[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 5/00
C07K 14/00
C12N 15/11
C12N 15/85
C07H 21/04
A61K 39/395

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03821409.1

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1681838A

[22] 申请日 2003.8.7 [21] 申请号 03821409.1

[30] 优先权

[32] 2002. 8.10 [33] US [31] 60/402,866

[86] 国际申请 PCT/US2003/025004 2003.8.7

[87] 国际公布 WO2004/014311 英 2004.2.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.9

[71] 申请人 拜奥根 IDEC 马萨诸塞公司

地址 美国马萨诸塞

共同申请人 耶鲁大学

[72] 发明人 D·H·S·李 R·B·佩平斯凯
W·李 S·A·拉巴奇
J·K·雷尔顿 D·S·沃利
S·M·斯特里特马特
D·Y·W·赛赫

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 7 页 说明书 63 页 附图 16 页

[54] 发明名称 NOGO 受体拮抗剂

[57] 摘要

本发明公开的是具有免疫原性的 Nogo 受体 1 多肽、Nogo 受体 1 抗体及其抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体及其融合蛋白，以及编码上述多肽/蛋白质的核酸。 本发明还公开了组合物，组合物包含这些 Nogo 受体抗体及其抗原结合片段、具有免疫原性的 Nogo 受体 - 1 多肽、可溶性 Nogo 受体及其融合蛋白以及编码上述多肽/蛋白质的核酸，还有制备和使用上述多肽/蛋白质和核酸的方法。

ISSN1008-4274

1.多肽，其选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5。

2.编码根据权利要求 1 的多肽的核酸。

3. 根据权利要求 2 的核酸，其操作性连接于表达调控序列。

4. 包含根据权利要求 2 或 3 的核酸的载体。

5. 宿主细胞，其包含根据权利要求 2 或 3 的核酸或者包含根据权利要求 4 的载体。

6. 制备根据权利要求 1 的多肽的方法，该方法包括以下步骤:

(a)培养根据权利要求 5 的宿主细胞；以及

(b) 从该宿主细胞或者培养基中回收多肽。

7. 制备抗体的方法，该方法包括以下步骤:

(a)使用根据权利要求 1 的多肽或者根据权利要求 5 的宿主细胞免疫宿主；以及

(b) 回收抗体。

8. 通过根据根据权利要求 7 的方法制备的抗体或者所述抗体的抗原结合片段。

9. 与根据权利要求 1 的多肽特异结合的抗体或者其抗原结合片段。

10. 根据权利要求 8 或 9 的抗体或者抗原结合片段，其中的抗体

(a)抑制神经元的生长椎蒌陷;

(b)降低对神经元内神经突向外生长和出芽的抑制；以及

(c)抑制 Nogo 受体 1 与配基结合。

11. 根据权利要求 10 的抗体或者抗原结合片段，其中神经突向外生长和出芽是轴突生长。

12. 根据权利要求 10 的抗体或者抗原结合片段，其中的神经元是中枢神经系统神经元。

13. 根据权利要求 8 或 9 的抗体或者抗原结合片段，其中的抗体是

单克隆抗体。

14. 根据权利要求 8 或 9 的抗体或者抗原结合片段，其中的抗体是小鼠抗体。

15. 根据权利要求 8 或 9 的抗体，其中抗体选自人源化抗体、嵌合抗体以及单链抗体。

16. 杂交瘤细胞系，它选自 HB 7E11 (ATCC® 登录号 PTA-4587)，HB 1H2 (ATCC® 登录号 PTA-4584)，HB 3G5 (ATCC® 登录号 PTA-4586)，HB 5B10 (ATCC® 登录号 PTA-4588) 以及 HB 2F7 (ATCC® 登录号 PTA-4585)。

17. 由根据权利要求 16 的杂交瘤细胞系产生的抗体或者其抗原结合片段。

18. 抗体或者其抗原结合片段，它竞争性抑制根据权利要求 17 的抗体与根据权利要求 1 的多肽结合或者抑制根据权利要求 17 的抗体与 Nogo 受体 1 结合。

19. 抑制 Nogo 受体 1 与配基结合的方法，该方法包括以下步骤：使 Nogo 受体 1 与根据权利要求 10 或者 17 的抗体或者抗原结合片段相接触。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中的配基选自 NogoA, NogoB, NogoC, MAG 和 OM-gp。

21. 抑制神经元内生长椎蒌陷的方法，该方法包括以下步骤：使该神经元与根据权利要求 10 或者 17 的抗体或者其抗原结合片段相接触。

22. 降低对神经元内神经突向外生长或者出芽的抑制的方法，该方法包括以下步骤：使该神经元与根据权利要求 10 或者 17 的抗体或者其抗原结合片段相接触。

23. 根据权利要求 22 的方法，其中的神经突向外生长或者出芽是轴突生长。

24. 根据权利要求 21 或者 22 的方法，其中的神经元是中枢神经系统神经元。

25. 可溶性 Nogo 受体 1 多肽，它基本上由 Nogo 受体 1 的 N-端结

构域（NT）、8个富集亮氨酸的重复结构域（LRR）以及LRR C端结构域(LRRCT)组成。

26. 根据权利要求25的可溶性Nogo受体1多肽，其与信号序列相连。

27. 根据权利要求25或26的可溶性Nogo受体1多肽，其中LRR包括异源LRR。

28. 可溶性Nogo受体1多肽，该多肽选自：SEQ ID NO:6的26-344氨基酸残基；SEQ ID NO:7的26-310氨基酸残基；SEQ ID NO:8的26-344氨基酸残基；SEQ ID NO:9的26-310氨基酸残基；SEQ ID NO:8的27-344氨基酸残基；和SEQ ID NO:9的27-310氨基酸残基。

29. 核酸，其编码根据权利要求25到28中任意一项的可溶性Nogo受体1多肽。

30. 根据权利要求28的核酸，其操作性连接表达调控序列。

31. 载体，它包含根据权利要求29或者30的核酸。

32. 宿主细胞，它包含根据权利要求29或者30的核酸或者包含根据权利要求31的载体。

33. 制备根据权利要求25到28中任意一项的可溶性Nogo受体1多肽的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 培养根据权利要求32的宿主细胞；以及

(b)从该宿主细胞或者培养基中回收多肽。

34. Nogo受体1融合蛋白，它包含可溶性Nogo受体1多肽和异源多肽。

35. 根据权利要求34的Nogo受体1融合蛋白，其中可溶性Nogo受体1多肽主要由Nogo受体1的N-端结构域（NT）、8个富集亮氨酸的重复结构域（LRR）以及LRR C端结构域（LRRCT)组成。

36. 根据权利要求35的Nogo受体1融合蛋白，其与信号序列相连。

37. 根据权利要求34或者35的Nogo受体1融合蛋白，其中的LRR包含异源LRR。

38. 根据权利要求34到37中的任意一项的Nogo受体1融合蛋白，

其中可溶性 Nogo 受体 1 多肽包含根据权利要求 25 到 28 中任意一项的多肽。

39. 根据权利要求 34 到 37 中的任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白，其中异源多肽包含免疫球蛋白的恒定区。

40. 根据权利要求 39 的 Nogo 受体 1 融合蛋白，其中免疫球蛋白恒定区是免疫球蛋白重链恒定区。

41. 根据权利要求 40 的 Nogo 受体 1 融合蛋白，其中免疫球蛋白重链恒定区是 IgG 重链恒定区。

42. 根据权利要求 34 到 37 中的任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白，其中异源多肽是 Fc。

43. 根据权利要求 34 到 37 中的任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白，其中 Nogo 受体 1 融合蛋白是二聚体。

44. 核酸，它编码根据权利要求 34 到 37 中的任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白。

45. 根据权利要求 44 的核酸，其操作性连接于表达调控序列。

46. 包含根据权利要求 44 或者 45 的核酸的载体。

47. 宿主细胞，该宿主细胞包含根据权利要求 44 或者 45 的核酸或者包含根据权利要求 46 的载体。

48. 制备根据权利要求 34 到 37 中任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 培养根据权利要求 47 的宿主细胞；以及

(b)从该宿主细胞或者培养基中回收 Nogo 受体 1 多肽。

49. 抑制 Nogo 受体 1 与配基结合的方法，该方法包括以下步骤：使所述配基与根据权利要求 25 到 28 中任意一项的可溶性 Nogo 受体 1 多肽相接触，或者与根据权利要求 34 到 37 中任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。

50. 调节 Nogo 受体 1 配基活性的方法，该方法包括以下步骤：使该 Nogo 受体 1 配基与根据权利要求 25 到 28 中任意一项的多肽相接触或者与根据权利要求 34 到 37 中任意一项的 Nogo 受体 1 融合蛋白相接

触。

51. 抑制神经元内生长椎蒌陷的方法，该方法包括以下步骤：使Nogo受体1配基与根据权利要求25到28中任意一项的多肽相接触或者与根据权利要求34到37中任意一项的Nogo受体1融合蛋白相接触。

52. 降低对神经元内神经突向外生长或者出芽抑制的方法，该方法包括以下步骤：使Nogo受体1配基与根据权利要求25到28中任意一项的多肽相接触或者与根据权利要求34到37中任意一项的Nogo受体1融合蛋白相接触。

53. 根据权利要求49到52中任意一项的方法，其中配基选自NogoA、NogoB、NogoC、MAG和OM-gp。

54. 根据权利要求52的方法，其中的神经突向外生长或者出芽是轴突生长。

55. 根据权利要求51或者52的方法，其中的神经元是中枢神经系统神经元。

56. 组合物，它包含可药用载体和选自下列的组分：

(a)根据权利要求8,9和16中任意一项的抗体或者抗原结合片段；

(b)根据权利要求25到28中任意一项的可溶性Nogo受体1多肽；以及

(c)根据权利要求34到37中任意一项的融合蛋白。

57. 根据权利要求56的组合物，该组合物还包含一或更多种其他的治疗剂。

58. 促进濒临死亡的神经元存活的方法，该方法包括：使该神经元与有效量的(a) 抗Nogo受体1抗体或者抗原结合片段相接触；或者与有效量的(b) 可溶性Nogo受体1多肽相接触。

59. 权利要求58的方法，其中神经元是体外的。

60. 权利要求58的方法，其中可溶性Nogo受体1多肽是融合蛋白。

61. 权利要求60的方法，其中融合蛋白是Fc融合蛋白。

62. 权利要求61的方法，其中Fc融合蛋白是Ig-sNogoR344。

63. 权利要求58的方法，其中神经元在哺乳动物体内。

64. 权利要求 63 的方法，其中哺乳动物表现出多发性硬化症、肌萎缩性侧索硬化症、亨丁顿氏症、阿尔茨海默病、帕金森氏症、糖尿病性神经病、中风、外伤性脑损伤或脊髓损伤的征兆或者症状。

65. 促进哺乳动物体内濒临死亡的神经元存活的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 提供培养的宿主细胞，其表达

(i)抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段；或者

(ii)可溶性 Nogo 受体 1 多肽 ；

以及(b) 将该宿主细胞引入哺乳动物神经元所在位置或者附近。

66. 促进哺乳动物体内濒临死亡的神经元存活的基因治疗方法，该方法包括，在神经元所在位置或者附近施用包含核苷酸序列的病毒载体，该核苷酸序列编码：

(a)抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段；或者(b)可溶性 Nogo 受体 1 多肽，

其中在哺乳动物中该抗 Nogo 受体 1 抗体、其抗原结合片段或者可溶性 Nogo 受体 1 多肽从所述核苷酸表达足够促进神经元存活的量。

67. 抗体或者其抗原结合片段，其与 Nogo 受体 1 特异结合，其中所述的抗体或者片段包含轻链，该轻链包含选自以下序列的氨基酸序列：(a) SEQ ID NO:15 的氨基酸序列；(b)SEQ ID NO:16 的氨基酸序列；以及(c) 包含 SEQ ID NO:22,23 和 24 的 CDR1，CDR2 和 CDR3 氨基酸序列的氨基酸序列。

68. 权利要求 67 中的抗体或者抗原结合片段，它还包含重链，该重链包含选自以下序列的氨基酸序列：(a) SEQ ID NO:17 的氨基酸序列；(b)SEQ ID NO:18 的氨基酸序列；以及(c) 包含 SEQ ID NO:19、20 和 21 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 氨基酸序列的氨基酸序列。

69. 抗体或者其抗原结合片段，它与 Nogo 受体 1 特异结合，其中所述的抗体或者片段包含重链，该重链包含选自以下序列的氨基酸序列：(a) SEQ ID NO:17 的氨基酸序列；(b)SEQ ID NO:18 的氨基酸序列；以及(c) 包含 SEQ ID NO:19、20 和 21 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 氨基酸

序列的氨基酸序列。

70. 权利要求 69 中的抗体或者抗原结合片段，它还包含轻链，该轻链包含选自以下序列的氨基酸序列：(a) SEQ ID NO:15 的氨基酸序列；(b)SEQ ID NO:16 的氨基酸序列；以及(c) 包含 SEQ ID NO:22,23 和 24 的 CDR1，CDR2 和 CDR3 氨基酸序列的氨基酸序列。

NOGO 受体拮抗剂

发明领域

[0001] 本发明涉及神经生物学和分子生物学。更为具体的是，本发明涉及具有免疫原性的 Nogo 受体-1 多肽，Nogo 受体-1 抗体及其抗原结合片段，可溶性 Nogo 受体及其融合蛋白以及编码上述多肽/蛋白质的核酸。本发明进一步涉及组合物，其包含这些 Nogo 受体抗体及其抗原结合片段、具有免疫原性的 Nogo 受体-1 多肽、可溶性 Nogo 受体及其融合蛋白以及编码上述多肽/蛋白质的核酸，以及制备和使用上述多肽/蛋白质和核酸的方法。

发明背景

[0002] 神经元的轴突和树突是自神经元发出的长的细胞延伸。延伸的轴突或者神经突末端包含特化的区域，称为生长锥。生长椎感受局部环境并且指导轴突向神经元的目标细胞生长。生长椎对许多环境信号产生应答，例如表面黏连性、生长因子、神经递质和电场。在生长椎处对生长的指导涉及了多种不同类型的黏连分子、细胞间信号以及刺激和抑制生长椎的因子。正在生长的神经突其生长椎以不同的速率生长，但通常是每天一到两毫米。

[0003] 生长椎具有手的形状，具有宽而扁平的突出（微刺突或者丝状伪足），以不同方式黏附到胚胎的表面。丝状伪足一直是有活性的，有一些丝状伪足缩回到生长椎内，而其他丝状伪足继续伸长，通过基质。不同丝状伪足之间的延伸形成层形足板。

[0004] 生长椎用其层形足板和丝状伪足探查其前方及两侧的区域。当伸长接触到一个不适于生长的表面时，就会缩回。当伸长接触到一个适于生长的表面时，它就会继续延伸并且指引生长椎朝这个方向生长。生长椎可以被基质表面特性的微小变化所指引。当生长椎到达一

个适当的目标细胞时就会产生一个突触连接。

[0005] 神经细胞的功能受到其临近环境中神经元和其他细胞之间接触的巨大影响(U. Rutishauser, T. M. Jessell, Physiol. Rev. 1988, 68, p. 819)。这些细胞包括特化的神经胶质细胞、中枢神经系统内的少突神经胶质细胞、外周神经系统内的施旺细胞，该细胞用髓鞘（一种多层膜组成的绝缘结构）将神经元的轴突包住(G. Lemke, in An Introduction to Molecular Neurobiology, Z. Hall, Ed. [Sinauer, Sunderland, Mass., 1992], p. 281)。

[0006] 尽管中枢神经系统神经元具有损伤之后再生的能力，但是由于在髓鞘中存在抑制蛋白并且很可能由于这些细胞所处的局部环境中通常具有其他类型的分子，神经元的再生受到抑制 (Brittis and Flanagan, Neuron 2001, 30, pp. 11-14; Jones et al., J. Neurosci. 2002, 22, pp. 2792-2803; Grimpe et al., J. Neurosci. 2002, 22, pp. 3144-3160)。

[0007] 在少突神经胶质细胞中已经鉴别出了许多髓鞘抑制蛋白，例如NogoA(Chen et al., Nature, 2000, 403, 434-439; Grandpre et al., Nature 2000, 403, 439-444)，髓鞘相关糖蛋白(MAG, McKerracher et al, Neuron 1994, 13, 805-811; Mukhopadhyay et al, Neuron 1994, 13, 757-767)以及少突神经胶质细胞糖蛋白(OM-gp, Mikol and Stefansson, J. Cell. Biol. 1988, 106, 1273-1279)。在分别的研究中，发现这些蛋白中每一种都是神经元Nogo受体-1的配基(Wang et al., Nature 2002, 417, 941-944; Liu et al., Science, 2002, 297, 1190-93; Grandpre et al., Nature 2000, 403, 439-444; Chen et al., Nature, 2000, 403, 434-439; Domeniconi et al., Neuron, 2002, 35, 283-90)。

[0008] Nogo受体1是一种糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定的膜蛋白，它含有8个富含亮氨酸的重复(Fournier et al., Nature 2001, 409, 341-346)。在与抑制蛋白（例如NogoA，MAG和OM-gp）发生相互作用时，Nogo受体1复合物转导信号，导致生长椎萎陷且神经突向外生长受

到抑制。

[0009] 现在迫切需要抑制 Nogo 受体 1 与其配基结合且减弱髓鞘介导的生长椎萎陷及对神经突向外生长的抑制的分子。

发明概述

[0010] 本发明涉及可溶性 Nogo 受体 1 多肽和含有这些多肽的融合蛋白，以及针对 Nogo 受体 1 的特异免疫原性区域的抗体及其抗原性片段。本发明还涉及与本发明抗体结合的免疫原性的 Nogo 受体 1 多肽。本发明还涉及编码本发明中多肽的核酸、载体和包含这些核酸的宿主细胞，以及制备这些多肽的方法。本发明中的抗体、可溶性受体和受体融合蛋白拮抗或者阻断 Nogo 受体 1，并且用于抑制 Nogo 受体 1 与其配基的结合、抑制神经元中生长椎的萎陷以及降低神经元内神经突向外生长或者出芽的抑制。

[0011] 在一些实施方案中，本发明提供免疫原性的多肽，该多肽选自：SEQ ID NO:1，SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5。

[0012] 在一些实施方案中，本发明提供编码所述免疫原性多肽的核酸、包含所述核酸的载体和包含所述核酸或者载体的宿主细胞。在一些实施方案中，核酸与一段表达调控序列操作性地相连接。

[0013] 在一些实施方案中，本发明提供制备免疫原性多肽的方法，该方法包括以下步骤：(a) 培养包含编码免疫原性多肽的核酸或者含上述核酸的载体的宿主细胞；以及 (b) 从宿主细胞或者培养基中回收多肽。

[0014] 在一些实施方案中，本发明提供制备与 Nogo 受体 1 特异结合的抗体的方法，该方法包括以下步骤：(a)用选自 SEQ ID NO:1，SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO: 5 的多肽或表达所述多肽的宿主细胞免疫宿主；和(b) 收获抗体。在一些实施方案中，抗体或者其抗原结合片段是通过这种方法制备的。在一些实施方案中，抗体或者其抗原结合片段与选自下面的多肽发生特异结合：SEQ ID

NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5。在一些实施方案中，抗体或者抗原结合片段(a)抑制神经元生长椎的萎陷；(b) 降低神经元内对于神经突向外生长和出芽的抑制；以及(c) 抑制 Nogo 受体 1 与配基结合。在一些实施方案中，抗体或者抗原结合片段促进濒临死亡的神经元存活。在一些实施方案中，濒临死亡的神经元是动物（例如哺乳动物）的神经元。在一些实施方案中，神经突向外生长和出芽是轴突生长。在一些实施方案中，神经元是中枢神经系统神经元。

[0015] 在一些实施方案中，抗体或者抗原结合片段是单克隆抗体。在一些实施方案中，抗体或者抗原结合片段是小鼠抗体。在一些实施方案中，抗体是人源化抗体、嵌合抗体或者是单链抗体。

[0016] 在一些实施方案中，本发明提供杂交瘤细胞系，该细胞系选自：HB 7E11 (ATCC® 登录编号 PTA-4587)，HB 1H2 (ATCC® 登录编号 PTA-4584)，HB 3G5 (ATCC® 登录编号 PTA-4586)，HB 5B10 (ATCC® 登录编号 PTA-4588) 和 HB 2F7 (ATCC® 登录编号 PTA-4585)。在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段由该杂交瘤细胞生产。

[0017] 在一些实施方案中，抗体或者其抗原结合片段包含轻链，该轻链的氨基酸序列选自：(a)SEQ ID NO:15 的氨基酸序列；(b) SEQ ID NO:16 的氨基酸序列和(c)包含 SEQ ID NO:22, 23 和 24 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体或者其抗原结合片段包含重链，该重链的氨基酸序列选自：(a)SEQ ID NO:17 的氨基酸序列；(b) SEQ ID NO:18 的氨基酸序列和(c)包含 SEQ ID NO:19, 20 和 21 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中，本发明提供编码所述抗体或者其抗原结合片段的核酸。在一些实施方案中，所述核酸与表达调控序列操作性相连接。在一些实施方案中，本发明提供包含所述核酸的载体。在一些实施方案中，本发明提供包含所述核酸的宿主细胞或者包含含所述核酸的载体的宿主细胞。

[0018] 在一些实施方案中，抗体或者其抗原结合片段竞争性抑制由杂交瘤细胞系产生的抗体与 Nogo 受体 1 结合或者与选自以下的免

疫原性多肽结合：SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5。

[0019] 在一些实施方案中，本发明提供抑制Nogo受体1与配基结合的方法，该方法包含下面的步骤：使Nogo受体1与本发明的抗体或者抗原结合片段结合。在一些实施方案中，配基选自：NogoA、NogoB、NogoC、MAG和OM-gp。

[0020] 在一些实施方案中，本发明提供抑制神经元内生长椎萎陷的方法，该方法包含下面的步骤：使神经元与本发明中的抗体或者其抗原结合片段接触。在一些实施方案中，本发明提供降低对神经元内神经突向外生长或出芽抑制的方法，该方法包含下面的步骤：使神经元与本发明中的抗体或者抗原结合片段接触。在一些实施方案中，神经元是中枢神经系统神经元。在这些方法中的一些中，神经突的生长或者出芽是轴突生长。

[0021] 在一些实施方案中，本发明提供促进濒临死亡的神经元存活的方法，该方法包含以下步骤：使神经元与有效量的(a)抗Nogo受体1抗体或者其抗原结合片段或者(b)可溶性Nogo受体1多肽接触。在一些实施方案中，可溶性Nogo受体1多肽是融合蛋白，例如Fc融合蛋白。在一些实施方案中，融合蛋白是sNogoR344-Fc蛋白。在一些实施方案中，神经元是体外神经元。在一些实施方案中，神经元位于哺乳动物体内，该哺乳动物表现例如多发性硬化症、ALS（肌萎缩性侧索硬化症）、亨丁顿氏症、阿尔茨海默病、帕金森氏症、糖尿病性神经病、中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤等疾病的征兆或者症状。

[0022] 在一些实施方案中，本发明提供促进濒临死亡的哺乳动物神经元存活的方法，该方法包括(a)提供表达(i)抗Nogo受体1的抗体或其抗原结合片段；或(ii)可溶性Nogo受体1多肽的培养的宿主细胞；以及(b)在哺乳动物神经元所在位置或其附近引入该宿主细胞。

[0023] 在一些实施方案中，本发明提供促进濒临死亡的哺乳动物神经元存活的基因治疗方法，该方法包括在神经元或其附近位置施用病毒载体，此载体包含编码(a)抗Nogo受体1抗体或抗原结合片段；或

(b)可溶性 Nogo 受体 1 多肽的核苷酸序列，其中的抗 Nogo 受体 1 抗体、抗原结合片段或者可溶性 Nogo 受体 1 多肽表达自哺乳动物体内的核苷酸序列，其表达量足以促进神经元的存活。

[0024] 在一些实施方案中，本发明提供基本上由 Nogo 受体 1 的 N 端结构域（NT）、8 个富含亮氨酸的重复结构域（LRR）和 LRR C 端结构域(LRRCT)组成的可溶性 Nogo 受体 1 多肽。在一些实施方案中，所述的可溶性 Nogo 受体 1 多肽与一段信号序列相连接。在一些实施方案中，LRR 包含异源 LRR。在一些实施方案中，本发明提供的可溶性 Nogo 受体 1 多肽选自：SEQ ID NO:6 的 26-344 氨基酸残基，SEQ ID NO:7 的 26-310 氨基酸残基，SEQ ID NO:8 的 26-344 氨基酸残基，SEQ ID NO:9 的 26-310 残基，SEQ ID NO:8 的 27-344 残基，以及 SEQ ID NO: 9 的 27-310 残基。在一些实施方案中，本发明提供编码所述可溶性 Nogo 受体 1 多肽的核酸。在一些实施方案中，核酸与表达调控序列操作性相连接。在一些实施方案中，本发明提供包含所述核酸的载体。在一些实施方案中，本发明提供包含所述核酸的宿主细胞或者含有所述核酸的载体的宿主细胞。

[0025] 在一些实施方案中，本发明提供制备本发明中可溶性 Nogo 受体 1 多肽的方法，包括以下步骤(a)培养包含编码可溶性 Nogo 受体 1 多肽的核酸的宿主细胞或者包含含有所述核酸的载体的宿主细胞；和(b)从宿主细胞或者培养基中回收多肽。

[0026] 在一些实施方案中，本发明提供包含可溶性 Nogo 受体 1 和异源多肽的 Nogo 受体 1 融合蛋白。在一些实施方案中，可溶性 Nogo 受体 1 多肽基本上是由 Nogo 受体 1 的 N 端结构域（NT）、8 个富含亮氨酸的重复结构域（LRR）和 LRR C 端结构域（LRRCT）组成。在一些实施方案中，可溶性 Nogo 受体 1 多肽与一段信号序列相连接。在一些实施方案中，LRR 包含异源 LRR。在一些实施方案中，Nogo 受体 1 融合蛋白包含的多肽选自：SEQ ID NO:6 的 26-344 氨基酸残基，SEQ ID NO:7 的 26-310 氨基酸残基，SEQ ID NO:8 的 26-344 氨基酸残基，SEQ ID NO:9 的 26-310 残基，SEQ ID NO:8 的 27-344 残基，以及 SEQ ID NO: 9 的

27-310 残基。在一些实施方案中，异源多肽包含免疫球蛋白的恒定区。在一些实施方案中，免疫球蛋白恒定区是免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中，免疫球蛋白重链恒定区是 IgG 重链恒定区。在一些实施方案中，异源多肽是 Fc 区。在一些实施方案中，Nogo 受体 1 融合蛋白是一个二聚体。

[0027] 在一些实施方案中，本发明提供编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸。在一些实施方案中，将编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸与一段表达调控序列操作性相连接。

[0028] 在一些实施方案中，本发明提供包含编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸的载体。

[0029] 在一些实施方案中，本发明提供宿主细胞，该宿主细胞包含编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸或者包含一个载体，此载体含有编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸。

[0030] 在一些实施方案中，本发明提供制备 Nogo 受体 1 融合蛋白的方法，该方法包括以下步骤(a)培养包含编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸的宿主细胞或者包含含有上述核酸的载体的宿主细胞；以及(b)从宿主细胞或者培养基中回收 Nogo 受体 1 融合蛋白。

[0031] 在一些实施方案中，本发明提供抑制 Nogo 受体 1 与配基结合的方法，包含下面的步骤：使配基与可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者与本发明中的 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。

[0032] 在一些实施方案中，本发明提供调节 Nogo 受体 1 配基的活性的方法，包括下面的步骤：使 Nogo 受体 1 的配基与本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者与 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。

[0033] 在一些实施方案中，本发明提供抑制神经元中生长椎蒌陷的方法，包括下面的步骤：使 Nogo 受体 1 配基与本发明中的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者与 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。在一些实施方案中，本发明提供神经元内神经突向外生长或者出芽的抑制的方法，包括下面的步骤：使 Nogo 受体 1 配基与本发明中的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。在一些实施方案中，神经元是中枢

神经系统神经元。在一些实施例中，配基选自：NogoA、NogoB、NogoC、MAG 和 OM-gp。在一些实施方案中，神经突向外生长或者出芽是轴突生长。

[0034] 在一些实施方案中，本发明提供组合物，它包含药物上可以接受的载体以及选自以下(a)至(c)的组分：(a)根据本发明的抗体或者抗原结合片段；(b)根据本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽；以及(c)根据本发明的 Nogo 受体 1 融合蛋白。在一些实施方案中，组合物还包括一种或者多种额外的治疗剂。

附图概述

[0035] 图 1 是 Nogo 受体 1 结构的示意图。人 sNogoR310 包含残基 26-310，而 sNogoR344 包含 26-344 残基。大鼠 sNogoR310 包含残基 27-310，而 sNogoR344 包含 27-344 残基。

[0036] 图 2 是利用 Vector Nti™ 软件描绘的 Nogo 受体 1 蛋白的抗原性曲线。大鼠 P-617 是 SEQ ID NO:10，而大鼠 P-618 是 SEQ ID NO:11。

[0037] 图 3A 描绘的是抗 Nogo 受体 1 抗体，7E11 的结合活性。该图给出了 7E11 的浓度对于 Nogo66 与 Nogo 受体 1 结合的影响。图 3B 描绘的是抗 Nogo 受体 1 抗体，1H2 的结合活性。该图给出了 1H2 的浓度对于 Nogo66 与 sNogoR344-Fc（在此以及在美国专利申请 60/402,866 中也被称为 Fc-sNogoR344 或者 Ig-sNogoR344）。Fc-MAG 不与 Nogo66 竞争同 sNogoR344-Fc 的结合。

[0038] 图 4 描绘的是抗 Nogo 受体 1 抗体 1H2、3G5 和 2F7 的 ELISA 结果。实验确定了在固定化抗原的存在下抗体对 OD_{450} 的影响。固定化抗原是 sNogoR310-Fc（在此以及在美国专利申请 60/402,866 中也被称为 Fc-sNogoR310 或者 Ig-sNogoR310），sNogoR344-Fc，p-617，p-618，p-4，p-5 以及卵清蛋白和 BSA。

[0039] 图 5 描绘的是在不同含量的髓鞘存在的条件下，单克隆抗体 7E11 对于大鼠 DRG 神经突向外生长的影响。

[0040] 图 6A 描绘了在以下竞争剂：Nogo66，Nogo40 和抗 Nogo 受体 1 单克隆抗体上清存在的条件下对 sNogoR310 与 ^{125}I-Nogo66 和 ^{125}I-Nogo40 结合的影响。图 6B 描绘了 ^{125}I-Nogo66 与 sNogoR310 的结合活性。

[0041] 图 7 描绘了 sNogoR310-Fc 对于 ^{125}I-Nogo40 与 sNogoR310 结合的影响。

[0042] 图 8 描绘了 sNogoR310-Fc 与 ^{125}I-Nogo40 的结合活性。

[0043] 图 9A 给出了在髓鞘存在或者不存在的情况下 sNogoR310 对于每个细胞的神经突向外生长的影响。图 9B 给出了在髓鞘存在或者不存在的情况下 sNogoR310 对于神经突向外生长的影响。

[0044] 图 10A 描绘了存在或者不存在髓鞘含量增加的情况下 sNogoR310-Fc 对于 P4 大鼠 DRG（背根神经节）神经突向外生长的影响。图 10B 描绘了在使用 PBS、PBS + sNogoR310-Fc，20 纳克 髓鞘以及髓鞘 + sNogoR310-Fc 处理之后每个细胞中神经突的数目。

[0045] 图 11 描述了在髓鞘含量增加的情况下单克隆抗体 5B10 对于每个细胞的 DRG 神经突向外生长的影响。

[0046] 图 12 描绘了在大鼠脊髓模切模型中诱导损伤之后直至 30 天时 sNogoR310-Fc 对于 BBB 评分的影响。

[0047] 图 13A 和 13B 给出的是在野生型或者转基因小鼠 08 或者 01 品系中进行背部半切断之后运动功能 BBB 评分作为时间的函数。图 13C 表示了在野生型或者转基因小鼠损伤之后最大可承受的斜板角度作为时间的函数。图 13D 显示了在倾斜格栅爬行试验中后肢错误作为损伤后时间的函数。在所有的图中给出的数据是每组 7-9 只小鼠的平均值 ± 平均标准误差。转基因组的数值与野生型小鼠的数值有统计学差异。（两个星号，$P < 0.01$；Student’s t-检验）。

[0048] 图 14A 显示了在使用载体或者 sNogoR310-Fc 处理的动物中进行背部半切断之后，运动功能 BBB 评分作为时间的函数。图 14B 显示了损伤之后在格栅行走中后肢错误作为时间的函数。图 14C 显示了脚印分析，揭示了与未受损伤的小鼠或者受到损伤的且给予

sNogoR310-Fc 的大鼠相比，在对照小鼠中，步幅的长度缩短，宽度变长。在所有的图中给出的数据是每组 7-9 只大鼠的平均值 ± s.e.m.。sNogoR310-Fc 组的数值与对照的数值有统计学差异（图 14A-B）。对照数值与没有脊髓损伤或者脊髓损伤且给予 sNogoR310-Fc 小鼠的数值有统计学差异（图 14C）。（星号，$p< 0.05$; 两个星号，$P < 0.01$; Student's t-检验）。

本发明详述

定义以及一般技术

[0049] 除了不同的定义以外，这里使用的所有技术和科学术语都与本发明所属的领域内具有普通技术的人员通常理解的含义相同。如果有冲突，以包含定义在内的本申请为准。而且，除非上下文有特别的要求，单数术语包括复数，复数术语也包括单数。一切出版物、专利和这里提到的其他参考文献被完整引用作为参考，用于所有的目的。

[0050] 尽管可以在实践中或者试验本发明时使用与这里的描述相似或相同的材料和方法，下面仍然描述适宜的方法和材料。材料、方法和实例仅仅是例证性的，其目的不是要给出限制。本发明的其他特点和优点将会在详述和权利要求中显现出来。

[0051] 在本说明书和权利要求中，“包含”一词其含义应该被理解为要包括所述的一个整体或者整体的组，而不是不包括其他的任何整体或者整体组。

[0052] 这里提供以下的术语和定义，以更详细地阐述本发明。

[0053] 正如在这里所使用的，“抗体”的含义是完好的免疫球蛋白，或者是其抗原结合片段。本发明的抗体可以是任何同种型或者类(例如 M, D, G, E 和 A)或者是任何亚类（例如 G1-4, A1-2），并且可以具有 κ 或 λ 轻链。

[0054] 正如在这里所使用的，"Fc"的含义是通过木瓜蛋白酶降解可以得到的抗体重链恒定区的那一部分。

[0055] 正如在这里所使用的，“NogoR 融合蛋白”的含义是包

含与异源多肽融合的 Nogo 受体 1 的可溶性部分的蛋白质。

[0056] 正如在这里所使用的，“人源化抗体”的含义是指抗体中至少一部分的非人序列被人的序列所代替。如何制备人源化抗体的例子可以在美国专利 6,054,297, 5,886,152 和 5,877,293 中找到。

[0057] 正如在这里所使用的，“嵌合抗体”的含义是抗体中含有第一抗体的一个或者更多区域以及至少另外一个抗体的一或者更多区域。第一个抗体和另外的抗体可以来源于相同或者不同的物种。

[0058] 正如在这里以及在美国专利申请 60/402,866 中所使用的，"Nogo 受体," "NogoR," “NogoR-1,” “NgR,” 和 “NgR-1” 的含义都是 Nogo 受体 1。

免疫原性的 Nogo 受体 1 多肽

[0059] 一方面本发明涉及免疫原性的 Nogo 受体 1 多肽。在本发明的一些实施方案中，具有免疫原性的多肽基本上由选自下列的氨基酸序列构成：LDLSDNAQLRVVDPTT （大鼠） (SEQ ID NO: 1); LDLSDNAQLRSVDPAT （人） (SEQ ID NO: 2); AVASGPFRPFQTNQLTDEELLGLPKCCQPDAADKA （大鼠） (SEQ ID NO: 3); AVATGPYHPIWTGRATDEEPLGLPKCCQPDAADKA （人） (SEQ ID NO: 4); 和 CRLGQAGSGA （小鼠） (SEQ ID NO: 5).

[0060] 在一些实施方案中，本发明涉及核酸，该核酸编码 SEQ ID NO: 1-5 中的多肽。在本发明的一些实施方案中，核酸分子与表达调控序列（例如 pCDNA(I)）相连。

[0061] 本发明还涉及载体，该载体包含编码本发明的免疫原性多肽的核酸。在本发明的一些实施方案中，载体是克隆载体。在本发明的一些实施方案中，载体是表达载体。在本发明的一些实施方案中，载体含有至少一个选择性标记。

[0062] 本发明还涉及宿主细胞，这些宿主细胞包含以上描述核酸或载体。

[0063] 本发明还涉及制备本发明的免疫原性多肽的方法，该方

法包括培养宿主细胞的步骤。在一些实施方案中，宿主细胞是原核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞是真核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞是酵母。

抗体

[0064] 本发明还涉及与本发明的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽特异结合的抗体或者其抗原结合片段。在一些实施方案中，抗体或者抗原结合片段与多肽结合，该多肽基本上由选自 SEQ ID NO: 1-5 的氨基酸序列构成。本发明中的抗体或者抗原结合片段可以在体内或者体外制备。以下讨论抗体或者抗原结合片段的制备。

[0065] 本发明的抗体或者其抗原结合片段抑制 Nogo 受体 1 与配基（例如 NogoA, NogoB, NogoC, MAG, OM-gp）的结合并降低髓鞘介导的对神经突向外生长和出芽（特别是轴突生长）的抑制，且减弱髓鞘介导的生长椎萎陷。

[0066] 在一些实施方案中，抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段是鼠的。在一些实施方案中，Nogo 受体 1 来自大鼠。在另一些实施方案中 Nogo 受体 1 是人的。在一些实施方案中抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段是重组的、工程化的、人源化的和/或嵌合的。

[0067] 在一些实施方案中，抗体选自：单克隆抗体 7E11 (ATCC® 登录号 PTA-4587)；单克隆抗体 1H2 (ATCC® 登录号 PTA-4584)；单克隆抗体 2F7 (ATCC® 登录号 PTA-4585)；单克隆抗体 3G5 (ATCC® 登录号 PTA-4586)；以及 单克隆抗体 5B10 (ATCC® 登录号 PTA-4588)。在一些实施方案中，抗体是多克隆抗体 46。

[0068] 有代表性的抗原结合片段是 Fab, Fab′, $F(ab')_2$, Fv, Fd, dAb 以及含有互补决定区片段的片段、单链抗体 (scFv)、嵌合抗体、双抗体和含有至少部分免疫球蛋白的多肽，这部分免疫球蛋白足以使得多肽具有特异的抗原结合（例如免疫粘合素）。

[0069] 正如在这里所使用的，Fd 是指由 V_H 和 C_{H1} 结构域构成的片段；Fv 是指由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域构成的片段。dAb 是指是由

V_H结构域构成的片段(Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)。正如在这里所使用的，单链抗体(scFv)的含义是指其中 V_L区和 V_H区通过合成的连接物配对形成单价分子的抗体，该连接物使得 V_H区和 V_L区成为一个蛋白单链(Bird et al., Science 242:423-426, 1988 和 Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988)。正如在这里所使用的，双抗体的含义是指双特异性抗体，其中 V_H和 V_L结构域在一个多肽单链上表达，但是使用的连接物很短，不能使两个结构域在同一条链上配对，这样就迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参加例如 Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, 以及 Poljak, R. J., et al., Structure 2:1121-1123, 1994)。正如在这里所使用的，与目的抗原特异结合的免疫粘合素是指其中可以共价或者非共价地结合一或者多个互补决定区（CDR）的分子。

[0070] 在一些实施方案中，本发明提供本发明的 Nogo 受体 1 抗体的一个亚基多肽，其中的亚基多肽选自：(a)重链或者其可变区；和(b)轻链或者其可变区。

[0071] 在一些实施方案中，本发明提供核酸，该核酸编码属于本发明中 Nogo 受体 1 抗体的一个亚基多肽的重链或其可变区，或者此亚基多肽的轻链或其可变区。

[0072] 在一些实施方案中，本发明提供一个本发明中的 Nogo 受体 1 抗体高变区（CDR）或者编码 CDR 的核酸。

免疫接种

[0073] 本发明的抗体可以通过免疫接种合适的宿主(例如脊椎动物，包括人、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛、马、爬行动物、鱼、两栖动物以及在禽类、爬行动物和鱼的卵中）而产生。这样的抗体可以是多克隆或者单克隆的。

[0074] 在一些实施方案中，使用本发明中具有免疫原性的 Nogo 受体 1 多肽免疫宿主。在另一些实施方案中，使用与完好或者破裂细胞

的细胞膜相联的Nogo受体1免疫宿主,通过与本发明的免疫原性的Nogo受体1多肽的结合来鉴别本发明的抗体。

[0075] 在一些实施方案中，Nogo 受体 1 抗原与佐剂一起施用以刺激免疫应答。通常除了抗原之外还需要施用佐剂以诱导对于抗原的免疫应答。这些佐剂通常是不溶的或者是不能降解的物质，可以引起非特异的炎症，吸引单核巨噬细胞到达免疫接种位置。佐剂的实例包括，但是不止限于，弗氏佐剂，RIBI（胞壁酰二肽）、ISCOM（免疫刺激复合物）或者其片段。

[0076] 参见例如 Harlow 和 Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Yelton, D.E. et al. (1981); Ann. Rev. of Biochem., 50, pp. 657-80., 和 Ausubel et al. (1989); Current Protocols in Molecular Biology (New York: John Wiley & Sons) 综述的制备抗体的方法。确定与本发明的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽发生反应的免疫反应性，可以使用本领域内众所周知的许多方法，包括例如，免疫印迹检测和 ELISA。

抗体的制备和产生抗体的细胞系

[0077] 本发明的单克隆抗体可以通过如Harlow和Lane (1988), (在前) 中描述的标准方法制备。

[0078] 概括的讲，在适当的时间处死动物，通过本领域内众所周知的一种方法使淋巴结和/或脾脏 B 细胞无限增殖，这些方法包括，但是不限于，转化例如使用 EBV 或者与无限增殖细胞系例如骨髓瘤细胞融合。之后将细胞分为单个的克隆，检测每一个克隆的上清是否产生了对于本发明免疫原性的 Nogo 受体 1 多肽特异的抗体。筛选、克隆和杂交瘤的扩增是本领域内众所周知的。类似的，鉴定免疫球蛋白核苷酸和氨基酸序列的方法也是本领域内已知的。

[0079] 其他制备本发明中抗体的适宜方法包括在体外使淋巴细胞与 Nogo 受体 1 接触或者与本发明的免疫原性多肽接触。另一种方法是在噬菌体或者类似载体中筛选抗体库。参见 Huse et al., Science,

246, pp. 1275-81 (1989).用于本发明中的抗体可以经过修饰或者无需修饰而使用。

[0080] 可以将抗原（这里是指 Nogo 受体 1 或者本发明中的免疫原性多肽）和抗体与可以提供可检测信号的物质进行共价或者非共价连接而对抗原和抗体进行标记。本领域内已有多种不同的标记和偶联技术，可以在实施本发明的实践中使用。适宜的标记包括，但是不只限于，放射性核苷酸、酶、底物、辅酶、抑制剂、荧光试剂、化学发光试剂、磁性粒子等等。教导如何使用这些标记的专利包括美国专利 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 和 4,366,241。而且还可以制备重组免疫球蛋白（参见美国专利 4,816,567）。

[0081] 在本发明的一些实施方案中，抗体有多种结合特异性，例如双功能抗体，它可以使用本领域内技术人员知道的众多技术（包括制备杂交瘤、二硫交换、化学交联、在两个单克隆抗体之间添加多肽连接物、向某一个细胞系中引入两组免疫球蛋白的重链和轻链，等等，参见下面更详细的讨论）来制备。

[0082] 本发明的抗体还可以是人单克隆抗体，例如那些由无限增殖的人细胞系产生的、由 SCID-hu 小鼠或者其他能够产生“人”抗体的非人动物产生。

噬菌体展示文库

[0083] 本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体可以通过筛选重组联合抗体文库筛选出来。例证性的联合文库用于与本发明的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽相结合，例如使用 V_L和 V_H cDNA（cDNA 来自免疫接种了本发明的 Nogo 受体 1 多肽的动物的 mRNA）制备的 scFv 噬菌体展示文库。制备和筛选这种文库的方法是本领域内已知的。有商品化的用于制备噬菌体展示文库的材料和方法。（例如 the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 目录号 27-9400-01; the Stratagene SurfZAP™ phage display 试剂盒, 目录号 240612; 以及其他来自 MorphoSys 的

试剂盒)。还有其他可以用于制备和筛选抗体展示文库的方法和试剂(参见例如 Ladner et al. 美国专利 5,223,409; Kang et al. PCT 公开文本 WO 92/18619; Dower et al. PCT 公开文本 WO 91/17271; Winter et al. PCT 公开文本 WO 92/20791; Markland et al. PCT 公开文本 WO 92/15679; Breitling et al. PCT 公开文本 WO 93/01288; McCafferty et al. PCT 公开文本 WO 92/01047; Garrard et al. PCT 公开文本 WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19:4133-4137; and Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.)。

[0084] 从重组免疫球蛋白展示文库中筛选和分离出本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体之后，可以从展示的噬菌体中（例如从噬菌体基因组中）回收编码所选抗体的核酸，并通过标准的重组 DNA 技术将其亚克隆到其他表达载体中。如果需要的话，还可以进一步对核酸进行处理，以制备本发明中的其他抗体形式，如下所述。为了表达通过筛选联合文库分离出的抗体，将编码该抗体重链和轻链或者轻链和重链的可变区的 DNA 克隆入重组表达载体，并将该载体引入哺乳动物宿主细胞，如上所述。

类别转换

[0085] 本发明中的抗 Nogo 受体 1 抗体可以是任何同种型。通过类别转换可以得到任何所需要的抗体同种型。使用本领域内众所周知的方法分离出编码 V_L 或者 V_H 的核酸，其不包括任何编码 C_L 和 C_H 的序列，用于类别转换。将编码 V_L 或者 V_H 的核酸与编码来自所需类别免疫球蛋

白分子的 C_L 或者 C_H 的核苷酸序列操作性连在一起。可以通过使用包含 C_L 或 C_H 链的载体或者核酸来实现这种连接，如上所述。例如，本发明中原来是 IgM 的抗 Nogo 受体 1 抗体可以通过类别转换变为 IgG 抗体。而且，还可以利用类别转换将一个 IgG 亚类变为另一个 IgG 亚类，如从 IgG1 转变为 IgG2。

突变的抗体

[0086] 在另一些实施方案中，本发明的抗体或抗原结合片段可以在重链和/或轻链的可变区结构域发生突变，以改变抗体的结合特性。例如，可以在一个或者更多 CDR 区内进行突变，以升高或者降低抗体对 Nogo 受体 1 的 K_d 值，升高或降低 K_{off} 值，或者改变抗体的结合特异性。位点特异突变技术是本领域内众所周知的。参见例如 Sambrook et al. 和 Ausubel et al.，在前。在一个优选实施方案中，在一个氨基酸残基上进行突变，已知该残基与生殖系相比，在本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体的可变区中发生了改变。在一些实施方案中，在一个或多个氨基酸残基上进行突变，已知这些残基与生殖系相比，在本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体的可变区相比发生了改变。在另一个实施方案中，在一个或者多个构架区内编码抗体重链或者轻链可变区的核酸发生突变。可以在构架区或者恒定区结构域内进行突变以提高半衰期。在构架区或者恒定区结构域内的突变还可以改变抗体的免疫原性，为抗体共价或者非共价结合另一个分子提供一个位点，或者改变例如补体结合的特性。在单突变抗体中的每一个构架区、恒定结构域和可变区都可以进行突变。突变也可以仅出现在单突变抗体中构架区、恒定结构域和可变区中的一个上。

融合抗体和免疫粘合素

[0087] 在另一个实施方案中，可以制备融合抗体或者免疫粘合素，它包含与另一个多肽相连的本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体的全部或者一部分。在一些实施方案中，只有抗 Nogo 受体 1 抗体的可变区与多肽相连。在另一些实施方案中，本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体的 V_H 结构

域与第一个多肽相连，而该抗体的 V_L 结构域与第二个多肽相连，这个多肽与第一个多肽相结合，其结合方式使得 V_H 和 V_L 结构域相互作用形成抗体结合位点。在其他实施方案中，V_H 结构域和 V_L 结构域被一个连接物分开，该连接物使得 V_H 和 V_L 结构域相互作用（参见下面的单链抗体部分）。然后将 V_H-连接物-V_L 抗体与目标多肽相连。融合抗体用于指导多肽进入表达 Nogo 受体 1 配基的细胞或者组织中。目标多肽可以是治疗剂，例如毒素，或者是诊断剂，例如可以很容易显现的酶，如辣根过氧化物酶。此外，融合抗体还可以利用两条（或者更多）单链抗体相互连接而产生。如果需要在一个单多肽链上产生一个二价或者多价抗体，或者制备一个双特异性抗体，上述方法是有用的。

单链抗体

[0088] 本发明包括与本发明的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽结合的单链抗体(scFv)。制备 scFv 时，将编码 V_H 和 V_L 的 DNA 与编码柔性连接物例如氨基酸序列 $(Gly_4\text{-}Ser)_3$ 的 DNA 操作性相连，这样 V_H 和 V_L 序列可以被表达为一个不间断的单链蛋白，其中 V_L 和 V_H 区由一个柔性连接物连接（参见例如 Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554）。如果仅仅使用一个 V_H 和一个 V_L 则单链抗体可以是单价的；如果使用两个 V_H 和两个 V_L 则单链抗体可以是二价的；如果使用了两个以上的 V_H 和 V_L，则单链抗体可以是多价的。

嵌合抗体

[0089] 本发明还包括双特异性抗体或者其抗原结合片段，其中一种特异性是针对本发明中的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽。在一个实施方案中，可以产生一个嵌合抗体，该抗体通过一个结合结构域与本发明的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽特异性地结合，而通过第二个结合结构域与另一个分子结合。嵌合抗体可以通过重组分子生物学技术制备，也可以物理地偶联在一起。此外，可以制备一个含有一个以上 V_H 和 V_L 的单

链抗体，该抗体与一个根据本发明的免疫原性多肽特异性地结合，还与另一个分子结合，这个分子与减弱髓鞘介导的生长椎蒌陷和降低对神经突向外生长和出芽的抑制有关。这种双特异性抗体可以使用众所周知的技术来制备，例如 Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994) 和 Wright 和 Harris, 在前，并且连同(iii) 参见例如 Traunecker et al. Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52 (1992).

[0090] 在一些实施方案中，使用本发明抗体的一个或者更多可变区制备嵌合抗体。在另一个实施方案中，使用所述抗体的一个或者更多 CDR 区制备嵌合抗体。

衍生化的和标记的抗体

[0091] 可以对本发明的抗体或抗原结合片段进行衍生化，或者将其与另一个分子（例如另一个多肽或者蛋白质）相连。一般来说，抗体和抗原结合片段衍生化的结果不能使与本发明的免疫原性多肽的结合受到衍生化或者标记的负面影响。例如，本发明的一个抗体或者抗体部分可以在功能上与一个或者更多其他的分子实体相连，例如另一个抗体（如一个双特异性抗体或者双抗体）、一种检测试剂、一种细胞毒性剂、一种药剂和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子（例如抗生物素蛋白链菌素核心区或者多聚组氨酸标签）相结合的蛋白质或多肽（例如通过化学偶联、遗传融合、非共价联合或者其他方法）。

[0092] 在一些实施方案中，通过交联两个或者多个抗体（属于同一个类别或者不同类别，例如以制备双特异性抗体时）产生衍生化抗体。适宜的交联连接物包括那些异双功能试剂，即具有由适当的间隔物分开的两种显著不同的反应基团的物质（例如邻-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯）或者同双功能试剂（例如二琥珀酰亚胺基辛二酸）。这种连接物可以从 Pierce Chemical Company, Rockford, Ill 获得。

[0093] 在一些实施方案中，衍生的抗体是标记的抗体。例如，用于衍生本发明中抗体或者抗体部分的检测剂就是荧光化合物，包括荧光素，异硫氰酸荧光素，罗达明，5-二甲氨基-1-萘磺酰氯，藻红素，

镧系磷光物等。也可以将用于检测的酶用来标记抗体，例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。在使用了可以检测的酶的实施方案中，检测抗体要使用额外的试剂，酶利用这些试剂产生可以被检测到的反应产物。例如使用过氧化氢和二氨基联苯，用于辣根过氧化物酶。还可以使用生物素标记抗体，通过间接测量亲和素和抗生物素蛋白链菌素的结合来检测。还可以使用被第二报告分子（例如亮氨酸拉链对序列、二抗的结合位点、金属结合结构域、表位标签）识别的、事先确定的多肽表位来标记抗体。

[0094] 还可以使用放射性标记氨基酸标记抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原片段。放射性标记可以用于诊断或者治疗的目的。放射性标记的抗Nogo受体1抗体可以在诊断中使用，例如用于确定在对象中Nogo受体 1 的水平。而且，放射性标记的抗 Nogo 受体 1 抗体还可以在治疗中使用，用于治疗脊髓损伤。用于多肽的标记有，但不止限于，以下的放射性同位素或放射性核苷酸－－ ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I.

[0095] 抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原片段还可以通过化学基团，例如聚乙二醇（PEG）、甲基或乙基或者糖基被衍生化。这些基团对于增强抗体的生物学性质是有用的，例如增加血清的半衰期或者增加对组织的结合。

抗 Nogo 受体 1 抗体的性质

抗 Nogo 受体 1 抗体的类别和亚类

[0096] 可以使用本领域内已知的方法来确定抗 Nogo 受体 1 抗体的类别和亚类。一般来说，可以使用对于某个特定抗体类和亚类特异的抗体来确定某个抗体的类和亚类。这种抗体是商品化的。可以使用 ELISA、蛋白质印迹以及其他的技术来确定类和亚类。或者可以测定抗体重链和/或轻链恒定结构域的部分或者全部的序列，将它们的氨基酸序列与多种不同类和亚类的免疫球蛋白的已知氨基酸序列进行比较，来确定抗体的类和亚类。

抗 Nogo 受体 1 抗体与 Nogo 受体 1 的结合亲和性

[0097] 本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体与本发明的免疫原性 Nogo 受体 1 多肽的结合亲和性与解离速率可以使用本领域内已知的方法来确定。例如可以通过竞争 ELISA、RIA、BIAcore 或者 KinExA 技术来测量结合亲和性。也可以用 BIAcore 或者 KinExA 技术测量解离速率。通过表面胞质共振，使用例如 BIAcore 来测量结合亲和性和解离速率。

[0098] 7E11 和 1H2 的 K_d 被分别确定为 1×10^{-7} M 和 2×10^{-8} M。

抗 Nogo 受体 1 抗体对 Nogo 受体 1 的抑制

[0099] 在一些实施方案中，本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段抑制了 Nogo 受体 1 与配基的结合。可以通过本领域内已知的方法例如 ELISA、RIA 或者功能性拮抗来测量这种抑制的 IC_{50}。在一些实施方案中，IC_{50} 介于 0.1 和 500 nM 之间。在一些实施方案中，IC_{50} 介于 10 和 400 nM 之间。在另一些实施方案中，抗体或者其部分的 IC_{50} 介于 60 和 400 nM 之间。在一次结合试验中确定 7E11 和 1H2 的 IC_{50} 分别为 400nM 和 60nM。参见表 3，在后面。

[0100] 总之，如果为本领域内的技术人员根据本发明的教导，有许多不同的方法，可以用来改变本发明抗体的生物学特性，这些方法包括提高或者降低给定抗体分子的稳定性或半衰期、免疫原性、毒性、亲和性或产量的方法，或者以任何其他方式改变抗体使其更加适合于某一个特别的应用。

[0101] 下面描述包含本发明抗体的组合物以及本发明抗体的应用

可溶性 Nogo 受体 1 多肽

蛋白质

[0102] 全长的 Nogo 受体 1 由信号序列、N 端区域（NT）、8 个

富含亮氨酸的重复（LRR），LRRCT 区（8 个富含亮氨酸的重复的富含亮氨酸的重复结构域 C 端）、C 端区（CT）和 GPI 锚定物组成（参见图 1）。

[0103] 本发明的一些实施方案提供可溶性的 Nogo 受体 1 多肽。本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽包含 NT 结构域、8 个 LRR 和一个 LRRCT 结构域但是没有信号序列和功能性的 GPI 锚定物（即没有 GPI 锚定物，或者有一个不能有效与细胞膜结合的 GPI 锚定物）。

[0104] 在一些实施方案中，可溶性 Nogo 受体 1 多肽包含异源的 LRR。在一些实施方案中，可溶性 Nogo 受体 1 多肽包含 2, 3, 4, 5, 6, 7 或者 8 个异源的 LRR。异源 LRR 是指来自于 Nogo 受体 1 以外的另一个蛋白的 LRR。异源 LRR 的来源蛋白质的示例有 toll 样受体（TLR1.2）；T 细胞活化富含亮氨酸重复的蛋白；deceorin；OM-gp;胰岛素样的生长因子结合蛋白酸性不稳定亚基 slit 和 robo；以及 toll 样受体 4。

[0105] 在一些实施方案中，本发明提供 319 氨基酸长的可溶性 Nogo 受体 1 多肽(可溶性 Nogo 受体 1 344, sNogoR1-344, 或 sNogoR344)（SEQ ID NO: 6 和 8 的 26-344 残基或者 SEQ ID NO: 8 的 27-344 残基）。在一些实施方案中，本发明提供 285 氨基酸长的可溶性 Nogo 受体 1 多肽(可溶性 Nogo 受体 1 310, sNogoR1-310, 或 sNogoR310) (SEQ ID NO: 7 和 9 的 26-310 残基或者 SEQ ID NO: 9 的 27-310 残基)。见图 1。

表 1. 人和大鼠的 Nogo 受体 1 多肽的序列

SEQ ID NO: 6 (人 1-344)	MKRASAGGSRLLAWV$_L$WLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAV PVGIPAASQRIFLHGNRISHVPAASFRACRNLTILWLHSNV$_L$ARIDAAAFT GLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHGLGRLHTLHLDRCGLQELGPGLFRGL AALQYLYLQDNALQALPDDTFRDLGNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSL DRLLLHQNRVAHV$_H$PHAFRDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQYL RLNDNPWVCDCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGRDLKRLAANDL QGCAVATGPYHPIWTGRATDEEPLGLPKCCQPDAADKA
SEQ ID NO: 7 (人 1-310)	MKRASAGGSRLLAWV$_L$WLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAV PVGIPAASQRIFLHGNRISHVPAASFRACRNLTILWLHSNV$_L$ARIDAAAFT GLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHGLGRLHTLHLDRCGLQELGPGLFRGL AALQYLYLQDNALQALPDDTFRDLGNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSL DRLLLHQNRVAHV$_H$PHAFRDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQYL RLNDNPWVCDCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGRDLKRLAANDL QGCA
SEQ ID NO: 8 (大鼠 1-344)	MKRASSGGSRLPTWV$_L$WLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSRPQQGLQAV PAGIPASSQRIFLHGNRISYVPAASFQSCRNLTILWLHSNALAGIDAAAFT GLTLLEQLDLSDNAQLRVVDPTTFRGLGHLHTLHLDRCGLQELGPGLFRGL AALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLGNLTHLFLHGNRIPSVPEHAFRGLHSL DRLLLHQNHVARV$_H$PHAFRDLGRLMTLYLFANNLSMLPAEV$_L$VPLRSLQYLR LNDNPWVCDCRARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLAGRDLKRLATSDLE GCAVASGPFRPFQTNQLTDEELLGLPKCCQPDAADKA
SEQ ID NO: 9 (大鼠 1-310)	MKRASSGGSRLPTWV$_L$WLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSRPQQGLQAV PAGIPASSQRIFLHGNRISYVPAASFQSCRNLTILWLHSNALAGIDAAAFT GLTLLEQLDLSDNAQLRVVDPTTFRGLGHLHTLHLDRCGLQELGPGLFRGL AALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLGNLTHLFLHGNRIPSVPEHAFRGLHSL DRLLLHQNHVARV$_H$PHAFRDLGRLMTLYLFANNLSMLPAEV$_L$VPLRSLQYLR LNDNPWVCDCRARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLAGRDLKRLATSDLE GCA

〔我们是否应该在这个表格中加上全长的和1-310氨基酸的小鼠序列？〕

[0106] 在本发明的一些实施方案中，使用本发明的可溶性Nogo受体1多肽抑制配基与Nogo受体1的结合，可溶性Nogo受体1多肽作为Nogo受体1配基的拮抗剂。在本发明的一些实施方案中，使用本发明的可溶性Nogo受体1多肽来降低对神经元内部神经突向外生长和出芽（例如轴突生长）的抑制，用来抑制髓鞘介导的神经元内的生长椎萎陷。在本发明的一些实施方案中，神经元是中枢神经系统神经元。

[0107] 令人惊奇的是，sNogoR310和sNogoR344阻碍NogoA，NogoB，NogoC，MAG和OM-gp与Nogo受体1的结合。

[0108] 在一些实施方案中，本发明的可溶性Nogo受体1多肽是融合蛋白的组分，该融合蛋白还包括异源多肽。在一些实施方案中，异源多肽是免疫球蛋白的恒定结构域。在一些实施方案中，免疫球蛋白的恒定结构域是重链恒定结构域。在一些实施方案中，异源多肽是Fc片段。在一些实施中，Fc与本发明的可溶性Nogo受体1多肽的C末端连接。在一些实施中，融合的Nogo受体1蛋白是一个二聚体。

本发明的核酸分子

[0109] 本发明提供了编码本发明中多肽的核酸，该多肽包括SEQ ID NO:1-9中任何一个多肽。在一些实施方案中，核酸编码的多肽选自：SEQ ID NO:6和8所示的Nogo受体1的26-344氨基酸残基，SEQ ID NO:8所示的Nogo受体1的27-344氨基酸残基。在一些实施方案中，核酸分子编码的多肽选自:SEQ ID NO:7和9所示的Nogo受体1的26-310残基或SEQ ID NO:9所示的Nogo受体1的27-310残基。正如这里所使用的，“核酸”指的是基因组DNA、cDNA、mRNA和反义分子，以及以另一条主链为基础的核酸或者包括了来自天然或者合成的其他碱基。在一些实施方案中，核酸还包括了转录启动子，及可选的信号序列，其操作性地与编码本发明多肽的核苷酸序列相连。

[0110] 在一些实施方案中，本发明提供编码本发明中 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸。在一些实施方案中，核酸编码本发明的 Nogo 受体 1 融合蛋白，其包括包含选自以下的多肽的融合蛋白：SEQ ID NO: 6 和 8 所示的 Nogo 所体 1 的 26-344 氨基酸残基或 SEQ ID NO:8 所示的 Nogo 受体 1 的 27-344 氨基酸残基和 SEQ ID NO:7 和 9 所示的 Nogo 受体 1 的 26-310 残基或 SEQ ID NO:9 显示的 Nogo 受体 1 的 27-310 残基。在一些实施方案中，编码 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸还包括了转录启动子，及可选的信号序列。在一些实施方案中，核苷酸序列还编码免疫球蛋白恒定区。在一些实施方案中，免疫球蛋白恒定区是重链恒定区。在一些实施方案中，核苷酸序列还编码与铰链区相连的免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中，核酸还编码 Fc。在一些实施方案中，Nogo 受体 1 融合蛋白包含 Fc 片段。

[0111] 本发明的编码核酸还可以被进一步修饰使其包含用于诊断和探针目的的可检测标记。在本领域内已知有多种这样的标记，并且可以很容易地用于这里描述的编码分子。适宜的标记包括，但不止限于，生物素、放射性标记核苷酸等。一个熟练的技术人员可以运用本领域内任何已知的标记得到标记的编码核酸分子。

组合物

[0112] 在一些实施方案中，本发明提供了组合物，该组合物包含选自以下序列的免疫原性多肽：SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5.

[0113] 在一些实施方案中，本发明提供了组合物，它们包含本发明中的抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段，或者可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者融合蛋白。

[0114] 在一些实施方案中，本发明可以含有适宜的药物上可被接受的载体，载体包含赋形剂和辅助物，它们的作用是促进活性化合物被加工成为可以被作为药物使用运输到作用位点的制剂。适宜的肠胃外给药制剂包括水溶形式的活性化合物的水溶液，如可溶于水的盐。此外，

还可以施用活性化合物的悬液，如适当的油性注射悬液。适宜的亲脂溶剂或赋形剂包括脂肪油，如芝麻油或者合成的脂肪酸的酯，如乙基油酸酯或甘油三酯。含水注射悬液可以含有提高悬液黏性的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和葡聚糖。可选，悬液中还可以包含稳定剂。还可以使用脂质体包裹本发明的分子用于向细胞内的运输。示例性的“药物可接受载体”是任何及全部的溶剂、分散介质、包被物、抗菌和抗真菌剂、等渗和延迟吸收剂、以及生理上相容的类似物质、水、盐水、磷酸盐缓冲液、右旋葡萄糖、甘油、乙醇等以及上述物质的组合。在一些实施方案中，组合物包含等渗剂，例如糖、多元醇，例如甘露醇、山梨醇或者氯化钠。在一些实施方案中，组合物包含药物上可接受的物质，例如润湿剂或者少量的辅助物，例如润湿剂、乳化剂，防腐剂或缓冲剂，这些物质延长了保存期或者提高了本发明中的抗体、抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体或者融合蛋白的效力。

[0115] 本发明的组合物可以以多种不同形式存在，包括例如液态、半固态以及固态剂型，例如液态溶液（如可注射和可灌注的溶液）、分散体或者悬液。优选的剂型取决于要采用的给药方式和治疗应用。在一些实施方案中，组合物的剂型是可注射和可灌输溶液，与其他抗体对人进行被动免疫所用的组合物类似。

[0116] 组合物可以配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体或其他适于高药物浓度的规则结构。将抗 Nogo 受体 1 抗体按照要求混于所需量的适当溶剂（溶剂中含有以上列举的成分中的一种或组合）中，过滤除菌，制备成为无菌的注射用溶液。一般来说，将活性化合物与无菌的载体混和（该载体中含有碱性的分散介质，以及其他所需的以上列举的成分）制备成分散体。至于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冻干，得到活性成分的粉末以及任何额外的成分，这些成分来自于事先无菌过滤制备好的该成分的溶液。可以通过使用包被物例如卵磷脂，通过维持所需的颗粒大小（对于分散体而言），以及通过使用表面活性剂来维持溶液适宜的流动性。通过在组合物中加入延缓吸收剂，例如单硬脂酸盐和明胶来延长注射组合物的吸收。

[0117] 在一些实施方案中，可以在制备活性化合物时加入载体，此载体能够防止化合物迅速释放，例如可控的释放配方，包括植入体、透皮贴剂和微胶囊运输系统。可以使用可生物降解的、生物亲和的多聚物，例如乙烯乙酸树脂、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原磷酯和聚乳酸。许多制备这种配方的方法被专利保护并且一般是本领域内技术人员所知道的。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0118] 还可以在组合物中混入补充活性化合物。在一些实施方案中，本发明的 Nogo 受体 1 抗体或其抗原结合片段、或可溶性 Nogo 受体 1 多肽或融合蛋白可以与一种或多种额外的治疗剂共同配制和/或共同给药。

[0119] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或者“预防有效量”的本发明的抗体、抗原结合片段、多肽或融合蛋白。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间内取得所需治疗效果的有效量。Nogo 受体 1 抗体或其抗原结合片段、或可溶性 Nogo 受体 1 多肽或融合蛋白的治疗有效量可能根据个体的疾病状态、年龄、性别和体重等因素而有所不同。治疗有效量还指其中抗体、抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者 Nogo 受体融合蛋白在治疗上的有益效果超出了任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间内取得所需预防效果的有效量。通常因为给对象使用预防剂量是在发病以前或者发病的早期，所以预防有效量要低于治疗有效量。

[0120] 可以调整给药剂量以提供最佳的所需应答(例如治疗或者预防应答)。例如可以给服单个大药丸，或随时间给服数个小的剂量，或者可以根据治疗情况的迫切程度成比例地降低或者提高剂量。将肠胃外组合物配制为剂量单位形式是非常有利的，使药物的给服变得不费力。正如这里所用到的，剂量单位形式的一致性是指在物理上独立的单位，适于治疗哺乳动物对象的单位剂量，每个单位含有预定量的活性化合物，经过计算可产生所需治疗效果，还含有所需的药物载体。本发明

中剂量单位形式的具体规格直接决定于(a)抗体、抗原结合片段、可溶性受体 1 多肽或 Nogo 受体融合蛋白的独特性质以及需要达到的特定的治疗或预防效果，和(b)用于个体敏感性治疗时复合配制这种抗体、抗原结合片段、可溶性受体 1 多肽或 Nogo 受体融合蛋白的固有限制。在一些实施方案中 Nogo 受体 1 抗体或其抗原结合片段的治疗有效剂量范围是 0.1-4 毫克每千克体重每天。在一些实施方案中 Nogo 受体 1 抗体或其抗原结合片段的治疗有效剂量范围是 0.2-4 毫克每千克体重每天。在一些实施方案中 Nogo 受体 1 抗体或其抗原结合片段的治疗有效剂量范围是 0.2 毫克每千克体重每天。

抗体、抗原结合片段、可溶性抗体和融合蛋白的应用

[0121] 在一些实施方案中，本发明提供通过向有需要的哺乳动物给药抗 Nogo 受体 1 抗体、这种抗体的抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者包含这种多肽的融合蛋白等而抑制 Nogo 受体 1 活性的方法。

[0122] 在一些实施方案中，本发明提供抑制 Nogo 受体 1 与配基结合的方法，该方法包含下面的步骤：使 Nogo 受体 1 与本发明的抗体或抗原结合片段接触。在一些实施方案中，配基选自：NogoA, NogoB, NogoC, MAG 和 OM-gp。

[0123] 在一些实施方案中，本发明提供抑制神经元内生长椎萎陷的方法，该方法包含以下步骤：使神经元与本发明的抗体或其抗原结合片段接触。在一些实施方案中，本发明提供降低神经元内神经突向外生长或出芽的抑制的方法，该方法包含以下步骤：使神经元与本发明的抗体或其抗原结合片段接触。在一些实施方案中，神经元是中枢神经系统神经元。在一些这样的方法中，神经突向外生长或出芽是轴突生长。

[0124] 在一些实施方案中，本发明提供促进哺乳动物濒临死亡的神经元存活的方法，该方法包含以下步骤：(a)提供表达(i) 抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段，或者(ii)可溶性 Nogo 受体 1 多肽的培养的宿主细胞；和(b) 将宿主细胞引入哺乳动物神经元所在的位置或

者其附近。Almudena Ramon-Cueto, M Isabel Cordero, Fernando F Santos-Benito and Jesus Avila (2000) Functional recovery of paralegic rats and motor axon regneration in their spinal cords by olfactory ensheathing cells. Neuron 25, 425-435.

[0125] 在一些实施方案中，本发明提供促进哺乳动物濒临死亡的神经元存活的基因治疗方法，该方法包含以下步骤：在神经元所在的位置或者其附近施用病毒载体，此载体包含编码(a)抗 Nogo 受体 1 抗体或者其抗原结合片段；或(b)可溶性 Nogo 受体 1 多肽的核苷酸序列，其中的抗 Nogo 受体 1 抗体，抗原结合片段或可溶性 Nogo 受体 1 多肽从哺乳动物体内的核苷酸序列表达，其表达量足以促进神经元的存活。病毒载体和对这些实施方案有用的方法在文献例如 Noël et al., Human Gene Therapy, 13, 1483-93 (2002)中有描述。

[0126] 在一些实施方案中，本发明提供抑制 Nogo 受体 1 与配基结合的方法，该方法包含以下步骤：使配基与本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。

[0127] 在一些实施方案中，本发明提供调节 Nogo 受体 1 配基活性的方法，该方法包含以下步骤：使 Nogo 受体 1 配基与本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。

[0128] 在一些实施方案中，本发明提供抑制神经元内生长椎萎陷的方法，该方法包含以下步骤：使 Nogo 受体 1 配基与本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或者 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。在一些实施方案中，本发明提供降低神经元内神经突向外生长或出芽的抑制的方法，该方法包含以下步骤：使 Nogo 受体 1 配基与本发明的可溶性 Nogo 受体 1 多肽或 Nogo 受体 1 融合蛋白相接触。在一些实施方案中，神经元是中枢神经系统神经元。在一些实施方案中，配基选自：NogoA, NogoB, NogoC, MAG 和 OM-gp。在一些实施方案中，神经突的生长或出芽是轴突生长。

[0129] 在这里描述的任何类型的抗体或者受体可以用于治疗。在一些实施方案中，抗 Nogo 受体 1 抗体是人抗体。在一些实施方案中，哺乳动物是人类患者。在一些实施方案中，抗体或者其抗原结合片段施

用于表达 Nogo 受体 1 的非人哺乳动物（例如灵长类，猕猴或恒河猴），抗体与表达的 Nogo 受体 1 发生交叉反应，用于兽医的目的或者作为人类疾病的动物模型。这种动物模型可能用于评价本发明抗体的治疗效果。

[0130] 在一些实施方案中，使用抗 Nogo 受体 1 抗体或抗原结合片段，或可溶性 Nogo 受体 1 多肽或融合蛋白给药以治疗脊髓损伤，促进损伤部位的轴突生长。

[0131] 本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体或抗原结合片段，或可溶性 Nogo 受体 1 多肽或融合蛋白可以单独提供，或者联合使用，或者与其他调节特定病理过程的药剂相继联合使用。例如，在中风之后可以同时给服消炎药，以阻止进一步的神经元损伤和对轴突再生的抑制。正如在这里所使用的，Nogo 受体 1 抗体、抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 和 Nogo 受体融合蛋白，与一或者多种其他治疗剂联合使用，二者可以同时、连续或者独立使用。

[0132] 本发明的抗 Nogo 受体 1 抗体，抗原结合片段，可溶性 Nogo 受体 1 多肽、Nogo 受体 1 融合蛋白可以通过肠胃外、皮下、静脉内、肌内、腹腔、透皮、吸入或者口腔等途径给药。例如可以通过微灌输在损伤的部位局部给药。通常的给药位置包括，但不止限于，损伤导致的脊髓受损区域。给药的剂量取决于年龄、健康状况、接受注射者的体重、同时进行的治疗的种类以及治疗频率（如果有的话），所需取得的效果的性质。

[0133] 本发明的化合物可以体内应用，一般用于哺乳动物，例如人、绵羊、马、牛、猪、狗、猫、大鼠和小鼠或者体外应用。

本发明的载体

[0134] 在一些实施方案中，本发明提供含有编码序列的重组 DNA 分子(rDNA)。正如这里所使用的，rDNA 分子是经过分子操作的 DNA 分子。产生 rDNA 分子的方法在本领域内是众所周知的，例如参见 Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Laboratory Press. 在一些 rDNA 分子中，将编码 DNA 序列与表达调控序列和载体序列操作性连接起来。

[0135] 在一些实施方案中，本发明提供包含了编码本发明多肽的核酸的载体。操作性与本发明的核酸相连的载体和表达调控序列的选择，直接取决于所需的功能特性（例如蛋白表达以及需要转化的宿主细胞），这是本领域内众所周知的。本发明的载体至少可以指导复制或者向宿主染色体的插入，优选能够指导 rDNA 分子内包含的结构基因的表达。

[0136] 操作性与蛋白编码序列相连的、用于调控表达的表达调控元件是本领域内已知的，它们包括，但是不止限于，诱导型启动子、组成型启动子、分泌信号和其他调控元件。优选地，诱导型启动子是很容易控制的，例如对宿主细胞培养基内的营养物质产生应答的启动子。

[0137] 在一个实施方案中，含有编码核酸分子的载体含有原核复制子，即一段 DNA 序列，它能够指导自我复制并且维持重组 DNA 分子位于被该 DNA 分子转化了的原核宿主细胞（例如细菌宿主细胞）的染色体之外。这种复制子在本领域内是众所周知的。此外，包含有原核复制子的载体还可以包含一个基因，该基因的表达使载体具有可被检测到的或可被筛选的标记，例如药物抗性。通常的细菌药物抗性基因是那些使载体具有氨苄青霉素或四环素抗性的基因。

[0138] 包含原核复制子的载体还可以包含能够指导编码基因序列在细菌宿主细胞（如大肠杆菌）内表达（转录和翻译）的原核或细菌噬菌体启动子。启动子是由 DNA 序列组成的表达调控元件，它可以与 RNA 聚合酶结合并启动转录。与细菌宿主相容的启动子序列通常由质粒载体提供，该质粒载体含有适宜的限制性位点的，可以方便插入本发明的 DNA 片段。这种载体质粒的实例有 pUC8, pUC9, pBR322 和 pBR329 (Bio-Rad® Laboratories), pPL 和 pKK223 (Pharmacia)。任何适宜的原核宿主都可以用来表达编码本发明蛋白质的重组 DNA 分子。

[0139] 与真核细胞相容的表达载体，优选那些与脊椎动物细胞相容的载体，也可以用于形成含有编码序列的 rDNA。真核细胞表达载体

在本领域内众所周知，可以从许多商业来源获得。通常提供的这种载体含有适宜的限制性位点可以方便地插入目的 DNA 片段。这种载体的实例有 pSVL 和 pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC® 31255)以及其他真核表达载体。

[0140] 用于构建本发明的 rDNA 分子的真核细胞表达载体还包括在真核细胞中有效的选择标记，优选药物抗性选择标记。优选的药物抗性标记是其表达产生新霉素抗性的基因，即新霉素磷酸基转移酶(neo)基因。(Southern et al., (1982) J. Mol. Anal. Genet. 1, 327-341). 或者选择标记位于另外一个质粒上，两个载体通过共转染入宿主细胞，通过在针对所选标记的适当药物中培养来筛选转染子。

[0141] 为表达本发明的抗体或抗体部分，将编码部分或者全长轻链和重链的 DNA 插入表达载体中，使基因有效地与转录和翻译调控序列相连。表达载体包括质粒、逆转录病毒、粘粒、YAC（酵母人工染色体）、EBV 衍生的附加体等。将抗体基因连入载体内，使载体内的转录和翻译序列行使它们预定的功能，调控抗体基因的转录和翻译。表达载体和表达调控序列的选择要与所使用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入不同的载体中。在一些实施方案中，二者被插入同一个表达载体中。使用标准方法（例如抗体基因片段上和载体上互补限制性位点的连接，或者没有限制性位点时使用平末端连接）将抗体基因插入到表达载体中。

[0142] 适宜的载体编码功能上完整的人 C_H 或 C_L 免疫球蛋白序列，通过基因工程引入适当的限制性位点，这样任何 V_H 或 V_L 序列可以很容易地插入和表达，如前所述。在这种载体中，拼接通常在被插入的 J 区中的拼接供体位点和人 C 区之前的拼接受体位点之间发生，以及在人 C_H 外显子内的拼接区域中。多聚腺嘌呤化和转录终止出现在编码区下游的天然染色体位置。重组表达载体也可以编码信号肽，信号肽有助于抗体链从宿主细胞中分泌出来。可以将抗体链基因克隆入载体，使得信号肽与抗体链基因的氨基端以正确的阅读框相连。信号肽可以是免疫球蛋白的信号肽或者异源信号肽（即来自非免疫球蛋白的信号肽）。

[0143] 除了本发明的免疫原性多肽、Nogo 受体 1 抗体、抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白之外，本发明的重组表达载体携带控制这些蛋白在宿主细胞内表达的调控序列。本领域的技术人员可以理解表达载体的设计，包括调控序列的选择，可能取决于要转化的宿主细胞、所需的蛋白质表达水平等因素。对于哺乳动物宿主细胞表达，优选的调控序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白表达的病毒元件，例如衍生自逆转录病毒长末端重复（LTR）的启动子和/或增强子、巨细胞病毒(CMV)（例如 CMV 启动子/增强子）、猴病毒 40（SV40）（例如 SV40 的启动子/增强子）、腺病毒（例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)）、多瘤病毒以及强哺乳动物启动子，如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。关于病毒调控元件的进一步描述以及其序列，参见 Stinski 的美国专利 5,168,062, Bell 等人的美国专利 4,510,245 和 Schaffner 等人的美国专利 4,968,615.

[0144] 除了异源基因和调控序列之外，本发明的重组表达载体还可以携带额外的序列，例如调控载体在宿主细胞内复制的序列（如复制起点）和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已经带有载体的宿主细胞（参见美国专利例如 4,399,216, 4,634,665 和 5,179,017, 所有的作者都是 Axel et al.）。例如，通常选择性标记基因使已经携带载体的宿主细胞具有对药物（如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤）的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶（DHFR）基因（用于 $dhfr^-$ 的宿主细胞内进行氨甲蝶呤筛选/扩增）以及 neo 基因（用于 G418 筛选）。

宿主细胞和重组生产本发明蛋白的方法

[0145] 编码本发明中的抗 Nogo 受体 1 抗体、免疫原性多肽、可溶性 Nogo 受体 1 多肽、可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白的核酸和包含这些核酸分子的载体可以用于转化适宜的宿主细胞。转化可以使用任何已知的向宿主细胞内引入多聚核苷酸的方法。向哺乳动物细胞内引入异源多聚核苷酸的方法是本领域众所周知的，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、用脂质体包裹多

聚核苷酸以及直接将 DNA 微注射进入细胞核内。此外，还可以通过病毒载体将核酸分子引入哺乳动物细胞。

[0146] 通过本领域众所周知的方法，用本发明的 rDNA 分子转化适当的细胞宿主，这些方法通常取决于所使用的载体类型和宿主系统。对于原核宿主细胞的转化，可以使用电穿孔和盐处理的方法（参见例如 Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cohen et al., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114). 对于用含有 rDNA 的载体转化脊椎动物细胞，可以使用电穿孔、阳离子脂质或者盐处理的方法（参见例如 Graham et al., (1973) Virology 52, 456-467; Wigler et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1373-1376)。

[0147] 可以通过众所周知的技术，包括对选择标记的筛选，鉴定被成功转化的细胞，即含有本发明 rDNA 分子的细胞。例如，引入本发明的 rDNA 后的细胞可以被克隆产生单细胞集落。收获这些集落，裂解并使用 Southern, (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517 描述的方法检查它们的 DNA 中是否存在 rDNA,或者用免疫学方法检测细胞产生的蛋白质。

[0148] 可作为表达宿主的哺乳动物细胞系在本领域内众所周知，包括许多可从美国模式培养物保藏所（ATCC®）获得的无限增殖细胞系。这些细胞系包括，特别是中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，NSO, SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞瘤细胞（例如 Hep G2），A459 细胞和一系列其他细胞系。通过确定哪些细胞系具有高表达水平来筛选特别优选的细胞系。其他可以使用的细胞系有昆虫细胞系，如 Sf9 细胞。当把编码本发明的免疫原性多肽、Nogo 受体 1 抗体或抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时，培养宿主细胞一段足够长的时间，抗体、多肽和融合蛋白就会在细胞中表达，或者更优选的是，本发明的免疫原性多肽、Nogo 受体 1 抗体或抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白被分泌到宿主细

胞生长的培养基中。可以使用标准的蛋白质纯化方法从培养基中回收本发明的免疫原性多肽、Nogo 受体 1 抗体或抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白。

[0149] 而且，可以使用一系列已知的技术提高本发明的免疫原性多肽、Nogo 受体 1 抗体或抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白（或者来自本发明的其他部分）从生产细胞系中的表达。例如谷胺酰胺合成酶基因表达系统（GS 系统）是在某些特定条件下提高表达的常用方法。GS 系统在欧洲专利 0 216 846，0 256 055，和 0 323 997 以及欧洲专利申请 89303964.4 中有完整或部分的讨论。

宿主细胞

[0150] 本发明还提供了由核酸分子转化的宿主细胞，该核酸分子编码本发明中的 Nogo 受体 1 抗体、抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和/或可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白。宿主细胞可以是原核或者真核的。只要细胞系与细胞培养方法、与表达载体的扩增、与基因产物的表达相兼容，则对适用于表达本发明蛋白质的真核细胞就没有限制。优选的真核宿主细胞包括，但是不止限于，酵母、昆虫和人细胞，优选脊椎动物细胞，例如来自小鼠、大鼠、猴或人的细胞系。有用的真核宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，此细胞系可以从 ATCC®获得，编号为 CCL61；NIH 瑞士小鼠胚胎细胞 NIH-3T3，其 ATCC 编号为 CRL1658；幼仓鼠肾细胞（BHK），等等真核组织培养细胞系。

使用 rDNA 分子的重组蛋白质生产

[0151] 本发明还提供使用这里描述的核酸分子，生产本发明中的 Nogo 受体 1 抗体或者抗原结合片段、可溶性 Nogo 受体 1 多肽和/或可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白。一般来说，重组形式蛋白质的生产通常包括以下的步骤：

[0152] 首先，要获得编码本发明蛋白质的核酸分子。如果编码

序列中没有内含子，则该编码序列可以直接用于任何宿主中的表达。

[0153] 核酸分子可选操作性地与适宜的调控序列连接，如上面所述，形成含有蛋白质开放阅读框的表达单位。使用该表达单位转化适宜的宿主，被转化的宿主在允许重组蛋白质产生的条件下培养。可选重组蛋白从培养基或者从细胞中分离；在可以容忍一些杂质的情况下，则不一定要对蛋白质进行回收和纯化。

[0154] 前面的每一步都可以通过多种不同的方式完成。例如，所需的编码序列可以从基因组片段中获得，并且直接用于适当的宿主。利用适当的复制子和调控序列，如以上提到的那些，构建适用于多种不同宿主的表达载体。调控序列、表达载体和转化方法取决于用于表达基因的宿主细胞类型，这些在前面有详细的讨论。如果原来没有的话，可以在编码序列的两端添加适宜的限制性位点，这样就得到一个可切除基因，在插入这些载体中之后，还可以切除出来。熟练的技术人员可以容易地根据所使用的本发明中的核酸分子，来调整本领域内已知的任何宿主/表达系统，以生产重组蛋白质。

[0155] 为了更好的理解本发明，给出以下实施例。这些实施例的目的仅仅是举例说明，而不应该被理解为以任何方式对本发明的范围的限制。

实施例 1

小鼠抗 Nogo 受体 1 单克隆抗体的生产

[0156] 使用以下的方法和步骤制备与本发明中免疫原性 Nogo 受体 1 多肽特异结合的抗 Nogo 受体 1 抗体。

免疫

[0157] 使用两种免疫方式:

1. 使用 COS-7 细胞或者含有 Nogo 受体 1(NogoR-1) 的 COS-7 细胞膜作为免疫原

[0158] 将大鼠 Nogo 受体 1 基因 (GenBank™ 登录号 AF 462390)

克隆到含有CMV启动子和用于药物筛选的遗传霉素抗性基因的表达载体pEAG1256 (Biogen®)中。使用 Superfect (Qiagen®)将重组质粒转染入 COS-7 细胞。使用遗传霉素(Gibco™, 2 毫克/毫升)筛选转染子，克隆和通过FACS法证实Nogo受体1蛋白在细胞表面的表达。根据[Wang et al., J. Neurochem.,75:1155-1161 (2000)] 描述的步骤制备 COS-7 细胞膜，两次漂洗，并于 10%甘油中，以浓度为 1 毫克/毫升(蛋白浓度)，在-70℃储存。

[0159] 使用含有 50 微克大鼠 Nogo 受体 1-COS-7 细胞膜或者含有 50 微克在其表面表达 Nogo 受体 1 的整个 COS-7 细胞及 50 微升 RIBI MPL+TDM+CWS 佐剂 (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO)的乳剂，通过腹腔内免疫八周龄的雌性 RBF 小鼠(Jackson Labs, Bar Harbor, ME)，免疫程序为每两周一次 (Lipman et al., 1992)。分别在第一次免疫前、第二次免疫后 7 天、第三次免疫后 7 天和第三次免疫后 38 天采集免疫小鼠的血清，使用以下描述的 ELISA 测量抗 Nogo 受体 1 抗体的滴度。

2. 使用特异的 Nogo 受体 1 多肽作为免疫原

[0160] 使用 Vector NTi™ 软件(图 2)分析 大鼠 Nogo 受体 1 基因序列的抗原性。使用标准的戊二醛方法将在分析中鉴定出的抗原性多肽与钥孔血兰蛋白(KLH)偶联。

[0161] 使用含有 50 微克 KLH 偶联多肽及 50 微升完全弗氏佐剂(Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO)的乳剂通过腹腔内免疫八周龄的雌性 RBF 小鼠(Jackson Labs, Bar Harbor, ME)，免疫程序为每两周一次。分别在第一次免疫前、第二次免疫后一周、第三次免疫后一周天采集免疫小鼠的血清，测量抗 Nogo 受体 1 抗体的滴度。第三次免疫以后增强免疫一次。此次增强免疫之后三天开始融合实验。

杂交瘤的制备和筛选

[0162] 使用 ELISA 筛选 Nogo 受体 1 抗原性多肽免疫的小鼠血清，而用表达 Nogo 受体 1 的 COS-7 细胞免疫的小鼠血清用细胞流式仪

来筛选。使用细胞流式仪鉴别产生了能够特异结合 Nogo 受体 1-COS-7 细胞的抗体的小鼠并处死。根据描述(Kennett et al., 1993. Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum Press, New York)分离脾细胞并与 FL653 骨髓瘤 (Ig^-/$HGPRT^-$ Balb/c 小鼠骨髓瘤的 $APRT^-$衍生物，维持液是含有 10%胎牛血清、4500 毫克/升葡萄糖、4mM L-谷胺酰胺和 20 毫克/毫升 8-氮鸟嘌呤的 DMEM)融合。融合细胞接种在 24 孔或 48 孔细胞培养板(Corning Glass Works, Corning, NY)中，培养基中添加腺嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶 (AAT)。通过ELISA或流式仪筛选抗AAT培养物中是否存在与Nogo受体1-COS-7细胞的结合或者与 Nogo 受体 1 抗原性多肽的结合，如下描述。阳性孔中的细胞通过有限稀释法进一步亚克隆。

[0163] 为了筛选与 Nogo 受体 1 抗原性多肽结合的抗体，将作为免疫原使用的肽与 BSA 偶联。在 96 孔 MaxiSorp™细胞培养板 (Nunc™)的每一孔中加入 50 微升含有 0.5 毫克偶联多肽的 0.1M 碳酸氢钠，pH9.0 缓冲液。在 37℃孵育 1 小时或者 4℃孵育 16 小时，使用含有 25 mM HEPES, pH 7.4 0.1% BSA, 0.1% 卵清蛋白, 0.1% blotto 和 0.001% 叠氮化物的封闭液封闭非特异性位点。加入杂交瘤上清，在 25℃孵育 1 小时。使用 PBS 漂洗三次之后，在每一孔中加入 50 微升 1:10000 稀释的辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠二抗(Jackson ImmunoResearch Inc.)，继续孵育一小时。漂洗三次之后，使用 TMB (Pierce)显色并用 2M 硫酸中止。使用分光光度计在 450nm 处测量颜色的深浅。

[0164] 使用以下方法筛选与全长 Nogo 受体 1 结合的抗体。根据销售商提供的方法，使用 0.1 μM CellTracker™ Green CMFDA (Molecular Probes, Eugene, OR)标记 COS-7 细胞。加入抗 Nogo 受体 1 待测血清孵育之前，将 CellTracker™标记的对照细胞与漂洗过的 Nogo 受体 1-COS-7 细胞等体积混和。50 微升的细胞混合物均匀分散至 96 孔 V 型底聚苯乙烯板 (Costar® 3877, Corning, NY) 的每一孔中，加入 100 微升的杂交瘤上清或者对照抗-Nogo 受体 1 抗体。在 4℃孵育半小时后，漂洗细胞，加入 50 微升溶于 PBS 的 R-藻红蛋白偶联的亲和纯的山

羊抗小鼠 IgG Fc gamma 特异二抗 F(ab′)$_2$片段，(1:200 稀释，Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA)。在孵育结束时，使用 PBS 漂洗细胞两次，用含有 1%胎牛血清的 200 微升 PBS 重悬细胞，进行 FACS 分析。或者，将 Nogo 受体 1-COS-7 细胞与杂交瘤上清混和，然后使用 R-藻红蛋白偶联的山羊抗小鼠二抗处理，之后直接进行标准的 FACS 分析。

[0165] 我们使用多种不同的免疫原制备了 25 个抗 Nogo 受体 1 抗体。我们使用大鼠 Nogo 受体 1 残基 110-125 对应的多肽序列作为免疫原，制备了两个抗体 7E11 和 5B10。我们使用全长大鼠 Nogo 受体 1 转染的 COS7 细胞制备的细胞膜作为免疫原，制备了三个抗体 1H2, 3G5 和 2F7。我们使用 sNogoR310-Fc 作为免疫原，制备了 13 个抗体(1D9.3, 1E4.7, 1B4.3, 2C4.3, 1F10.3, 2H1.4, 1H3.3, 1G4.1, 1E4.1, 2G7.1, 2C4.1, 2F11.1, 和 1H4.1)，使用与大鼠 Nogo 受体 1 残基 423-434 对应的多肽序列作为免疫原，制备了 7 个抗体(2E8.1, 2G11.2,和 1B5.1).

单克隆抗体 7E11 和 5B10 的序列分析

[0166] 我们使用 Qiagen® RNeasy® mini 试剂盒提取总 RNA，并且从分离的 RNA 得到 cDNA。我们使用引物 5’-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3’ (SEQ ID NO:12) 和 5’-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3’，用 PCR 扩增出轻链的序列；我们使用引物 5’-GGGGATATCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3’ (SEQ ID NO: 13) 和 5’-GGGGATATCCACCATGAGGKCCCCWGCTCAGYTYCTKGGA-3’ (SEQ ID NO: 14)用 PCR 扩增出重链的序列。这些引物包含简并的核苷酸，如下：S 代表 G 或 C; M 代表 A 或 C, R 代表 G 或 A; W 代表 A 或 T; K 代表 G 或 T; 以及 Y 代表 T 或 C。我们将 PCR 片段克隆入测序载体中，利用双脱氧终止法，使用测序载体特异的引物确定了 CDR 区的 DNA 序列。我们从概念上翻译了单克隆抗体 7E11 和 5B10 的重链和轻链的 CDR 区的 DNA 序列和部分的氨基酸序列，序列示于表 2。表 2 中在来自单克隆抗体重链和轻链的三个 CDR 区，加上了下划线。7E11 和 5B10 的轻链有 94%的

氨基酸序列一致性，重链有 91%的氨基酸序列一致性。单克隆抗体 7E11，5B10,和 1H2 属于 IgG1 同种型；单克隆抗体 3G5 和 2F7 属于 IgG2a 同种型。这 5 个单抗中每个都有一个 kappa 轻链。我们使用这种方法分析了其他单抗的序列。

表 2 单抗 7E11 和 5B10 的氨基酸序列

	序列	SEQ ID NO:
7E11 轻链	MKLPVRLLV$_L$MFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSL V$_H$SNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVDAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGGGTKLEIKRADAAPTVSISHH	15
5B10 轻链	MKLPVRLLV$_L$MFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSL V$_H$SNGYTYLHWYLQRPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVDAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSISHH	16
7E11 重链	VQLQESGAELVMPGASVKMSCKASGYTFTDYWMHWVKQRPGQGLEWIG AIDPSDSYSSYNQNFKGKATLTVDGSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RRITEAGAWFAYWGQGTTVT	17
5B10 重链	LQXSGAEIVMPGTAVTMSCKASGYTFTDFWMHWVKQRPGQGLEWIGAI DPSDSYSRINQKFKGKATLTVDESSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARR ITEAGAWFAYWGQGTTVT	18

用抗 Nogo 受体 1 单克隆抗体抑制配基与可溶性 Nogo 受体 1 的结合

[0167] 我们检测了以上制备的抗 Nogo 受体 1 单克隆抗体，确定它们是否抑制配基与 Nogo 受体 1 结合。

[0168] 按照以下的描述制备包含大鼠 Nogo 受体 1 的 26-344 氨基酸残基和铰链区以及大鼠 IgG1 分子 Fc 区 (sNogoR344-Fc) 的可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白。25℃下，将 0.5 微克的该融合蛋白固定在 250 毫克的蛋白 A 或小麦胚凝集素偶联的 SPA 凝胶珠上 2 小时。每个样品孔中加入 50 微升含有以下物质－－偶联有 Fc-sNogoR-1〔这是哪个 sNOGO? 〕的 SPA 珠、抗 Nogo 受体 1 单抗和 1 微升 ^{125}I-Nogo66 (Amersham, 2000 居里/毫摩尔, 1nM) －－的 HEPES 缓冲的孵育培养基(10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% 牛血清白蛋白, 0.1% 卵清蛋白, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$ 和蛋白酶抑制剂)。16 小时以后使用 TopCount® (Packard)测量四个平行样品孔中的放射性。根据曲线拟合分析（图 3）(PRISM, GraphPad

Software, NJ)计算 IC_{50}数值。在一些实验中，我们也使用碱性磷酸酶-配基偶联物（例如 AP-Nogo66）并且通过检测碱性磷酸酶的活性监测结合。我们还检测了单抗阻断配基 MAG-Fc 和 AP-OM-gp 与 Nogo 受体 1 结合的能力。

[0169] 单克隆抗体 7E11, 5B10, 1H2, 3G5 和 2F7 全部抑制 Nogo66、MAG 和 OM-gp 与 sNogoR344-Fc 的结合。计算出来的 7E11 和 1H2 对 Nogo66 的 IC_{50}分别为 400nM 和 60nM。由 ELISA 监测的单抗介导的对三种配基与 Nogo 受体 1 结合的抑制数据总结如表 3。

表 3. 单克隆抗体抑制 Nogo66、MAG 和 OM-gp 与 Nogo 受体 1 的结合

单克隆抗体	MAG + sNogoR344-Fc	Nogo66 + sNogoR344-Fc	OM-gp + sNogoR344-Fc
7E11	30 nM (60%) EC_{50} = 0.5 μM	EC_{50} = 1.7 μM	EC_{50} = 150 nM
1H2	30 nM (60%)	ND	ND
3G5	30 nM (60%)	EC_{50} = 9 nM	ND
2F7	30 nM (55%)	EC_{50} = 10 nM	EC_{50} = 5 nM
1D9.3	30 nM (70%) EC_{50} = 2.7 nM	EC_{50} = 13 nM	EC_{50} = 5.2 nM
2G7.1	30 nM (84%)	EC_{50} = 18 nM	EC_{50} = 1 nM
1E4.1	30 nM (75%) EC_{50} = 2.8 nM	—	EC_{50} = 9.1 nM
1G4.1	30 nM (90%) EC_{50} = 9.9 nM	—	EC_{50} = 8.2 nM
2C4.1	30 nM (50%)	—	ND
2F11.1	30 nM (45%)	ND	ND
1H4.1	—	ND	ND
2E8.1	30 nM (87%) EC_{50} = 9.2 nM	EC_{50} = 1.5 nM	EC_{50} = 42.9 nM
2G11.2	30 nM (80%)	ND	ND
1B5.1	30 nM (0%)	ND	ND

显示的取代百分比是在 30nM 抗体浓度时的，所述的曲线拟合分析

确定某些单抗的 EC_{50}。“—“表示没有可被检测到的活性，“ND”表示没有测定。

实施例 2

Fab-噬菌体抗 Nogo 受体 1 抗体的制备

[0170] 与本发明中免疫原性 Nogo 受体 1 多肽特异结合的抗 Nogo 受体 1Fab-噬菌体抗体，也是通过如下筛选 Fab-噬菌体文库制备的。

[0171] 使用重组大鼠可溶性 sNogoR310-Fc 蛋白和表达大鼠 Nogo 受体 1 的 COS7 细胞筛选 MorphoSys Fab-噬菌体文库 HuCAL® GOLD。与 Nogo 受体 1 特异结合的 Fab-噬菌体被纯化和鉴定出来。14D5 的重链衍生自 V_H2 基因，轻链衍生自 V_K1 基因。这些 Fab-噬菌体中的一个，14D5，其重链和轻链的 CDR 的氨基酸序列示于表 4。

表 4 14D5 的 CDR 的氨基酸序列

	氨基酸序列	SEQ ID NO:
重链 CDR1	GFSLSTSGGSVG	19
重链 CDR2	LIYSNDTKYYSTSLKT	20
重链 CDR3	SRFWTGEYDV	21
轻链 CDR1	RASQNIAITLN	22
轻链 CDR2	LASSLQS	23
轻链 CDR3	QQYDNYPL	24

[0172] 14D5 以单价和二价两种形式与大鼠 Nogo 受体 1 结合。此外，14D5 还与小鼠和人的 Nogo 受体 1 以及人的 Nogo 受体 2 结合，但是不与小鼠的 Nogo3 结合。

实施例 3

用抗 Nogo 受体 1 单克隆抗体免疫沉淀 Nogo 受体 1

[0173] 为了进行免疫沉淀，将 100 微升裂解的细胞或者 50 微升 PiPLC 处理的细胞分别与 400 或 450 微升的提取缓冲液[10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.5% Tween-20™, 0.2 mM PMSF] 或者 RIPA 缓冲液混和，其中分别存在 30 微升蛋白 A 或 G 和 1-2 毫克抗体。混合物置于振荡器中，在 4 C 孵育 16 小时。

[0174] 轻轻离心样品使偶联蛋白 A 或 G 的珠沉下来。洗涤凝胶珠三次，每次用 1 毫升洗涤缓冲液(10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.1% Tween-20™)。最后一次洗涤用 10%体积的原洗涤液。

[0175] 用 100 微升含有 10% beta-巯基乙醇的 2×SDS 上样缓冲液重悬凝胶颗粒。样品在室温放置，然后进行 SDS-PAGE， 使用 4-20%Tris-甘氨酸凝胶。SDS-PAGE 凝胶电泳的结果显示，单克隆抗体 3G5 和 2F7 可以免疫沉淀 Nogo 受体 1。

实施例 4

用 ELISA 确定抗体特异性

[0176] 为了确定实施例 1 和 2 中制备的单克隆抗体和 Fab-噬菌体抗体的特异性，我们使用了一组 Nogo 受体 1 多肽进行 ELISA 实验。该组多肽由以下多肽组成：sNogoR310-Fc (包含大鼠 Nogo 受体-1 的 26-310 氨基酸和一个大鼠 Fc 片段的融合蛋白)，sNogoR344-Fc (见上)，多肽 p-617 (SEQ ID NO: 1)，多肽 p-618 (来自大鼠 Nogo 受体 1 LRR7 区的 19 个氨基酸的多肽；图 2；SEQ ID NO: 25) 和多肽 p-4 (SEQ ID NO: 26) 以及 p-5 (SEQ ID NO: 27)(分别来自 Nogo 受体 1 的 LRR5 和 LRRCT 区的多肽)。使用卵清蛋白和 BSA 作为对照。如图 4 所示，单克隆抗体 1H2、3G5 和 2F7 全部与 sNogoR344-Fc 特异结合。在类似的实验中，那些抗体还与由大鼠 Nogo 受体 1 (SEQ ID NO: 3) 的 310-344 氨基酸残基的多肽特异结合，且单抗 7E11 和 5B10 与多肽 p-617 (SEQ ID NO: 1)

特异结合。

[0177] 来自 sNogoR310-Fc 免疫的 10 个抗体(1D9.3, 1E4.7, 1B4.3, 2C4.3, 1F10.3, 2H1.4, 1H3.3, 1G4.1, 1E4.1, 和 2G7.1)在结合方面可以互相替代，表明它们识别 sNogoR310-Fc 上相似的或者重叠的抗原表位。来自 sNogoR310-Fc 免疫的另外三个抗体(2C4.1, 2F11.1, 和 1H4.1) 识别位于氨基酸残基 26-310 上的不同表位。

[0178] 我们还使用 Fab-噬菌体 14D5 进行了 ELISA 结合实验。使配基 AP-Nogo66, AP-OM-gp 和 MAG-Fc 与固定化的 sNogoR344-Fc 结合，1 μM 的 14D5 完全抑制了 Nogo 和 MAG 的结合。需要 10 μM 的 14D5 以完全抑制 OM-gp 与 sNogoR344-Fc 的结合。

实施例 5
神经突向外生长实验

[0179] 为了检测上面产生的单抗和 Fab-噬菌体抗体减轻 CNS 髓鞘对神经元抑制的能力，用 0.1 毫克/毫升 多聚-D-赖氨酸 (Sigma®) 包被 Lab-Tek® 培养用载玻片 (4 孔)。将 3 微升一滴的 CNS 髓鞘或 PBS 点在载片上。在髓鞘或 PBS 中加入荧光微球体(Polysciences) ，用于在后面的步骤中鉴定液滴(Grandpre et al, Nature 403, 2000)。然后润洗 Lab-Tek®载片，用 10 微克/毫升的层粘连蛋白(Gibco™)包被。用 1 毫克/毫升 的类型 1 胶原酶(Worthington)解离 P3-4 Sprague Dawley 大鼠幼仔的背根神经节，用火磨光的巴氏吸管吹打，预接种以增加神经元细胞，最终以 23000 细胞每孔的密度接种到事先包被好的 Lab-Tek® 培养载片中。培养基是含有 5%热灭活供体马血清、5%热灭活胎牛血清和 50 纳克/毫升 小鼠神经生长因子的 F12，在 37℃ 和 5% CO_2 条件下孵育 6 小时。在接种后立即加入 15 微克/毫升的单抗 7E11。

[0180] 使用含有 20%蔗糖的 4%多聚甲醛溶液固定载玻片 20 分钟，使用抗 beta-III-微管蛋白抗体(Covance TUJ1) 1:500 稀释，染色检查神经元标记。二抗是抗小鼠 Alexa Fluor® 594 (Molecular

Probes)，1:300 稀释，并且用 Gel/Mount™ (Biømeda™)覆盖在载玻片上。使用 OpenLab™ 软件获得放大 5 倍的数码图像，并使用 MetaMorph® 软件分析定量神经突的生长。

[0181] 单抗 7E11 保护 DRG 神经元，使其不发生髓鞘介导的对神经突向外生长的抑制。用单抗 1H2 和 3G5 观察到了类似的结果。

[0182] 在神经突向外生长保护实验中，其中将大鼠的 P7 DRG 神经元培养在 CNS 髓鞘基质上，二价的 14D5 也可以有效地促进神经突的生长。

实施例 6

在转染了 Nogo 受体 1 的细胞上用 7E11 进行免疫组织化学

[0183] 为了进一步鉴定根据实施例 1 中的描述生产的抗 Nogo 受体 1 单抗的结合特性，我们比较了与固定的或者活的表达大鼠或人 Nogo 受体 1 的 COS-7 细胞或 293 细胞的结合。

固定的细胞:

[0184] 被 Nogo 受体 1 转染和没有被转染的细胞接种于 8 孔的 Lab-Tek®培养载玻片上，用 4%多聚甲醛固定 15 分钟，用含有 10%正常山羊血清和 0.1%TritonX-100 的 PBS 封闭 1 小时。在封闭液中加入 15 微克/毫升和 1.5 微克/毫升的单抗 7E11 室温孵育 2 小时；用封闭液 1:300 稀释 Alexa®-偶联的抗小鼠二抗(Molecular Probes)，孵育 1 小时。在二抗中加入 5 微克/毫升的 DAPI，以标记所有的细胞核。

活细胞:

[0185] 被 Nogo 受体 1 转染和没有被转染的细胞接种于 8 孔的 Lab-Tek®培养载玻片上，用 FACS 缓冲液(含有 4% 供体马血清) 4℃封闭 30 分钟，在 FACS 缓冲液中用 15 微克/毫升和 1.5 微克/毫升的 7E11，4℃孵育 1 小时，润洗后用（FACS 缓冲液 1:300 稀释的）Alexa®-偶联

的抗小鼠二抗，4℃孵育 30 分钟。

[0186] 免疫组织化学染色实验证明了所有的单抗都与表达大鼠 Nogo 受体 1 的细胞结合。单抗 7E11, 2G7.1 和 2C4.1 与表达人 Nogo 受体 1 的固定细胞和活细胞都能结合。

实施例 7

脊髓挫伤小鼠模型

[0187] 为了检测实施例 1 中制备的抗 Nogo 受体 1 单抗对神经元的体内作用，我们使用一个脊髓挫伤小鼠模型。

[0188] 用止痛剂和抗生素药剂预防性地处理雌性小鼠（18-22 克体重）。麻醉小鼠，将其置于立体定位仪中，在立体显微镜下固定脊柱。使用改良的重物下落打击法 (M. Li et al., Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. Neuroscience Vol. 99, pp. 333 342, 2000) 致脊髓外伤。

[0189] 简而言之，实施 T9 和 T10 椎板切除术，用一对小鼠横夹稳定脊柱，从两旁支撑 T9-T10 的横切作用。将直径为 1.4 毫米、重量为 2 克的不锈钢冲击棒置于硬脊膜上方 2.5 厘米处，且向下落在脊髓的 T10 节段上。在手术中将小鼠置于 37℃保温的毯子上，且术后每只小鼠均皮下注射 1 毫升热的无菌盐水以防止脱水。每天一次人工将膀胱内的尿液挤出，直至对膀胱的反射控制恢复。

[0190] 所有的小鼠在术后每 8-12 小时麻醉止痛一次，术后每天接受两次抗生素治疗连续 7 天。在研究过程中动物可以自由摄食和饮水。通过髓鞘内注射将抗 Nogo 受体 1 抗体输送到损伤部位，连续 28 天，见下面描述的大鼠脊髓横切模型。

实施例 8

可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白的性质

[0191] 为了研究可溶性 Nogo 受体 1 多肽(sNogoR-1)和融合蛋白(Fc-sNogoR-1)的性质，我们进行了下面的实验。

[0192] 将 3 微克的可溶性 Nogo 受体 (sNogoR310-Fc 和 sNogoR344-Fc)固定在 250 微克的 WGA-SPA 珠上，加入 0.5 微升的放射性配基(终浓度为 0.5nM)，终体积为 100 微升结合缓冲液(20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM Ca, 2 mM Mg, 0.1% BSA, 0.1% 卵清蛋白和蛋白酶抑制剂)。配基包括 10 μM Nogo66, 10 μM ^{125}I-Nogo40 (NogoA 的 1-40 氨基酸)，对每个配基用 10 微升抗-Nogo 受体 1 的上清。Nogo40 上的三个酪氨酸分别用碘标记，分别命名为 Nogo40-A,-B 和 -C。用标准化的结合放射性百分比表示三个平行样的平均值（图 6,7 和 8）。误差棒表示的是平均标准误差（SEM）。在数据标准化时，将没有抑制剂时的结合放射性作为 100%，而在 10μM Nogo40 存在时的结合放射性作为 0%。

实施例 9

配基与可溶性 Nogo 受体 1 融合蛋白结合的抑制

[0193] 使用与实施例 8 中的结合实验类似的结合实验，检测实施例 1 中产生的两个单抗抑制 ^{125}I-Nogo66 与 sNogoR344-Fc 结合的能力。单抗 2F7 和 3G5 抑制 ^{125}I-Nogo66 与 sNogoR344-Fc 的结合。

实施例 10

神经突向外生长实验

[0194] 用 0.1 毫克/毫升的多聚-D-赖氨酸 (Sigma®)包被 Lab-Tek® 培养载玻片（4 孔）。3 微升只含有 CNS 髓鞘的液滴或者分别含有 CNS 髓鞘与 sNogoR310 的混合物、与 sNogoR310-Fc 融合蛋白的混合物、与单抗 5B10 的混合物的液滴或者与对照 PBS 的混合物的液滴分

别点在载玻片上。在髓鞘或 PBS 中加入荧光微球体(Polysciences) 用于后面的步骤中鉴定液滴(Grandpre et al, Nature 403, 2000)。然后润洗 Lab-Tek®培养载玻片，用 10 微克/毫升的层粘连蛋白(Gibco™)包被。

[0195] 用 1 毫克/毫升的类型 1 胶原酶(Worthington)解离 P3-4 Sprague Dawley 大鼠幼仔的背根神经节，用火磨光的巴氏吸管吹打，预接种以增加神经元细胞，最终以 23000 细胞每孔的密度接种到事先包被好的 Lab-Tek®培养载片上。培养基是含有 5%热灭活供体马血清、5%热灭活胎牛血清和 50 纳克/毫升小鼠神经生长因子的 F12，在 37℃ 和 5% CO_2条件下孵育 6 小时。

[0196] 使用含有 20%蔗糖的 4%多聚甲醛溶液固定载玻片 20 分钟，并使用 1:500 稀释的抗 beta-III-微管蛋白抗体(Covance TUJ1)染色检查神经元标记。二抗是抗小鼠 Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes)，1:300 稀释使用，在载玻片上覆盖 Gel/Mount™ (Biømeda™)。使用 OpenLab™ 软件获得放大 5 倍的数码图像。使用 MetaMorph® 软件分析定量神经突的生长。

[0197] sNogoR310, sNogoR310-Fc 和单抗 5B10 全部保护 DRG 神经元不受髓鞘介导的神经突向外生长的抑制(图 9-11)。在一个类似的使用鸡神经元的实验中，发现 sNogo310 有保护效果。

[0198] 我们还使用层粘连蛋白存在或者不存在时生长的细胞进行实验，检测了可溶性 Nogo 受体的神经元保护作用。在没有层黏连蛋白的培养基中神经元细胞生长得很不好，模拟了神经元的胁迫生长条件。

[0199] 从出生后 6-7 天的大鼠幼仔(P6-7)中分离出背根神经节，解离为单个细胞，加入到事先用多聚-D-赖氨酸包被的 96 孔培养板中，如上所述。在一些孔中，在接种细胞之前加入 2 微克/毫升的层粘连蛋白孵育 2-3 小时并在铺入细胞之前冲洗。孵育培养板 18-20 小时之后，使用 4%的多聚甲醛固定，用兔抗 Beta-III-微管蛋白抗体(Covance®1:500稀释的)和 1:100稀释的抗-HuC/D (Molecular Probes)

染色，以 1:200 稀释度加入荧光二抗(Molecular Probes)。使用 ArrayScan® II (Cellomics®)获得放大 5 倍的数码图像，将神经突向外生长定量为每孔中的平均神经突向外生长/神经元，通过使用神经突向外生长应用。对于每个条件下的 3 个孔分析了 9 张 5 倍的图像。

[0200] 在一些实验中使用了 PC12 细胞(Neuroscreen™)的亚克隆。Neuroscreen™细胞用 200 纳克/毫升的神经生长因子预分化 7 天，脱壁并重新接种到事先用多聚-D-赖氨酸包被的 96 孔培养板中。在一些孔中，在接种细胞之前加入 5 微克/毫升的层粘连蛋白孵育 2-3 小时并在铺入细胞之前冲洗。孵育两天以后培养板使用 4%的多聚甲醛固定，用 1:500 稀释的兔抗 Beta-III-微管蛋白抗体(Covance®)和 Hoechst (核染)染色。使用 ArrayScan® II(Cellomics®)对神经突向外生长进行定量，如在 DRG 细胞中一样。

[0201] 在接种细胞时，向 P6-7 DRG 神经元和分化的 Neuroscreen™细胞中加入溶解的 sNogoR344-Fc 或大鼠 IgG。

[0202] P6 DRG 神经元在没有层粘连蛋白时生长，观察到 1 μM 和 10μM 的 sNogoR344-Fc 具有神经元保护作用。神经突向外生长的定量实验显示，随着 sNogoR344-Fc 的加入神经突的生长呈现剂量依赖的增长。向生长在层粘连蛋白基质中的 DRG 神经元中加入相同浓度的 sNogoR344-Fc，不能产生任何特殊异常的效果，表明 sNogoR344-Fc 只是在受胁迫的细胞中才有活性。对于 Neuroscreen™细胞，没有层粘连蛋白时，相同浓度的 sNogoR344-Fc 具有神经元保护作用。

实施例 11

Fc-sNogoR-1 融合蛋白的制备和纯化

[0203] 编码大鼠 Nogo 受体 1 的 1-310 氨基酸的 cDNA 构建体与位于哺乳动物表达载体上的大鼠 IgG1 Fc 融合，用电穿孔将该载体转入中国仓鼠卵巢(CHO) (DG44)细胞中。细胞在含有 10%透析的胎牛血清、2mM 谷胺酰胺和抗生素及抗霉剂的 alpha-MEM 培养基中维持。转染后两

天，收获条件培养基，在还原条件下用蛋白印迹分析。使用多克隆兔抗 Nogo 受体 1 抗体检测到一个约 60kD 的蛋白条带。使用 R-PE 偶联的山羊抗大鼠 IgG 抗体对细胞进行扩增和筛选。在第二次筛选后，将细胞接种到 96 孔培养板中，接种密度为每孔一个细胞。使用三明治 ELISA 检测和比较每一个孔中分泌出的可溶性 Nogo 受体 1 蛋白水平。ELISA 平板包被有山羊抗大鼠 IgGFcκ特异的抗体。使用条件培养基。用 HRP 偶联的驴抗大鼠 IgG Fab, Fc-特异的抗体检测结合上的可溶性 Nogo 受体 1 蛋白。克隆 4C12 具有最高的分泌水平。4C12 在旋转培养瓶中的 CHO-M7 培养基中扩增和生长。在 37 C 时的分泌水平大约是 10 毫克/升。

[0204] 大量培养表达 sNogoR310-Fc 融合蛋白的 CHO 细胞。从 10 升的生物反应器一次培养获得 1.7 升浓缩的条件培养基。加入 1/10 体积的 1.0 M Tris-HCl, pH 8.9 升高 pH 值。加入固体的氯化钠和甘氨酸至浓度分别为 3.0M 和 1.5M。准备 60 毫升蛋白 A-Sepharose™层析柱，用 10 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, 1.5 M 甘氨酸, pH 8.9 平衡。浓缩的条件培养基上柱，使用蠕动泵控制上样速度为 1.5 毫升/分钟。用 300 毫升 10 mM Tris-HCl, 3 M 氯化钠, 1.5 M 甘氨酸, pH 8.9 然后用 120 毫升 5 mM Tris-HCl, 3 M NaCl pH 8.9 洗柱。用 25mM 磷酸钠、100mM NaCl, pH2.8 溶液洗脱蛋白。在含有 1.0 毫升 1.0 M HEPES, pH 8.5 的试管中收集 10 毫升洗脱级分。混和蛋白质洗脱级分，每次用 2 升 5 mM 磷酸钠, 300 mM NaCl, pH 7.4 透析，连续三次。

实施例 12

脊髓横切实验

[0205] 为了检测其促进体内功能性恢复的能力，使用大鼠脊髓横切实验检测了 sNogoR-1 融合蛋白。

[0206] 使用当日新鲜配制的待测溶液（sNogoR310-Fc 溶于 PBS）充满 Alzet®渗透压泵。装载浓度计算为 5 和 50 μM。在向动物

移植之前，泵在 37 C提前运转 40 小时以上。雌性 Long Evans 大鼠在术前给服止痛药和镇静剂，并使用 3%异氟烷（在氧气中）麻醉。

[0207] 将大鼠置于立体定向架中，暴露运动皮质，用于在两侧灌输脊髓束示踪剂 BDA（分子量为 10,000）。然后对大鼠实施 T5-T6 段脊髓背部半切断，之后移植髓鞘内导管和泵系统，以输送待测化合物（每组 11 只大鼠）。

[0208] 术后让大鼠自由恢复和存活，直至第 28 天。损伤诱导之后使用 BBB 系统记录行为评分，直至第 28 天，即本研究中的有生命阶段结束之前。灌注和固定之后，取出脊髓，冷冻保存，切片，染色，进行轴突计数。

[0209] 对小鼠和大鼠在损伤后进行 BBB（Basso-Beattie-Bresnahan）（Basso 等人 1996，Newrotrauma13,343-359）运动评分、斜板试验和倾斜格栅行走试验（Li 和 Strittmatter,2003，J Neurosci.2003,23,4219-27）。对于斜板试验，我们测量了小鼠停留 5 秒钟不滑下时，50 厘米×60 厘米板能够倾斜的最大角度。对于倾斜格栅行走试验，训练小鼠爬上倾斜 45 度的线格栅（35 厘米长，2.54 平方厘米的方格）。每次从下到上爬行的过程中计数后爪落在栅格板以下的次数。使用 BBB 运动功能评分、格栅行走和脚印分析对大鼠进行行为学检测。对于格栅行走，训练大鼠爬上线格栅（70 厘米长，2.54 平方厘米的方格），计数后爪落在栅格板以下的次数。对于脚印分析，用墨水记录大鼠在连续运动经过 90 厘米长的跑道时后爪的行走模式，计算每侧的步幅长度和步幅宽度(Metz et al., 2000, Brain Res., 883, 165-177)。所有这些行为学测验至少由两个人进行。在手术、行为学测验和组织分析的全过程中，研究者不知道迷你泵中的化合物是什么。

[0210] sNogoR310-Fc 促进功能的恢复（图 12）。

实施例 13

大鼠脊髓挫伤实验

[0211] 用大鼠脊髓挫伤实验检测可溶性 Nogo 受体 1 多肽和融合蛋白对体内神经元的作用。

[0212] 使用止痛剂和抗生素预防性的处理头包头巾的 Long Evans 雌性大鼠（体重 170-190 克）。手术前 10 分钟，通过腹腔注射咪达唑仑 2.5 毫克每公斤体重使动物镇静，然后用 2-3% 异氟烷（混于氧气中的）使动物麻醉。然后将大鼠的毛刮掉，用乙醇和聚维酮碘擦拭，在眼部施用眼润滑剂。接下来沿着中线切开，暴露 T7 到 T12 段椎骨。

[0213] 在 T9 1/2 和 T10 段脊椎处进行背部 椎板切除术，暴露脊髓。将大鼠安放在冲击器上。首先将 T7 和 T8 节段夹住，然后将 T11 和 T12 节段固定在冲击器尾侧的夹子上。在大鼠的胸部下方放一块柔软的材料。将冲击棒设置在 0 的位置，将电地线夹连在伤口边缘。然后将冲击棒抬高到 25 毫米，调节其位置至它恰巧正好在暴露的脊髓之上。然后释放冲击棒击中脊髓，之后立即抬起冲击棒。

[0214] 然后将大鼠从冲击器上放下，在伤口处抹上 Gelfoam®。缝合伤口之上的肌肉，切口通过手术胶带封合。将动物置于一个孵化器内直至它们从麻醉中苏醒。根据需要为大鼠提供抗生素、止痛剂和盐水。此后每天早晚挤压膀胱，直至功能恢复。

[0215] 如上所述，通过髓鞘内向上述的大鼠脊髓横切模型施用可溶性受体 1 融合蛋白(例如 sNogoR310-Fc)。术后第二天进行 BBB 评分，之后每周一次，直至 4 到 6 周。

实施例 14

sNogoR310 在转基因小鼠中的表达

[0216] 我们制备了表达可溶性Nogo受体1蛋白的转基因小鼠，以检测可溶性 Nogo 受体 1 蛋白在体内表达时的作用。

[0217] 我们将小鼠的 sNogoR310 cDNA（对应于 Nogo 受体 1 的 1-310 氨基酸; SEQ ID NO: 28）克隆入 C-3123 载体的 *Not*I 位点中。在

这个载体中，sNogoR310 的表达是在神经胶质原纤维酸性蛋白(*gfap*)基因的调控序列的控制下的，这可以产生高水平表达，并且表达产物可以从损伤部位的活性星形胶质细胞中分泌出来。接下来我们用 *Aat*I 和 *Sfi*I 消化得到的载体，在 3.4kb 片段上分离出 *gfap::sNogoR310* 构建体。我们将这个片段微注射入胚胎中产生转基因小鼠。我们通过 PCR 证实了转基因已经整合并且鉴定出了 5 个起始品系。我们将具有最高表达水平的两个杂合雄性起始品系与雌性 C57BL/6J 小鼠交配。我们使用抗 Nogo 受体 1 的抗体，进行蛋白质印迹分析，确证在杂合的转基因小鼠中，GFAP 阳性的细胞表达和分泌 sNogoR310。

[0218] 我们将皮质和脊髓在含有蛋白酶抑制剂(Roche)的 Tris 盐缓冲盐溶液中匀浆，在 4℃ 40,000 rpm 离心匀浆产物 20 分钟。我们用 4%多聚甲醛处理上清 20 分钟以提高抗体的特异性，并在免疫印迹之前进行透析。我们通过在 RIPA 缓冲液(含 1% Triton® X-100, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS 的 PBS)中用超声波处理匀浆微粒级分，将得到的匀浆产物离心，同上处理此上清（去污剂－可溶性微粒级分）。我们使用 1:2000 稀释的 Nogo 受体 1 的兔抗血清，通过免疫印迹分析了 20 微克的大脑或脊髓蛋白质。在与 AP 偶联的抗兔 IgG 和 NBT/BCIP AP 底物孵育之后，我们显现了免疫反应性。

[0219] 我们检测到，在两个转基因品系 Tg08 和 Tg01 的皮质和脊髓的不含去污剂的可溶性提取物中有分泌型 37kD sNogoR310，但是在同窝野生型小鼠中不存在任何大小为 37kD 或 81kD 的可溶性 Nogo 受体 1 蛋白的（若有也很少）。对微粒级分的检查证明了在野生型和转基因小鼠中都存在相当水平的内源 Nogo 受体 1。

实施例 15

损伤之后在转基因小鼠中表达 sNogoR310

[0220] 通过背部过半切断损伤，检测中枢神经系统损伤对 sNogoR310 在转基因小鼠中表达的影响。我们通过如实施例 14 中描述的

方法将杂合雄性与 C57/BL6 雌性交配，获得 sNogoR310 转基因动物和非转基因对照动物。

[0221] 我们深度麻醉成年雌性杂合转基因或同窝野生型小鼠（10-16 周龄），实施完全椎板暴露手术，将背部脊髓 T6 和 T7 段完全暴露。我们对 T6 段脊髓实施背部过半切断，使用 30 号针和显微手术剪将背部和背外侧皮质脊髓束（CTS）完全分开。我们用做了记号的针多次穿过脊髓的背段，以确认损伤的深度为 1.0 毫米。我们缝合椎板暴露手术上方的肌肉层，使用手术胶带将背部皮肤封合。为了跟踪皮质脊髓束，我们在脊髓损伤后 14 天在大脑皮质上方的右侧向颅骨内钻了一个骨窗。我们在皮质表面以下 0.7 毫米深的四个位置注射示踪剂 BDA（分子量 10000，浓度为 10%溶于 PBS）(Molecular Probes, Eugene, OR)。损伤后四周，小鼠心脏灌注 PBS，然后用 4%多聚甲醛固定。用于 sNogoR310 表达实验的小鼠不注射任何示踪剂。

[0222] 用于蛋白印迹分析的小鼠，损伤之后 14 天，不进行灌注，收集在 T3 和 L3 段之间的脊髓。用于 Nogo 受体 1 免疫组织化学染色的小鼠在半切后 10 天用 4%多聚甲醛灌注,取出受损的脊髓进行切片。使用固定于立体定位装置(David Kopf, Tujunga, CA)中的 11 号解剖刀的刀刃对转基因和野生型小鼠实施皮质针刺损伤，以检查 sNogoR310 在受损脑部中的表达。在前囟后 0.5 毫米、距离中线侧 1.5 毫米处作一个 4 毫米长的副矢状切割，切割为 3.5 毫米深。

[0223] 损伤 10 天以后，我们在转基因小鼠的脊髓可溶性提取物中检测到 sNogoR310 表达的提高，但是在野生型小鼠中没有检测到。这与损伤后在损伤部位周围 GFAP 的水平升高是一致的。为了确证这不是由于 NogoA 补偿性增量调节造成的，我们检测了 NogoA 的表达，发现其在野生型或转基因小鼠中完整未损的或者受损的皮质和脊髓中表达是类似的。

[0224] 我们使用 Nogo 受体 1 抗体和 GAFP 抗体，通过对受损的脑和含有受损区域的脊髓进行免疫染色，检查了在受损 CNS 中 sNogoR310 的细胞表达。有反应活性的星形胶质细胞的神经胶质在野生

型和转基因小鼠中没有形态学差异，但是在 *gfap::sNogoR310* 转基因小鼠中的细胞内和细胞外间隙中，Nogo 受体 1 的染色强度明显高于野生型小鼠，表明在转基因小鼠的损伤周围，sNogoR310 表达的提高。Nogo 受体 1 蛋白和星形胶质细胞标记 GFAP 仅在转基因小鼠中共定位。在转基因样本中，存在明显增强的非细胞染色扩散，这与细胞外间隙中的 sNogo310R 是一致的。在野生型和转基因小鼠中都检测到了神经元细胞体的 Nogo 受体 1 染色。

实施例 16

分泌的 sNogoR310 诱导转基因小鼠中 CSF 出芽

[0225] 我们检测了转基因小鼠中损伤周围 sNogoR310 表达的提高是否导致受损轴突的再生。

[0226] 我们根据 Li 和 Strittmatter, 2003, J. Neurosci., 23, 4219-27，通过在右侧运动皮质中注射顺向示踪剂生物素葡聚糖胺(BDA)检测了下行皮质脊髓束（CSF）的完整性。在同窝野生型小鼠中，在损伤位置的头向，凸起的背部皮质脊髓束被紧紧绑缚在一起，在同侧能看到只有少数背外侧 CST 纤维。少量的 BDA 标记的短侧芽伸向灰质，特别是在腹侧脊髓中，但是出芽主要局限于与示踪剂注射对侧的脊髓中。但是在 sNogoR310 转基因小鼠的背部半切断位置头向的切片中显示了十分不同的 BDA 标记分布。在所有的转基因小鼠品系 Tg08 或者 Tg01 中，在凸起的背部皮质脊髓束以外都观察到了高密度的 BDA 标记的 CST 纤维。异位纤维遍布灰质区域，而一些纤维到达了外侧和背外侧的白质中。在脊髓的对侧（示踪剂注射点的同侧）可见许多纤维（每个横切中 4-12 个芽）。侧芽的微量光密度测量表明在 sNogoR310 转基因小鼠中出芽密度大约增加了 10 倍。对 sNogoR310 转基因小鼠距离损伤处 1 到 4 毫米的副矢状面纵切切片进行检查，发现 dCST 纤维向腹侧灰质区域伸出大量分支芽，这与同窝野生型小鼠形成对比。一般来说，在转基因小鼠中，在损伤位置的头向出芽的型式和程度与全身使用 Nogo 受体 1 拮抗肽

NEP1-40 治疗的小鼠中观察到的类似(Li 和 Strittmatter, 2003)。

[0227] 这些结果证明分泌的 sNogoR310 诱导转基因小鼠中 CST 出芽。

实施例 17

在 sNogoR310 转基因小鼠中，CST 轴突越过损伤部位向脊髓远端生长

[0228] 我们从转基因小鼠中分离出离损伤部位头向 4 毫米且尾向 4 毫米的脊髓（总共 8 毫米长），将其包埋于戊二醛聚合的白蛋白基质中，在振动切片机上作副矢状（30 微米厚）切割。我们收集离损伤部位头向 5-7 毫米且尾向 5-7 毫米的脊髓横切（50 微米）。对于大鼠中的 sNogoR310-Fc 注射实验，离损伤部位头向 10 毫米且尾向 10 毫米延伸的脊髓，在振动切片机上作副矢状切割（50 微米厚）。收集离损伤部位头向 11-16 毫米且尾向 11-16 毫米脊髓的横切。将切片与亲和素-生物素-过氧化物酶复合物共同温育，使用镍增强的二氨基联苯胺 HPR 反应(Grandpre, 2002, Nature, 417, 547-551)来显现 BDA 示踪剂。我们处理了一些用于 5-羟色胺组织化学（抗 5-羟色胺抗体）的切片，使用间接免疫荧光技术。为了看到受损的区域，我们用 GFAP 抗体(Sigma®, St. Louis, MO)对一些切片进行了双染色。我们对切片进行了封固、脱水，并用封固剂覆盖切片。

[0229] 我们检测转基因小鼠受损后表达的 sNogoR310 诱导出的纤维是否跨过受损区域到达尾向脊髓，使得功能恢复。

[0230] 在显微镜描图器中描绘的跨越损伤部位的连续副矢状切片显示损伤部位周围几个毫米处再生的 CST 纤维呈全面分布。野生型小鼠的切片显示没有从受损部位处伸出的 CST 纤维。sNogo310 转基因小鼠的类似切片显示大量跨越横切区域的 CST 纤维，且伸向远端的灰质和白质区域，呈现高度分支的型式。在半切的头向近旁，来自凸起 dCST 的、高密度的 BDA 标记的 CST 出芽伸向受损区域，但是大多数 CST 出芽

不能穿越疤痕形成和组织空洞大量存在的横切区域。小量但是非常显著的一部分再生轴突，通过腹侧和腹外侧灰质和白质的残余组织桥，绕过受损部位。此外，少量 CST 纤维自身通过受损的背侧和背外侧脊髓跨过横切区域，到达远端区域。在损伤的附近，再生纤维的行进路线通常是曲折的，与头向 CST 中正常平直的纤维显著不同。在远端脊髓的灰质区域中经常见到的是平行纤维和树枝状纤维。重建表明，在各转基因小鼠中，在损伤部位尾向 1-4 毫米的任何水平，5-15 BDA-标记的再生纤维沿着头－尾向轴向行进。在所有转基因小鼠中，在背部半切断尾向的 5-7 毫米的横切切片中，在灰质和白质区域都可以观察到 BDA 标记的 CST 轴突。转基因小鼠的纤维计数提示，在矢状切片中的近端水平上有大致相近数目的 BDA 标记的 CST 纤维。

[0231] 除了 CST 纤维以外，其他下行传导束，例如缝核脊髓（raphespinal）纤维，也在小鼠的运动功能中起作用。在这个小鼠背部过半切断模型中，横切损伤了大部分 5-羟色胺能纤维，使腹角中这些纤维的密度降低了大约 80%。对尾向脊髓腹角中 5-羟色胺能纤维的分析表明，在转基因小鼠中这些纤维的数目比野生型小鼠中的多，显示 sNogoR310 在转基因小鼠中的生长促进作用并不只限于一条轴突下行路径。

实施例 18

转基因表达 sNogoR310 促进运动功能的恢复

[0232] CST 轴突示踪和 5-羟色胺能纤维分析表明在转基因小鼠中星形胶质细胞释放的 sNogoR310 刺激脊髓中受损的下行轴突广泛的结构再生。我们进行了许多行为学实验，如实施例 12 所示，以确定这些再生的纤维是否有益于功能恢复。

[0233] 根据 BBB 实验给出的结果，野生型小鼠在 4 周的存活期内部分地恢复了运动功能。在损伤后 4 周时，大多数野生型小鼠的功能恢复到了持续负重的跖肌步行，但是它们仅仅表现出偶尔到经常的前后

肢协调，在刚刚接触测试表面时出现优势爪位置的旋转。与此相反，在7-28天的观察期内，sNogoR310转基因小鼠的两个品系Tg08和Tg01的BBB评分显著高于对照组（图13A和13B）。损伤后28天，大多数转基因小鼠表现出持续的前后肢协调，而且优势爪位置与身体平行。

[0234] 我们使用两个另外的行为学实验进一步鉴定sNogoR310转基因小鼠的表现。首先我们测量了小鼠能够在5秒钟之内不滑下的最大平板倾斜角度。在背部半切断损伤之前，转基因和野生型小鼠都能够在平板倾角为55度时保持它们的姿势。在损伤后7-28天内，对于所有的小鼠，可以经受的倾角都有所缩小，但是转基因小鼠的可经受的倾角明显大于对照组小鼠（图13C）。在另一个行为实验中，小鼠攀爬与垂直方向呈45度角的格栅，并计数爬行途中后肢落在格栅的平面以下的次数(Metz et al., 2000)。在损伤之前的训练中，所有的小鼠都没有在该实验中出现这样的错误。在损伤后2-6周期间，野生型小鼠出现大量的后脚错误，且只有最低限度的提高。与此相反，在此期间，sNogoR310转基因小鼠在爬格栅实验中表现出持续的提高，主要的提高出现在损伤后1-3周之间（图13D）。这样，从星形胶质细胞分泌sNogoR310的转基因小鼠在胸髓（thoracic spinal）半切断之后表现出CST再生，缝核脊髓出芽和运动功能的增强。

实施例19

髓鞘内施用sNogoR310-Fc蛋白诱导CST出芽

[0235] 作为第二个检测可溶性Nogo受体1在脊髓外伤之后有促生长益处的实验，我们髓鞘内给药纯化的蛋白。

[0236] 我们将大鼠Nogo受体1的配基结合结构域(27-310)与大鼠IgG1 Fc结构域相融合，以提高稳定性，有助于纯化。我们从稳定转染的CHO细胞中纯化蛋白。该蛋白阻断Nogo-66, MAG和髓鞘在体外的作用，如以前对小鼠sNogoR310-Myc His的研究所示(Fournier et al., 2002, J Neurosci., 22, 8876-8883; Liu et al., 2002, Science, 297,

1190-1193)。我们通过渗透压小泵，将 sNogoR310-Fc 蛋白髓鞘内给予受到中胸背部半切断损伤的小鼠。在损伤后 4 周的存活期内，每只大鼠局部注射 1.2 毫克 sNogoR310-Fc 蛋白。在接受载体处理（1.2 毫克大鼠 IgG）的大鼠中，半切断位置头向的切片显示在损伤部位上方有紧紧绑缚的突出背部 CST 和极少的异位 BDA 标记的 CST 纤维。接受 sNogoR310-Fc 蛋白的损伤大鼠，其损伤位置头向的切片显示了十分不同的标记分布模式。从横切和副矢状切片中可以观察到大量从 BDA 标记的 CST 上发出的异位纤维。有些情况下，突出越过了临近中线的 dCST 区域，到达索的周围，与背外侧的 CST 混和在一起。出芽的轴突在灰质中的扩展比在白质中的扩展程度要大。测量显示，在 sNogoR310-Fc 处理的大鼠中与 dCST 邻近的异位出芽纤维（在横切中≥100 微米；在矢状切面中≥200 微米）增加得更多。

实施例 20

在 sNogoR310-Fc 治疗的大鼠中，CST 轴突的再生向远端脊髓进行

[0237] 我们对雌性 Sprague Dawley 大鼠（体重 190-250 克）实施深度麻醉，在 T6-7 段脊髓实施胸椎暴露术，暴露脊髓。我们切开脊髓背部一半，使用 30 号针和显微剪刀将背部 CSGT 束分开，并用 11 号手术刀的锋利的刀刃通过髓的背部一半(Grandpre et al., 2002, Nature, 417, 547-551)以确保损伤的深度（1.8 毫米）。渗透压小泵（(Alzet® 2ML4，2 毫升容积，2.5 微升每小时，28 天给药)中充满含有 1.2 毫克大鼠 IgG 的 PBS 或者含 1.2 毫克 sNogoR310-Fc 融合蛋白的 PBS，将泵缝在动物背部皮肤下的肌肉中。与小泵的出口相连的导管，通过一个硬脊膜上的小洞，被插入到 T7-8 段脊髓的髓鞘内空隙。

[0238] Nogo 受体 1 拮抗剂蛋白灌输在大鼠半切断位置的头向诱导出大量的出芽，但是更为关键的问题是出芽的 CST 纤维是否伸向远端脊髓且是否有助于运动功能恢复。在载体处理的大鼠中，损伤部位的纵切切片显示，在损伤以下没有可被检测到的或者只检测到很少数目的

BDA标记的腹侧CST纤维(GrandPre et al., 2002; Weidner et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 3513-3518)。来自经sNogoR310-Fc治疗的大鼠的类似切片显示，有许多BDA标记的纤维通过腹侧和腹外侧脊髓的桥梁组织绕过了横切部位伸向脊髓的尾向。对星形胶质细胞标记GFAP的免疫染色显示，横切到达的深度深过脊髓的中央管区。与突出的背部CST中头向纤维的线形走势不同，再生的CST纤维在远端脊髓中通常呈现高度的分支型式，特别是在灰质区内。在脊髓的许多区域内都检测到这些纤维，但是在整个脊髓的中部和背部一半可以更容易地看到。矢状切片中的CST纤维计数显示，在每一只sNogoR310-Fc治疗的大鼠中，损伤部位后面1-2毫米处有大约20个BDA标记的轴突；且在损伤部位远端7-8毫米处有15个标记的轴突。

[0239] 一般来说，这些纤维的分支型式与局部NEP1-40肽处理的动物中出现的分支型式相似，但是使用sNogoR310-Fc蛋白治疗的切片中可以看到每一个芽体更加向两侧分支。对从远端脊髓发出的芽进行测量，表明sNogoR310-Fc处理的动物中每一个芽的总侧向长度是NEP 1-40处理的动物中的两倍。脊髓尾向1-10毫米内芽体(长度≥200微米)的数目，在两组Nogo受体1拮抗剂处理的大鼠中都比对照组大20-40倍。与局部使用NEP 1-40的治疗比较，sNogoR310-Fc治疗的大鼠中可以看到更多的出芽（NEP组中每只大鼠约25个出芽，sNogoR310-Fc组中每只大鼠约50个出芽），但是这种区别在统计上不显著 (p=0.1713, t检验)

[0240] 在接受sNogoR310-Fc治疗的大鼠半切断部位尾向11-15毫米处的脊髓横切切片中，可以见到正在再生的CST轴突。这些纤维在脊髓的灰质和白质中都可以检测到。与白质相比，在灰质中检测到的纤维通常具有更加侧向的分支。与此相反，赋形剂处理组的横切切片中，在腹侧白质区域中，只能偶尔看到BDA标记，这与未损伤组的腹侧CST轴突一致。在远端脊髓的这一水平上，两种Nogo受体1拮抗剂处理组（sNogoR310-Fc和NEP 1-40）中BDA标记的CST纤维的平均数目是载体处理大鼠的大约20倍。两种Nogo受体拮抗剂--

sNogoR310-Fc 蛋白 和 NEP 1-40 肽一起，可以使远端脊髓中产生显著的 CST 轴突再生，但是由 sNogoR310-Fc 蛋白诱导出的出芽呈现出更为高度分支的模式。

实施例 21

局部 sNogoR310-Fc 诱导受损的大鼠脊髓中红核脊髓的和 5-羟色胺能轴突的出芽

[0241] 半切断后 14 天，在下肢感觉运动皮质上方的颅骨的各侧钻一个骨窗，以示踪 CST 纤维。在各侧硬脊膜下深度为 1.5 毫米的 7 个注射部位注射顺向的神经元示踪剂 BDA（溶于 PBS 中，浓度为 10%，每个皮质 3.5 微升）(Grandpre, 2002)。对于大鼠中红核脊髓束的示踪，将示踪剂 BDA（分子量 10000，溶于 PBS 中，浓度为 10%，1 微升）注射入左侧的红核内（前囟前 5.8 毫米，距离颅骨表面外侧 0.7 毫米，腹侧 7.0 毫米）。BDA 注射后两周，依次使用 PBS 和 4%多聚甲醛灌注动物，收集组织，用于组织学分析。

[0242] 脊髓损伤之后功能改善的原因是受损红核脊髓束（RST）纤维的修复(Liu et al., 1999, J. Neurosci., 19, 4370-4387)。在 CNS 神经元内 Nogo 受体 1 的广泛分布使得 Nogo 受体 1 被其拮抗剂抑制可能导致 RST 轴突在受损后重新生长。为了检测 sNogoR310-Fc 对受损 RST 的作用，使用 BDA 注射入左侧红核，示踪该途径的完整性。在脊髓水平上，RST 纤维一般位于脊髓的背外侧白质区，且被本研究中的背部半切断横切开。在对照组大鼠中，损伤头向 11-15 毫米处的横切切片显示，在突出的 RST 和背角灰质之间可以看到少量的 BDA 标记的短纤维。在同一水平的 sNogoR310-Fc 处理的切片中，在 RST 主干和背角灰质之间呈现有许多连接纤维。载体处理的大鼠中，距离 SCI 远端 11-15 毫米处的横切切片显示，没有 BDA 标记的 RST 纤维。与此相反，接受 sNogoR310-Fc 处理的同一水平的切片中显示，在示踪剂注射对侧的灰质和白质中有大量的 BDA 标记的 RST 纤维。在与 BDA 注射同侧的灰质中

可见一些具有分支模式的出芽。

[0243] 在经 sNogoR310-Fc 治疗的脊髓损伤的大鼠中还检查了红核脊髓束纤维。免疫染色表明，损伤部位头向 11-15 毫米处 5-羟色胺能纤维的密度在接受载体和 sNogoR310-Fc 治疗的组中大致相同。在损伤部位下面 11-15 毫米处的切片中，sNogoR310-Fc 治疗的大鼠的 5-羟色胺纤维的数目是对照组的两倍。这些结果表明 sNogoR310-Fc 蛋白对 Nogo 受体 1 的抑制作用不止限于 CST 纤维，而且其他下行束，例如红核脊髓束和 5-羟色胺能轴突，也对 Nogo 受体 1 拮抗作用有反应。

实施例 22

使用 sNogoR310-Fc 局部治疗增进大鼠的功能恢复

[0244] 通过髓鞘内给药 sNogoR310-Fc 蛋白，促进外伤性脊髓损伤后许多下行途径中轴突的再生。我们检测了该蛋白在受损的脊髓中是否还增进了功能恢复。

[0245] 半切断后两周，接受赋形剂治疗的大鼠的运动功能 BBB 评分达到了稳定的 12 分水平（图 14A）。损伤后 4 周，大多数对照（7 个中有 6 个）具有频繁到持续的负重跖肌步行，以及频繁到持续的前后肢协调，但是它们在初次接触测试表面时，优势爪位置有旋转。与此相反，接受 sNogoR310-Fc 蛋白治疗的大鼠中，运动功能评分在损伤后 2 到 4 周内持续升高。损伤后的 4 周时，所有 9 只 sNogoR310-Fc 治疗的动物都具有持续的前后肢协调，并且爪在首次接触测试表面时是平行的。

[0246] 使用格栅行走来评价脊髓损伤后下行精细运动控制中的缺陷(Metz et al., 2000)。格栅行走需要前后肢的协调和由腹外侧纤维、皮质脊髓纤维和红核脊髓束纤维介导的自主运动控制。在损伤之前的训练中，所有的大鼠都准确地将它们的后肢放在格子的边框上。损伤后 2-4 周，对照大鼠在每次行走中要出现 8-9 个错误，并且随时间延长只有最低限度的改善。与此相反，使用 sNogoR310-Fc 治疗的大鼠在格栅行走时表现出稳定的改善，出现的错误显著减少(平均每次行走 4-7

个错误）。改善主要出现在损伤后的 2-3 周。对照组后爪脚印的分析显示，与未受到损伤的大鼠或者接受 sNogoR310-Fc 治疗的受损伤大鼠相比，对照组大鼠半切断后 4 周时步幅的长度显著减小且步幅的宽度增加（图 14C）。因此，这些多种行为学测试表明使用局部注射拮抗剂蛋白抑制了 Nogo 受体 1 的功能，增进了损伤后运动功能的恢复。

生物保藏

[0247] 杂交瘤 HB 7E11 (ATCC® 登录编号 PTA-4587)，HB 1H2 (ATCC® 登录编号 PTA-4584)，HB 3G5 (ATCC® 登录编号 PTA-4586)，HB 5B10 (ATCC® 登录编号 PTA-4588) 以及 HB 2F7 (ATCC® 登录编号 PTA-4585) 2002 年 8 月 9 日保藏于美国模式培养物保藏所("ATCC®")中，地址为 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA。

[0248] 正如本领域内的技术人员所理解的，在不脱离本发明的本质精神的前提下，可以对优选实施例作多方面的改动和调整。这些改动应该是在本发明的范围之内的。

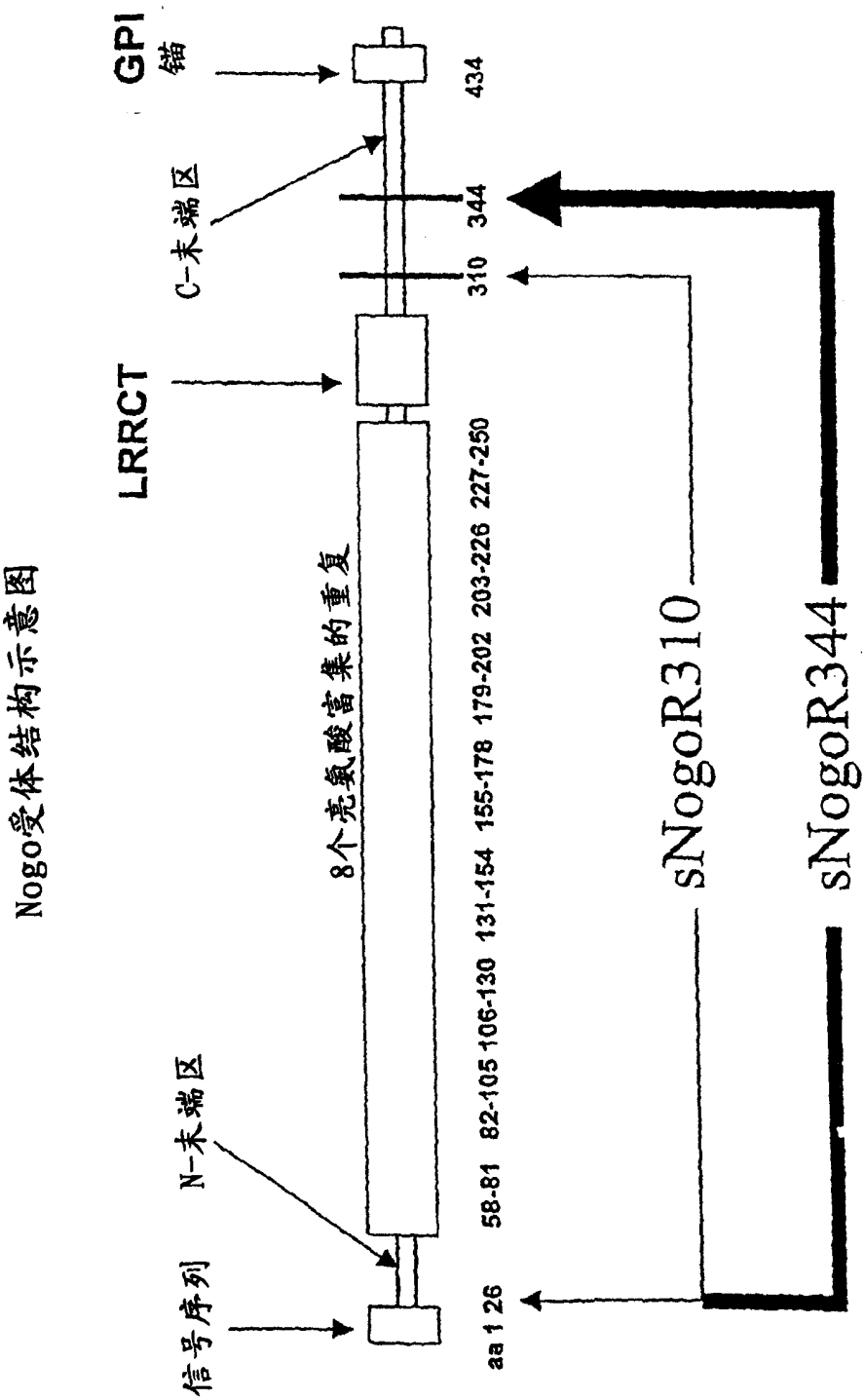

Nogo受体结构示意图
GPI
锚
C-末端区
LRRCT
8个亮氨酸富集的重复
N-末端区
信号序列
aa 1 26
58-81
82-105
106-130
131-154
155-178
179-202
203-226
227-250
310
344
434
sNogoR310
sNogoR344

图1

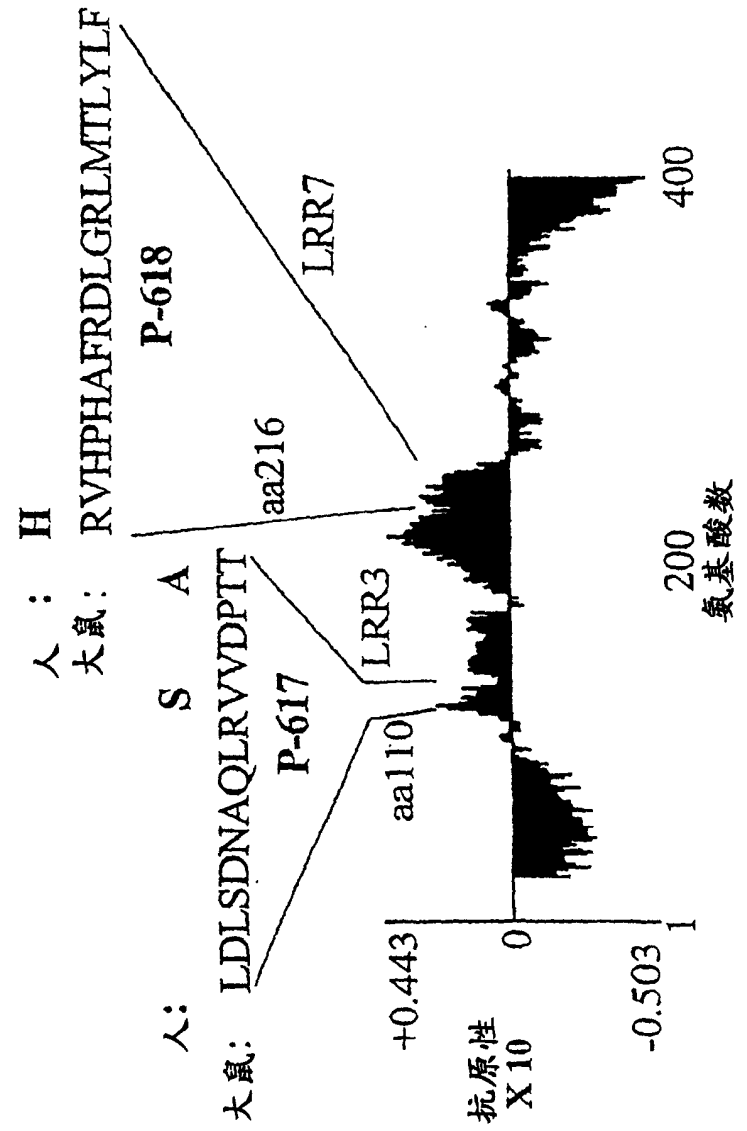

人： H
大鼠： RVHPHAFRDLGRLMTLYLF
P-618
S A
人：
大鼠： LDLSDNAQLRVVDPTT
P-617
aa216
LRR7
LRR3
aa110
+0.443
0
-0.503
抗原性
X 10
1
200
400
氨基酸数

图 2

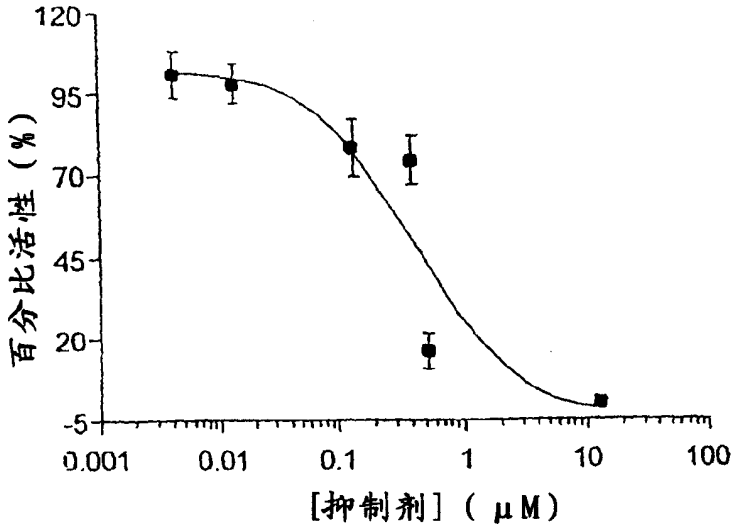

120
95
70
45
20
-5
百分比活性（%）
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[抑制剂]（μM）

图 3A

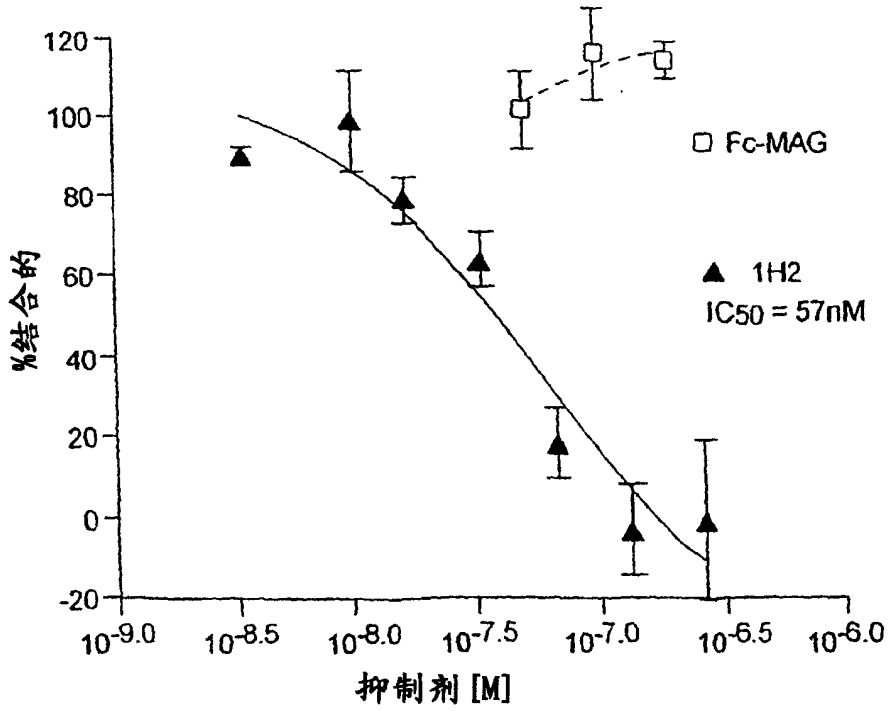

120
100
80
60
40
20
0
-20
%结合的
Fc-MAG
1H2
IC50 = 57nM
10-9.0
10-8.5
10-8.0
10-7.5
10-7.0
10-6.5
10-6.0
抑制剂 [M]

图 3B

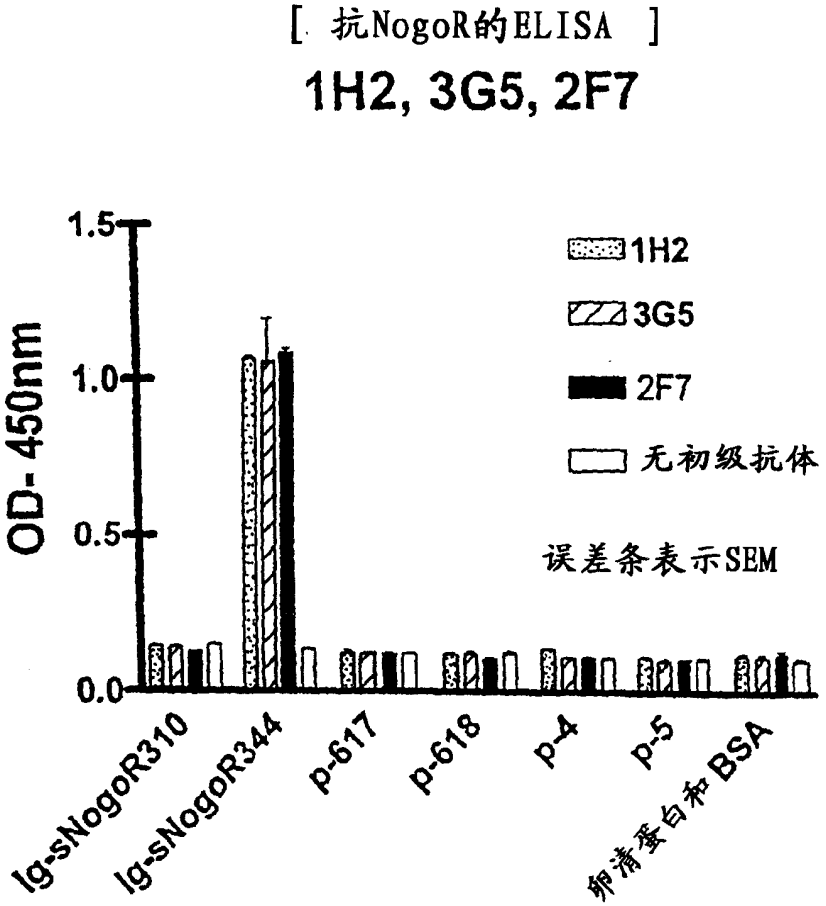

[抗NogoR的ELISA]
1H2, 3G5, 2F7
OD-450nm
1.5
1.0
0.5
0.0
1H2
3G5
2F7
无初级抗体
误差条表示SEM
Ig-sNogoR310
Ig-sNogoR344
p-617
p-618
p-4
p-5
卵清蛋白和BSA
固定化的抗原

图4

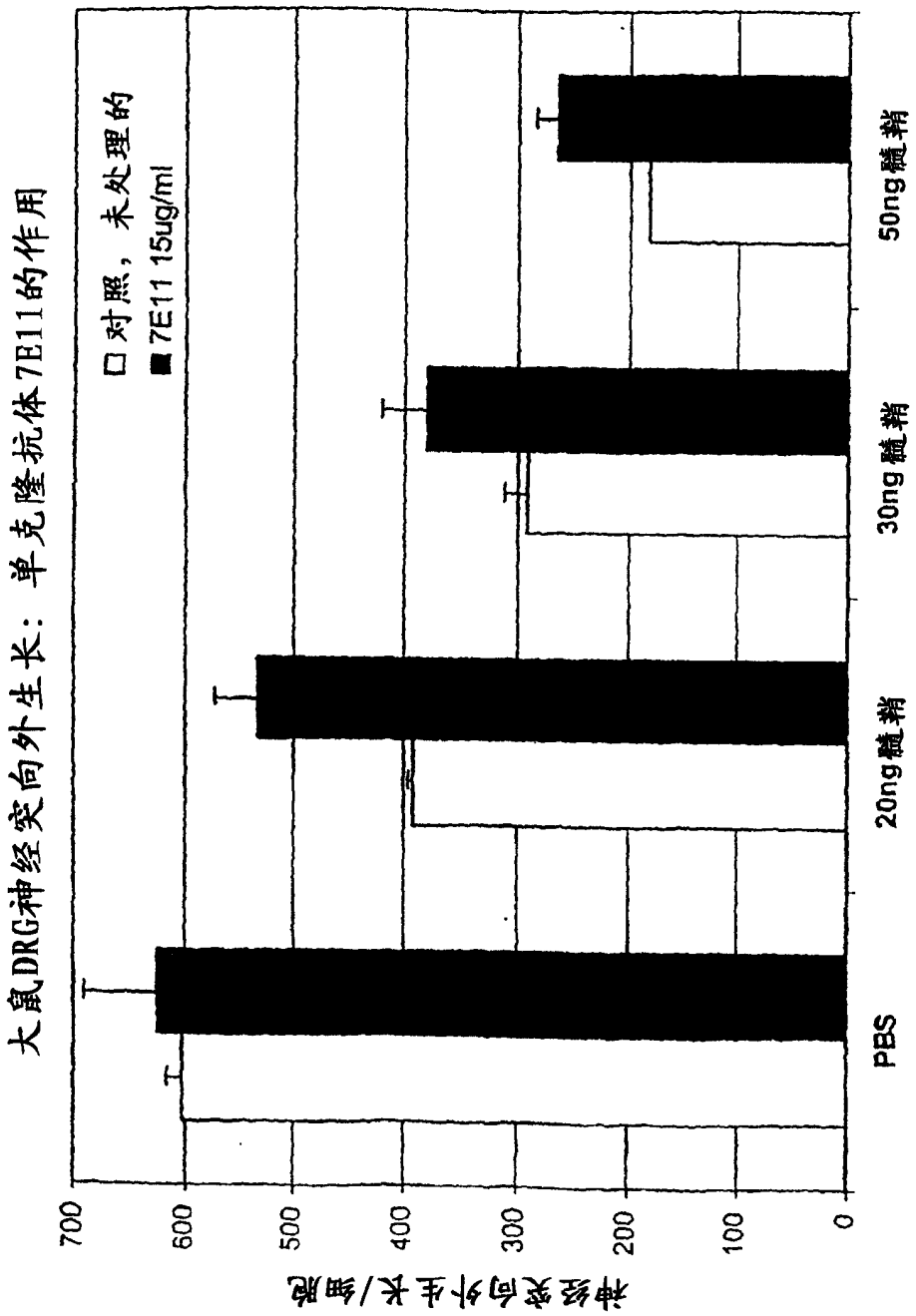

大鼠DRG神经突向外生长：单克隆抗体7E11的作用
□对照，未处理的
■7E11 15ug/ml
神经突向外生长/细胞
0
100
200
300
400
500
600
700
PBS
20ng 髓鞘
30ng 髓鞘
50ng 髓鞘

图5

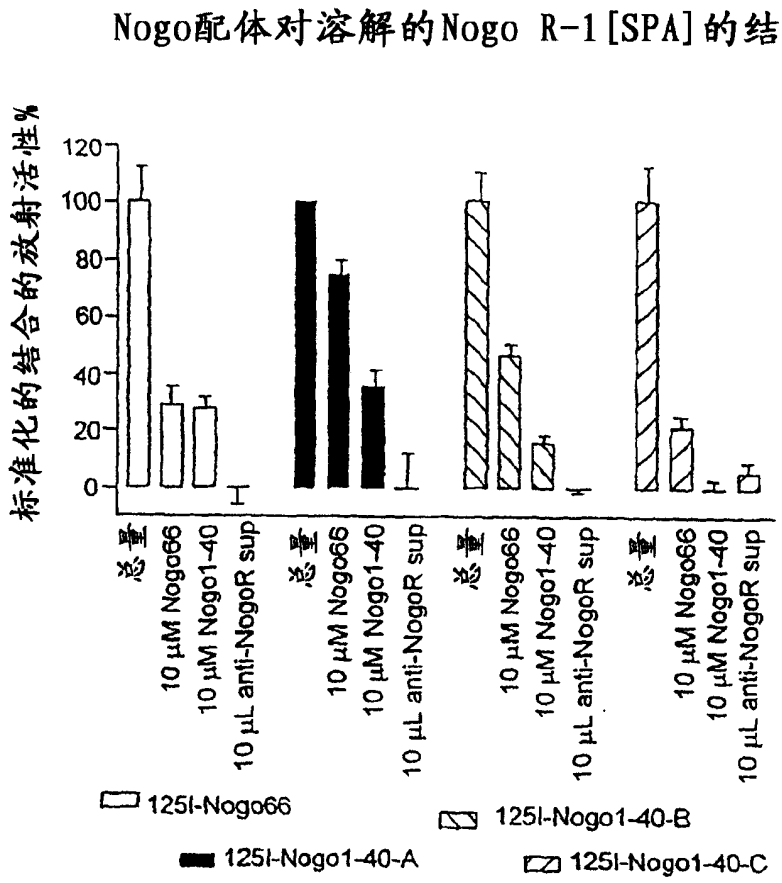

Nogo配体对溶解的Nogo R-1[SPA]的结合
标准化的结合的放射活性%
120
100
80
60
40
20
0
总量
10 μM Nogo66
10 μM Nogo1-40
10 μL anti-NogoR sup
125I-Nogo66
125I-Nogo1-40-A
125I-Nogo1-40-B
125I-Nogo1-40-C

图6A

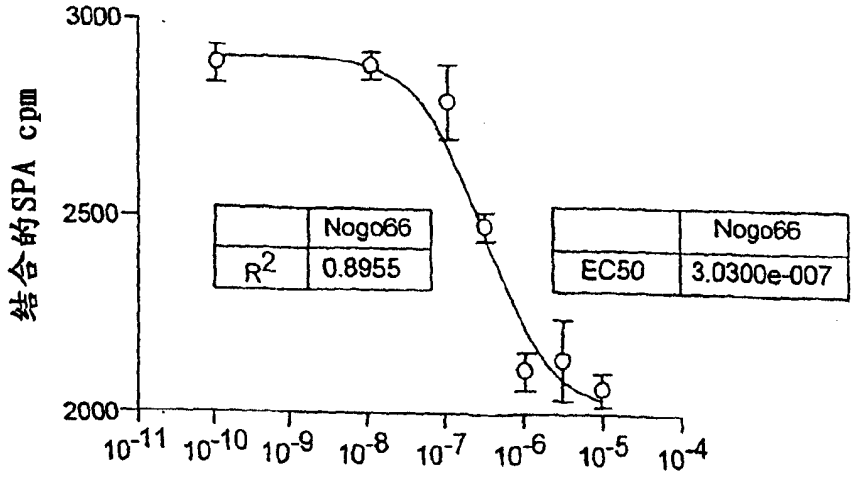

结合的SPA cpm
3000
2500
2000
10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5 10-4
Nogo66
R2 0.8955
Nogo66
EC50 3.0300e-007

图6B

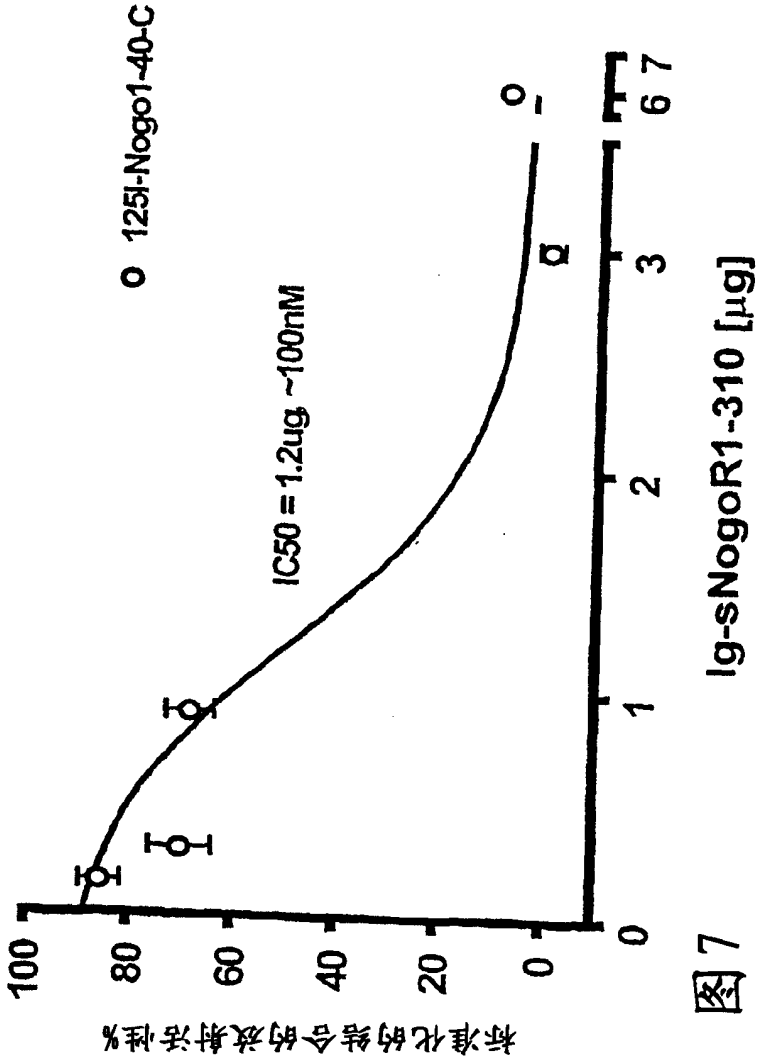

125I-Nogo1-40-C
IC50 = 1.2ug ~100nM
标准化的结合的放射活性%
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
6 7
lg-sNogoR1-310 [μg]

图 7

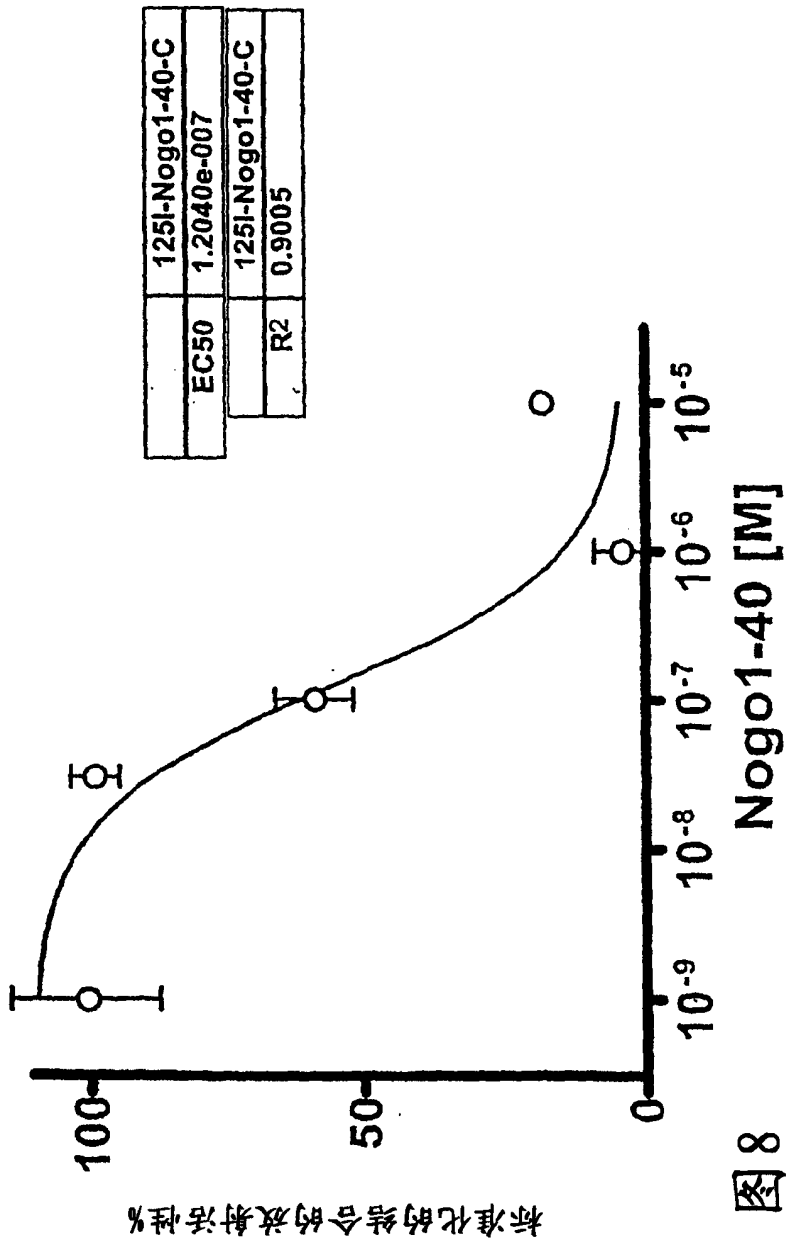

125I-Nogo1-40-C
EC50
1.2040e-007
125I-Nogo1-40-C
R2
0.9005
100
50
0
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
Nogo1-40 [M]
标准化的结合的放射活性%

图8

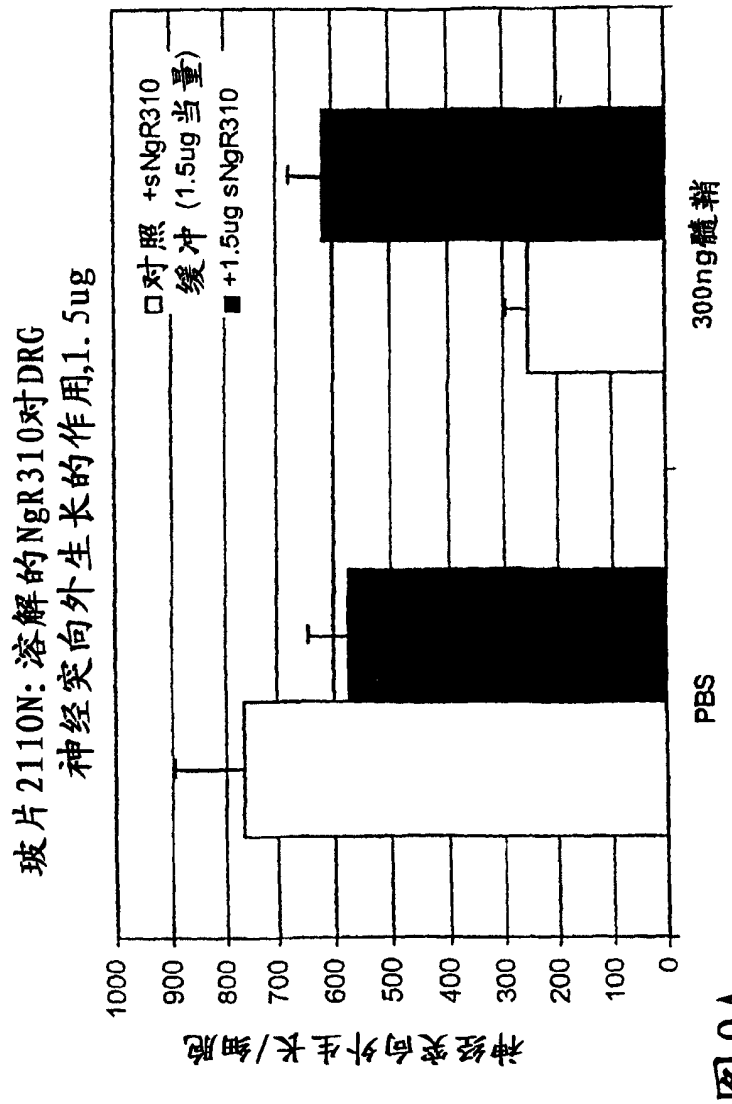

玻片2110N:溶解的NgR310对DRG
神经突向外生长的作用,1.5ug
□对照 +sNgR310
缓冲 (1.5ug 当量)
■ +1.5ug sNgR310
神经突向外生长/细胞
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
PBS
300ng髓鞘

图9A

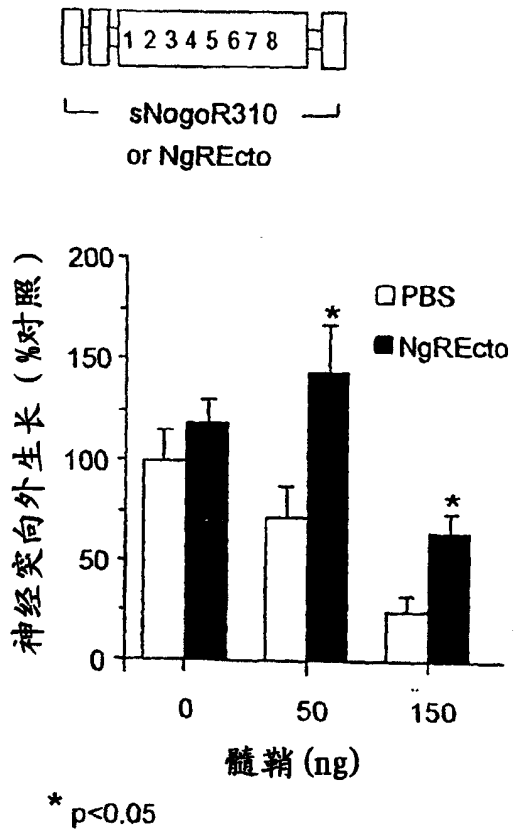

1 2 3 4 5 6 7 8
sNogoR310
or NgREcto
神经突向外生长（%对照）
200
150
100
50
0
PBS
NgREcto
*
*
0
50
150
髓鞘 (ng)
* p<0.05

图9B

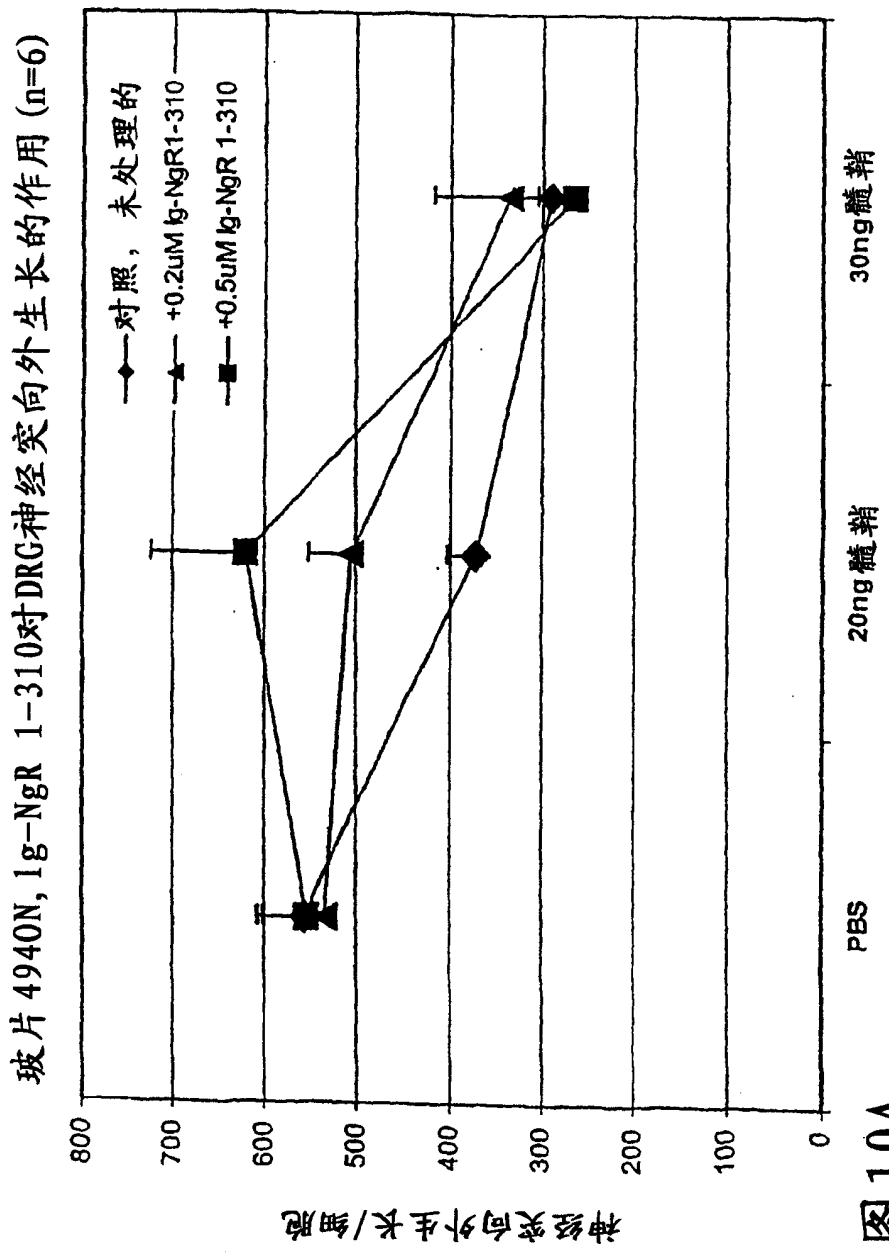

玻片4940N, Ig-NgR 1-310对DRG神经突向外生长的作用 (n=6)
对照，未处理的
+0.2uM Ig-NgR1-310
+0.5uM Ig-NgR 1-310
神经突向外生长/细胞
800
700
600
500
400
300
200
100
0
PBS
20ng髓鞘
30ng髓鞘

图10A

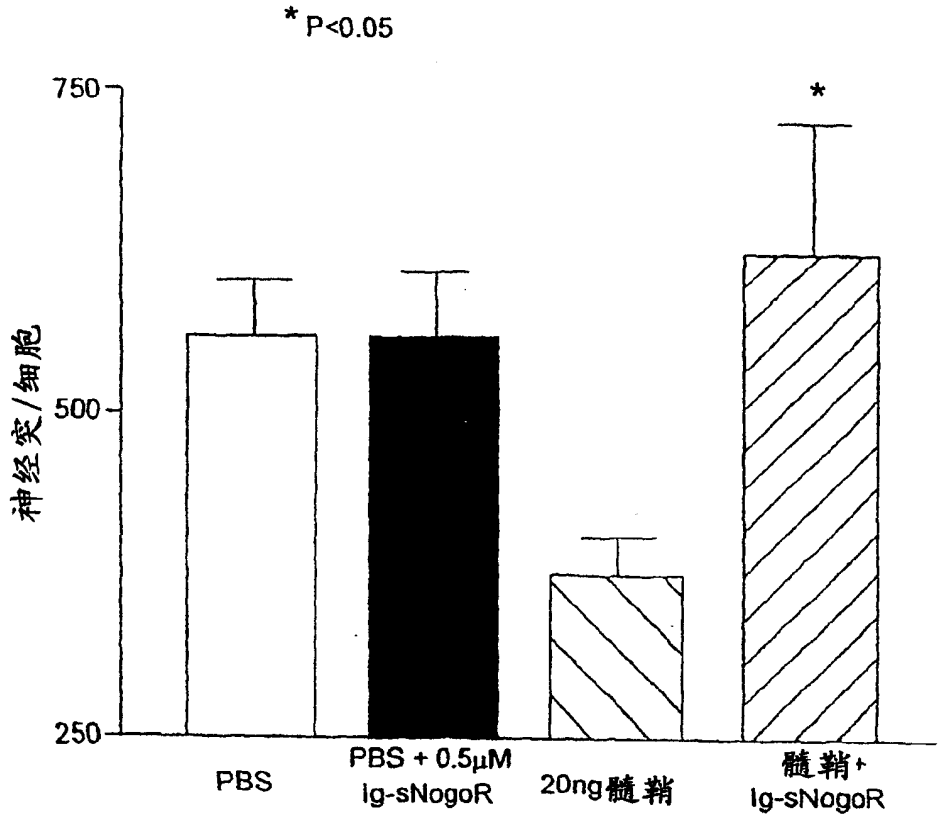

* P<0.05
750
500
250
神经突/细胞
*
PBS
PBS + 0.5μM Ig-sNogoR
20ng髓鞘
髓鞘+ Ig-sNogoR

图10B

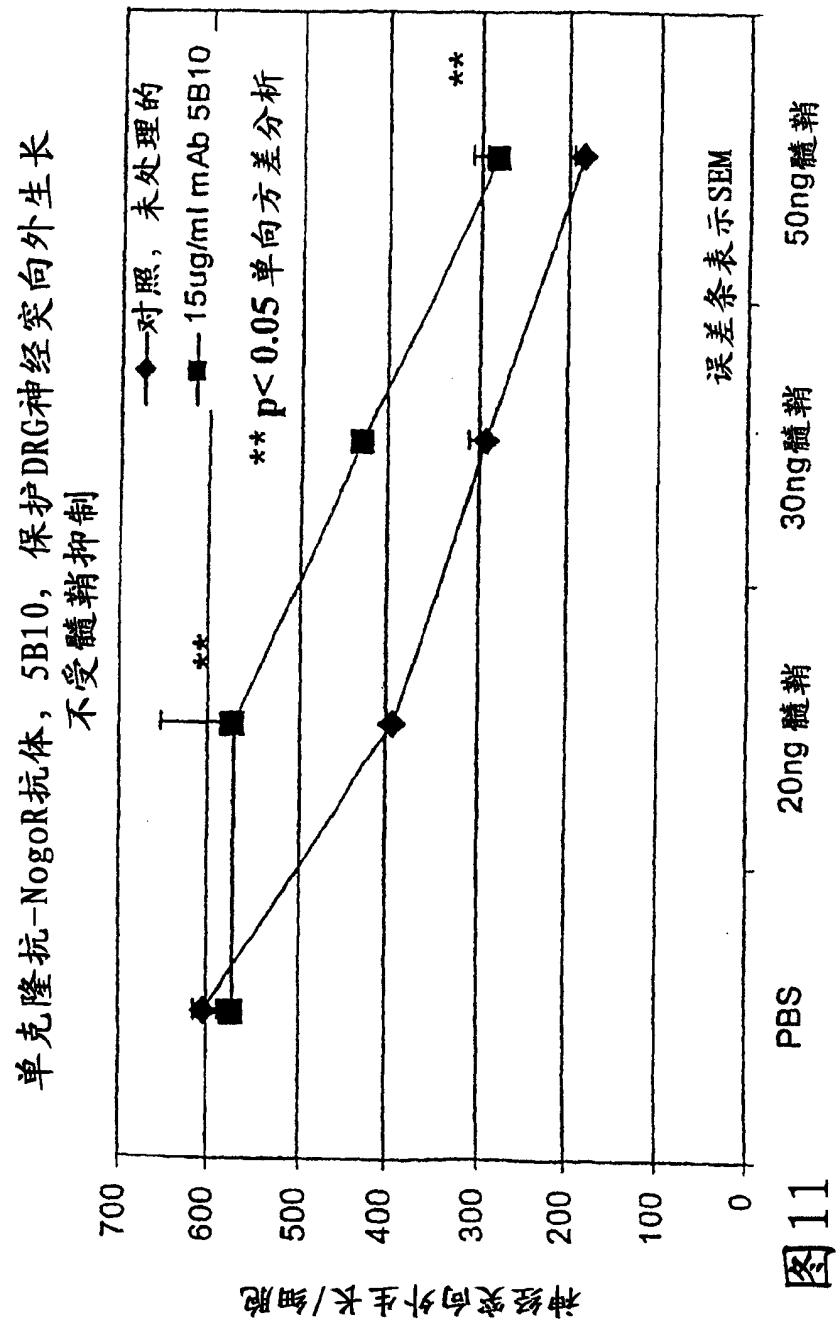

单克隆抗-NogoR抗体，5B10，保护DRG神经突向外生长
不受髓鞘抑制
对照，未处理的
15ug/ml mAb 5B10
** p< 0.05 单向方差分析
**
**
误差条表示SEM
PBS
20ng 髓鞘
30ng髓鞘
50ng髓鞘
神经突向外生长/细胞
700
600
500
400
300
200
100
0

图 11

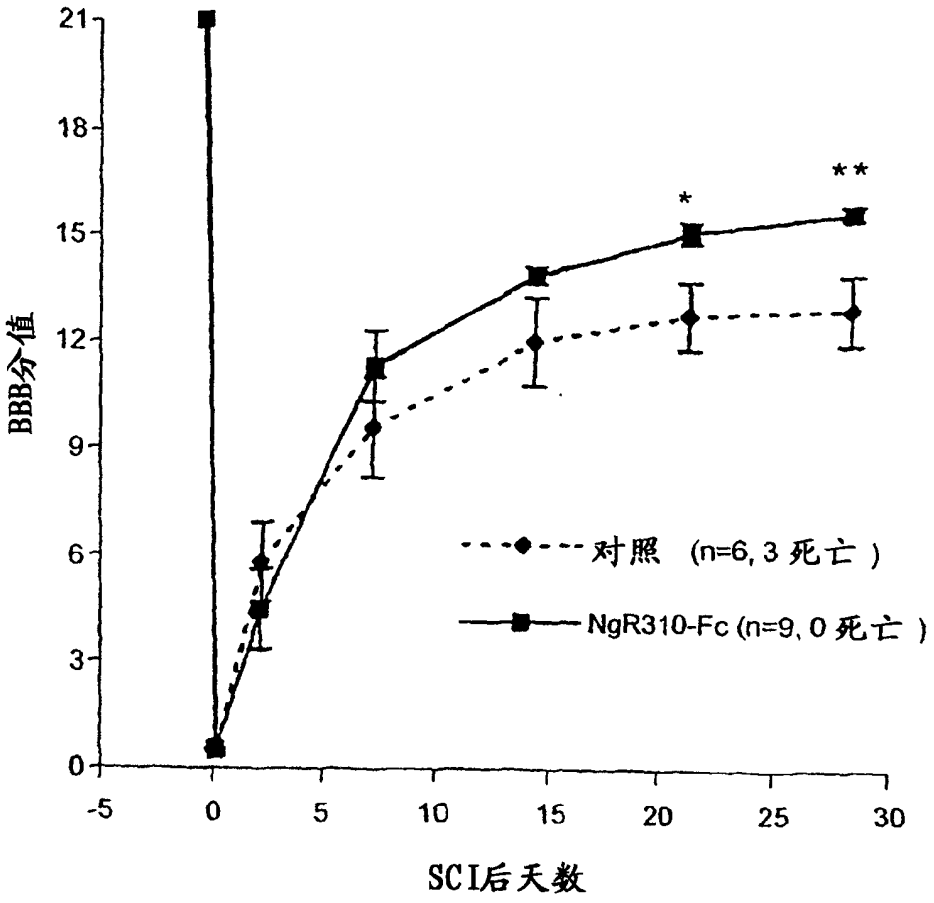

21
18
15
12
9
6
3
0
BBB分值
-5
0
5
10
15
20
25
30
SCI后天数
*
**
对照 (n=6, 3 死亡)
NgR310-Fc (n=9, 0 死亡)

图12

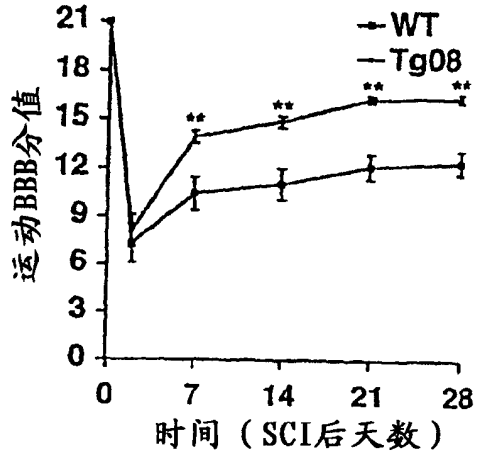


图13A

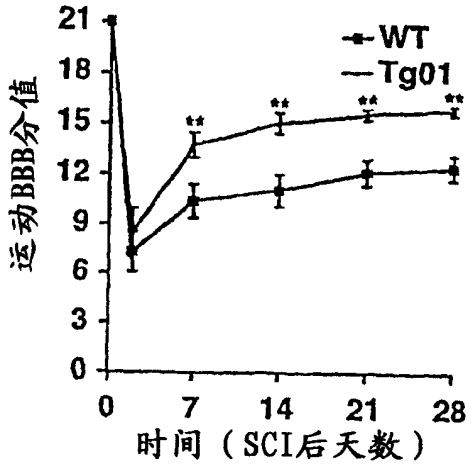


图13B

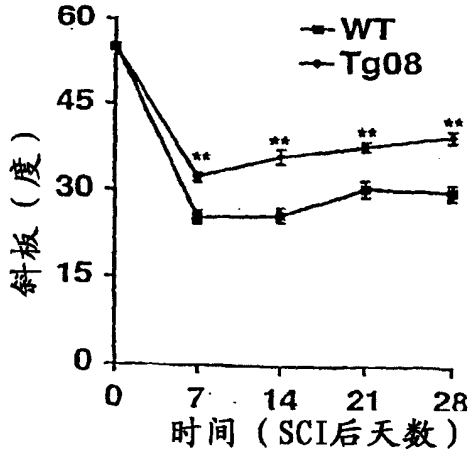


图13C

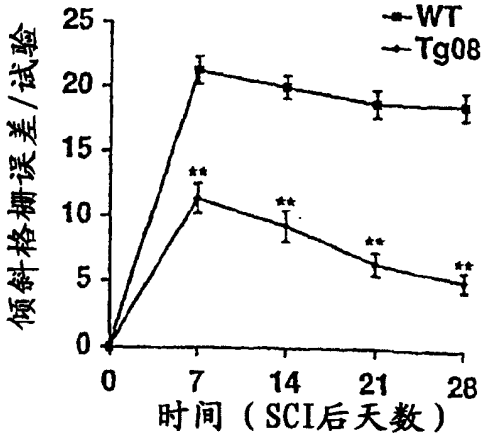


图13D

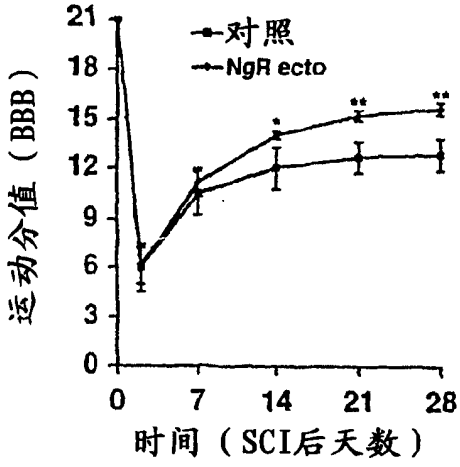


图14A

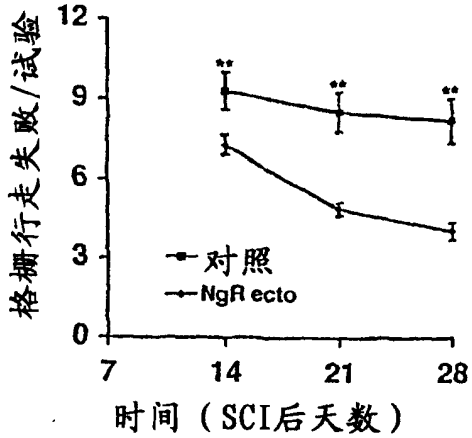


图14B

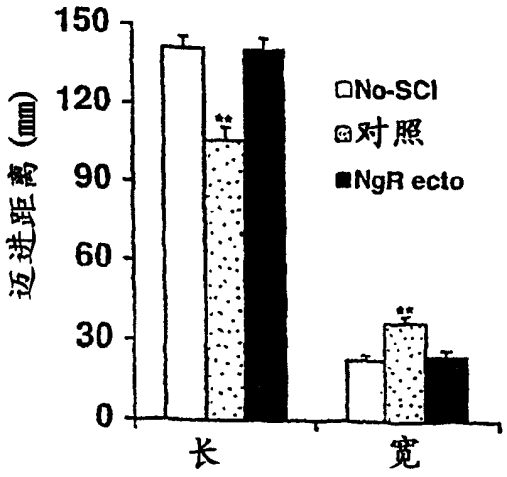


图14C