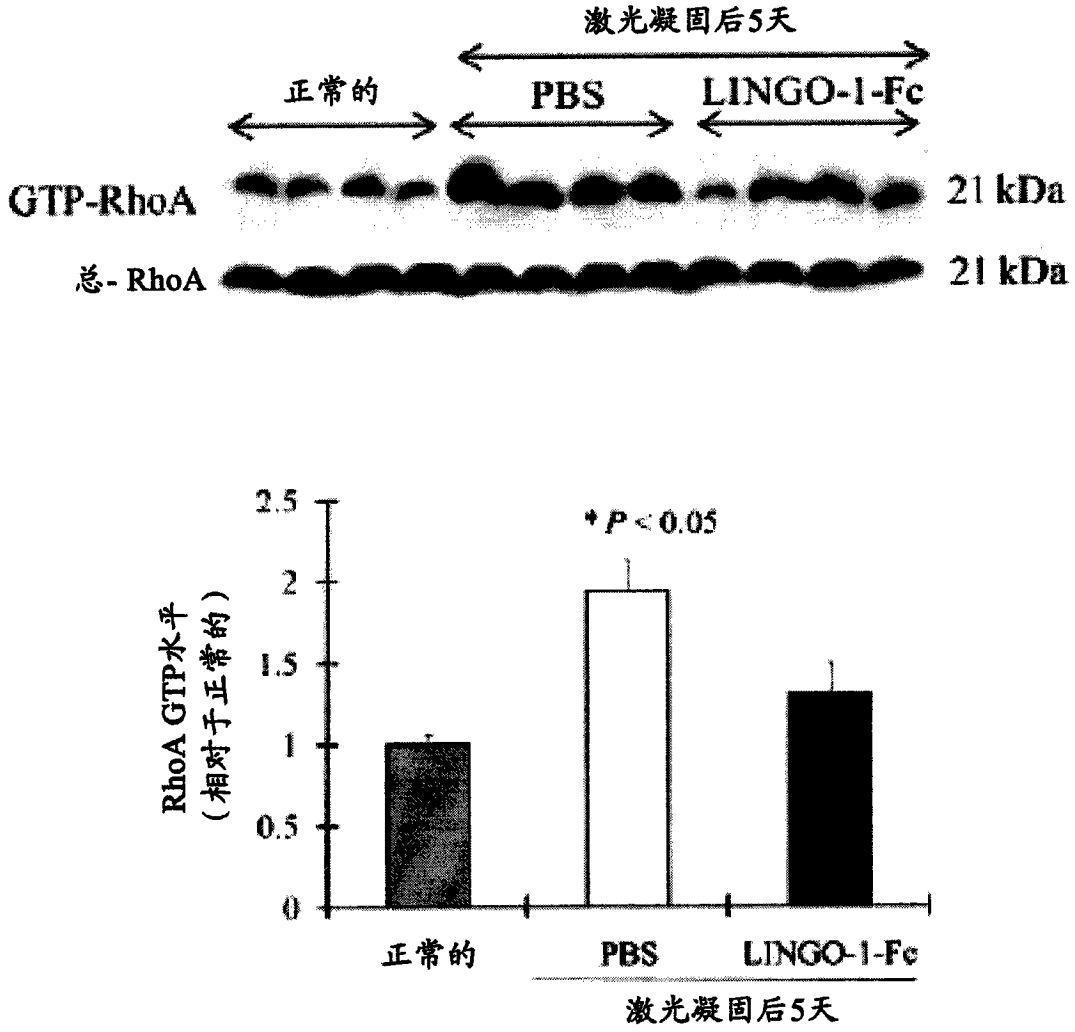

激光凝固后5天
正常的
PBS
LINGO-1-Fc
GTP-RhoA
21 kDa
总- RhoA
21 kDa
RhoA GTP水平
（相对于正常的）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*P < 0.05
正常的
PBS
LINGO-1-Fc
激光凝固后5天

图 21