

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： f313 f70 f

※ 申請日期： 97-12-20

※IPC 分類：A61K/C07K

C07K 16/28, A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/105, C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

免疫球蛋白

IMMUNOGLOBULINS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

英商葛蘭素集團有限公司

GLAXO GROUP LIMITED

代表人：(中文/英文)

彼得 約漢 吉第絲

GIDDINGS, PETER JOHN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

英國米德賽克斯郡格林福德市柏克力大道葛蘭素大廈

GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY AVENUE, GREENFORD,

MIDDLESEX UB6 0NN, ENGLAND

國籍：(中文/英文)

英國 U.K.

三、發明人：(共 8 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 強納森 亨利 艾力斯
ELLIS, JONATHAN HENRY
2. 亞歷山大 安-杜凡爾
EON-DUVAL, ALEXANDRE
3. 羅伯特 伊安 格蘭迪
GRUNDY, ROBERT IAN
4. 法哈納 胡夏
HUSSAIN, FARHANA
5. 羅絲 麥卡丹
MCADAM, RUTH
6. 克理斯多弗 普朗頓
PLUMPTON, CHRISTOPHER
7. 雷賓德 庫馬 普林加
PRINJHA, RABINDER KUMAR
8. 保羅 亞歷山大 威爾森
WILSON, PAUL ALEXANDER

國 籍：(中文/英文)

1. 英國 U.K.
2. 法國 FRANCE
3. 英國 U.K.
4. 英國 U.K.
5. 英國 U.K.
6. 英國 U.K.
7. 英國 U.K.
8. 英國 U.K.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 英國；2003 年 12 月 22 日；0329711.6
2. 英國；2003 年 12 月 22 日；0329684.5

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於免疫球蛋白(特別是關於可結合至NOGO並中和其活性之抗體)、編碼此等抗體之聚核苷酸、含有該等抗體之醫藥調配物及此等抗體在治療及/或預防神經疾病上之用途。從後文所述中可清楚明白本發明之其它態樣、目的及優點。

【先前技術】

在西方世界，中風係造成死亡及失能之主要原因。除了在發作3小時之內，經電腦斷層攝影術(CT)掃描後，投用組織血纖維蛋白溶酶原(t-PA)排除出血外，尚未核准用以治療中風之療法。至今大多數針對治療急性中風(即神經保護)之治療劑主要係與麩胺酸受體及其彼等下游訊號傳輸路徑(已知與急性細胞死亡有關)為標的有關。然而，至今此等策略在臨床試驗中證明並不成功，且係經常伴隨劑量限制副作用(Hill & Hachinski, The Lancet, 352: (suppl III) 10-14 (1998))。因此需要針對血液流動停止後舒緩細胞死亡的新穎方法。神經保護作用係防止或舒緩因回應損傷或疾病過程所造成之神經元細胞損失的治療能力，可直接性或間接性以該等神經元為標的，以防止神經膠質(包括寡樹突細胞)細胞損失而達到此作用。

中風發作之後，在許多患者中觀察到某程度自發功能恢復，此推測大腦在受傷後具有修復及/或重塑(雖然受限制)之能力。因此具有增強此恢復潛力之藥劑可允許在大腦局

部缺血發作較遲(可能數天)之後進行介入。能夠既提供急性神經保護又增強功能恢復之藥劑可提供優於當前潛在神經保護策略的顯著優勢。

阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)(AD)特徵為存在兩種病理診斷特徵。此等分別係由聚集之 β -澱粉樣肽(A β 40及A β 42)及過度磷酸化滔(tau)構成之澱粉狀斑塊及神經原纖維纏結(Dawbarn & Allen 2001 Neurobiology of Alzheimer's Disease OUP)。

一綜合研究已顯示在患者中在 β -澱粉樣積聚及認知衰退之間之強關聯(Naslund等人, JAMA, 三月22/29, 2000, 283卷, No;12, 第1571至1577頁)。此與提示在APP及早老素(presenilin)基因中之一些突變能使人易患早期發作AD的遺傳及疫學研究一致, 此等突變亦提高A β 40及A β 42肽之含量(包括其比率)。

藉由兩種不同蛋白酶(標定為 β -及 γ -分泌酵素)分裂I型跨膜澱粉樣前驅蛋白質(APP)對於形成 β -澱粉樣肽係必須的。作為天冬胺醯基蛋白酶Asp2/BACE1之 β -分泌酵素之分子特徵(molecular identity)已被確認(Hussain等人 Mol.Cell.NeuroSci. 16, 609-619 (2000); Vassar等人, Science (1999), Oct.22; 286 (5440):735-741)。 γ -分泌酵素之性質仍引起一些爭論且可能由至少下列蛋白質構成之高分子量複合物構成: 早老素、Aph1、Pen2及尼卡斯群(nicastrin)(評述於Medina & Dotti Cell Signalling 2003 15(9):829-41)。

在CNS中APP之處理可能發生在許多細胞型(其包括神經

元、寡樹突細胞、星型細胞及小膠質細胞)中。然而APP、BACE1/Asp2、早老素-1及-2、Aph1、Pen2及尼卡斯群表達之相對程度將影響在此等細胞中APP處理之總速率。

而且，調節APP之細胞內位置之額外因素亦能影響其處理，此如在阻斷其內飲作用之APP細胞質域內之YENP基元之突變降低 β -澱粉樣產製的發現(Perez等人1999 J Biol Chem 274 (27) 18851-6)所示。藉由添加KKQN保留基元將APP- β -CTF保留在ER中足以降低在轉染細胞中之澱粉樣產製(Maltese等人2001 J Biol Chem 276 (23) 20267-20279)。相反，內飲作用之提高(藉由Rab5之過度表達)係足以提高自轉染細胞之澱粉樣分泌(Grbovic等人2003 J Biol Chem 278 (33) 31261-31268)。

與此等發現一致之進一步研究已經顯示降低細胞膽固醇含量(為吾人所熟知之AD致病因素)降低了 β -澱粉樣之形成。此變化係視經改變內飲作用而定，其如藉由使用顯性抑制發動蛋白(dynamin)突變體(K44A)及Rab5 GTPase活化蛋白質RN-Tre之過度表達來表明(Eehalt等人2003 J Cell Biol 160 (1) 113-123)。

膽固醇富集微域或筏亦係 β -澱粉樣產製之重要細胞位點且APP、BACE1及 γ -分泌酵素複合物之組份已經全部被顯示暫時存在於筏中。接近膽固醇富集筏之APP及BACE1之抗體交聯能夠提高 β -澱粉樣產製(Eehalt等人2003 J Cell Biol 160 (1) 113-123)。GPI-錨定BACE1之表達(其係僅僅以脂質筏為目標)同樣能夠提高APP分裂及 β -澱粉樣產製(Cordy等

人 2003 PNAS 100(20) 11735-11740)。

功能恢復之潛在機制目前係不為吾人所知。已經提議受傷或未受傷軸突之發芽作為一種可能的機制。然而，雖然活體內研究已經顯示用神經營養因子治療脊髓損傷或中風導致功能恢復增強及一定程度軸突發芽，但是此等未證明在軸突發芽程度及功能恢復範圍之間之直接聯繫(Jakeman 等人 1998, *Exp. Neurol.* 154: 170-184, Kawamata 等人 1997, *Proc Natl Acad. Sci. USA.*, 94:8179-8184, Ribotta 等人 2000, *J Neurosci.* 20: 5144-5152)。此外，軸突發芽需要一有活力神經元。因此，在疾病如中風(其係與大範圍細胞死亡有關)中，由中風後之給定藥劑所提供之功能恢復增強可能係通過不同於軸突發芽之機制如內生幹細胞之分化、多餘路徑之活化、在受體分佈或神經元或神經膠質之興奮性方面之變化(Fawcett & Asher, 1999, *Brain Res. Bulletin*, 49: 377-391, Horner & Gage, 2000, *Nature* 407 963-970)。

吾人認為中樞神經系統(CNS)在損傷後修復之有限能力係部分歸因於在CNS環境內之對於軸突發芽(神經突長出)具有抑制影響之分子。吾人認為CNS髓鞘含有抑制分子(Schwab ME及Caroni P (1988) *J. Neurosci.* 8, 2381-2193)。兩種髓鞘蛋白質，髓鞘相關糖蛋白(MAG)及NOMO已被選殖且被驗明係神經突長出之假定抑制劑(Sato S.等人(1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163, 1473-1480; McKerracher L等人(1994) *Neuron* 13, 805-811; Mukhopadhyay G等人(1994) *Neuron* 13, 757-767; Torigoe K及Lundborg G (1997)

Exp. Neurology 150, 254-262; Schafer 等人(1996) Neuron 16, 1107-1113; WO9522344; WO9701352; Prinjha R 等人(2000) Nature 403, 383-384; Chen MS 等人(2000) Nature 403, 434-439; GrandPre T 等人(2000) Nature 403, 439-444; US005250414A; WO200005364A1; WO0031235)。

吾人已驗明人類NOGO之三種形式：NOGO-A，其具有1192個胺基酸殘基(GenBank入藏登記號AJ251383)；NOGO-B，一剪接變體(其無該假定細胞外域內之186至1004殘基(GenBank入藏登記號AJ251384))及一更短剪接變體，NOGO-C，其亦無186至1004殘基且亦具有更小、替代性胺基末端域(GenBank入藏登記號AJ251385)(Prinjha 等人(2000)見前述)。

抑制該CNS抑制蛋白質如NOGO可提供一治療手段來改善神經元損害且促進神經元修復及生長，因此潛在有助於如在中風中遭受的神經元損傷之恢復。該等NOGO抑制劑之實例可包括小分子、肽及抗體。

抗體通常包含兩重鏈及兩輕鏈，其中兩重鏈藉由二硫鍵連接在一起。每一輕鏈係藉由二硫鍵連接至各自重鏈。每一重鏈在一端具有一可變區域，繼之以許多恆定域。每一輕鏈在一端具有一可變區域且在其另一端具有一恆定域。該輕鏈可變區域係與該重鏈之可變區域對準。該輕鏈恆定域係與該重鏈之第一恆定域對準。在該等輕及重鏈中之恆定域係不直接涉及使抗體結合至抗原。

每對輕及重鏈之可變區域形成該抗原結合位點。在該等

輕及重鏈上之該等可變區域具有相同的通用結構且每一域包含四個區(其序列係相對守恆)之框架,該等四個區由三個互補決定區(CDR)(其經常稱作高變區)來連接。該等四框架區主要採用一 β -片層構型且該等CDR形成環,該等連接 β -片層結構,且在一些情況下形成 β -片層結構之部分。該等CDR置於該等框架區近旁,且與來自另一域之CDR一起有助於形成該抗原結合位點。可參照Kabat等人("Sequences of proteins of immunological interest" US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1987)來測定抗體之CDR及框架區。

吾人已發現當將抗-MAG單株抗體(其被描述(Poltorak等人(1987) *Journal of Cell Biology* 105, 1893-1899, DeBellard等人(1996) *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 89-101; Tang等人(1997) *Mol. Cell. Neurosci.* 9, 333-346; Torigoe K及Lundborg G (1997) *Exp. Neurology* 150, 254-262)且市面上有售(MAB1567 (Chemicon))在老鼠中病灶性大腦局部缺血(中風模型)之後直接投用於大腦中或靜脈內投用時,其提供神經保護且增強功能恢復(PCT/EP03/08749)。

因此抗-MAG抗體提供用於中風後急性神經保護以及功能恢復之促進兩者的潛在治療劑。此抗體係一鼠科抗體。雖然鼠科抗體係被經常用作診斷劑,但是僅在少數情況中證實了作為一治療劑之彼等效用。彼等有限應用係部分歸因於向人重複投用一鼠科單株抗體通常引起人對此等分子之免疫反應。為克服鼠科抗體之此等內在不良性質,經設

計以合併人類抗體之區之"改變"抗體已經研發且被良好確立於該項技術中。例如，一人類化抗體含有非人類來源之互補決定區("CDR")且該結構其餘大多數係衍生自一人類抗體。

吾人亦已經報道一鼠科單株抗體，IN-1(其經培植以對抗NI-220/250，一髓鞘蛋白質(其係神經突長出之有效抑制劑(且後來被顯示係NOGO-A之片段))促進軸突再生(Caroni, P及Schwab, ME (1988) *Neuron* 1 85-96; Schnell, L及Schwab, ME (1990) *Nature* 343 269-272; Bregman, BS等人(1995) *Nature* 378 498-501及Thallmair, M等人(1998) *Nature Neuroscience* 1 124-131)。吾人亦已經報道NOGO-A係IN-1之抗原(Chen等人(2000) *Nature* 403 434-439)。投用IN-1 Fab片段或人類化IN-1給已經受脊髓橫切之大鼠增強了恢復(Fiedler, M等人(2002) *Protein Eng* 15 931-941; Brosamle, C等人(2000) *J. Neuroscience* 20 8061-8068)。然而至今在文獻中不存在證據來提示IN-1，或其人類化形式能結合且抑制人類NOGO-A，此係單株抗體用於人類NOGO調控疾病及病症(如中風及神經退化疾病)之治療性治療之必要條件。

因此分離且開發一種治療有用單株抗體(其結合且抑制人類NOGO之活性)依然係一非常需要之目標。神經退化過程造成許多神經疾病/病症，其包括(但不限制於)急性病(如中風(局部缺血或出血)、創傷性腦損傷及脊髓損傷)以及慢性病，其包括阿茲海默氏症、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathie))、末梢神經疾病、帕金森

森氏症 (Parkinson's disease)、庫雅氏症 (Creutzfeldt-Jakob disease)(CJD)、精神分裂症 (Schizophrenia)、肌萎縮性側索硬化 (ALS)、多發性硬化、亨丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease)、多發性硬化及包含體肌炎 (inclusion body myositis)。

因此一種抗-NOGO單株抗體係可用於治療此等疾病/病症。本發明提供用於治療上述所提到之疾病/病症之此等抗體且詳細描述於下文。

揭示於本說明書之所有公開案，刊物及專利兩者係明示地且全部地以引用的方式併入本文。

【發明內容】

本發明提供一抗體或其功能性片段，該抗體或其功能性片段結合至NOGO(較佳是人類NOGO，更佳者是人類NOGO-A)，且可中和其活性(本文有時候稱作"抗-NOGO"抗體)。例如此抗體可包含一或多個如表1至6所示之CDR，該等表顯示三種此類獨立分離抗體：(2A10/3、2C4/1及15C3/3)之CDR。該等CDR係如Kabat(Kabat等人(1991) "Sequences of proteins of immunological interest"；第五版；US Department of Health and Human Services；NIH公開案第91-3242號)所描述來驗明。CDR較佳係如Kabat所定義但遵循如Chothia及Lesk所定義之蛋白質結構及折疊之原理(Chothia等人，(1989) "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions"；Nature 342，第877至883頁)應瞭解亦可認為額外殘基係該抗原結合區之部分且因此被本發明

所涵蓋。

表 1：抗體 2A10/3("2A10")輕鏈 CDR

CDR	根據 Kabat
L1	RSSKSLLYKDGKTYLN (SEQ ID NO:1)
L2	LMSTRAS (SEQ ID NO:2)
L3	QQLVEYPLT (SEQ ID NO:3)

表 2：抗體 2A10/3重鏈 CDR

CDR	根據 Kabat
H1	SYWMH (SEQ ID NO:4)
H2	NINPSNGGTNYNEKFKS (SEQ ID NO:5)
H3	GQGY (SEQ ID NO:6)

表 3：抗體 2C4/1("2C4")輕鏈 CDR

CDR	根據 Kabat
L1	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:7)
L2	KVSNRFS (SEQ ID NO:8)
L3	SQSTHVPLT (SEQ ID NO:9)

表 4：抗體 2C4/1重鏈 CDR

CDR	根據 Kabat
H1	FSCYAMS (SEQ ID NO:10)
H2	SISDGGSYTYYPDNVKG (SEQ ID NO:11)
H3	ELLFDY (SEQ ID NO:12)

表 5：抗體 15C3/3("15C3")輕鏈 CDR

CDR	根據 Kabat
L1	RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO:13)
L2	RMSNLAS (SEQ ID NO:14)
L3	MQHLEYPLT (SEQ ID NO:15)

表 6：抗體 15C3/3 重鏈 CDR

CDR	根據 Kabat
H1	SYWMN (SEQ ID NO:16)
H2	QIYPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO:17)
H3	RFDY (SEQ ID NO:18)

在一第一態樣，本發明提供：

- (a) 一抗體或其功能性片段，其可結合至 NOGO (特別是人類 NOGO，更特別的是人類 NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體或其功能性片段包含一重鏈可變區域 (其包含表 2 之 CDR 之每一) 及一輕鏈可變區域 (其包含來自表 1 之 CDR 之每一)。
- (b) 一抗體或其功能片段，其可結合至 NOGO (特別是人類 NOGO，更特別的是人類 NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體或其功能性片段包含一重鏈可變區域 (其包含表 4 之 CDR 之每一) 及一輕鏈可變區域 (其包含表 3 之 CDR 之每一)。
- (c) 一抗體或其功能片段，該抗體或其功能片段包含一重鏈可變區 (其包含選自表 6 之 CDR 之每一) 及一輕鏈可變區域 (其包含表 5 之 CDR 之每一)。

吾人進一步提供一抗 NOGO 抗體或其功能片段，其包含：

- a) 一重鏈可變區域 (V_H)，其依序包含來自表 2 之 CDRH1、CDRH2 及 CDRH3，
及 / 或
- b) 一輕鏈可變區域 (V_L)，其依序包含來自表 1 之 CDRL1、

CDRL2及CDRL3；

一抗NOGO抗體或其功能片段，其包含：

a) 一重鏈可變區域(V_H)，其依序包含來自表4之CDRH1、
CDRH2及CDRH3，

及/或

b) 一輕鏈可變區域(V_L)，其依序包含來自表3之CDRL1、
CDRL2及CDRL3；或

一抗NOGO抗體或其功能片段，其包含：

a) 一重鏈可變區域(V_H)，其依序包含來自表6之CDRH1、
CDRH2及CDRH3，

及/或

c) 一輕鏈可變區域(V_L)，其依序包含來自表5之CDRL1、
CDRL2及CDRL3。

該抗體可為嵌合體、全人類或經人類化。

在另一態樣，本發明亦係關於一抗NOGO抗體，其作為具有上述所描述之重及輕鏈可變區之抗體結合至該NOGO多肽上相同(或重疊)抗原決定部位。該抗原決定部位較佳係被包含在586至785區(NOGO-A胺基酸編號，Genbank入藏登記號AJ251383)中，該抗原決定部位更佳係被包含在586至685或686至785區中。競爭抑制檢定係用於在一抗原上之該等抗原決定部位之定位。因此亦提供一抗NOGO抗體，其可結合至人類NOGO-A之586至685或686至785胺基酸間，且中和NOGO-A之活性。可根據下文所闡述之方法來產生此抗體。在一進一步態樣，亦提供一抗NOGO抗體，其競爭性抑

制具有如前所描述之CDR之抗體結合至NOGO，較佳人類NOGO，最佳人類NOGO-A。

更具體言之，提供一抗體，其可為全人類、人類化或嵌合體，其可結合至NOGO(特別是人類NOGO，更特別是人類NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體以等莫耳濃度競爭性抑制具有一重鏈可變區(其包含表2之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表1之CDR之每一)之抗體結合至人類NOGO-A。

在另一實施例中，提供一抗體，其可為全人類、人類化或嵌合體，其可結合至NOGO(特別是人類NOGO，更特別的是人類NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體競爭性抑制具有一重鏈可變區(其包含表4之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表3之CDR之每一)之抗體結合至人類NOGO-A。

在另一實施例中，提供一抗體，其可為全人類、人類化或嵌合體，其結合至NOGO(特別是人類NOGO，更特別的是人類NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體競爭性抑制具有一重鏈可變區(其包含表6之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表5之CDR之每一)之抗體結合至人類NOGO-A。

在典型實施例中，該競爭抗體係屬IgG類別，更通常係IgG1或IgG4。

嵌合抗體

本發明亦提供一嵌合抗體，其可結合至NOGO(較佳為人類NOGO，更佳者為人類NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體包含如表1至6所揭示之彼等CDR。該嵌合抗體較佳包

含小鼠及人類序列(例如小鼠可變區及人恆定區)。而且提供一嵌合抗體，其包含一重鏈可變區(其包含表2之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表1之CDR之每一)。

亦提供一嵌合抗體，其包含一重鏈可變區(其包含表4之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表3之CDR之每一)。

亦提供一嵌合抗體，其包含一重鏈可變區(其包含表6之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表5之CDR之每一)。

在典型實施例中，該競爭抗體係屬IgG類別，更通常係人類IgG1或IgG4，其具有一k型人類輕鏈。

人類化抗體

進一步，本發明亦提供一人類化抗體，其可結合至NOGO(較佳者為人類NOGO，更佳者為人類NOGO-A)，且可中和其活性。

更具體言之，提供一人類化抗體，其包含一重鏈可變區(其包含表2之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表1之CDR之每一)。

亦提供一人類化抗體，其包含一重鏈可變區(其包含表4之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表3之CDR之每一)。

亦提供一人類化抗體，其包含一重鏈可變區(其包含表6之CDR之每一)及一輕鏈可變區(其包含表5之CDR之每一)。

在典型實施例中，無論本發明之該等抗體係嵌合體、人類化或全人類，彼等係屬IgG類別，更通常係人類IgG1或IgG4，其具有一k型人類輕鏈。

本發明之又一態樣提供一醫藥組合物，其包含本發明之

抗NOGO抗體或其功能片段連同醫藥學上可接受稀釋劑或載體。

在一又一態樣，本發明提供一種治療或預防人類中之中風(特定局部缺血中風)及其它神經疾病(詳言之阿茲海默氏症)之方法，其包含將有效量之本發明之抗NOGO抗體或其功能片段投予需要其之該人。

在另一態樣，本發明提供本發明之抗NOGO抗體或其功能片段之用途，其係用於製備供治療或預防中風(特定局部缺血中風)及其它神經疾病(詳言之阿茲海默氏症)之藥物。

在一又一態樣，本發明提供一種在罹患(或可能患)中風(特定局部缺血中風)或其它神經疾病(詳言之阿茲海默氏症)的人類患者中抑制神經退化且/或促進功能恢復之方法，其包含將有效量之本發明之抗NOGO抗體或其功能片段投予需要其之該人。

在再一態樣，本發明提供本發明之抗NOGO抗體或其功能片段之用途，其係用於製備供在罹患(或可能患)中風及其它神經疾病(詳言之阿茲海默氏症)的人類患者中抑制神經退化且/或促進功能恢復之藥物。

在又一態樣中，吾人提供一抗體或其功能片段，其包含一重鏈可變區域(其包含一或多個選自表1之CDRH1、CDRH2及CDRH3之CDR，較佳包含至少CDRH3)及/或一輕鏈可變區域(其包含一或多個選自表4之CDRL1、CDRL2及CDRL3之CDR)；一抗體或其功能片段，其包含一重鏈可變區域(其包含一或多個選自表2之CDRH1、CDRH2及

CDRH3之CDR，較佳包含至少CDRH3)及/或一輕鏈可變區域(其包含一或多個選自表5之CDRL1、CDRL2及CDRL3之CDR)；一抗體或其功能片段，其包含一重鏈可變區域(其包含一或多個選自表3之CDRH1、CDRH2及CDRH3之CDR，較佳包含至少CDRH3)及/或一輕鏈可變區域(其包含一或多個選自表6之CDRL1、CDRL2及CDRL3之CDR)；

本發明之其它態樣及優勢係被進一步描述於詳細發明說明及其較佳實施例中。

【實施方式】

本發明之抗體通常係單株抗體(mAb)且較佳係嵌合體、人類化、全人類或改形。其中特定較佳係人類化及全人類之此等。

本發明之抗體通常具有一天然抗體或其功能片段之結構。因此該抗體可包含一全長抗體、一(Fab')₂片段、一Fab片段、一輕鏈二聚物或一重鏈二聚物。該抗體可為IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4；或IgM；IgA、IgE或IgD或其修飾變體。可相應地選擇該抗體重鏈之恆定域。該輕鏈恆定域可為κ或λ恆定域。而且，該抗體可包含所有類別(如IgG二聚物)之修飾、Fc突變體(其不再結合Fc受體或調控Clq結合)。該抗體亦可為WO86/01533中所描述之類型之嵌合抗體，其包含一抗原結合區及一非免疫球蛋白區。該抗原結合區係一抗體輕鏈可變區域或重鏈可變區域。通常該抗原結合區包含輕及重鏈可變區域兩者。該非免疫球蛋白區係在其C端被融合至該抗原結合區。該非免疫球蛋白區通常係一非

免疫球蛋白蛋白質且可為酶、毒素或具有已知結合特異性之蛋白質。可藉由一可分裂連接子序列來連接此類型嵌合抗體之該等兩區域。具有如本文先前所描述之CDR之免疫黏附素亦涵蓋於本發明中。

根據所需功能性選擇該恆定域。通常IgG1將通過結合補體來表明溶胞能力且/或調控ADCC(視抗體而定之細胞毒性)。若需要一非細胞毒性阻斷抗體，則將較佳係IgG4。然而，IgG4抗體可在產製中表現不穩定性且因此更佳係修飾通常更穩定的IgG1。經建議之修飾係描述於EP0307434中較佳修飾包括在235及237位置。因此本發明提供根據本發明之抗體之溶胞或非溶胞形式。

因此在較佳形式中，本發明之抗體係一全長(即H2L2四聚物)非溶胞IgG1抗體，其具有如前所描述之CDR。在最佳形式中，吾人提供全長非溶胞IgG1抗體，其具有SEQ ID NOs 1至6；SEQ ID NOs 7至12或SEQ ID NOs 13至18之CDR。

在一又一態樣，本發明提供編碼該等CDR之聚核苷酸。例如本發明提供編碼如表1至6所揭示之CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及CDRL3之聚核苷酸。較佳聚核苷酸序列係如下表7至12中所示。

表7：抗體2A10/3輕鏈CDR

CDR	
L1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATG GGAAGACATACTTGAAT (SEQ ID NO:19)
L2	TTGATGTCCACCCGTGCATCA (SEQ ID NO:20)
L3	CAACA ACTTGTAGAGTATCCGCTCACG (SEQ ID NO:21)

表 8：抗體 2A10/3 重鏈 CDR

CDR	
H1	AGCTACTGGATGCAC (SEQ ID NO:22)
H2	AATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTACA ATGAGAAGTTCAAGAGC (SEQ ID NO:23)
H3	GGACAGGGCTAC (SEQ ID NO:24)

表 9：抗體 2C4/1 輕鏈 CDR

CDR	
L1	AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATG GAAACACCTATTTACAT (SEQ ID NO:25)
L2	AAAGTTTCCAACCGATTTTCT (SEQ ID NO:26)
L3	TCTCAGAGTACACATGTTCCG CTCACG (SEQ ID NO:27)

表 10：抗體 2C4/1 重鏈 CDR

CDR	
H1	TTCAGTTGCTATGCCATGTCT (SEQ ID NO:28)
H2	TCCATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCTACTAT CCAGACAATGTAAAGGGC (SEQ ID NO:29)
H3	GAACTACTTTTTGACTAC (SEQ ID NO:30)

表 11：抗體 15C3/3 輕鏈 CDR

CDR	
L1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGG CAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:31)
L2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:32)
L3	ATGCAACATCTAGAATATCCGCTCACG (SEQ ID NO:33)

表 12：抗體 15C3/3 重鏈 CDR

CDR	
H1	AGCTACTGGATGAAC (SEQ ID NO:34)
H2	CAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTA CAACGGAAAGTTCAAGGGC (SEQ ID NO:35)
H3	CGCTTTGACTAT (SEQ ID NO:36)

在本發明之一又一態樣，提供一聚核苷酸，其編碼一抗 NOGO 抗體之一輕鏈可變區，該輕鏈可變區包括至少一選自表 1、3、5 中之 CDRL1、CDRL2 及 CDRL3 之 CDR，其更佳包括表 1 中所有 3 種 CDR 或表 3 中所有 3 種 CDR 或表 5 中所有 3 種 CDR。

在本發明之一又一態樣，提供一聚核苷酸，其編碼一抗 NOGO 抗體之一重鏈可變區，該重鏈可變區包括至少一選自 CDRH1、CDRH2 及 CDRH3 之 CDR，其更佳包括表 2 中所有 3 種 CDR 或表 4 中所有 3 種 CDR 或表 6 中所有 3 種 CDR。

本發明進一步提供一抗 NOGO 抗體、或其功能片段，其可結合至 NOGO(較佳者為人類 NOGO，及更佳者為人類 NOGO-A)，且可中和其活性，其包含一重鏈可變區，該重鏈可變區包含下列胺基酸序列之一：

QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNINPSNGGTNY
NEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCELGQGYWGQGTTLTVSS

(SEQ ID NO: 37)；或

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSCYAMSWVRQTPEKRLEWVASISDGGSYTYY
PDNVKGRFTISRDNKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCAKELLFDYWGQGTTLTVSS

(SEQ ID NO: 38)；或

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDGDTNY
 NGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAVRFDYWGQTTTLTVSS

(SEQ ID NO: 39)。

本發明進一步一抗NOGO抗體、或其功能片段，其可結合至NOGO，且中和其活性，其包含一輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含下列胺基酸序列之一：

DIVITQDELSNPVTSGESVSI SCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQRPQGQSPQLLIYLMSTRA
 SGVSDRFSGSGSGTDFITLEISRVAEDVGVYYCQQLVEYPLTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 40)

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
 FSGVPDRFSGSGSGTDFITLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 41)。

DIVMTQAAPSVPTPGESVSI SCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLA
 SGVSDRFSGSGSGTDFITLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 42)。

在本發明之一又一態樣，提供一抗NOGO抗體、或其功能片段，其可結合至NOGO(較佳為人類NOGO，更佳為人類NOGO-A)，且可中和其活性，其包含：

a) SEQ ID NO:37之一重鏈可變區與包含SEQ ID NO:40胺基酸序列之一輕鏈可變區；或

b) SEQ ID NO:38之一重鏈可變區與包含SEQ ID NO:41胺基酸序列之一輕鏈可變區；或

c) SEQ ID NO:39之一重鏈可變區與包含SEQ ID NO:42胺基酸序列之一輕鏈可變區。

在本發明之一又一態樣，提供一抗NOGO抗體、或其功能

片段，其包含：

包含SEQ ID NO:37之一重鏈可變片段及一人類重鏈之恆定部分或其片段及

包含SEQ ID NO:40之一輕鏈可變片段及一人類輕鏈之恆定部分或其片段；

或

包含SEQ ID NO:38之一重鏈可變片段及一人類重鏈之恆定部分或其片段；及

包含SEQ ID NO:41之一輕鏈可變片段及一人類輕鏈之恆定部分或其片段

或

包含SEQ ID NO:39之一重鏈可變片段及一人類重鏈之恆定部分或其片段；及

包含SEQ ID NO:42之一輕鏈可變片段及一人類輕鏈之恆定部分或其片段。

在一又一態樣，本發明提供聚核苷酸，其編碼包含SEQ ID NOs 37至39胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NOs 40至42胺基酸序列之輕鏈可變區。

編碼SEQ ID NO: 37胺基酸序列之較佳聚核苷酸序列係：

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGG
CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTAC
AATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
ATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGAACTGGGACAG
GGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID NO: 43)

編碼 SEQ ID NO: 38 胺基酸序列之較佳聚核苷酸序列係：

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTC
 CCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTTGCTATGCCA
 TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCATCC
 ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACAATGTAAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGA
 GCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAAGGAACTA
 CTTTTTACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID NO: 44)

編碼 SEQ ID NO: 39 胺基酸序列之較佳聚核苷酸序列係：

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTC
 AGTGAAGATTTCTGCAAAGCTTCTGGCTACGCATTCAGTAGCTACTGGA
 TGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGAAAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAG
 ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAACGGAAAGTTCAAGGGCAA
 GGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA
 GCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAGTACGCTTT
 GACTATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID NO: 45)

編碼 SEQ ID NO: 40 胺基酸序列之較佳聚核苷酸序列係：

GATATTGTGATAACCCAGGATGAACTCTCCAATCCTGTCACCTTCTGGAGA
 ATCAGTTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATG
 GGAAGACATACTTGAATTGGTTTCTGCAGAGACCAGGACAATCTCCTCAG
 CTCCTGATCTATTTGATGTCCACCCGTGCATCAGGAGTCTCAGACCGGTT
 TAGTGGCAGTGGGTGAGAACAGATTTACCCTGGAAATCAGTAGAGTGA
 AGGCTGAGGATGTGGGTGTGTATTACTGTCAACAACCTTGTAGAGTATCCG
 CTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

(SEQ ID NO: 46)

編碼 SEQ ID NO: 41 胺基酸序列之較佳聚核苷酸序列係：

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGA
 TCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATG
 GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG
 CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
 CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG
 AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTTCCG
 CTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

(SEQ ID NO: 47)

編碼 SEQ ID NO: 42 胺基酸序列之較佳聚核苷酸序列係：

GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACCTCCTGGAGA
 GTCAGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATG
 GCAACACTTACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
 CTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT
 CAGTGGCAGTGGGTCAGGAACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGG
 AGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCG
 CTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

(SEQ ID NO: 48)

抗NOGO抗體2A10包含具有SEQ ID NO: 37胺基酸序列之一重鏈可變區及具有SEQ ID NO: 40胺基酸序列之一輕鏈可變區。

抗NOGO抗體2C4包含具有SEQ ID NO: 38胺基酸序列之一重鏈可變區及具有SEQ ID NO: 41胺基酸序列之一輕鏈可變區。

抗NOGO抗體15C3包含具有SEQ ID NO: 39胺基酸序列之一重鏈可變區及具有SEQ ID NO: 42胺基酸序列之一輕鏈

可變區。

"NOGO"係指任何NOGO多肽，其包括變體形式。此包括(但不侷限於)NOGO-A，其具有1192個胺基酸殘基(GenBank入藏登記號AJ251383)；NOGO-B，一剪接變體，其無該假定細胞外區域內之186至1004殘基(GenBank號入藏登記號AJ251384))及一更短剪接變體，NOGO-C，其亦無186至1004殘基且亦具有更小、替代性胺基末端區域(GenBank入藏登記號AJ251385)(Prinjha等人(2000)見前述)。除非一特定形式被指出，否則應理解本文對NOGO的所有提及均包括NOGO之任何及所有變體形式(如NOGO-A)及所描述之剪接變體。

"中和"及其語法變化係指全部或部分抑制NOGO功能，其中NOGO功能包括其結合至神經元及抑制神經突生長。

"經改變抗體"係指藉由一經改變免疫球蛋白編碼區域編碼之蛋白質，其可藉由在所選宿主細胞中之表達而獲得。此等經改變抗體包括改造抗體(例如，嵌合、改形、人類化或具載體之抗體)或無所有或部分免疫球蛋白恆定區之抗體片段，例如，Fv、Fab、或F(ab)₂及其類似物。

"經改變免疫球蛋白編碼區"係指編碼經改變抗體之核酸序列。當該經改變抗體係一CDR嫁接或人類化抗體時，編碼來自一非人類免疫球蛋白之互補決定區(CDR)之該等序列係被插入包含人類可變框架序列之第一免疫球蛋白伴體。視情況該第一免疫球蛋白伴體係有效地連接至第二免疫球蛋白伴體。

"第一免疫球蛋白伴體"係指一核酸序列，其編碼一人類框架或人類免疫球蛋白可變區，該核酸序列中藉由一供體抗體之CDR-編碼區域置換該原生(或自然產生)CDR-編碼區域。該人類可變可變區可為一免疫球蛋白重鏈、一輕鏈(或兩種鏈)、一類似物或其功能片段。可藉由此項技術中已知方法來測定此等CDR區域，其位於抗體(免疫球蛋白)之可變區中。例如 Kabat 等人 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第四版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)) 揭示了用於定位 CDR 之規則。而且，適用於驗明 CDR 區域/結構之電腦程式係為吾人所知。

"第二免疫球蛋白伴體"係指編碼一蛋白質或肽之另一核苷酸序列，該第一免疫球蛋白伴體係以框架方式或藉由可選之習知連接子序列(即有效地連接)融合至該核苷酸序列。其較佳係一免疫球蛋白基因。該第二免疫球蛋白伴體可包括一核酸序列，其編碼所關注之相同(即，同源-第一及第二經改變抗體係衍生自相同來源)或一額外(即，異源)抗體的整個恆定區。其可為一免疫球蛋白重鏈或輕鏈(或作為一單一多肽之部分之兩種鏈)。該第二免疫球蛋白伴體不限於一特定免疫球蛋白類別或同種型。而且，該第二免疫球蛋白伴體可包含免疫球蛋白恆定區之部分，如見於 Fab、或 F(ab)₂ 中者(即，適當人類恆定區或框架區之一分離部分)。此第二免疫球蛋白伴體亦可包含一序列，其編碼暴露在一宿主細胞之外表面上之整合膜蛋白質(如，作為一噬

菌體展示庫之部分)，或一序列，其編碼用於分析或診斷偵測之蛋白質，即，辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶等。

該等術語 Fv、Fc、Fd、Fab、或 F(ab)₂ 係以彼等標準含義被使用 (例如見，Harlow 等人，Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988))。

如本文所使用，一"改造抗體"描述了一類型經改變抗體，即，一全長合成抗體 (例如，與一抗體片段相對而言之一嵌合、改形或人類化抗體)，其中藉由一或多個來自供體抗體 (其對所選擇抗原決定部位具有特異性) 之類似部分來置換所選擇受體抗體之輕及/或重鏈可變區域之一部分。例如，此等分子可包括抗體，其特徵為與一未修飾輕鏈 (或嵌合輕鏈) 相關聯之一人類化重鏈，或反之亦然。改造抗體之特徵亦可為改變核酸序列以保持供體抗體結合特異性，該等核酸序列編碼受體抗體輕及/或重鏈可變區域框架區。此等抗體可包含以來自本文所描述之供體抗體之 CDR 置換一或多個來自該受體抗體之 CDR (較佳全部)。

一"嵌合抗體"係指一類型改造抗體，其含有衍生自一供體抗體之自然產生可變區 (輕鏈及重鏈)，該可變區與衍生自一受體抗體之輕及重鏈恆定區相關聯。

一"人類化抗體"係指一類型改造抗體，其具有衍生自一非人類供體免疫球蛋白之其 CDR，該分子之其餘免疫球蛋白衍生部分係衍生自一 (或多種) 人類免疫球蛋白。而且，可改變框架支承殘基以保存結合親和性 (例如，見 Queen 等人，Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989))。

Hodgson等人, Bio/Technology, 9:421 (1991))。根據與該供體抗體之核苷酸及胺基酸序列同源, 一適當人類受體抗體可為選自一習知資料庫, 如KABAT®資料庫、Los Alamos資料庫、及Swiss Protein資料庫。特徵為與該供體抗體之框架區同源(在胺基酸基礎上)之人類抗體可適合於為插入供體CDR提供一重鏈恆定區及/或一重鏈可變框架區。可以類似方式選擇能夠給予輕鏈恆定或可變框架區之適當受體抗體。應注意的是不需要受體抗體重及輕鏈來自相同受體抗體。先前技術描述了幾種產生此等人類化抗體之方式-例如見EP-A-0239400及EP-A-054951。

"改形人類抗體"係指一經改變抗體, 其中最小程度上用至少一來自第一人類單株供體抗體之CDR取代在第二人類受體抗體中之CDR。較佳置換所有六種CDR。更佳用來自第一人類供體單株抗體之整個抗原結合區(例如, Fv、Fab或F(ab')₂)取代在第二人類受體單株抗體中之相應區。最佳來自第一人類供體之Fab區域係被有效連接至第二人類受體抗體之適當恆定區來形成一全長單株抗體。

一"具載體之抗體"係指附接有一試劑來改良通過血腦屏障(BBB)之傳輸的抗體。(評述見Pardridge; Advanced Drug Delivery Review 36, 299-321, 1999)。該附接可為化學的或替代地該部分可被改造併入該抗體。一實例係製造具有如下抗體之嵌合體, 該抗體被導向腦毛細管內皮細胞受體(例如抗胰島素受體抗體或抗鐵傳遞蛋白受體抗體)(Saito等人(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 10227-31; Pardridge等

人(1995) Pharm. Res. 12 807-816; Broadwell等人(1996)Exp. Neurol. 142 47-65; Bickel等人(1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90, 2618-2622; Friden等人(1996) J. Pharm. Exp. Ther. 278 1491-1498, US5182107、US5154924、US5833988、US5527527)。一旦該雙特異性抗體之兩組份被結合至該受體，彼等就藉由胞吞轉送過程橫穿該BBB。或者，該試劑可為一配位體，其結合此等細胞表面受體，如胰島素、鐵傳遞蛋白或低密度脂蛋白(Descamps等人(1996) Am. J. Physiol. 270 H1149-H1158; Duffy等人(1987) Brain Res. 420 32-38; Dehouck等人(1997) J. Cell Biol. 1997 877-889)。亦可使用自然產生肽，如穿透肽(penetratin)及SynB1及SynB3，其係為吾人所知可改良穿過該BBB之傳輸(Rouselle等人(2000) Mol. Pharm. 57, 679-686及Rouselle等人(2001) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 296, 124-131)。

術語"供體抗體"係指一抗體(單株，及/或重組)，其貢獻其可變區、CDR、或其它功能性片段或其類似物之胺基酸序列給第一免疫球蛋白伴體，以便提供經改變免疫球蛋白編碼區域，及產生具有抗原特異性及中和活性(其為該供體抗體之特性)之所表達經改變抗體。

術語"受體抗體"係指與供體抗體異源之抗體(單株及/或重組)，其貢獻所有(或任何部分，但所有更佳)胺基酸序列(其編碼該受體抗體之重及/或輕鏈框架區及/或該受體抗體之重鏈及/或輕鏈恆定區)給該第一免疫球蛋白伴體。人類抗

體較佳係為該受體抗體。

"CDR"係被定義為一抗體之互補決定區胺基酸序列，其係免疫球蛋白重鏈及輕鏈之高變區。例如見Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第四版，U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)。在免疫球蛋白之可變部分存在三種重鏈及三種輕鏈CDR(或CDR區)。因此，本文所用之"CDR"係指所有三種重鏈CDR，或所有三種輕鏈CDR(或若適當，則係指所有重及所有輕鏈CDR)。該抗體之結構及蛋白質折疊意指其它殘基係被認為是該抗原結合區之部分且熟習此項技術者應理解為如此。例如見Chothia等人，(1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342，第877至883頁。方便起見，SEQ ID NOs 37至42中如Kabat所定義之CDR係加了邊框(boxed)。

CDR提供用於使該抗體結合至該抗原或抗原決定部位的接觸殘基之大部分。在本發明中所關注之CDR係衍生自供體抗體可變重及輕鏈序列，且包括自然產生CDR之類似物，該等類似物亦共有或保留與彼等所衍生自之供體抗體相同的抗原結合特異性及/或中和能力。

一"功能片段"係一部分重或輕鏈可變序列(例如，在該免疫球蛋白可變區之胺基或羧基末端之少量刪除)，其保留與該片段所衍生自之抗體相同的抗原結合特異性及相同或相似中和能力。

一"類似物"係藉由至少一種胺基酸修飾之胺基酸序列，

其中該修飾可為化學性或少數胺基酸(即,不超過10)之取代或重排,此修飾允許該胺基酸序列保留未經修飾序列之生物特性,例如,抗原特異性及高親和性。例如,當在CDR編碼區之內或周圍建置核酸內切酶限制位點時,通過取代建構啞(silent)突變。本發明涵蓋本發明之抗體之類似物之使用。吾人所熟知在胺基酸或核酸序列中之少量變化例如可導致該原蛋白質之等位基因形式,此保留大體上相似性質。因此本發明之抗體之類似物包括彼等,其中在該等重及輕鏈之高變區中之CDR係與如在上文表1至6中所定義之CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及CDRL3之CDR至少80%同源,至少90%同源較佳且至少95%同源更佳且保留中和NOGO活性。若當最佳對準胺基酸序列時,彼等在一相同位置具有80%一致胺基酸殘基(裂隙或插入物算作非一致殘基),則彼等係至少80%同源。本發明亦涵蓋本發明之抗體之類似物,其中該等框架區係與在SEQ ID NOs 37至42中所闡述之框架區至少80%,較佳至少90%且更佳至少95%同源。若當最佳對準胺基酸序列時,彼等在一相同位置具有80%一致胺基酸殘基(裂隙或插入物算作非一致殘基),則彼等係至少80%同源。

類似物亦可作為等位基因變更產生。一"等位基因變更或修飾"係在該核酸序列之改變。此等變更或修飾可歸因於在該遺傳編碼之簡並或可為被特意改造來提供所需特性。此等變更或修飾可或不可導致在任何編碼胺基酸序列中之變化。

術語"效應試劑"係指非蛋白質載體分子，該等經改變抗體、及/或該供體抗體之天然或合成輕或重鏈或該供體抗體之其它片段可藉由習知方法與其相關聯。此等非蛋白質載體可包括在診斷領域中所使用之習知載體，例如，聚苯乙烯或其它塑膠珠子、多糖(例如在BIAcore [Pharmacia]系統中使用)，或其它用於醫學領域且可安全投予人類及動物之非蛋白質物質。其它效應試劑可包括一大環，其用於螯合一重金屬原子、或放射性同位素。此等效應試劑亦可用來增加該等經改變抗體之半衰期(例如，聚乙二醇)。

或者，吾人可藉由使非人類物種(例如，牛、綿羊、猴、雞、齧齒動物(例如，鼠科及大鼠)等)免疫產生所需免疫球蛋白來建構抗體、經改變抗體及片段，其中產生所需免疫球蛋白之過程係基於給予其來自任何物種(依靠該物種而產生與人類NOGO交叉反應之抗體，例如人或雞)之原生NOGO。採用習知融合瘤技術來提供一融合瘤細胞株，其分泌一對抗NOGO之非人類mAb。然後篩檢此等融合瘤之結合，其係使用塗覆至384-或96-孔板之NOGO，使用結合至一抗生蛋白鏈菌素塗覆板之生物素化NOGO或在一同系銷-APC連接免疫檢定中使用生物素化NOGO。

在一人類抗體小鼠(例如"Xenomouse™" (Abgenix))中可產生一原生人類抗體，該人類抗體小鼠中該等小鼠免疫球蛋白基因已被移除且編碼該等人類免疫球蛋白之基因已被插入該小鼠染色體。照常使該等小鼠免疫且形成一抗體響應，其衍生自該等人類基因。因此該小鼠產生人類抗體，

其排除人類化陽性融合瘤之後選擇性之需要。(見 Green L.L., J Immunol Methods 1999 Dec 10; 231(1-2):11-23)。

本發明亦包括衍生自針對NOGO之mAbs之Fab片段或F(ab')₂片段之使用。一Fab片段含有整個輕鏈及重鏈之胺基末端部分；且一F(ab')₂片段係藉由用雙硫鍵結合之兩Fab片段形成之片段。可藉由習知方法(例如，藉由適當解蛋白酶、木瓜蛋白酶及/或胃蛋白酶分裂mAb)，或藉由重組方法來獲得Fab片段及F(ab')₂片段。該等Fab及F(ab')₂片段本身係用作治療劑或預防劑，且用作包括用於形成如本文所描述之重組或人類化抗體之可變區之序列及CDR序列之供體。

亦可藉由一組合噬菌體庫(見 Winter 等人，Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994))或藉由免疫球蛋白鏈改組(例如，見 Marks 等人，Bio/Technology, 10:779-783 (1992)，兩者全部以引用的方式併入本文中)來建構該等Fab及F(ab')₂片段。

因此可使用人類抗體片段噬菌體展示庫來分離對NOGO具特異性之人類抗體片段(Fv、scFv、Fab)。細菌噬菌體粒子庫(其展示該等人類抗體片段蛋白質)相對於NOGO蛋白質進行篩查。彼等噬菌體展示抗體片段(其結合該NOGO)係自該庫被保留且選殖擴增。然後該等人類抗體基因係被自該特定細菌噬菌體切除且被插入含有該等人類IgG恆定區之人類IgG表達構築體以形成具有來自對NOGO特異性之經分離細菌噬菌體之該等可變區的完整人類IgG分子。

該等供體抗體可貢獻序列，例如可變重及/或輕鏈肽序

列、框架序列、CDR序列、功能片段、及其類似物、及編碼彼等之該等核酸序列，其用於設計且獲得多種經改變抗體，該等經改變抗體特性為該供體抗體之抗原結合特異性。

考慮該遺傳編碼之簡並度，可建構多種編碼序列，其編碼該等可變重及輕鏈胺基酸序列、及CDR序列以及功能片段及其類似物，其共有該供體抗體之抗原特異性。當與第二免疫球蛋白伴體有效結合時，可使用經分離核酸序列、或其片段(其編碼該等可變鏈肽序列或CDR)來產生經改變抗體(例如嵌合或人類化抗體)、或其它改造抗體。

經改變免疫球蛋白分子可編碼經改變抗體，其包括改造抗體(例如嵌合抗體及人類化抗體)。一所需經改變免疫球蛋白編碼區含有CDR編碼區，其編碼具有抗NOGO抗體，較佳高親和性抗體之抗原特異性之肽，其被插入一第一免疫球蛋白伴體(一人類框架或人類免疫球蛋白可變區)中。

該第一免疫球蛋白伴體係較佳有效連接至第二免疫球蛋白伴體。該第二免疫球蛋白伴體係如上文所定義，且可包括一編碼所關注之一第二抗體區(例如一Fc區)之序列。第二免疫球蛋白伴體亦可包括編碼另一免疫球蛋白(該輕或重鏈恆定區係以框架方式或藉由一連接子序列與其融合)之序列。可設計針對功能片段或NOGO類似物之改造抗體來使得結合增強。

該第二免疫球蛋白伴體亦可與如上文所定義之效應試劑(其包括非蛋白質載體分子)相關聯，該第二免疫球蛋白伴體可藉由習知手段與其有效連接。

在該等第二免疫球蛋白伴體(例如，抗體序列)與該效應試劑之間之融合或連接可藉由任何適當手段，例如習知共價鍵或離子鍵、蛋白質融合、或雜雙官能交聯劑(例如，碳化二醯亞胺、戊二醛及其類似物)。此等技術係在此項技術中為吾人所知且易描述於習知化學及生化課本中。

另外，習知連接子序列(其僅提供在第二免疫球蛋白伴體及效應試劑之間之所需量之間距)亦可被建構併入該經改變免疫球蛋白編碼區。此等連接子之設計係為熟習此項技術者所熟知。在本發明之進一步態樣，吾人提供微型雙功能抗體(二價或雙特異性)、微型三功能抗體、微型四功能抗體及其它多價scFV蛋白質物質，其具有一或多個種如前所描述，結合至NOGO，且中和其功能之CDR。

在一進一步實施例中，本發明之抗體可將一另外試劑附接於彼。例如，可使用重組DNA技術之程序來產生本發明之改造抗體，其中已藉由酶或其它可探測分子(即，一多肽效應劑或報道分子)來置換一全長抗體分子之該Fc片段或CH2-CH3域。

該第二免疫球蛋白伴體亦可有效連接至一非免疫球蛋白肽、蛋白質或其片段，其與具有抗NOGO抗體之抗原特異性之含CDR序列異源。所得蛋白質可在表達時展現抗NOGO抗原特異性及該非免疫球蛋白之特性兩者。彼融合伴體特性可為(例如)一功能特性(例如另一結合或受體域)、或一治療特性(若該融合伴體自身係一治療蛋白質)或另外抗原特性。

本發明之另一所需蛋白質可包含一全長抗體分子，其具有全長重及輕鏈、或任何其分離片段(例如Fab或F(ab')₂片段)、一重鏈二聚物、或其任何最小重組片段(例如Fv)或一單鏈抗體(SCA)或具有與所選供體mAb相同特異性之任何其它分子。此蛋白質可以經改變抗體之形式被使用，或以其未融合形式被使用。

只要該第二免疫球蛋白伴體係衍生自不同於供體抗體之一抗體(例如任何同種型或類別之免疫球蛋白框架或恆定區)，即可得到一改造抗體。改造抗體可包含來自一源(例如，該受體抗體)之免疫球蛋白(Ig)恆定區及可變框架區、及一或多種(較佳所有)來自該供體抗體之CDR。而且，可該等核酸或胺基酸等級上進行受體mAb輕及/或重可變區域框架區或該等供體CDR區之改變(例如，刪除、取代或添加)來保留供體抗體抗原結合特異性。

設計此等改造抗體以採用該抗NOGO mAb之可變重及/或輕鏈之一(或兩者)或該等重或輕鏈CDR之一或多種。如上文所定義，該等改造抗體具有中和效應。

此等改造抗體可包括一人類化抗體(其含有一所選人類免疫球蛋白或亞型之框架區)、或一嵌合抗體(其含有與該等抗NOGO抗體功能片段融合之人類重及輕鏈恆定區)。根據與該供體抗體之核苷酸及胺基酸序列同源，一適當人類(或其它動物)受體抗體可為一選自一習知資料庫(例如，KABAT®資料庫、Los Alamos資料庫、及Swiss Protein資料庫)之受體抗體。特徵為與該供體抗體之框架區同源(在胺基

酸基礎上)之人類抗體可適合於為插入供體 CDR 提供一重鏈恆定區及/或一重鏈可變框架區。可以類似方式選擇能夠給予輕鏈恆定或可變框架區之適當受體抗體。應注意的是不需要該等受體抗體重及輕鏈來自相同受體抗體。

所需異源框架及恆定區係選自人類免疫球蛋白類別及同種型，例如 IgG(亞型 1 至 4)、IgM、IgA、及 IgE。然而，該受體抗體不需要僅包含人類免疫球蛋白序列。例如，可建構一基因，其中編碼人類免疫球蛋白鏈之部分的 DNA 序列係與編碼一非免疫球蛋白胺基酸序列(例如一多肽效應劑或報道分子)之 DNA 序列融合。

在一人類化抗體中，較佳藉由一或多種 CDR 置換來改造在人類重及輕鏈兩者中之該等可變區。可使用全部六種 CDR、或少於該等六種 CDR 之多種組合。較佳置換所有六種 CDR。使用自人類受體抗體之未修飾輕鏈作為輕鏈，可置換僅在人類重鏈中之 CDR。或者，藉助於彼等習知抗體資料庫，一相容輕鏈可選自另一人類抗體。該改造抗體之其餘部分可衍生自任何適當受體人類免疫球蛋白。

該改造人類化抗體因此較佳具有一天然人類抗體或其片段之結構，且具有有效治療用途所需性質之組合。

熟習此項技術者應瞭解不必要影響供體抗體(即，一類似物)之特異性及高親和性，可藉由在可變區域胺基酸中之變化來進一步修飾改造抗體。吾人預期可藉由在可變區域框架或 CDR 兩者之一或兩者中之其它胺基酸來取代重及輕鏈胺基酸。

而且，改變該恆定區來提高或降低本發明之分子之選擇性質。例如，二聚作用(其結合Fc受體)或結合且活化補體之能力(例如，見Angal等人，Mol. Immunol, 30:105-108 (1993)，Xu等人，J. Biol. Chem, 269:3469-3474 (1994)，Winter等人，EP 307,434-B)。

一經改變抗體(其係一嵌合抗體)不同於如上文所描述之人類化抗體，該經改變抗體提供非人類供體抗體重鏈及輕鏈可變區(其包括框架區)以及用於兩種鏈之來自其它物種(較佳人類)之免疫球蛋白恆定區。

藉由下列過程，在本發明之經改變抗體，較佳人類化抗體之構築體中較佳利用適當供體mAb之可變輕及/或重鏈序列及CDR、及彼等編碼核酸序列。亦可採用相同或相似技術來產生本發明之其它實施例。

產生所選供體mAb之融合瘤係以習知方式選殖，且藉由為熟習此項技術者所習知之技術(例如，Sambrook等人所描述之彼等技術，(Molecular Cloning (A Laboratory Manual) 重及輕鏈可變區之DNA。為保留供體mAb結合特異性所需之該等可變重及輕鏈區(其至少含有該等CDR編碼區)及受體mAb輕及/或重可變區域框架區之彼等部分，以及自人類免疫球蛋白衍生之抗體鏈之其餘免疫球蛋白衍生部分係使用聚核苷酸引子及反轉錄酶來獲得。使用已知資料庫且與其它抗體比較來驗明該等CDR編碼區。

然後可製備一小鼠/人類嵌合抗體且檢定其結合能力。此一嵌合抗體含有該等全部非人類供體抗體VH及VL區域，以

及用於兩種鏈之人類Ig恆定區。

使用電腦化資料庫(例如，KABAT®)來驗明自一人類抗體之重鏈可變區之同源框架區，且將選擇具有與供體抗體同源性之人類抗體作為受體抗體。可以類似方式設計一適當輕鏈可變框架區。

一人類化抗體可衍生自嵌合抗體，或較佳藉由在所選重及輕鏈框架中適當插入自該等重及輕鏈之供體mAb CDR編碼區來合成製造。或者，可使用標準突變形成技術來製造一人類化抗體。因此，所得人類化抗體含有人類框架區及供體mAb CDR編碼區。存在框架殘基之後續操作。所得人類化抗體可被表達在重組宿主細胞(例如，COS、CHO或骨髓瘤細胞)中。

藉由與習知調節控制序列(其能夠控制在宿主細胞中之複製及表達、及/或自宿主細胞之分泌)有效關聯而設置抗體之此等編碼序列來產生習知表達載體或重組質體。調節序列包括啟動子序列(例如CMV啟動子)、及訊號序列，其可衍生自其它已知抗體。類似，可產生具有一DNA序列之一第二表達載體，該序列編碼一互補抗體輕或重鏈。除了所關注之編碼序列及可選擇標記範圍以外，此第二表達載體較佳係等與該第一表達載體一致，如此為了盡可能保證每一多肽鏈係被功能性表達。或者，用於該經改變抗體之重及輕鏈編碼序列可存在一單一載體上。

藉由習知技術以第一及第二載體兩者來共轉染所選宿主細胞(或僅藉由一單一載體轉染)以建置本發明之經轉染宿

主細胞，其包含重組或合成輕及重鏈兩者。然後藉由習知技術培養該經轉染細胞以產生本發明之改造抗體。藉由適當檢定(例如ELISA或RIA)自培養物篩檢該抗體，其包括重組重鏈及/或輕鏈兩者之聯合。可採用類似習知技術來建構其它經改變抗體及分子。

熟習此項技術者可選擇適當載體用於在本發明之方法及組合物之建構中採用之選殖及次選殖步驟。例如，可使用選殖載體之習知pUC系列。一載體，pUC19，係自供應機構(例如Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom)或Pharmacia (Uppsala, Sweden)商業獲得。另外，能夠易於複製之任何載體具有豐富的選殖位點及可選擇基因(例如，抗生素抵抗)，且易於操縱可用於選殖。因此，選殖載體之選擇不是本發明中之一限制因素。

類似，熟習此項技術者可自任何習知載體選擇用於該等抗體表達之載體。該等載體亦含有所選調節序列(例如CMV或RSV啟動子)，其指導異源DNA序列在所選宿主細胞中之複製及表達。此等載體含有以上所描述之DNA序列，其編碼該抗體或經改變免疫球蛋白編碼區。而且，該等載體可包括為了易於操作而藉由插入所需限制位點來修飾之所選免疫球蛋白序列。

該等表達載體特性亦為適合於擴增異源DNA序列表達之基因，例如，哺乳動物的二氫葉酸還原酶基因(DHFR)。其它較佳載體序列包括一多A訊號序列，例如來自牛生長激素(BGH)及 β 球蛋白啟動子序列(betaglopro)。可藉由為彼等熟

習此項技術者所熟知之技術來合成用於本文之該等表達載體。

可自商業或天然來源獲得或藉由用於指導在一所選宿主中重組DNA產物之表達及/或分泌之已知程序來合成此等載體之組份，例如複製子、選擇基因、增強子、啟動子、訊號序列及其類似物。為此目的亦可選擇其它適當表達載體，其許多類型係在用於哺乳動物、細菌、昆蟲、酵母、及真菌表達之技術中為吾人所知。

本發明亦涵蓋一細胞株，其經一重組質體轉染，該重組質體含有該等抗體或其經改變免疫球蛋白分子之編碼序列。用於選殖及此等選殖載體之其它操作之宿主細胞亦係習知的。然而，最需要的是，來自大腸桿菌之多種品系之細胞係用於該等選殖載體之複製及本發明之經改變抗體之建構之其它步驟。

用於本發明抗體之表達之適當宿主細胞或細胞株較佳係哺乳動物細胞(例如NS0、Sp2/0、CHO(例如DG44)、COS)、纖維母細胞(例如，3T3)、及骨髓瘤細胞，且更佳係CHO或骨髓瘤細胞。可使用人類細胞，因此使該分子經人類糖基化模式修飾。或者，可採用其它真核細胞株。適當哺乳動物宿主細胞之選擇及轉殖、培養、擴增、篩檢及產物生產及純化之方法係在此項技術中為吾人所知。例如，見上文所引用之Sambrook等人。

細菌細胞可證明適用作適合於本發明之重組Fab之表達之宿主細胞(例如，見Plückthun, A., Immunol. Rev., 130:151-

188 (1992))。然而，歸因於將以未折疊或不正確折疊形式或以非糖基化形式在細菌細胞中表達之蛋白質之趨勢，在一細菌細胞中產生的任何重組Fab必須被篩檢以保留抗原結合能力。若以正確折疊形式產生以細菌細胞表達之分子，則彼細菌細胞將係所需宿主。例如，用於表達之大腸桿菌之多種品系係在生物工藝學領域中作為宿主細胞為吾人所熟知。在此方法中亦可採用枯草芽孢桿菌、鏈黴菌、其它桿菌及類似物之多種品系。

若需要，為熟習此項技術者所知之酵母細胞之品系，以及昆蟲細胞（例如果蠅 (*Drosophila*) 及鱗翅目昆蟲 (*Lepidoptera*)) 及病毒表達系統亦可作為宿主細胞來利用。例如見Miller等人，*Genetic Engineering*, 8:277-298, Plenum Press (1986) 及本文所引用的參考文獻。

可建構該等載體之常用方法、需要用來產生本發明之宿主細胞之轉染方法、及必須用來自此宿主細胞產生本發明之抗體之培養方法全部係習知技術。通常，本發明之培養方法係無血清培養方法，通常藉由在懸浮液中無血清培養細胞。同樣，一旦產生本發明之抗體，則根據此項技術之標準程序(其包括硫酸銨沉澱、親和柱、管柱層析法、凝膠電泳法及類似方法)自細胞培養內含物純化本發明之抗體。此等技術係在此項技術之技能中且不限制本發明。例如，WO 99/58679及WO 96/16990描述了經改變抗體的製備。

然而該等抗體之表達之另一方法可利用轉基因動物中之表達，例如其描述於美國專利案第4,873,316號。此係關於

一表達系統，其使用動物酪蛋白啟動子，當其被轉基因併入一哺乳動物中時，其允許雌性動物在其乳中產生所需重組蛋白質。

在本發明之一進一步態樣，提供產生本發明之抗體之方法，該方法包含培養經編碼本發明之抗體之輕及/或重鏈的載體轉殖或轉染之宿主細胞及回收因此產生之抗體之步驟。

依照本發明係提供產生特異性結合至人類NOGO-A及中和其活性之抗NOGO抗體之方法，該方法包含以下步驟：

- (a) 提供一第一載體，其編碼該抗體之一重鏈；
- (b) 提供一第二載體，其編碼該抗體之輕鏈；
- (c) 以該等第一及第二載體轉殖一哺乳動物宿主細胞(例如 CHO)；
- (d) 在有益於該抗體自該宿主細胞分泌進入該培養基質的條件下培養步驟(c)之宿主細胞；
- (e) 回收步驟(d)之所分泌抗體。

一旦以所需方法被表達，然後就使用適當檢定來檢查該抗體活體外活性。當今採用習知ELISA檢定格式來評定該抗體至NOGO之定性及定量結合。另外，其它活體外檢定亦可用於在後續人類臨床研究之前核實致中和功效，該等研究經執行以便在通常廓清機制之不利影響下評價體內抗體持久性。

可作為預防藥或在臨床症狀之中風事件/發作之後，或在其它方面按需要來投用本發明之治療劑。治療劑量及持續

時間係關於在人體循環中本發明之分子之相對持續時間，且可視所治療病症及患者大體健康狀況由熟習此項技術者調整。預計可能需要在長時期(例如四至六個月)內重複給藥(例如一週一次或每兩週一次)以達成最大治療功效。

本發明之治療劑之投用模式可為任何適當途徑，其傳輸該藥劑至該宿主。本發明之該等拮抗劑及抗體、及醫藥組合物係特定用於非經腸投用，即，皮下、鞘內、腹膜內、肌肉內、靜脈內、或鼻內，其中靜脈內係特定較佳。

可製備本發明之治療劑作為醫藥組合物，其含有處於醫藥學上可接受載劑中的有效量之本發明之拮抗劑或抗體作為活性成份。在本發明之預防劑中，較佳係以易於注射形式之含水懸浮液或溶液，其含有改造抗體，較佳在生理pH值下被緩衝。用於非經腸投用之組合物將通常包含本發明之拮抗劑或抗體或其雞尾酒溶解在一醫藥學上可接受載劑(含水載劑較佳)中之溶液。可採用多種含水載劑，例如，0.9%鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物。此等溶液係無菌且通常無顆粒物質。可藉由習知、為吾人所熟知之殺菌技術(例如，過濾)來對此等溶液殺菌。該等組合物可含有用以逼近生理條件所需之醫藥學上可接受輔助物質如pH值調整及緩衝劑等。在此醫藥調配物中之本發明拮抗劑或抗體之濃度能廣泛變化，即，自少於約0.5%(通常為或至少約1%)至多達15至20重量%且根據所選投用特定模式，將主要基於流體體積、黏度被選擇。

因此，可製備用於肌肉內注射之本發明之醫藥組合物，

其含有 1 mL 無菌緩衝水、及在約 1 ng 至約 100 mg (例如約 50 ng 至約 30 mg 或約 5 mg 至約 25 mg 更佳) 之間之本發明之拮抗劑或抗體。類似，可製得用於靜脈內灌輸之本發明之醫藥組合物，其含有約 250 ml 無菌 Ringer 溶液，及約 1 至約 30 及更佳 5 mg 至約 25 mg 本發明之改造抗體。用於製備非經腸可投用組合物之實際方法係為吾人所熟知且將為彼等熟習此項技術者所顯而易見且例如更詳細描述於 Remington's Pharmaceutical Science, 第 15 版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。對於製備本發明之靜脈內可投用抗體調配物見 Lasmar U 及 Parkins D "The formulation of Biopharmaceutical products", Pharma. Sci. Tech. today, 第 129 至 137 頁, 第 3 卷 (2000 年 4 月 3 日), Wang, W "Instability, stabilisation and formulation of liquid protein pharmaceuticals", Int. J. Pharm 185 (1999) 129-188, Stability of Protein Pharmaceuticals Part A 及 B 編著 Ahern T.J., Manning M.C., New York, NY: Plenum Press (1992), Akers, M.J. "Excipient-Drug interactions in Parenteral Formulations", J. Pharm Sci 91 (2002) 2283-2300, Imamura, K 等人 "Effects of types of sugar on stabilization of Protein in the dried state", J Pharm Sci 92 (2003) 266-274, Izutsu, Kkojima, S. "Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying", J Pharm. Pharmacol, 54 (2002) 1033-1039, Johnson, R, "Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization", J. Pharm. Sci, 91 (2002) 914-

922。

Ha, E Wang W, Wang Y.j. "Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability", J. Pharm Sci, 91, 2252-2264, (2002)

其全部內容以引用的方式併入本文且讀者可具體查詢。

較佳地，本發明之治療劑當在醫藥制劑中係以單位劑型存在。熟習此項技術者易於判定適當治療有效劑量。為了有效治療人類之中風及其它神經疾病，高達每70 kg體重700 mg劑量本發明之拮抗劑或抗體應該被非經腸，較佳i.v.或i.m.(肌肉內)投用。若必要，在醫師適當選擇的適當時間間隔內重複此劑量。如實例中所揭示，當靜脈內投用本發明之抗體時，本發明者能夠證明對本文大鼠模型功能恢復之正面效應。

本文所描述之抗體可被凍乾儲存且在使用前在適當載劑內重構。已顯示此技術對習知免疫球蛋白有效且能採用技術已知凍乾及重構技術。

亦可與神經營養因子(例如神經生長因子(NGF))，例如腦源性神經營養因子(BDNF)、消炎劑(例如皮質類固醇)、及/或tPA組合(即同時、依序或個別)來使用本發明之抗體。在以下實例中所闡明的MCAO模型中可評定本發明之NOGO抗體與如tPA之組合。

在另一態樣，本發明提供一醫藥組合物，其包含本發明之抗NOGO抗體或其功能片段及醫藥學上可接受載劑，該組合物係用於治療或預防中風及其它神經疾病。

在又一進一步態樣，本發明提供一醫藥組合物，其包含

本發明之抗NOGO抗體或其功能片段及醫藥學上可接受載劑，該組合物係用於在罹患、或可能患中風或其它神經疾病之人類患者中抑制神經退化且/或促進功能恢復。

本發明進一步提供治療或預防人類中風(特定局部缺血中風)及其它神經疾病/病症，特定言之阿茲海默氏症之方法，其包含將有效量之抗NOGO抗體或其功能片段投予需要其之該人。除了(或作為另一選擇)治療人類患者已確定疾病，在治療方法中可使用本發明之抗體來減慢或停止阿茲海默氏症之擴展及/或發作。

本發明進一步提供了抗NOGO抗體或其功能片段之用途，其係用於製備供治療或預防中風及其它神經疾病/病症(特定言之阿茲海默氏症)之藥物。

本發明亦提供在罹患、或可能患中風或其它神經疾病/病症，特定言之阿茲海默氏症之人類患者中抑制神經退化且/或促進功能恢復之方法，其包含將有效量之抗NOGO抗體或其功能片段投予需要其之該人。

而且，本發明提供抗NOGO抗體或其功能片段之用途，其係用於製備供在罹患、或可能患中風或其它神經疾病/病症，特定言之阿茲海默氏症之人類患者中抑制神經退化且/或促進功能恢復之藥物。

本發明進一步提供治療或預防人類中風或其它神經疾病/病症(特定言之阿茲海默氏症)之方法，其包含非經腸投用治療有效量之抗NOGO抗體步驟。較佳靜脈內投用該抗NOGO抗體。

如本文上述所使用之神經疾病或病症包括(但不侷限於)創傷性腦損傷、脊髓損傷、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathies))、末梢神經疾病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、多發性硬化及特定言之阿茲海默氏症。

本發明亦提供促進軸突發芽之方法，其包含使人類軸突與抗NOGO抗體接觸之步驟。在活體外或在活體內進行此方法，較佳在活體內進行該方法。

因此在一進一步態樣，提供靜脈內投用形式的包含表1及2之CDR；表3及4之CDR；或表5及6之CDR之本發明之抗NOGO抗體或其功能片段之用途，其係用於製造供治療人類患者中風(特定局部缺血中風)、大腦損傷、脊髓損傷、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathies))、末梢神經疾病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、多發性硬化及特定言之阿茲海默氏症之藥物。

因此在一進一步態樣，提供治療人類患者中風(特定局部缺血中風)、大腦損傷、脊髓損傷、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathies))、末梢神經疾病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、多發性硬化及特定言之阿茲海默氏症之方法，該方法包含靜脈內投用治療有效量之本發明之抗NOGO抗體。

在本發明之一進一步態樣，提供促進在人類受治者(例如

患者)中樞神經系統內之神經元軸突發芽之方法，該方法包含投用(例如靜脈內投用)治療有效量之抗NOGO抗體(例如包含如本文所闡述之CDR之抗NOGO抗體)。

在本發明之一進一步態樣，提供抗NOGO抗體(例如包含如本文所闡述之CDR之抗NOGO抗體)的用途，其係用於製造供治療人類患者中風(特定局部缺血中風)、大腦損傷、脊髓損傷、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathies))、末梢神經疾病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、多發性硬化及特定言之阿茲海默氏症之靜脈內投用藥物。

在本發明之一進一步態樣，提供罹患(或易患)中風(特定局部缺血中風)、大腦損傷、脊髓損傷、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathies))、末梢神經疾病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、多發性硬化及特定言之阿茲海默氏症之人類患者之中樞神經系統之神經元中再生軸突伸出之方法，該方法包含投用(例如靜脈內)治療有效量之抗NOGO抗體(例如具有本文所闡述之CDR之抗NOGO抗體)。

在本發明之一進一步態樣，提供抗NOGO抗體(例如具有本文所闡述之CDR之抗NOGO抗體)的用途，其係用於製造供在罹患(或易患)中風(特定局部缺血中風)、大腦損傷、脊髓損傷、額顳葉失智症(fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病(tauopathies))、末梢神經疾病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、多發性硬

化及特定言之阿茲海默氏症之人類患者之中樞神經系統之神經元中再生軸突伸出之靜脈內投用醫藥組合物。

在本發明之一進一步態樣，提供調節成澱粉樣肽產生之方法，其包含用抗NOGO抗體(例如包含本文所闡述之CDR之抗NOGO抗體，特定2A10及其全人類或人類化形式)接觸一細胞，該細胞表達該前驅體(該成澱粉樣肽自其衍生)及NOGO多肽(例如人類NOGO-A)。在典型實施例中，該前驅體係APP。在進一步典型實施例中，該成澱粉樣肽係A β ，最佳係A β 40、A β 42或兩者之組合。

如本文所使用，術語"功能恢復"係指在例如臨床症狀之局部缺血事件或損傷或發作之後受治者中運動神經及/或感官及或行為之改良。可藉由被設計來量測基本神經功能(例如運動神經強度、感覺及協調)、認知功能(例如記憶、語言及遵循方向的能力)、及功能能力(例如基本日常生活活動或工具性活動)之工具來評價人類功能恢復。可藉由工具如NIH中風量表(Stroke Scale)(NIHSS)來量測基本神經功能恢復，可藉由神經心理測試如波士頓名稱測試(Boston Naming Test)、蹤跡描繪測試(Trail-making Test)、及California口語學習測試(Verbal Learning Test)來量測認知功能之恢復，且藉由工具例如ADCS/ADL(阿茲海默氏症臨床研究/日常生活活動)量表或Bristol日常生活活動量表來量測日常生活活動，所有測試及量表在此項技術中係為吾人所知。

下列實例舉例說明但不限制本發明。

範例

實例1-製備及選擇融合瘤

抗NOGO單株抗體係藉由融合瘤細胞產生，融合瘤細胞係小鼠骨髓瘤細胞與來自經目標抗原免疫之小鼠之B淋巴細胞融合之結果。藉由骨髓瘤融合伴體使該融合瘤細胞永生，同時藉由彼B淋巴細胞提供產生抗體的能力。每一融合瘤細胞僅製造一個具有獨特特異性之個別抗體因此術語單株。

皮下使用CFA及RIBI佐劑兩者，藉由10 µg總蛋白質(1:1，人類NOGO-A剪接(胺基酸186-1004)與大鼠NOGO-A剪接(胺基酸173-975)，作為GST-融合蛋白質被產生在大腸桿菌BL21中)使SJL小鼠免疫。然後4及8天後使用RIBI佐劑藉由5 µg相同蛋白質增進該等小鼠。又3天後，免疫細胞係被自局部引流淋巴結採集且與小鼠骨髓瘤細胞融合(使用PEG1500)來產生融合瘤。藉由兩次循環限制稀釋來選殖個別融合瘤細胞株。藉由經人類及大鼠NOGO-A兩者使該等小鼠免疫，來培植抗體，其對大鼠以及人類NOGO-A兩者具有良好結合特異性及/或結合親和性。此依次使在投予人之前評價大鼠及/或齧齒動物模型中此等抗體成為可能。

初始融合瘤抗體選擇係以在微量滴定盤上直接結合至NOGO蛋白質為基礎。隨後基於可溶蛋白質(其含有使用Precission™蛋白酶自GST部分被分解的人類NOGO-A序列)的能力來選擇大約60個融合瘤以在ELISA檢定中競爭此結合活性。

實例2-可變區之選殖

自所選2A10/3、2C4/1及15C3/3融合瘤細胞萃取總RNA，之後藉由反轉錄及聚合酶鏈反應(RT-PCR)來萃取重及輕可變區域cDNA序列。用於RT-PCR之前置引子係專門用於鼠科免疫球蛋白基因引導序列之簡並引子之混合物且該反置引子係導向恆定區之同種型特異抗體。設計PCR引子來承載5'限制酶識別位點以使選殖進入用於DNA定序之pUC19成為可能。

RNA萃取

根據製造者指示使用自Promega之SV總RNA分離系統自每一融合瘤純系之 10^6 個細胞顆粒物萃取總RNA。

反轉錄

使用專門用於鼠科引導序列之前置引子及鼠科IgGκ恆定區之反置引子，RNA經反轉錄以產生可變重及輕域之cDNA。該IgGγ1反置引子係被用於融合瘤2C4/1及15C3/3；且IgGγ2b用於2A10/3。前置引子在5'端承載一Sall限制酶識別位點，為了有效限制消化添加四種額外核苷酸至此5'。此等引子自Jones ST及Bendig MM 1991 (Biotechnology 9, 88-89)經調適。反置引子在5'端承載附加XmaI限制酶識別位點及額外四種核苷酸。

引子：

鼠科V_H引導序列前置引子：

AG77: 5'-ACT AGT CGA CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT STT CTT C-3'
(SEQ.I.D.NO:51)

AG78: 5'-ACT AGT CGA CAT GGG ATG GAG CTR TAT CAT SYT CTT-3'
(SEQ.I.D.NO:52)

AG79: 5'-ACT AGT CGA CAT GAA GWT GTG GTT AAA CTG GGT TTT T-3'
(SEQ.I.D.NO:53)

AG80: 5'-ACT AGT CGA CAT GRA CTT TGG GYT CAG CTT GRT TT-3'
(SEQ.I.D.NO:54)

AG81: 5'-ACT AGT CGA CAT GGA CTC CAG GCT CAA TTT AGT TTT CCT T-3'
(SEQ.I.D.NO:55)

AG82: 5'-ACT AGT CGA CAT GGC TGT CYT RGS GCT RCT CTT CTG C-3'
(SEQ.I.D.NO:56)

AG83: 5'-ACT AGT CGA CAT GGR ATG GAG CKG GRT CTT TMT CTT-3'
(SEQ.I.D.NO:57)

AG84: 5'-ACT AGT CGA CAT GAG AGT GCT GAT TCT TTT GTG-3'
(SEQ.I.D.NO:58)

AG85: 5'-ACT AGT CGA CAT GGM TTG GGT GTG GAM CTT GCT ATT CCT G-3'
(SEQ.I.D.NO:59)

AG86: 5'-ACT AGT CGA CAT GGG CAG ACT TAC ATT CTC ATT CCT G-3'
(SEQ.I.D.NO:60)

AG87: 5'-ACT AGT CGA CAT GGA TTT TGG GCT GAT TTT TTT TAT TG-3'
(SEQ.I.D.NO:61)

AG89: 5'-ACT AGT CGA CAT GAT GGT GTT AAG TCT TCT GTA CCT G-3'
(SEQ.I.D.NO:62)

鼠科 V_L 引導序列前置引子：

AG90: 5'-ACT AGT CGA CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT GTT GGT GCT G-3'
(SEQ.I.D.NO:63)

AG91: 5'-ACT AGT CGA CAT GGA GWC AGA CAC ACT CCT GYT ATG GGT-3'
(SEQ.I.D.NO:64)

AG92: 5'-ACT AGT CGA CAT GAG TGT GCT CAC TCA GGT CCT GGC GTT G-3'
(SEQ.I.D.NO:65)

AG93: 5'-ACT AGT CGA CAT GAG GRC CCC TGC TCA GWT TYT TGG MWT CTT G-3'
(SEQ.I.D.NO:66)

AG94: 5'-ACT AGT CGA CAT GGA TTT WCA GGT GCA GAT TWT CAG CTT C-3'
(SEQ.I.D.NO:67)

AG95: 5'-ACT AGT CGA CAT GAG GTK CYY TGY TSA GYT YCT GRG G-3'
(SEQ.I.D.NO:68)

AG96: 5'-ACT AGT CGA CAT GGG CWT CAA GAT GGA GTC ACA KWy YCW GG-3'
(SEQ.I.D.NO:69)

AG97: 5'-ACT AGT CGA CAT GTG GGG AYC TKT TTY CMM TTT TTC AAT TG-3'
(SEQ.I.D.NO:70)

AG98: 5'-ACT AGT CGA CAT GGT RTC CWC ASC TCA GTT CCT TG-3'
(SEQ.I.D.NO:71)

AG99: 5'-ACT AGT CGA CAT GTA TAT ATG TTT GTT GTC TAT TTC T-3'
(SEQ.I.D.NO:72)

AG100: 5'-ACT AGT CGA CAT GGA AGC CCC AGC TCA GCT TCT CTT CC-3'
(SEQ.I.D.NO:73)

MKV12: 5'-ACT AGT CGA CAT GAA GTT TCC TTC TCA ACT TCT GCT C-3'
(SEQ.I.D.NO:74)

鼠科 $\gamma 1$ 恆定區反置引子：

AG102: 5'-GGA TCC CGG GCC AGT GGA TAG ACA GAT G-3'
(SEQ.I.D.NO:75)

鼠科 $\gamma 2b$ 恆定區反置引子：

AG104: 5'-GGA TCC CGG GAG TGG ATA GAC TGA TGG-3'
(SEQ.I.D.NO:76)

鼠科 κ 恆定區反置引子：

AG101: 5'-GGA TCC CGG GTG GAT GGT GGG AAG ATG-3'
(SEQ.I.D.NO:77)

以 50 μ M 製備鼠科 V_H 或 V_L 引導序列前置引子庫。亦以 50

μ M製備鼠科 γ 或 κ 恆定區反置引子溶液。

反轉錄酶PCR (RT-PCR)

根據製造者指示使用自Promega之Access RT-PCR系統進行編碼可變重及輕區之RNA之雙重反轉錄。大約200 ng RNA被包括在50 μ l反應物中，其含有所提供之RT-PCR緩衝液、0.2 mM dNTP、1 μ M每一引子組、1 μ M MgSO₄及5 U每一AMV反轉錄酶及Tfl DNA聚合酶。

RT-PCR循環：1-48°C 歷經45 min

2-94°C 歷經2 min

3-94°C 歷經30 sec

4-50°C 歷經1 min

5-68°C 歷經2 min

6-68°C 歷經7 min

步驟3至5：重複30次。

pUC19選殖

根據彼等指示使用Qiagen MinElute Qiagen PCR純化套組來純化該等可變區RT-PCR產物且依序根據製造者指示藉由自New England Biolabs之XmaI及Sall來消化其。然後彼等係被負載在含有0.5%溴化乙錠之一製備性1%瓊脂糖凝膠上且在50 mA下之TAE緩衝液中運行1小時且在紫外光下切除該等V區域帶。根據製造者指示使用自Qiagen之MinElute凝膠萃取套組自該凝膠純化該等DNA片段。藉由用Sall及XmaI消化pUC19，然後使用自Qiagen之MinElute反應清理套組來純化且根據製造者指示使用蝦鹼性磷酸酶

(USB)來脫去磷酸而製備pUC19載體隊組。自分析1%瓊脂糖/溴化乙錠凝膠估計該等載劑隊組及該等V區片段之濃度，以1:2莫耳比混合且根據製造者指示使用Promega's快速連接套組連接。根據製造者指示已連接質體轉殖進入DH5 α 細胞 (Invitrogen)。選擇生長在含有100 μ g/ml安比西林 (ampicillin)之L瓊脂盤上之菌落用於DNA序列分析。

可變區定序

在37°C在經100 μ g/ml安比西林補充之5 ml LB培養質中培養菌落隔夜且萃取質體DNA且根據製造者指示使用Qiagen QIAprep Spin Miniprep套組來純化。使用標準M13前置及反置引子來使該等V_H及V_L區域經DNA序列化。

SEQ ID NOs 43至48顯示了該序列測定結果。

實例3-重組抗NOGO抗體

自經質體轉染之細胞純化具有鼠科2a/k恆定區之重組抗體，該質體包含選殖至小鼠IgG2a/k恆定區基因片段上之輕及重可變區。藉由PCR擴增該等經選殖鼠科V區以引入需要用來選殖進入哺乳動物表達載體R1d及R1n之限制位點。經V_H域以框架方式設計Hind III及Spe I位點以允許選殖進入含有該小鼠 γ 2a恆定區之經修飾R1d載體。經V_L域以框架方式設計Hind III及BsiW I位點且允許選殖進入含有該小鼠 κ 恆定區之經修飾R1n載體。

PCR引子

2A10V_H前置引子：

5'- ACTCATAAGCTTGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTTTTGGTAG -3'

(SEQ.I.D.NO:78)

V_H 反置引子：

5'-ACTATGACTAGTGTGCCTTGGCCCCAGTAG-3' (SEQ.I.D.NO:79)

V_L 前置引子：

5'- ACTCATAAGCTTGCCACCATGAGGTGCTCTCTTCAGTTTCTG -3' (SEQ.I.D.NO:80)

V_L 反置引子：

5'- ACTATGCGTACGTTTCAGCTCCAGCTTGG -3' (SEQ.I.D.NO:81)

根據製造者指示在含有約 10 ng pUC19 微量純化 (miniprep)(其含有 V 區域)、2% DMSO、400 μ M dNTPs、1 μ M 每一引子及所提供之緩衝液的 50 μ l 體積中使用 Hercules (Stratagene) 執行 PCR。如下 1-95°C 2 mins、2-95°C 1 min、3-56°C 1 min、4-72°C 1 min 進行 PCR。30 次循環步驟 2-4。

選殖進入表達載體

根據製造者指示使用自 Qiagen 之 MinElute PCR 純化套組來純化該等 PCR 產物。該 V_H PCR 產物及 R1d (IgG2a) 哺乳動物表達載體係被 Hind III-Spe I 消化。根據製造者指示該 V_L PCR 產物及 R1n(k) 哺乳動物表達載體係被 Hind III-BsiW I (NEB) 消化。使用 Promega 快速連接套組以 1:2 莫耳比連接載體至插入物。連接混合物係被轉染進入 DH5 α 細胞且生長在安比西林選擇上之菌落成長且發送用於 DNA 序列核實。

重組抗 NOGO 抗體 2A10/3 之序列

測定在 HindIII 及 EcoRI 選殖位點之間之 2A10 重鏈之序列為：

AAGCTTGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTTTGGTAGCAGC

AGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGACTGAAC
TGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTAC
ACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGG
CCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTACA
ATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTA
TTATTGTGAACTGGGACAGGGCTACTGGGGCCAAGGCACACTAGTCACCG
TCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCTGTG
TGTGGAGATACAACACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGG
TTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAAGTCTGGATCCCTGTCCA
GTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGAGTCTGACCTCTACACCCTC
AGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCAC
CTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG
AGCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCA
CCTAACCTCCTGGGTGGCCCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAA
GGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGG
ATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAAC
GTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAG
TACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCCAGGACTGGATGA
GTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCCAGCGCCC
ATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGT
ATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTC
TGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGG
ACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCT
GGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGA
AGAAGTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGT
CTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATG
AGAATTC

(SEQ ID NO: 49)

測定在 HindIII 及 EcoRI 選殖位點之間之 2A10 輕鏈之序列
為：

AAGCTTGCCACCATGAGGTGCTCTCTTCAGTTTCTGGGGGTGCTTATGTT
CTGGATCTCTGGAGTCAGTGGGGATATTGTGATAACCCAGGATGAACTCT
CCAATCCTGTCACTTCTGGAGAATCAGTTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGT
AAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGAAGACATACTTGAATTGGTTTCTGCA
GAGACCAGGACAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATTTGATGTCCACCCGTG
CATCAGGAGTCTCAGACCGGTTTAGTGGCAGTGGGTGAGGAACAGATTTT
ACCCTGGAAATCAGTAGAGTGAAGGCTGAGGATGTGGGTGTGTATTACTG
TCAACAACCTGTAGAGTATCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAACGTACGGATGCTGCACCGACTGTATCCATCTTCCCACCATCC
AGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAA
CTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAAC
GACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGC
ACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACG
ACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCA
TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAAGAATTC

(SEQ ID NO: 50)

2A10 之嵌合體亦如本文中 HcLc 所提及來建構。

實例 4-小鼠抗 NOGO 抗體結合至 NOGO

在 4°C 下，在 50 mM Tris pH 值 9.5 中之 5 µg/ml GST 人類 NOGO-A56 塗覆至 Nunc Immunosorp 盤 (每孔 100 µl) 之上隔夜。孔經 PBS 漂洗一次然後用 PBS 中 1% BSA 培育以在室溫下阻斷非特異性結合位點 1 小時。在 PBS 中稀釋抗體至 2 µg/ml 及由此製造 1/3 稀釋液。以三份式添加抗體至孔中且在 4°C 培育隔夜。以 PBS 清洗孔三次然後與抗小鼠 HRP(1:1000) 培育 1 小時。以 PBS 清洗五次然後每孔經 100 µl TMB 基質

(Sigma)培育10分鐘。藉由添加50 μ l濃HCl停止該顯色反應。使用盤讀數器來量測在450 nm之光學密度。減去自不具有抗體之孔之背景值。

圖8顯示在ELISA檢定中全部三種小鼠抗NOGO-A單株抗體(2A10、2C4及15C3)之視劑量而定結合至人類NOGO-A56。

Y軸顯示在450 nm所測光學密度(OD)、捕獲在孔中之抗體之定量量測。X軸顯示在每一資料點每孔所使用抗體之濃度(ng/ml)。抗體2A10，其提示對人類NOGO-A之更高親和性的濃度範圍內顯示最高訊號。

實例5-抑制NOGO-A片段(NOGO-A56, SEQ.I.D. NO:87)之產生

編碼人類NOGO-A之(MQESLYPAAQLCPSFEESEATPSPVLPDIVMEAPLN SAVPSAGASVIQPSSSPLEASSVNYESIKHEPENPPPYEEAMSVSLKKVSGIKKEEIKPEN INAALQETEAPYISIACDLIKETKLSAEPAPDFSDYSEMAKVEQPVPDHSELVEDSSPDSE PVDLFSDDSI PDVPQKQDETVM LVKESLTETS FESMIEYENKE-SEQ.I.D.NO:87) 胺基酸586-785之cDNA序列係被選殖進入pGEX-6P1之 BamHI-XhoI位點來產生命名為NOGO-A56之GST標籤融合蛋白質。質體在37°C經IPTG誘導至0.5 mM歷經3小時之後在2XTY培養質中經100 μ g/ml安比西林表達在BL21細胞中。藉由超聲波處理溶解細胞顆粒物且按照製造者指示使用麩胱甘肽-瓊脂糖(Amersham Pharmacia)來純化該融合蛋白質。使用經減少之麩胱甘肽來洗提經純化蛋白質且相對於PBS廣泛透析，使用BSA標準及基於BioRad庫馬斯之蛋白質檢定法定量且然後在-80°C按等分量被儲存。因此本發明提

供一抗體或其功能性片段，其可結合至NOGO-A(特別是人類NOGO-A)，其中該抗體或其功能性片段可中和包含由SEQ.I.D.NO:87編碼之多肽之NOGO蛋白質的活性，其中該抗體可結合至該蛋白質之SEQ.I.D.NO:87。以典型形式，本發明抗體可結合人類NOGO-A之胺基酸586-785間，且可中和NOGO-A之活性。

實例6-神經突長出檢定

僅GST或GST-NOGOA56融合蛋白質之對照組係在冰上被解凍且在0.5x組織培養級PBS中稀釋至3 pmol/ μ l。在組織培養櫃中在經BD-Biocoat聚-d-離胺酸塗覆之96孔盤之每孔中央乾燥5 μ l物斑。一旦被乾燥，在HBSS(Life Technologies)中稀釋經純化抗體、融合瘤條件組織培養上清液或化合物且在4及8孔之間之複本塗覆50 μ l至孔中。以無補充物之HBSS處理單獨GST及GST-NOGO-A56之對照孔。在37°C預處理2小時後，以100 μ l體積以每孔20-40,000神經元添加自出生8天後大鼠大腦的經純化、解離之小腦顆粒神經元且在37°C培育24小時。在PBS中使用4%三聚甲醛/10%蔗糖固定培養物1小時，然後使用多株抗 β III微管蛋白抗體來染色神經突。在Cellomics Arrayscan系統上使用自動化影像捕獲及分析來定量神經突長出。

圖1至6顯示了該等結果。

圖1顯示NOGO-A56對神經突長出之抑制效應，其與單獨對照蛋白質GST相比較。

圖2至5顯示功能阻斷抗NOGO抗體2A10/3、2C4/1及

15C3/3 連同非功能阻斷對照抗體 12G3 的驗明。抗體 12G3 結合至 NOGOS6 但不抑制神經突長出活性。該等圖表顯示暴露於未純化抗體(在上清液中)之培養物平均神經突長度。資料顯示 2A10/3、2C4/1 及 15C3/3 對 NOGO-A56 之神經突長出抑制活性之阻斷效應。該對照係單獨 GST。

圖 6 顯示經純化 2A10/3 對 NOGO-A56 之神經突長出抑制效應之阻斷。

實例 7-IN-1 對人類 NOGO 具有非阻斷活性。

當以 IN-1 抗體進行時，如實例 5 所描述之神經突長出檢定顯示 IN-1 未阻斷人類 NOGO-A 之抑制活性(圖 7)。

實例 8-2A10 之人類化

藉由建造重疊寡核苷酸重新製備人類化 V_H 及 V_L 構築體，該等寡核苷酸包括用於選殖進入 Rld 及 Rln 哺乳動物表達載體以及人類訊號序列之限制位點。引入 Hind III 及 Spe I 限制位點以框架化 V_H 域，其含有用於選殖進入 Rld 之 CAMPATH-1H 訊號序列，Rld 含有人類 $\gamma 1$ 已變異恆定區。引入 Hind III 及 BsiW I 限制位點以框架化 V_L 域，其含有用於選殖進入 Rln 之 CAMPATH-1H 訊號序列，Rln 含有人類 κ 恆定區。

CAMPATH-1H 訊號序列：MGWSCIILFLVATATGVHS

(SEQ.I.D.NO:82)

重鏈

鑑定與 2A10 V_H 胺基酸序列具有 66% 一致性之人類生殖株(germline)序列。選擇 U84162 之框架序列進行人類化作

用：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY
AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGQWLVLNFDYWGQGLVTVSS
(SEQ.I.D.NO:83)。

因此本發明提供在產製人類化抗-NOGO抗體(特別是抗-NOGO抗體，其可結合人類NOGO-A，且包含表2中所闡釋之CDR且/或可結合至上文所闡釋之抗原決定部位)中SEQ.I.D.NO:83(或具有與SEQ.I.D.NO:83相差少於10個胺基酸(例如相差少於8個胺基酸)，較佳相差少於6個胺基酸，更佳相差少於4個胺基酸(例如相差2或1個胺基酸)之框架)的用途。鑑定位置93及94係維持CDR構型中潛在重要的殘基。

位置(Kabat#)	2A10 V _H	U84162
93-94	EL	AR

應注意在此等位置之EL基元係是不尋常的。

設計下列人類化構築體：

人類化V_H構築體H1：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGNINPSNGGTNY
NEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCELGQGYWGQGLVTVSS
(SEQ.I.D.NO: 84)。

輕鏈

鑑定與2A10 V_L胺基酸序列具有66%一致性之人類生殖株序列。選擇CAA85593之框架序列進行人類化作用：

框架：CAA85593

DIVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQGLVYSDGDTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
SGVPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIK

(SEQ.I.D.NO:85)。因此本發明提供在產製人類化抗NOGO抗體中SEQ.I.D.NO:85(或具有相差少於8個胺基酸(例如相差6個胺基酸),較佳相差少於4個胺基酸(例如相差2或1個胺基酸)之框架)的用途,其中該人類化抗體結合至NOGO-A(特定一抗體,其包含上文表1中所闡釋之一或多種(例如所有)CDR之輕鏈且/或結合至上文所闡釋之NOGO-A之抗原決定部位)且可中和NOGO-A(特別是人類NOGO-A)之活性。

鑑定下列框架殘基在恢復親和性中的潛在重要性:

位置(Kabat#)	2A10 V _L	AAK94811
4	I	M
45	R	Q
46	R	L

設計人類化V_L構築體:

構築體	框架模板	位置(Kabat#)	胺基酸	
			人	小鼠
L11	CAA85593	4	M	I
		45	R	Q
		46	R	L

人類化V_L構築體L11:

DIVITQSPSLPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPQLLIYLMSTRA
SGVPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVEYPLTFGQGTKLEIK

(SEQ.I.D.NO:86)

將編碼SEQ.I.D.NO:84及86之質體以暫時性共同轉染至CHO細胞中,且小規模表達以產生抗體H1L11。亦可將編碼SEQ.I.D.NO:92及86之質體以暫時性共同轉染至CHO細胞

中，且小規模表達以產生抗體H7L11。

因此本發明提供一人類化抗體，其可結合至NOGO(特別是人類NOGO，更特別是人類NOGO-A)，且可中和其活性，該人類化抗體包含SEQ.I.D.NO:84之重鏈可變區及SEQ.I.D.NO:86之輕鏈可變區。在本發明之另一態樣，係提供一抗體(特別是全人類或人類化抗體)，其可結合至NOGO(特別是人類NOGO，更特別是人類NOGO-A)，且可中和其活性，該抗體以競爭性方式抑制包含SEQ.I.D.NO:85之重鏈可變區及SEQ.I.D.NO:86之輕鏈可變區之人類化抗體以等莫耳濃度結合至人類NOGO-A。該競爭抗體較佳抑制包含SEQ.I.D.NO:85之一重鏈可變區及SEQ.I.D.NO:86之一輕鏈可變區之抗體之至少50%結合至人類NOGO-A。

根據本發明，提供抗NOGO抗體，其可特異性結合至人類NOGO-A，且中和其活性，該抗體包含SEQ.I.D.NO:88之一重鏈及SEQ.I.D.NO:89之一輕鏈。本發明亦涉及包含該抗體之醫藥組合物及治療人類患者，特定患中風(例如局部缺血中風)或阿茲海默氏症之患者之方法。對於彼等熟習此項技術者將顯而易見在用於移除一訊號序列之任何處理(例如宿主細胞調控處理)之前SEQ.I.D.NO:88及SEQ.I.D.NO:89分別代表該重鏈及輕鏈。通常SEQ.I.D.NO:88之經處理形式將在位置20開始且SEQ.I.D.NO:89之經處理形式將在位置20開始。

SEQ.I.D.NO:88

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAP

GQGLEWMGNINPSNGGTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCELGQG
 YWQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

SEQ.I.D.NO:89

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVITQSPLSLPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWF
 QQRPGQSPQLLIYLMSTRASGV PDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVEYPL
 TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

SEQ.I.D.NO:90 闡釋了編碼 SEQ.I.D.NO:88 之聚核苷酸：

AAGCTTTACAGTTACTCAGCACACAGGACCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCT
 TCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTG
 AGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCA
 CCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAA
 ATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTCACCA
 TGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG
 ACACGGCCGTGTATTACTGTGAACTGGGACAGGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTAGTCA
 CAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGA
 GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC
 TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
 GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC
 TCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCT
 CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG

AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAATTC

(SEQ.I.D.NO:90)

SEQ.I.D.NO:91 闡釋了編碼 SEQ.I.D.NO:89 之聚核苷酸：

AAGCTTTACAGTTACTCAGCACACAGGACCTACCCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTG
 GTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGATATTGTGATAACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGT
 CACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGA
 AGACATACTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTTATTTGATG
 TCCACCCGTGCATCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCGGTGGGTCAGGCACTGATTTCACT
 GAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCCAACAACTTGTAGAGTATC
 CGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
 ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA
 CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
 AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
 GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGAATTC

(SEQ.I.D.NO:91)

實例 9-H1L11 抗 NOGO 單株抗體之 BiaCore 分析

使用 Biacore3000 生物傳感器來分析該抗 NOGO 單株抗體 (mAb) 至重組表達人類 NOGO-A (hNOGO) 之結合動力學。該方法論係如下：

方法

使用為目標固定等級設計之Biacore Wizard程式藉由第一胺耦合使hNOGO固定至一CM5晶片。通過50 mM N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)及200 mM N-乙基-N'-二甲基胺丙基碳化物溶液來活化該CM5傳感器表面。然後使用hNOGO在5 mM 乙酸钠中之300 mM溶液，pH值5.0，固定hNOGO在50-200共振單位之間之濃度範圍。固定完成之後，藉由注射1 M乙醇胺鹽酸鹽，pH值8.5來阻斷任何仍活化酯。

在HBS-EP(10 mM HEPES，pH值7.4，150 mM NaCl，3 mM EDTA，及0.005% P-20表面活性劑)中稀釋該H1L11 mAb(見實例8)至低濃度且在0.1-100 nM之間變化之濃度進行結合研究。為了動力學分析，使用60 μ l/分鐘流速，且未見到質量轉移效應。以任意順序以兩份式執行所有濃度，且包括緩衝液空白組。藉由單一注射單獨15 μ l衝量50 mM氫氧化鈉或藉由注射15 μ l 100 mM H₃PO₄兩者之一，之後藉由隨後注射15 μ l 50 mM氫氧化鈉來獲得再生。以30 μ l/分鐘流速運行兩種再生協定；且兩種方法導致完全移除結合H1L11但不導致hNOGO傳感器表面之結合能力之任何損失。所有運行參照一空白傳感器表面(如先前所描述其已活化且阻斷但未添加配位體)。使用BIAevaluation動力學分析軟體版4.1來進行結合分析。本發明之其它抗體之Biacore分析大體上遵循如本文所描述之相同協定。

結果：

抗體	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
HcLc	2.23×10^6	2.49×10^{-3}	1.26
H1L11	1.0×10^6	2.15×10^{-2}	22.16
小鼠2A10	2.9×10^6	1.84×10^{-3}	0.8
小鼠2C4	8.09×10^6	6.44×10^{-4}	8
小鼠15C3	4.07×10^4	8.28×10^{-4}	17.5

使用大鼠NOGO-A進行相似分析。

結果：

抗體	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
小鼠2C4	1.62×10^5	5.33×10^{-4}	3.9
小鼠15C3	4.6×10^4	8.7×10^{-4}	24.9
小鼠2A10	1.26×10^6	1.01×10^{-3}	1

實例 10-tMCAO之後抗NOGO抗體(2C4)對病變體積及功能恢復的效應。

目的：

此研究之目的係為了調查腦室內(ICV)投用抗NOGO單株抗體(mab)對大腦中動脈暫時性阻塞(tMCAO)後小鼠之病變體積及功能恢復的功效。利用圓筒測試、楔形樑及神經功能評分工作來評定暫時性局部缺血90分鐘之後之長期功能恢復且收集大腦用於再生過程之免疫組織化學評價及病變體積評定。

方法：

外科製備

在該研究中使用由Charles River提供之雄性Sprague-Dawley大鼠(300-350 g)。在普通麻醉下將腦室內(i.c.v.)套

管置於左側腦室。自手術恢復至少4天之後，藉由用ICV投用之血管緊縮素II攻毒來確定套管位置。

病灶性局部缺血之誘導

如 Longa 及合作者 (Stroke, 1989, 20, 84-91) 所描述，在氟烷/氧/一氧化二氮麻醉條件下所有動物經歷 tMCAO。藉由直腸溫度計在整個手術程序中來監控體溫，且藉由該溫度計所控制之加熱毯來維持該等動物正常溫度 ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$)。在左中腦動脈 (MCA) 阻塞且在再灌注時記錄實際核心溫度值。

MCA 阻塞後 90 分鐘，再次麻醉該等大鼠且緩慢且完全地撤出該細絲以允許再灌注。該動脈切開係經透熱療法來閉合，再次核實止血，且該頸部傷縫合處閉合。

阻塞後恢復

MCA 阻塞之後，停止麻醉且在一保育箱 ($23-25^\circ\text{C}$) 中歷經 1 小時在嚴格觀察下允許該等動物恢復意識及正位反射。然後將該等動物單獨養於手術後恢復室，其中在整個存活期間密切監控彼等總健康狀態。

行為工作：

1. 神經學評定：

使用 28 點分級量表，在 MCA 阻塞後 1 小時、24 小時及然後每週一次歷經 8 週之時間點評定 MCA 阻塞後之運動神經及行為變化。

所使用神經學評定("神經功能評分")之細節：

與相同研究內其它大鼠相比較之 MCAO 動物之神經功能

評分-最高評分28點。

爪子放置

將該等動物縱向固持於長凳邊緣，將你手作杯狀罩在其頭上，且，一個接一個，取每一爪子且將其置於該長凳邊緣外。觀察爪子收回及在長凳上之重新置放。

評分：1用於每一成功爪子置放(最高評分=4)

正位反射

緊緊抓住該動物，且旋轉其直至其仰躺在你手掌中。放鬆緊握力且看該動物是否將自身正位。

評分：1用於成功正位

橫桿

將該動物之前爪置於一竹節桿上且允許其懸掛。

評分：3若兩後肢升至該桿上

2若一後肢升至桿上

1若動物僅僅懸掛

0若動物跌落(歸因於無緊握力)

傾斜平臺

固持籠子蓋在45°。將動'以下坡方式'置於該蓋上

評分：3若該動物在15秒內旋轉來面向'上坡'

2若其花15-30秒

1若其花了多於30秒

0若歸因於弱/無緊握力該等動物自該蓋上跌落，

或仍朝向'下坡'

對側旋轉

固持該動物尾巴底部且順時針然後逆時針旋轉該動物。

觀察該動物對側旋轉至旋轉方向的能力。

評分：1用於每一側(最高評分=2)

視覺前爪觸及

固持該動物尾巴底部，且其頭恰好在該椅子頂端位準之下。接近該椅子直至該動物的觸鬚係幾乎接觸其。該動物應該彎成弓形且試圖將其前爪置於該椅子表面上。

評分：1用於每一成功爪子置放(最高評分=2)

環繞

將該動物置於地面且環繞著尋覓

評分：4用於未環繞

3趨向於一側

2用於大繞圈 >50 cm半徑

1用於中等繞圈 $>15 < 50$ cm半徑

0用於旋轉/緊密繞圈 <15 cm半徑

對側反射

握住該動物尾巴底部。

評分：0用於一反射

1用於無反射

緊握力強度

讓動物僅以前爪固持在籠子桿上。向後拉動物尾巴。

評分：2-正常緊握力強度

1-弱緊握力強度

0-無緊握力

活動力

觀察在地板上時之環繞活性。

循環：3-用於正常活動力

2-若活躍但環繞

1-若不穩定

0-若不情願移動

大體狀況

評分：3-正常(良好的皮毛狀況，警惕，四處移動，增重正常)

2-非常好但增重少於正常

1-良好

0-一般(例如髒的皮毛，也許未多刷拭，隆起姿勢，好鬥，弱的肌肉緊張度)

最高評分(即正常大鼠)=28

2.圓筒測試

每週在前爪置放圓筒測試中評定動物。將動物置於直徑20 cm且高30 cm透明Perspex®圓筒中歷經3分鐘之階段。在此階段評定左及右前爪置放之次數。在紅光條件下進行此測試。

3.楔形樑行走：

對於此測試，在一紅光室培訓所有大鼠來穿過大約40度角1 m長的正方形楔形樑，向上朝其家籠跑。因為樑寬漸小，所以當該大鼠沿該樑移動時，此工作變得越來越困難。為了分析的目的，標記該樑以將其分成3部分，在最寬部分

(6 cm)分級為容易直至在楔形端(2 cm)困難。

手術前培訓-歷時2天自其家籠取每一大鼠且以不斷增加的距離將其置於該樑之上(大約總共四次)。當每一大鼠未經哄騙且以極少腳步犯規而穿過該樑時，將其分類為經培訓的。將任何表現差者排除出該測試。

測試-每測試時期將每一大鼠置於該樑上3次且手動記錄穿過延遲、腳步滑動次數(定義為未達成接觸該樑之頂部表面的腳步置放)、(後肢及前肢)且然後取此等之平均值。在週5對於批1及在週4對於該等動物之兩批，改變分析為視訊記錄該測試。然後為了增加靈敏性根據該已記錄測試來進行分析。

用於MCAO動物之測試時期係在手術之前，然後在手術後第7天且其後每週直至在第8週殺死。

給藥方案

在阻塞之後1小時、24小時、1週及2週投用抗體。

組：

IgG1對照(5 μ g)(組D)

抗體2C4 (5 μ g)(組F)

抗體2C4 (15 μ g)(組E)

以已消毒鹽水進行全部製備。

在投用之前對各組採取盲法。

為了避免所用大鼠之次序所引入的偏見，採用Latin方格設計。

在一灌輸泵(2.5 μ l/min)幫助下，在2分鐘內傳輸5 μ l體積

的備料(1 mg/ml及3 mg/ml)將抗體給藥。注射之後，保持套管在原位又2分鐘。

神經病理學及局部缺血損害之定量

MCA阻塞8週後，以冰-冷4%三聚甲醛固定灌注大鼠。在解剖及處理以用於石蠟包埋及隨後免疫組織化學之前，將該等動物然後斬首且該等大腦就地儲存在冰-冷4%三聚甲醛中。

為了大腦體積分析，使用大腦矩陣(brain matrix)以2 mm間隔連續將大腦自前極至小腦切薄片以用於石蠟處理。然後該等大腦係經石蠟處理且係被用蠟包埋。收集4微米切片，其對應於自相對於前囟前+3 mm至後-7.5 mm之定向預測定冠狀面。在以蘇木紫(Haematoxylin)及伊紅(Eosin)著色前安裝該等切片至聚離胺酸塗覆載片上。使用基於電腦之影像分析系統(Datacell, 硬體Optimas Software)分析該等切片病變體積及膨脹。

病變面積包括未經蘇木紫(Haematoxylin)及伊紅(Eosin)著色之組織。藉由循該病變面積之邊界跟蹤來量測病變且表達為與大腦對側非病變側相比較的%病變面積。

統計分析：

以時間作為重複度量，使用一重複量測ANOVA方法來分析該等神經功能評分及體重資料。使用1-因子ANOVA及ANCOVA方法來分析病變體積且使用一重複量測ANOVA方法來分析病變面積。

以週及樑難度作為可重複量測，使用一重複量測ANOVA

方法來對該等前肢及後肢單獨分析腳步滑動資料，以尋找群體效應。為了尋找前肢及後肢之間之差異，亦以週及腿作為重複量測(在難度範圍內平均)使用一重複量測ANOVA方法來分析該等腳步滑動資料。

來自組E(高劑量Ab組)之三隻動物接受一比此組中其它動物少之劑量(見下)。雖然，以及不以此等動物進行該分析且其顯示對該等結果無顯著影響且因此該等動物係被包括在該分析中，但重要的是，注意到在該圓筒測試及體重概況之情況下，當比較給藥3次之動物及給藥4次之動物與對照組時，只有給藥4次之動物係顯著不同於以對照抗體給藥之動物。

應注意在此研究過程中，歸因於假定感染許多大鼠死亡。因此，在該最高劑量組(組E)中之三隻動物接受一比此組中其它動物少之劑量。

結果：

來自組E(高劑量Ab組)之三隻動物接受一比此組中其它動物少之劑量。以及不以此等動物分析該等資料且除非本文另有陳述，否則對分析結果不存在顯著影響。

圖9顯示對照組及5 μg 及15 μg 測試組中作為總大腦體積之百分比的病變體積。當與對照組相比較時，該抗體對病變體積不具有影響。

圖10此圖顯示由平均值 \pm SEM表示之神經功能評分資料。歸因於所觀察資料之大範圍，認為參量分析係有效的。在週1、4、7及8之15 μg 劑量組與對照組之間存在顯著差異。

當以此方式分析時，在週7及8之15 μg 劑量組與對照組之間存在顯著差異。

圓筒測試

見圖11A、11B、11C、11D。由平均值 \pm SEM表示之圓筒資料用於A)兩爪子，B)左爪，C)右爪及D)右爪，其分屬接受3劑量15 μg 抗NOGO抗體之大鼠，且接受4劑量抗NOGO抗體之彼等。

該15 μg 劑量抗體產生右爪使用之顯著增加。

當該高劑量組係被分成接受全部四劑量之大鼠對僅接受三劑量抗體之大鼠時，在該兩亞組之間未見顯著差異。然而如圖11D中所顯示，當比較4劑量組與對照組時，存在一顯著差異，當比較3劑量組與對照組時未見該差異。統計分析對重複量測資料使用Fisher's LSD測試。

楔形樑

見圖12。圖12顯示前肢腳步滑動，其由平均值 \pm 95%置信區間表示。

*在週6，與組D、對照、($p=0.0305$)相比較，組F，5 μg 劑量係不斷增加前腳步滑動次數。

雖然此處未顯示，但是前爪腳步滑動次數隨著沿著該樑難度不斷增加而增加。

見圖13。圖13顯示後肢腳步滑動，其由平均值 \pm 95%置信區間表示。

*在該研究過程中與組D、對照、($p=0.0488$)相比較，組F，5 μg 劑量係不斷顯著增加後腳步滑動次數。在週6及7，與

組D、(分別 $p=0.0098$ 及 $p=0.0370$)相比較，組F係不斷顯著增加後腳步滑動次數。

雖然此處未顯示，但是後爪腳步滑動次數隨著沿著該樑難度不斷增加而增加。

動物穿過該樑之延遲資料顯示在起始週內隨著該等動物恢復延遲減少，然而未觀察到治療效應。

圖14A)顯示體重，其由平均值 \pm SEM表示。經 $15\ \mu\text{g}$ 抗體給藥之動物導致在24小時、1週且在週3至研究完成之每一時間點體重增加。

圖14B)圖顯示分屬給藥3次之動物及給藥四次之彼等的 $15\ \mu\text{g}$ 劑量群組之重量。資料表達為平均值 \pm 95%置信區間。 $*P<0.05$ ，重複量測ANOVA。

圖14C)圖顯示分屬給藥3次之動物及給藥四次之彼等的 $15\ \mu\text{g}$ 劑量群組之重量。與經 $5\ \mu\text{g}$ 抗NOGO抗體給藥之動物及經對照抗體給藥之動物相比較。資料表達為平均值 \pm 95%置信區間。 $*P<0.05$ ，重複量測ANOVA。

雖然不顯著高於其它組，但是該高劑量組具有高比例通過安樂死或死亡移除之動物。此說明當與對照組相比時體重之平均提高。

結論：

此研究考慮當在1小時、24小時、1週及2週ICV投用時，90分鐘tMCAO後兩劑量抗NOGO抗體2C4對病變體積及功能恢復之影響。

- 該抗體治療對病變體積不具有影響。

- 以最高劑量 15 μg ICV 時，該抗體治療對神經功能評分具有適度，但顯著影響。在週 1、4、7 及 8 時使用平均評分(當資料覆蓋大範圍時使用，因此為參量分析提供依據)，此劑量顯著增加神經功能評分。

- 該抗體治療對以最高劑量，15 μg ICV 時圓筒測試中之右爪使用具有顯著影響。該研究之整個階段中與對照相比，此劑量導致右爪使用之顯著增加，特定在週 2 及 6 亦存在右爪使用之顯著增加。

- 該抗體治療對楔形樑行走測試中表現不具有正面影響。然而，似乎該低劑量抗體組(5 μg ICV)尤其在週 6 增加腳步滑動次數。然而當分析每難度部分腳步滑動次數時未見差異，當分析延遲穿過該樑時亦未見。

- 該抗體治療對以最高劑量，15 μg ICV 時之體重具有顯著影響。自週 3 起，當與對照相比，此抗體組具有顯著增加之體重。雖然非一功能結果，但是體重係大體健康之良好反映且此增加將反映 tMCAO 之後之已改良生理恢復。

在接受較高劑量抗體之組中最後 3 隻大鼠因上述所給出原因未接受第四及最後劑量。為了測定此最後劑量之重要性，進行接受與 4 劑量相對之 3 劑量之最高抗體劑量組中之大鼠的比較。

給藥持續時間

給藥 4 次之動物顯著增加右爪置放次數，但是給藥 3 次之動物不增加。而且，當與給藥 3 次之動物相比較時，在第二週給藥似乎加速體重增加。與對照相比較，給藥 4 次亦產生

重量顯著增加，但是給藥3次不增加。

給藥不影響病變體積、神經功能評分或在楔形樑行走測試中之表現。

總結

總而言之，雖然該治療對病變體積不具有影響，但是最高劑量抗NOGO抗體2C4(15 μ g)對3或4劑量之後之功能恢復(其如本文所闡釋之神經功能評分所評定)及爪置放及投用4劑量之後之體重具有正面影響。

實例 11-靜脈內投用抗NOGO單株抗體對tMCAO之後之病變體積及功能恢復之影響

目的：

此研究之目的係為了調查靜脈內投用(IV)投用之抗NOGO單株抗體(mabs)2A10及2C4對暫時性左中腦動脈阻塞(tMCAO)後大鼠之病變體積及功能恢復的功效。利用圓筒測試、楔形樑及神經功能評分工作來評定暫時性局部缺血90分鐘之後之長期功能恢復且收集大腦用於再生過程之免疫組織化學評價及病變體積評定。

方法：

病灶性局部缺血之誘導

如Longa及合作者(Stroke, 1989, 20, 84-91)所描述，在氟烷/氧/一氧化二氮麻醉條件下所有動物經歷tMCAO。藉由直腸溫度計在整個手術程序中來監控體溫，且藉由該溫度計所控制之加熱毯來維持該等動物正常溫度(37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C)。在MCA阻塞時且在再灌注時記錄實際核心溫度值。

MCA阻塞後90分鐘，再次麻醉該等大鼠且緩慢且完全地撤出該細絲以允許再灌注。該動脈切開係經透熱療法來閉合，再次核實止血，且該頸部傷縫合處閉合。

阻塞後恢復

MCA阻塞之後，停止麻醉且在一保育箱(23-25°C)中歷經1小時在嚴格觀察下允許該等動物恢復意識。然後將該等動物單獨養於手術後恢復室，其中在整個存活期間密切監控彼等總健康狀態。

行為工作：

神經學評定

使用28點分級量表("神經功能評分"，見實例10之細節)，在MCA阻塞後1小時、24小時及然後每週一次歷經8週之時間點評定MCA阻塞後之運動神經及行為變化。

圓筒測試

每週在前爪置放圓筒測試中評定動物。將動物置於直徑20 cm且高30 cm透明perspex圓筒中歷經3分鐘之階段。在此階段評定自發立起來探索環境時左、右及兩前爪置放之次數。在紅光條件下進行此測試。

楔形樑行走

對於此測試，在一紅光室培訓所有大鼠來穿過大約40度角1 m長的正方形楔形樑，向上朝其家籠跑。因為樑寬漸小，所以當該大鼠沿該樑移動時，此工作變得越來越困難。

手術前培訓-歷時2天自其家籠取每一大鼠且以不斷增加的距離將其置於該樑之上(大約總共四次)。當每一大鼠未經

哄騙且以極少腳步犯規而穿過該樑時，將其分類為經培訓的。將任何表現差者排除出該測試。

測試-每測試時期將每一大鼠置於該樑上3次且以視訊記錄穿過延遲、腳步滑動次數(定義為未達成恰當接觸該樑之頂部表面的腳步置放)、(後肢及前肢)，於往後某日評定且然後取此等之平均值。用於MCAO動物之測試時期係在手術之前，然後在手術後第7天且其後每週直至在第8週殺死。

給藥方案(IV)

在阻塞之後1小時、24小時、1週及2週靜脈內投用抗體。

組：

A -2C4 3 mg/kg(歸因於低MW分率，調節4.7 mg/kg)

B -2A10 3 mg/kg

C -對照IgG2a 3 mg/kg

D -2A10 10 mg/kg

以消毒鹽水進行全部製備。

在投用之前對各組採取盲法。

為了避免所用大鼠之次序所引入的偏見，採用Latin方格改造。隨意挑選動物且操作者採取盲法進行治療。

神經病理學及局部缺血損害之定量

MCA阻塞8週後，以冰-冷4%三聚甲醛固定灌注大鼠。在解剖及處理以用於石蠟包埋及隨後免疫組織分析之前，將該等動物然後斬首且該等大腦就地儲存在冰-冷4%三聚甲醛中48小時。

為了大腦體積分析，使用大腦矩陣(brain matrix)以2 mm 間隔連續將大腦自前極至小腦切薄片以用於石蠟處理。然後該等大腦係經石蠟處理且係被用蠟包埋。收集4微米切片，其對應於自相對於前囟前+3 mm至後-7.5 mm之定向預測定冠狀面。在以蘇木紫(Haematoxylin)及伊紅(Eosin)著色前安裝該等切片至聚離胺酸塗覆載片上。使用基於電腦之影像分析系統(Datacell, 硬體Optimas Software)分析該等切片病變體積藉由具有經減少蘇木紫(Haematoxylin)及伊紅(Eosin)之組織之面積來描繪病變面積。藉由循該病變面積之邊界跟蹤來量測病變且表達為與大腦對側非病變側相比較的%病變面積。

統計分析

以時間作為重複度量，使用一重複量測ANOVA方法來分析該等神經功能評分及體重資料。使用1-因子ANOVA及ANCOVA方法來分析病變體積且使用一可重複量測ANOVA方法來分析病變面積。

以週及樑難度作為可重複量測，使用一重複量測ANOVA方法來對該等前肢及後肢單獨分析腳步滑動資料，以尋找群體效應。為了尋找前肢及後肢之間之差異，亦以週及腿作為可重複量測(在難度範圍內平均)使用一重複量測ANOVA方法來分析該等腳步滑動資料。

結果：

病變體積

圖15代表作為總大腦體積之百分比的病變體積。當該抗

體與對照組相比較時，其對病變體積不具有影響。

神經功能評分

圖16顯示神經功能評分資料，其由平均值 \pm SEM來表示。歸因於所觀察資料之大範圍，認為參量分析係有效的。

* $P < 0.05$ 與對照抗體相比較，重複量測ANOVA。

圓筒測試

見圖17A、17B及17C由平均值 \pm SEM表示之圓筒資料用於A)兩爪子，B)左爪，C)右爪。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 與對照抗體相對，重複量測ANOVA。

楔形樑

前肢腳步滑動

見圖18前肢腳步滑動表示為平均值 \pm SEM。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 與對照抗體相對，重複量測ANOVA。

後肢腳步滑動

見圖19後肢腳步滑動表示為平均值 \pm SEM。* $P < 0.05$ 與對照抗體相對，重複量測ANOVA。

延遲穿過該樑

見圖20。後肢腳步滑動表示為平均值 \pm SEM。* $P < 0.05$ 與對照抗體相對，重複量測ANOVA。

結論：

此研究考慮當在1小時、24小時、1週及2週投用IV時90分鐘tMCAO之後兩劑量抗NOGO抗體2A10(3&10 mg/kg)及一劑量2C4 (3 mg/kg)對病變體積及功能恢復之影響。

- 該抗體治療對病變體積不具有影響。

- 該抗體治療對在24小時以最高劑量2A10(10 mg/kg)對神經功能評分不具有重要影響。
- 該2A10抗體治療(3 mg/kg)在圓筒測試中特定在週1及週2時對右爪使用具有重要影響。
- 在tMCAO之後1週及2週，2A10(3 mg/kg)具有降低前爪腳步滑動次數之明確影響，在tMCAO之後2週，2A10(10 mg/kg)具有降低後爪腳步滑動次數之影響，且在tMCAO之後1週兩種濃度2A10降低穿過該樑之延遲性。相對於對照抗體，在tMCAO之後3週2C4 (3 mg/kg)降低前爪腳步滑動。

總結

總而言之，雖然該治療對病變體積無影響，但是如主要在tMCAO之後前兩週內神經功能評分、爪子置放及楔形樑所評定，抗NOGO單株抗體2A10及2C4兩者之靜脈注射對功能恢復具有正面影響。

實例12-NOGO cDNA之轉染進入SHSY5Y-APP細胞

在轉染前一天，該等SHSY5Y-APPwt細胞係被胰蛋白酶化，計數且以6-孔板(Nunc)之每孔200,000至1百萬細胞重新塗布。

藉由稀釋該DNA進入無血清培養基(OptiMEM-1)中，添加PlusTM試劑，混合且在室溫保育15分鐘使該NOGO表達構築體(在pCDNA3中之FLAG-標籤NOGO-A cDNA (Invitrogen)；在pCDNA3.1A中之MYC-標籤NOGO-B及NOGO-C)與PlusTM試劑複合。(6 µl Plus試劑進入每孔總體積100 µl之

2 μg DNA及OptiMEM-1中)

LipofectAMINETM試劑係被稀釋進入在第二試管中之無血清培養基(Optimem-1)中且被混合(4 μl Lipofectamine在每孔100 μl 體積中)。

預複合DNA(來自上文)係與經稀釋lipofectAMINE結合，混合且在室溫保育15分鐘。

同時以無血清培養基(OptiMEM-1)沖洗該等細胞且然後添加新鮮無血清培養基至該等細胞中(每孔800 μl)。

然後添加該等DNA-Plus-LipofectAMINE試劑複合物至該等細胞(200 μl)中，輕輕混合且在5% CO_2 中在37 $^{\circ}\text{C}$ 保育該等細胞5小時。

5小時後，添加1 ml含血清生長培養基至該等細胞中且保育該等細胞隔夜或2小時。

14小時(或2小時)後，移除所有培養基且以每孔1 ml (OptiMEM-1)置換其。

48小時調節後，收集培養基且如實例13中所描述檢定其澱粉樣含量。

實例13-藉由IGEN ELISA偵測A β 肽

過度表達人類APPwt或澱粉樣前驅體蛋白質瑞典變體序列(APPswe)之SHSY5Y細胞按所需密度在6孔或96孔Nunc板中接種。

24小時後添加用於測試之試劑(例如抗體、肽、化合物等等)至最終120 μl 體積之細胞及經保育24小時細胞。

將該培養基自細胞移除且採用A β C-終端特定抗體以一

隔夜ORIGEN免疫檢定來檢定50 μ l用於A β x-40及50 μ l用於A β x-42。簡而言之，使用生物素化6E10(Singet Labs)來捕獲A β 肽。使用Ori-標籤標記A β C-終端特定抗體來偵測A β x-40及A β x-42物質。以經抗生蛋白鏈菌素塗覆之磁珠來捕獲抗體-A β 複合物且用IGEN M8分析儀來檢定。

使用MTT(溴化3-[4,5-二甲基噻唑2-基]-2,5-二苯基四唑鹽；噻唑基藍)試劑來核實該等細胞之生存能力。簡而言之，在培養基質中以1:10稀釋MTT試劑(5 mg/ml在磷酸鹽緩衝鹽水中)且添加100 μ l至每孔中。在37 $^{\circ}$ C保育4小時之後，添加100 μ l溶化液(20% SDS/50%二甲基甲醯胺)。在590 nm使用Delfia Wallac盤讀儀來對盤吸光率讀數。

圖21至34顯示了該等結果。

SHSY5Y-APPwt細胞表達野生型APP。SHSY5Y-APPswe細胞表達APP之瑞典突變形式。

實例14-NOGO-A表達對經分泌A β 40及A β 42肽之含量之影響

當引入表達NOGO-A之一表達構築體進入SHSY5Y-APPwt細胞或SHSY5Y-APPswe細胞時，可見A β 40及A β 42之含量顯著增加，此提示NOGO-A在某種方式直接或間接調節APP之蛋白溶解過程及/或A β 肽之降級。此經改變APP處理之產物係肽A β 40之事實可提示NOGO效應將係在調節 β -分泌酵素活性之程度上。

圖21顯示當自一表達載體表達NOGO-A時，分泌A β 40之含量增加。該等兩左側桿係該等對照(載體單獨及承載一對照蛋白質、綠色螢光蛋白質(GFP)之載體)，此顯示在此細

胞株中A β 40產物之背景含量。該等其餘桿顯示當在該等細胞中表達與FLAG肽融合之NOGO-A時偵測到A β 40肽含量顯著增加且亦顯示當表達與真菌融合之NOGO-B時，雖然不太明顯，但是有相似提高。

使用特定用於A β 42之ELISA重複相同實驗。該等結果顯示A β 42肽分泌含量之相似提高，其如在早期實驗中使用A β 40 ELISA時所見。又NOGO-B亦顯示A β 42肽增加分泌且又該增加係與NOGO-A相比不太明顯。圖22顯示該等結果。

與載體pCDNA3單獨比較，比較來自經NOGO-A轉染之細胞之分泌肽含量之重複實驗顯示於圖23(用於A β 40)及24(用於A β 42)中。

圖25顯示A β 40及A β 42之分泌肽含量之直接比較。圖25係三至五獨立實驗之平均值以確定NOGO之一致性。

因此本發明提供在製造用於治療阿茲海默氏症之藥物中抗NOGO抗體(特定抗NOGO-A及/或抗NOGO-B抗體)的用途。

實例15-抗NOGO-A抗體抑制自SHSY5Y-APPwt及SHSY5Yswe細胞之A β 40及A β 42肽分泌

圖26顯示當引入抗NOGO抗體2A10進入培養基中時，自表達內生NOGO-A之SHSY5Y-APPwt細胞分泌之A β 40及A β 42肽含量急遽降低。

以視劑量而定之方式，在達到幾乎90%抑製程度的30 μ g/ml下見至該效應。在A β 40及A β 42肽之間之效應不存在明顯差別(分別見於圖26中之白桿及黑桿)，換句話說抗

NOGO抗體對APP處理之任何影響不偏向於A β 40或A β 42肽兩者之任一。

圖27顯示如圖26相同實驗但以不相關IgG1抗體。如該圖中清晰所見，一不相關(非抗NOGO A)單株抗體對自該等細胞之A β 40及A β 42肽分泌含量不具有抑制效應。

圖28顯示相同不相關IgG1抗體對自表達NOGO-A之SHSY5Y-APP_{swe}細胞之A β 40及A β 42肽分泌含量類似顯示極少或無抑制效應。

類似地，圖29顯示如上文圖26所描述之相同實驗結果但使用抗NOGO單株抗體，其結合至NOGO-A但非功能阻斷劑(6D5)。該非功能阻斷抗NOGO-A單株抗體對自表達NOGO-A之SHSY5Y-APP_{wt}細胞之A β 40及A β 42肽分泌具有最小影響(少於10%)。此結果提示圖26中顯示之結果係藉由抗NOGO抗體抑制NOGO功能活性之結果。

圖30顯示與圖29相同實驗結果，其使用非功能阻斷抗NOGO單株抗體(6D5)但藉由表達內生NOGO-A之SHSY5Y-APP_{swe}細胞。如之前(圖29)對此細胞株分泌之A β 40及A β 42之含量存在最小影響，係少於10%抑制。

圖31顯示一實驗結果，該實驗擴展圖26之實驗結果。圖31顯示功能阻斷抗體2A10/3所顯示之抑制效應之視濃度而定效應在一更高濃度繼續，以50 μ g/ml抗體濃度達成高於90%抑制之程度。

圖32顯示與圖32之彼等一致的實驗結果，除此使用SHSY5Y_{swe}細胞之外。在50 μ g/ml之更高濃度繼續見到抗

體2A10/3之視濃度而定抑制效應。

圖33顯示不同功能阻斷抗NOGO-A抗體，2C4對自SHSY5Y-APPwt細胞之A β 40及A β 42肽分泌之影響。該等結果顯示對A β 40及A β 42肽分泌含量之視濃度而定抑制效應達到20 μ g/ml濃度下之36%程度。又對於A β 40及A β 42肽兩者見到該效應。

圖34比較抗NOGO-A功能阻斷抗體2A10、2C4及15C3(以該圖所顯示之濃度)與其它對照抗體10A4、IgG2b及14D12之抑制效應。該圖顯示對A β 40及A β 42分泌之抑制效應係特定對該等功能阻斷抗NOGO-A單株抗體。

實例16-增加NogoA表達以視劑量而定方式提高A β 含量

為了調查NogoA表達對A β 含量之影響，以不斷增加含量之C-終端真菌標籤NogoA cDNA過渡性轉染SHSY5Y-APPwt細胞。使用pcDNA3.1真菌cDNA對於每次轉染保持cDNA總量(5 μ g)恆定。轉染48小時後，移除培養基且對A β 40檢定。而且，細胞被收集且溶解在含有Triton X-100及全部蛋白酶抑制劑(Roche)之10 mM Tris/HCl中。用10% Novex Tris-甘胺酸凝膠解析細胞溶胞物且藉由抗NogoA抗體經受西方轉漬分析。以不斷增加之NogoA cDNA濃度觀察到NogoA蛋白質表達之增加。此伴隨在自此等細胞之培養基中A β 40含量之相應增加。因此，NogoA之增加表達導致A β 40含量之視劑量而定增加。見圖36。

圖17-嵌合2A10(HcLc)

含有嫁接至人類IgG1/k野生型C區之親本鼠科V區之嵌合

抗體係被設計以當測試人類化構築體時作為參照使用。在該小鼠重組R1d質體中之NOGO 2A10 V_H域係被切除Hind III-Spe I且被連接至含有hC γ 1wt之R1d載體。在該小鼠重組R1n質體中之NOGO 2A10 V_L域係被切除Hind III-BsiW I且被連接至含有hC κ 之R1n載體。

SEQ.I.D.NO:92 闡釋用於HcLc之重鏈序列

MGWSCIIILFLVAAATGVHSQVQLQQPGTELKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRP
 GQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCELGQG
 YWQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ.I.D.NO:92)

SEQ.I.D.NO:93 闡釋編碼 SEQ.I.D.NO:92 之聚核苷酸。

AAGCTTGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTTTTGGTAGCAGCAGCTACAGGT
 GTCCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCA
 GTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTG
 AAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCCTAGCAATGGTGGT
 ACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
 ACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGAA
 CTGGGACAGGGCTACTGGGGCCAAGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
 GGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGC
 GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
 AAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC

CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGAATTC (SEQ.I.D.NO:93)。

SEQ.I.D.NO:94 闡釋 HcLc 之輕鏈之胺基酸序列：

MRCSLQFLGLVLMFWISGVSGDIVITQDELSNPVTSGESVVISCRSSKSLLYKDGKTYLW
 FLQRPQSPQLLIYLMSTRASGVSDRFSGSGSDFTLEISRKAEDVGVYYCQQLVEYP
 LTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSEQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ.I.D.NO:94)

SEQ.I.D.NO:95 闡釋編碼 SEQ.I.D.NO:94 之聚核苷酸。

AAGCTTGCCACCATGAGGTGCTCTTTCAGTTTCTGGGGTGCTTATGTTCTGGATCTCT
 GGAGTCAGTGGGGATATTGTGATAACCCAGGATGAACTCTCCAATCCTGTCACTTCTGGA
 GAATCAGTTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTATATAAGGATGGGAAGACA
 TACTTGAATTGGTTTCTGCAGAGACCAGGACAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATTTGATG
 TCCACCCGTGCATCAGGAGTCTCAGACCGGTTTAGTGGCAGTGGGTGAGGAACAGATTC
 ACCCTGGAAATCAGTAGAGTGAAGGCTGAGGATGTGGGTGTGTATTACTGTCAACAACCTT
 GTAGAGTATCCGCTCACGTTCCGGTGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCT
 GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAC
 AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC

ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
GGAGAGTGTTAGGAATTC (SEQ.I.D.NO:95)

實例 18-人類化抗NOGO抗體結合至人類NOGO

在 4°C 將 50 mM Tris pH 值 9.5 中之 1 µg/ml GST-人類 NOGO-A56 塗覆至 Nunc Immunosorp 盤 (每孔 100 µl) 之上隔夜。以 TBS+0.05% 吐溫沖洗孔一次，然後以在 TBS+0.05% 吐溫中之 2% BSA 保育來在室溫下阻斷非特異性結合位點 1 小時。在 TBS+0.05% 吐溫+2% BSA 中稀釋抗體至 10 µg/ml 且由此製造 1/2 稀釋液。以兩份式添加抗體至孔中且在室溫下保育 1 小時。以 TBS+0.05% 吐溫沖洗孔三次，然後以抗人類 K 過氧化物酶共軛體 (1:2000) 保育 1 小時。以 TBS+0.05% 吐溫沖洗孔三次，然後以每孔 100 µl OPD 過氧化物酶基質 (Sigma) 保育 10 分鐘。藉由添加 25 µl 濃 H₂SO₄ 停止該顯色反應。使用一盤讀數器來量測在 490 nm 之光學密度。減去不具有抗體之孔之背景值。

圖 35A 至 C 舉例說明在 ELISA 檢定中人類化抗體 H1L11 與嵌合體 (HcLc) 相比較之視劑量而定結合至人類 NOGO-A56。該 Y 軸顯示在 490 nm 量測之光學密度 (OD)、捕獲在該等細胞中之抗體之定量量測。該 X 軸顯示在每一資料點每孔所用抗體之濃度 (µg/ml)。抗體 H1L11 及 HcLc 分別給出 0.118 µg/ml 及 0.022 µg/ml 之 EC50 值。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示 GST-NOGO-A56 融合蛋白質對神經突長出之抑

制效應。該Y軸顯示在任意單位中平均神經突長度/神經突(NL/N)。

圖 2 顯示融合瘤 2A10 之上清液對 NOGO-A56(GST-Nogo5&6)之神經突長出抑制活性之阻斷效應。該Y軸係如圖 1。

圖 3 顯示融合瘤 2C4 之上清液對 NOGO-A56(GST-Nogo5&6)之神經突長出抑制活性之阻斷效應。該Y軸係如圖 1。

圖 4 顯示融合瘤 15C3 之上清液對 NOGO-A56(GST-Nogo5&6)之神經突長出抑制活性之阻斷效應。該Y軸係如圖 1。

圖 5 係對照融合瘤上清液 12G3，其不具有 NOGO-A56 阻斷活性。該Y軸係如圖 1。

圖 6 顯示在 4 種濃度下經純化 2A10 之 NOGO-A56 阻斷效應。該Y軸係如圖 1。

圖 7 顯示重組 IN-1 單株抗體對 NOGO-A56(GST-NOGO5&6) 不顯示任何阻斷活性。Y軸係如圖 1。

對於圖 1 至 7 該負對照係單獨該 GST 蛋白質。

圖 8 顯示 2A10、2C4 及 15C3 單株抗體結合至人類 NOGO-A56。該Y軸顯示在 450 nm 所量測之 OD、該等孔中所捕獲之抗體之定量度量。該X軸顯示在每一資料點每孔所用抗體之濃度 (ng/ml)。

圖 9 顯示在遵循實例 10 之研究的不同濃度下作為大腦總體積之百分比之病變體積。

圖 10 顯示實例 10 之以平均值 \pm SEM 表示之神經功能評分 (neuroscore) 資料。

圖 11A、11B、11C、11D 以平均值 \pm SEM 表示之實例 10 之圓筒資料，其用於 A) 兩爪，B) 左爪，C) 右爪及 D) 右爪，其分屬接受 3 劑量 15 μ g 抗 NOGO 抗體之大鼠，且接受 4 劑量抗 NOGO 抗體之彼等。

圖 12 顯示以平均值 \pm 95% 置信區間表示之實例 10 之前肢腳步滑動。

圖 13 顯示以平均值 \pm 95% 置信區間表示之實例 10 之後肢腳步滑動。

圖 14A) 顯示以平均值 \pm SEM 表示之體重。用 15 μ g 該抗體之劑量投予動物導致在 24 小時、1 週及自週 3 至研究完成之每一時間點體重之增加。

圖 14B) 圖表顯示分屬投藥 3 次之動物及投藥四次之彼等的 15 μ g 劑量群組之重量。以平均值 \pm 95% 置信區間表示資料。* P <0.05，重複量測 ANOVA。

圖 14C) 圖表顯示分屬投藥 3 次之動物及投藥四次之彼等的 15 μ g 劑量群組之重量。與以 5 μ g 該抗 NOGO 抗體投用之動物及以對照抗體投用之動物相比較。以平均值 \pm 95% 置信區間表示資料。* P <0.05，重複量測 ANOVA。

圖 15 代表作為實例 11 之大腦總體積之百分比之病變體積。

圖 16 顯示實例 11 之以平均值 \pm SEM 表示之神經功能評分資料。

圖 17A、17B及 17C實例 11之對於 A)兩爪，B)左爪，C)右爪以平均值 \pm SEM表示之圓筒資料。

圖 18顯示實例 11之楔形樑測試之以平均值 \pm SEM表示之前肢腳步滑動。

圖 19顯示實例 11之以平均值 \pm SEM表示之後肢腳步滑動。

圖 20顯示以平均值 \pm SEM表示之後肢腳步滑動(穿過樑之延遲測試)。

圖 21：NOGO A轉染導致在 SHSY5Y-APPwt細胞中之A β 40肽含量之提高。

圖 22：NOGO A轉染導致在 SHSY5Y-APPwt細胞中之A β 42肽含量之提高。

圖 23：NOGO A表達對A β 40肽含量之影響。

圖 24：NOGO A表達對A β 42肽含量之影響。

圖 25：NOGO A、NOGO-B及NOGO-C表達對A β 40及A β 42之影響。

圖 26.抗NOGO A抗體 2A10-BR抑制自 SHSY5Y-APPwt細胞之A β 分泌。

圖 27.對照 IgG1對自 SHSY5Y-APPwt細胞之A β 分泌之影響。

圖 28.對照 IgG1對自 SHSY5Y-APPswe細胞之A β 分泌之影響。

圖 29.對照抗NOGO(非功能阻斷)抗體 6D5對自 SHSY5Y-APPwt細胞之A β 分泌之影響。

圖 30.對照抗NOGO(非功能阻斷)抗體 6D5對自 SHSY5Y-

APP_{swe}細胞之A β 分泌之影響。

圖 31. 功能阻斷抗 NOGO A 單株抗體 2A10 抑制自 SHSY5Y-APP_{wt}細胞之A β 分泌。

圖 32. 功能阻斷抗 NOGO A 單株抗體 2A10 抑制自 SHSY5Y-APP_{swe}細胞之A β 分泌。

圖 33. 功能阻斷抗 NOGO A 單株抗體 2C4 抑制自 SHSY5Y-APP_{wt}細胞之A β 分泌。

圖 34. 抗 NOGO A 靜態培養抗體製備物及額外對照抗體對自 SHSY5Y-APP_{wt}細胞之A β 分泌之影響。2A10、2C4及15C3係該等靜態培養抗體。所有其它係BR(生物反應器)純化對照或市售對照。

圖 35A至C闡釋在ELISA檢定中人類化抗體H1L11(其與嵌合體(HcLc)相比較)視劑量而定結合至人類NOGO-A56。該Y軸顯示在490 nm所量測光學密度(OD)、該等孔中所捕獲之抗體之定量度量。該X軸顯示在每一資料點每孔所用抗體之濃度($\mu\text{g/ml}$)。

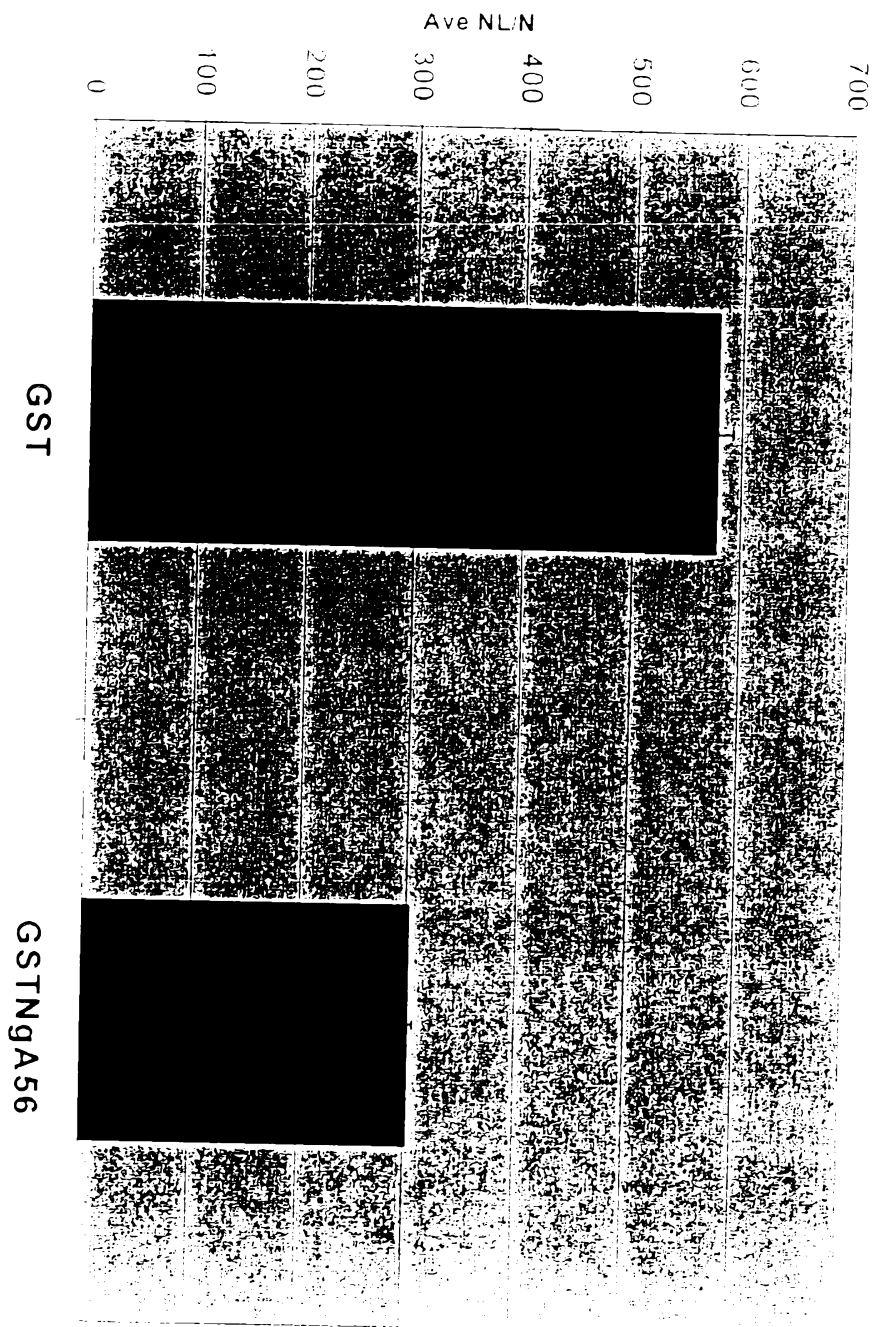
圖 36. 增加之NogoA表達以視劑量而定之方式提高了A β 含量。該圖之Y軸係A β 40之%增加。該X軸顯示真菌示蹤NogoA cDNA之漸增濃度。該圖上方係一凝膠，其顯示如使用一抗NogoA抗體西方轉漬檢定所示之NogoA蛋白質表達之增加量。

五、中文發明摘要：

本發明係關於抗NOGO之抗體、含有彼等之醫藥調配物及此等抗體在治療及/或預防神經疾病/病症上之用途。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：



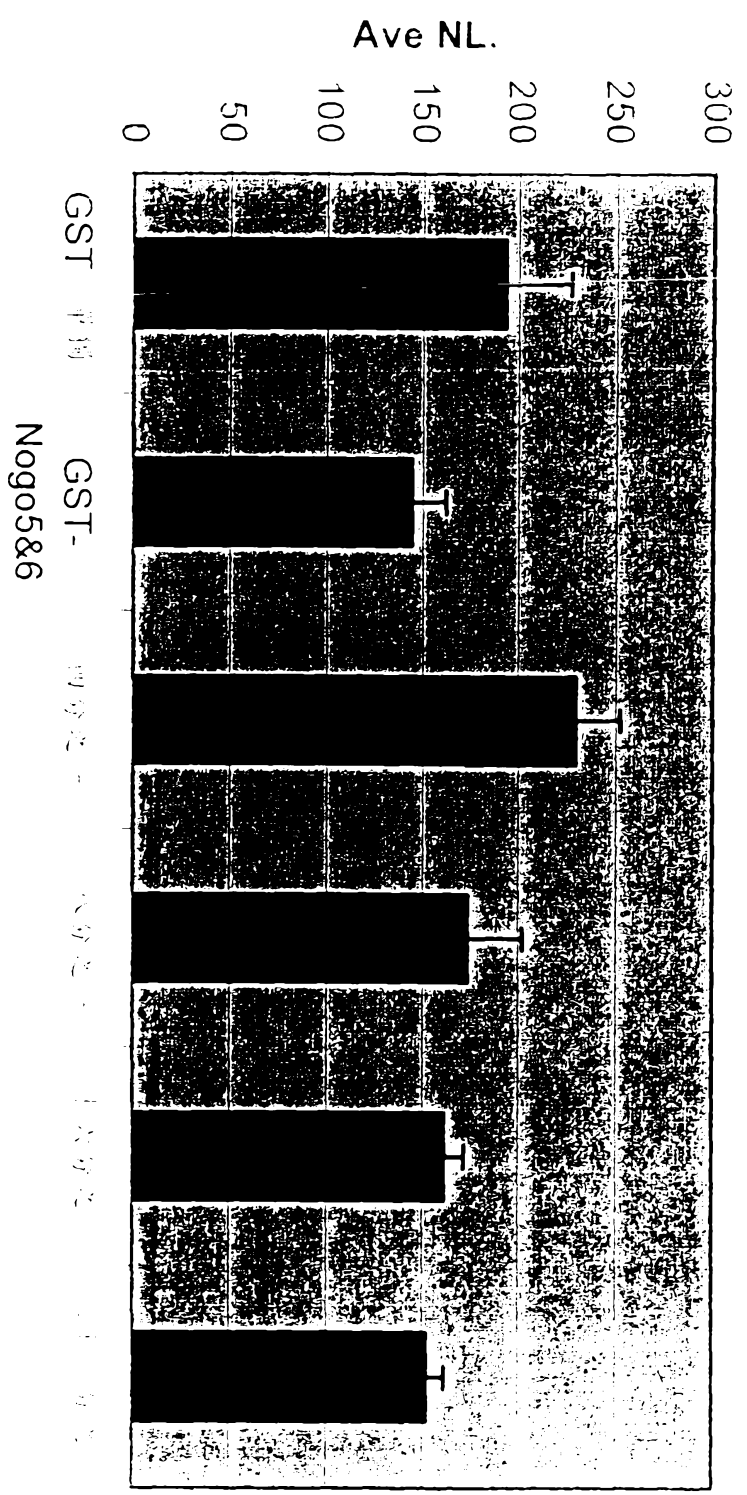


圖 2

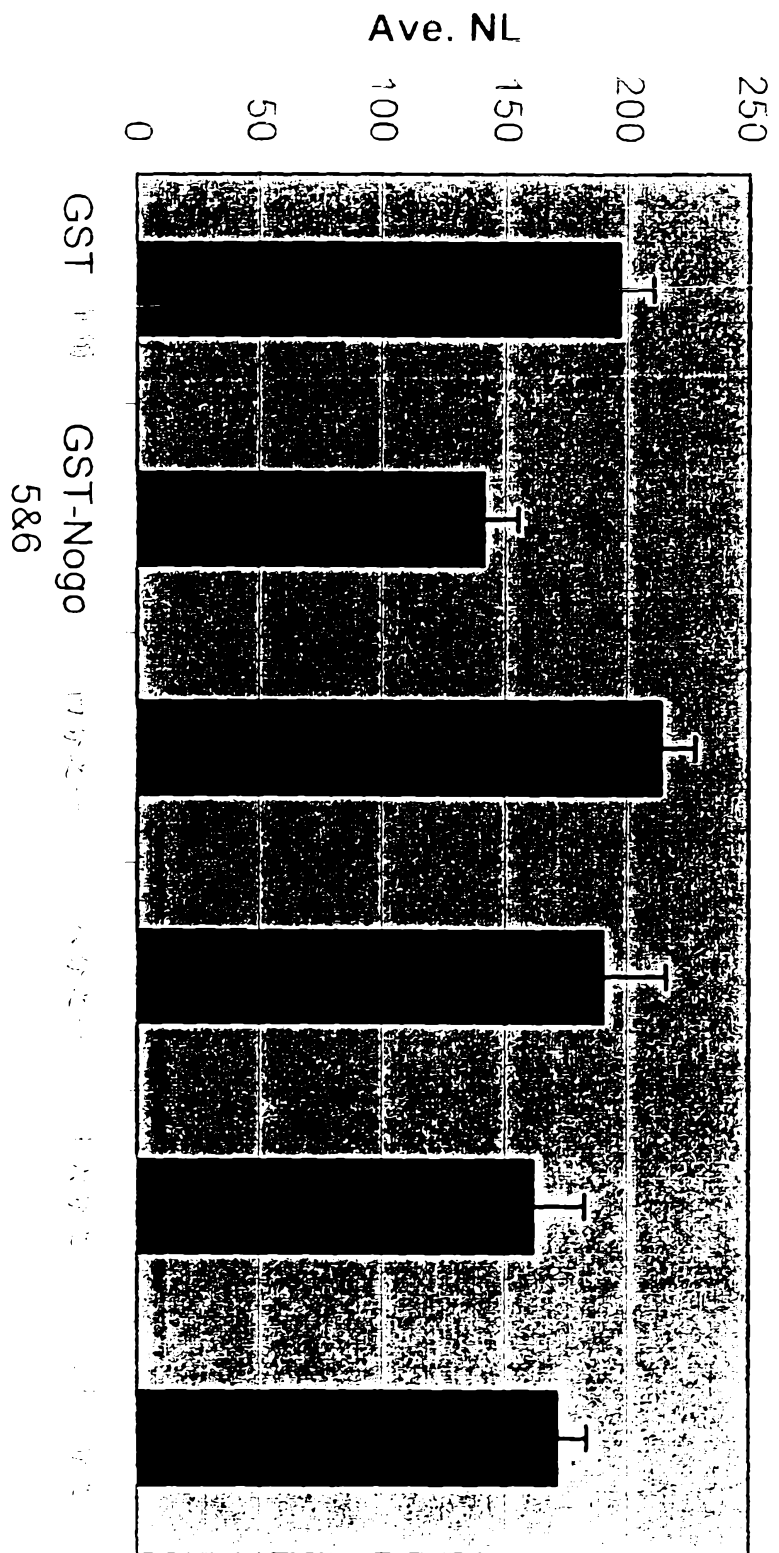


Fig 3

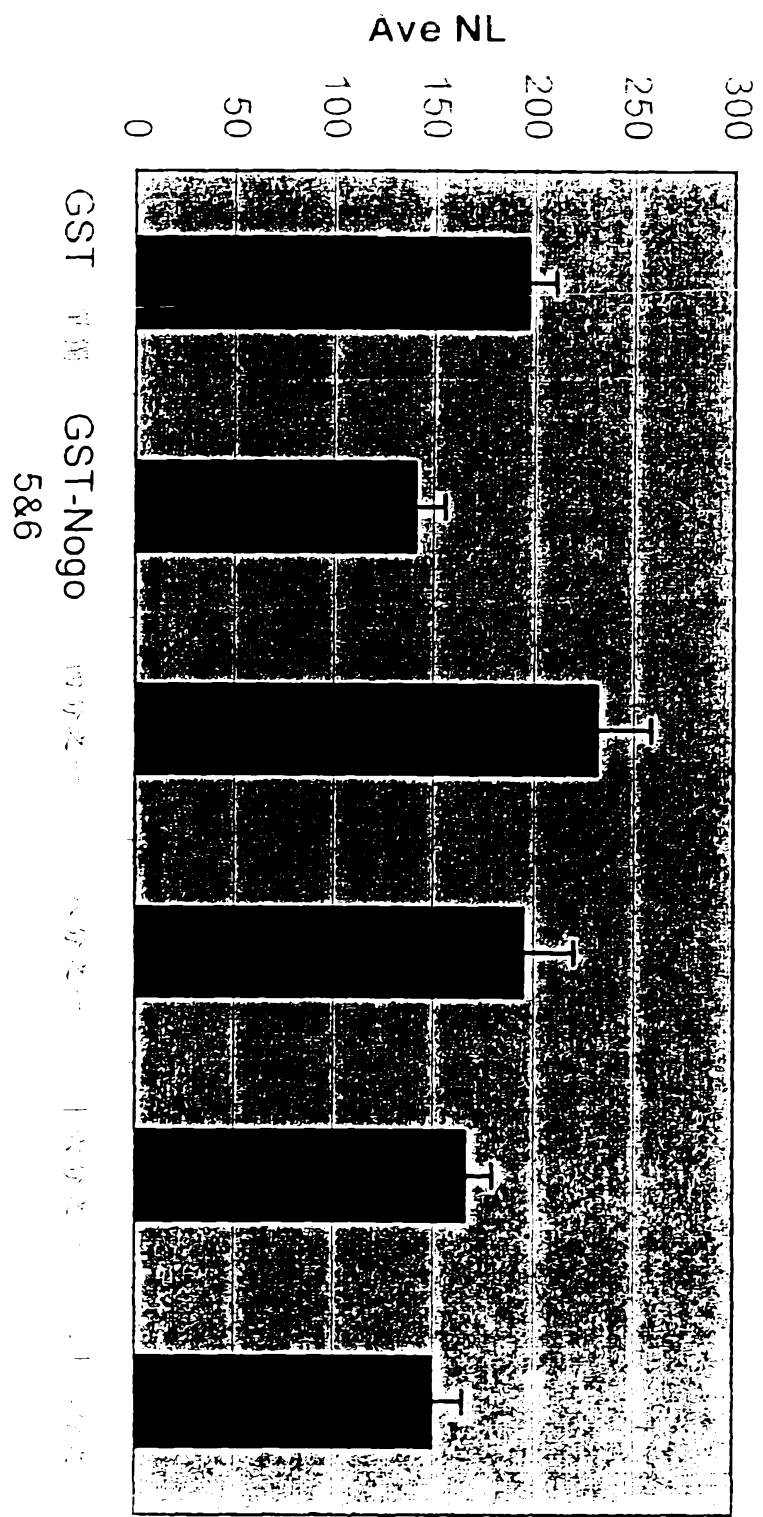


图 4

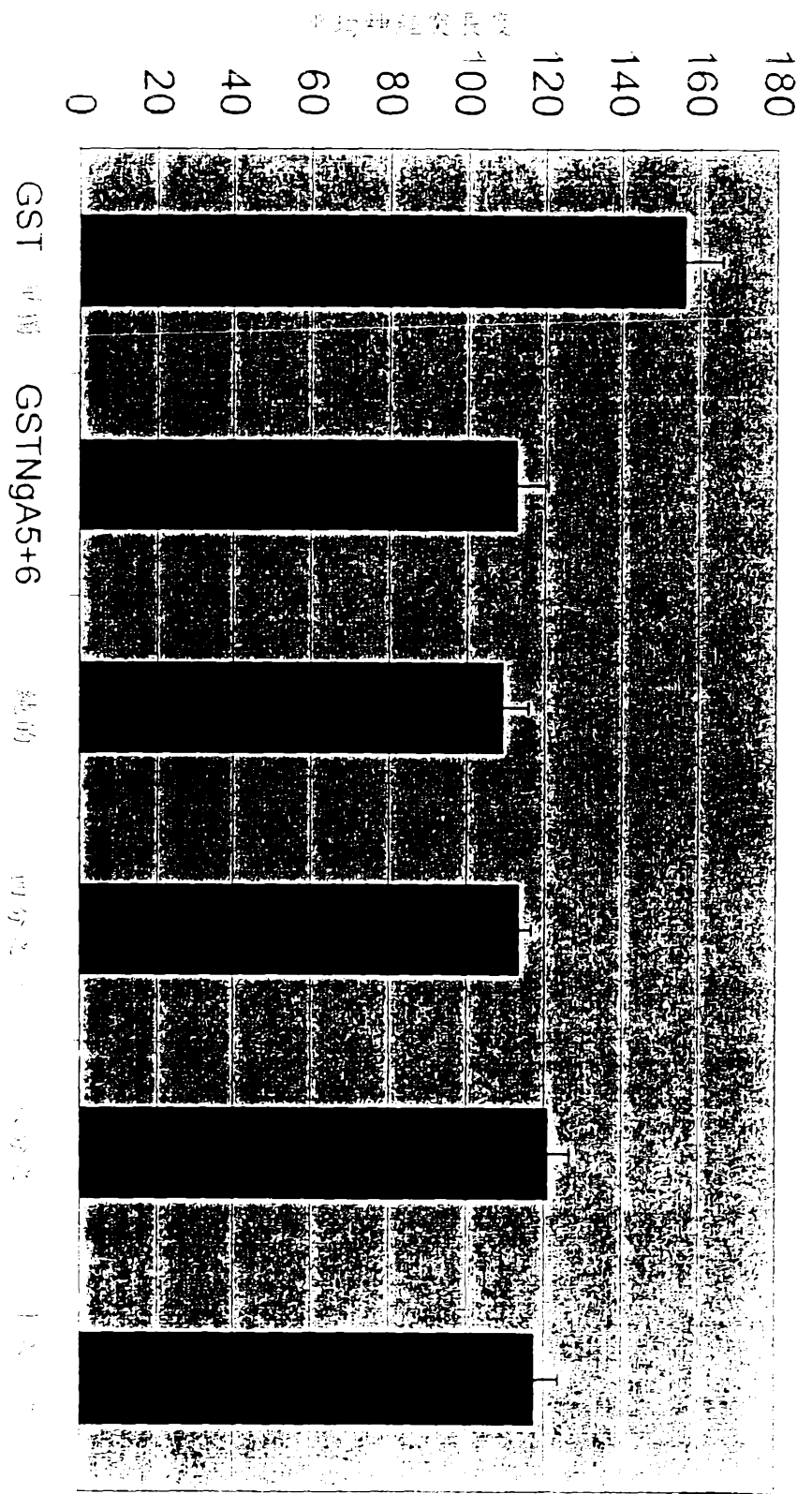


圖 5

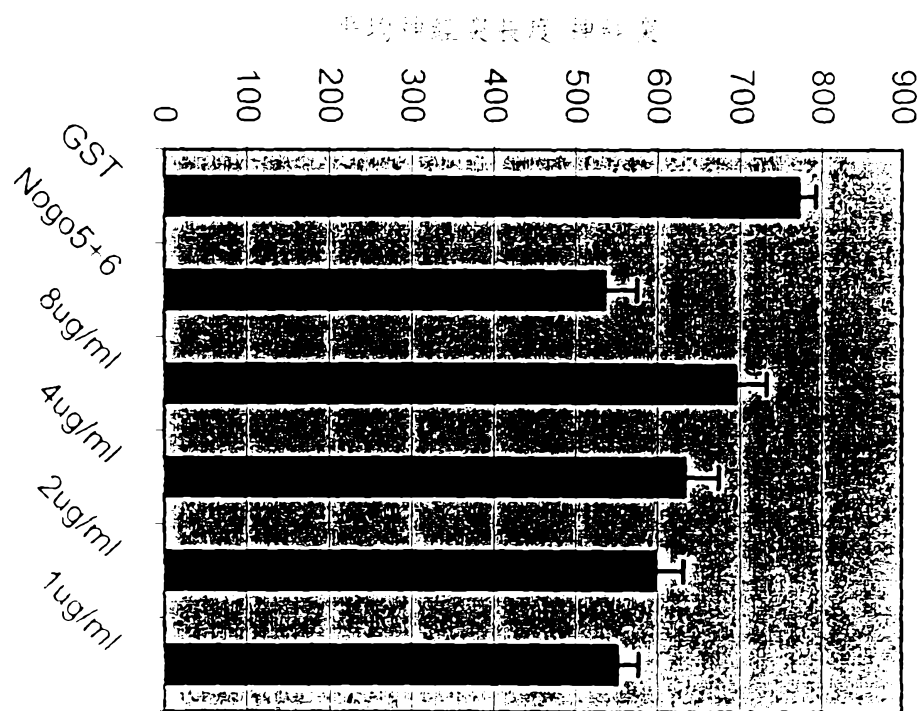


圖 6

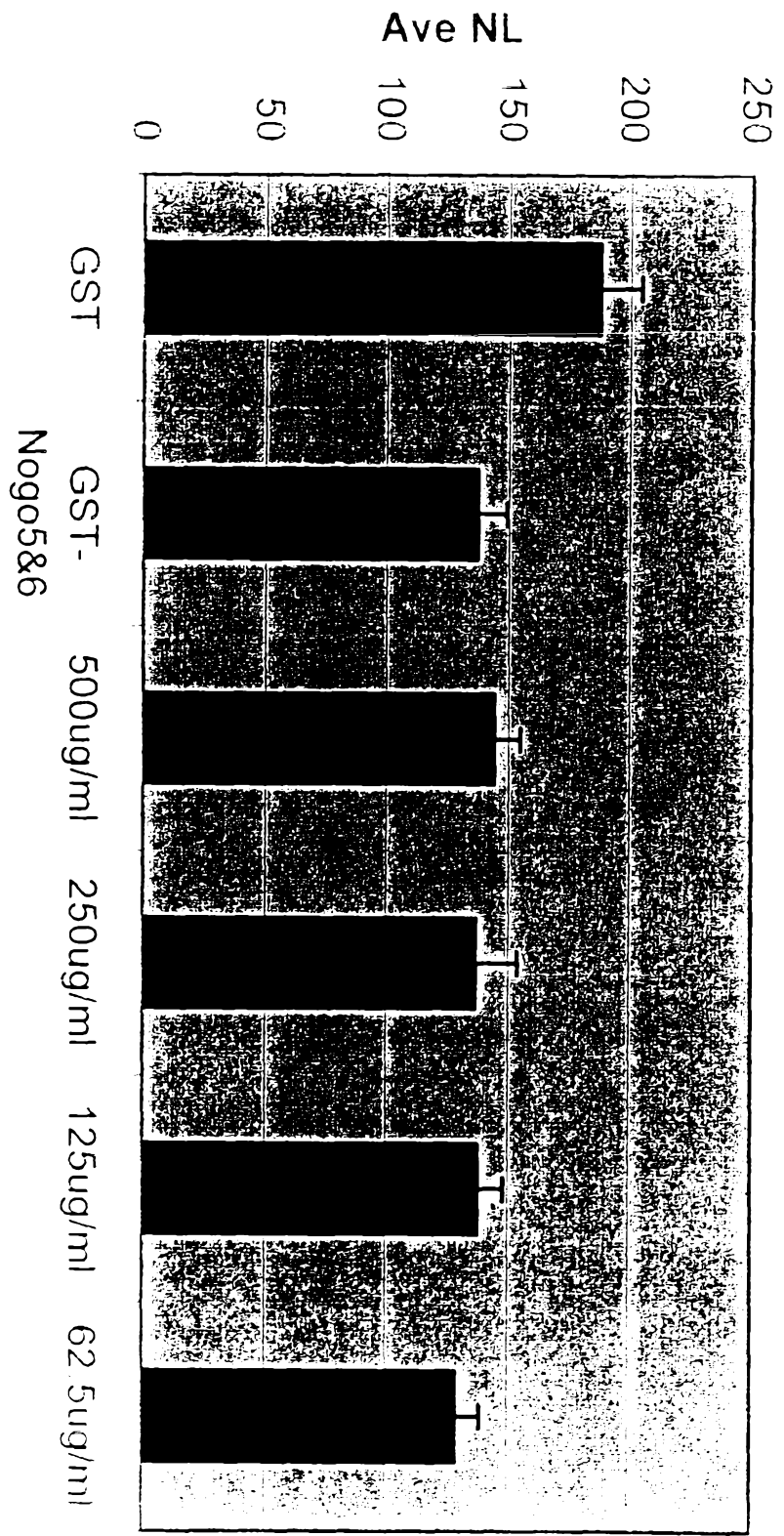


图 7

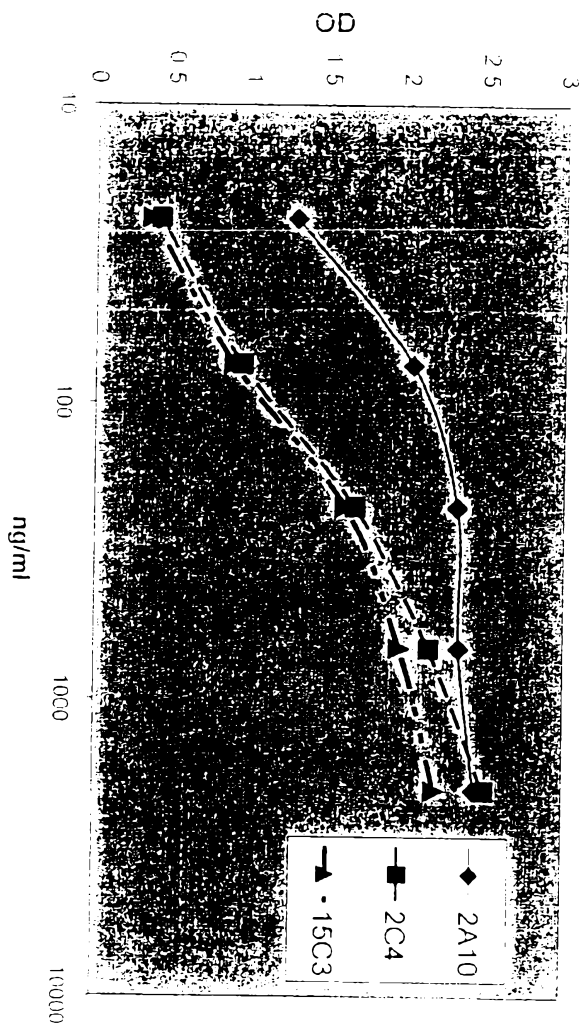


图 8

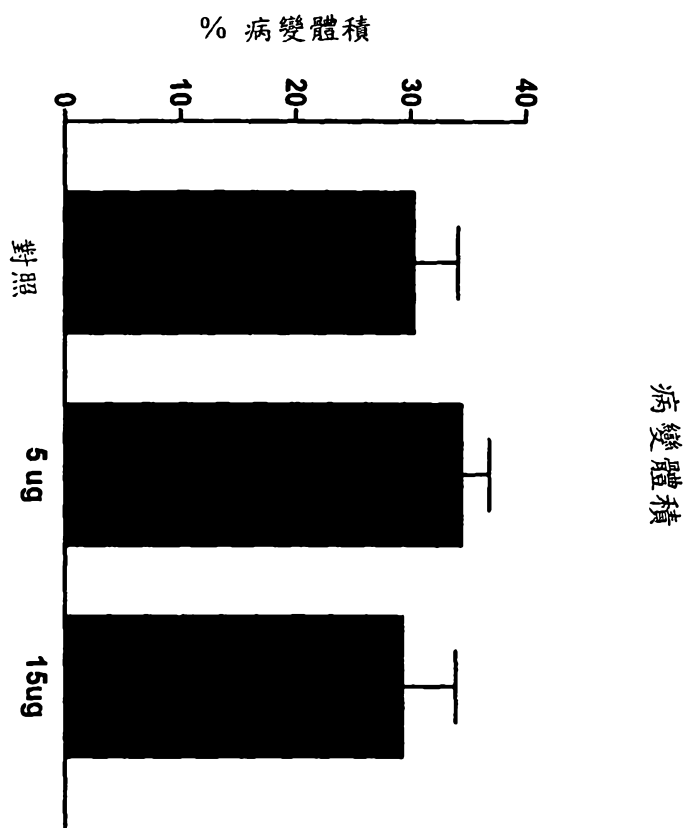


圖 9

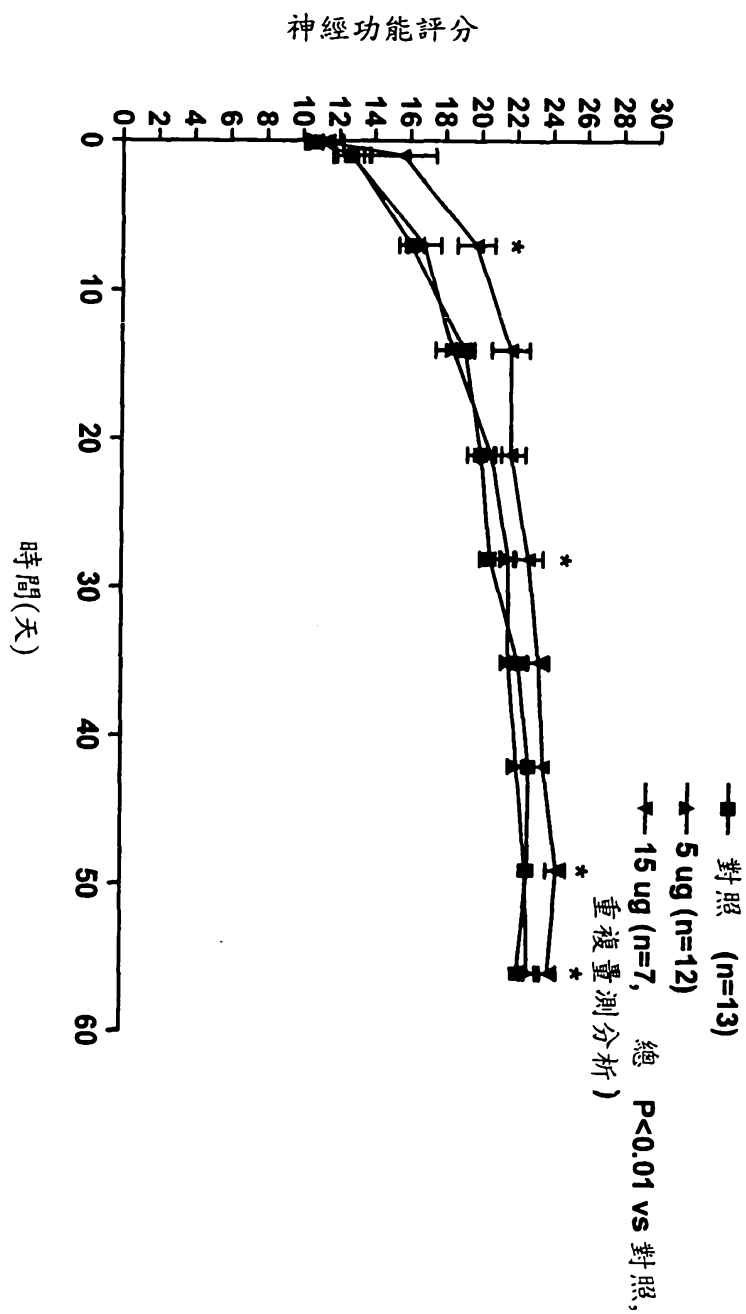


圖 10

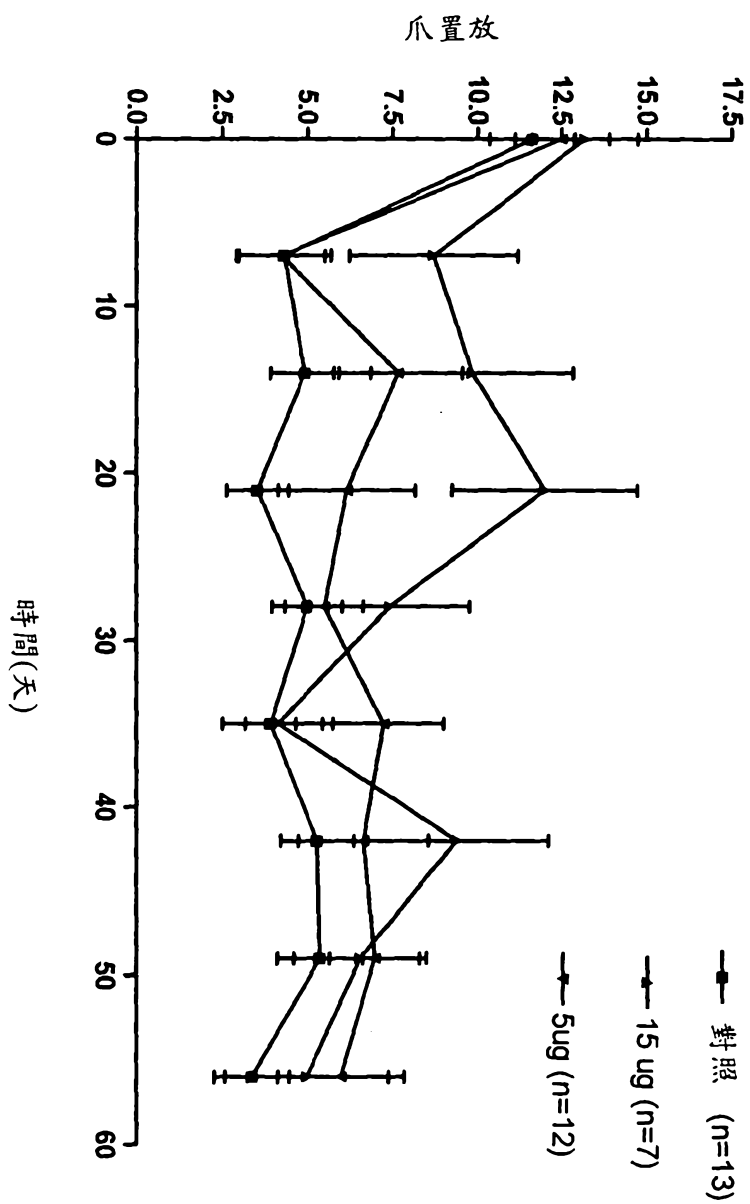


圖 11A

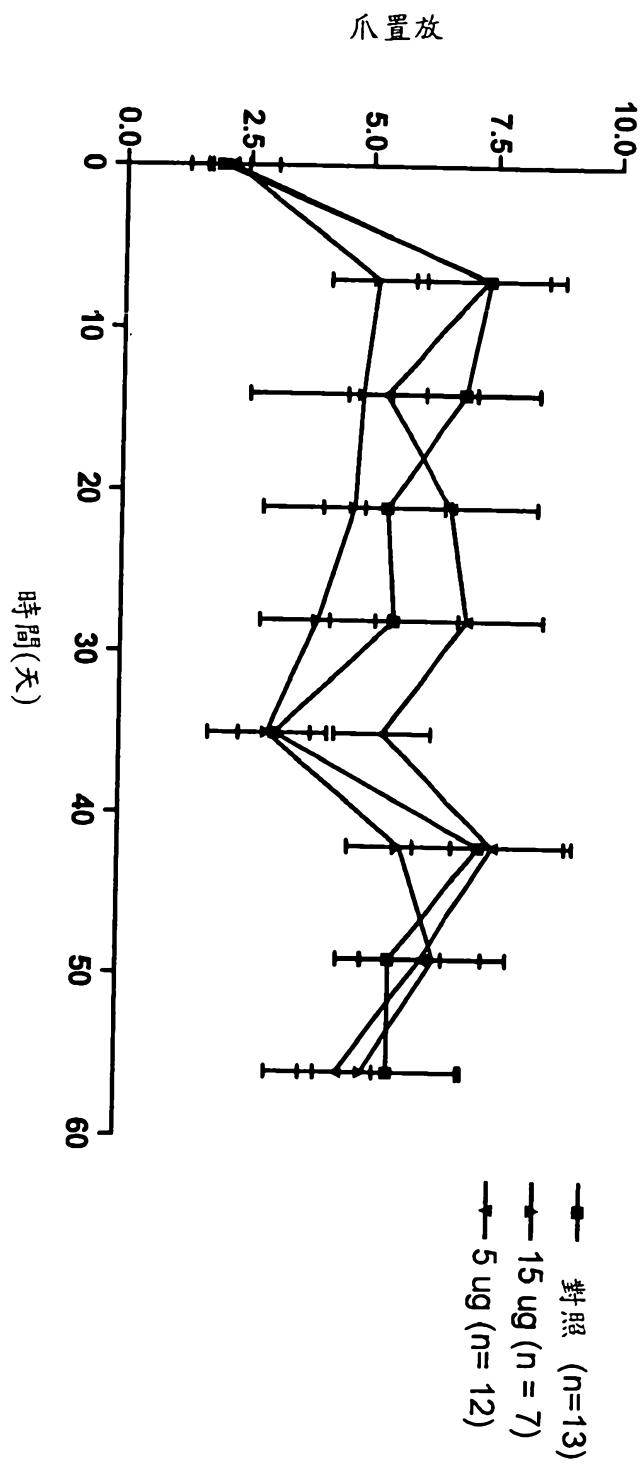


圖 11B

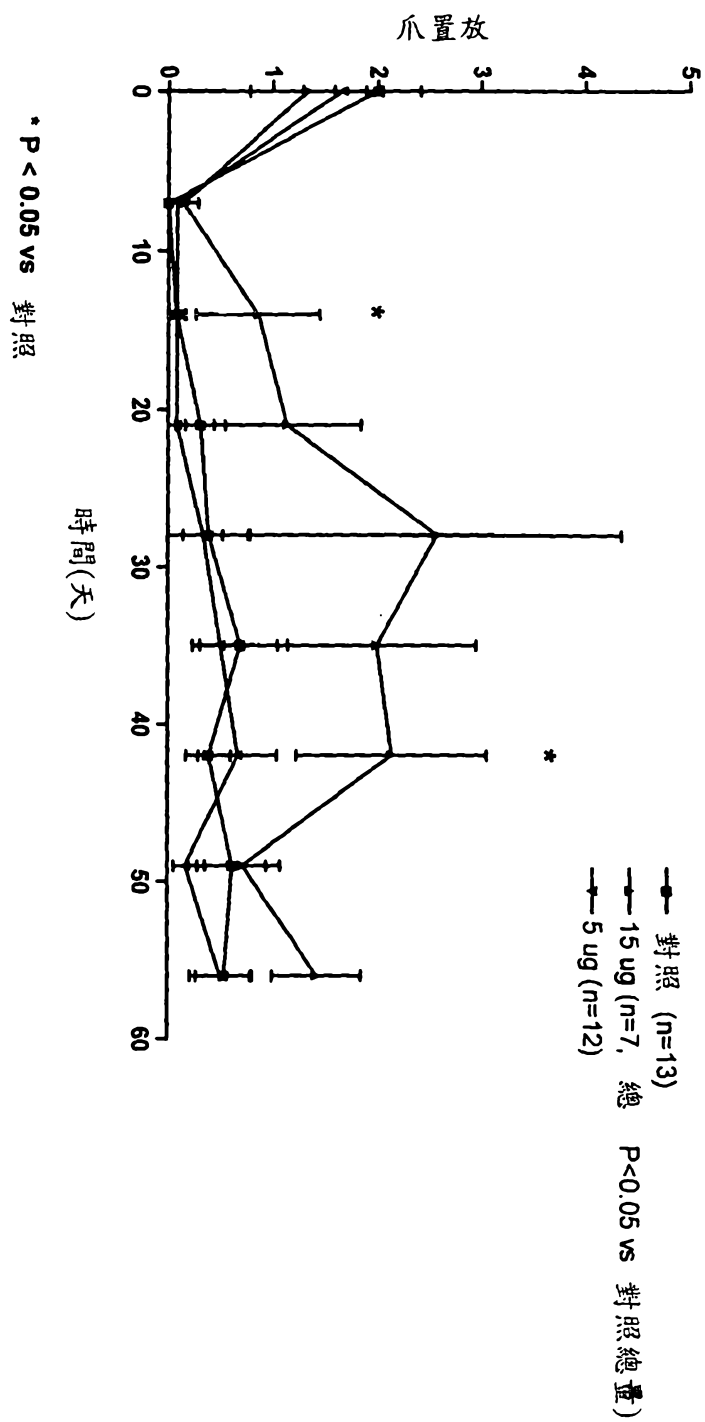


圖 11C

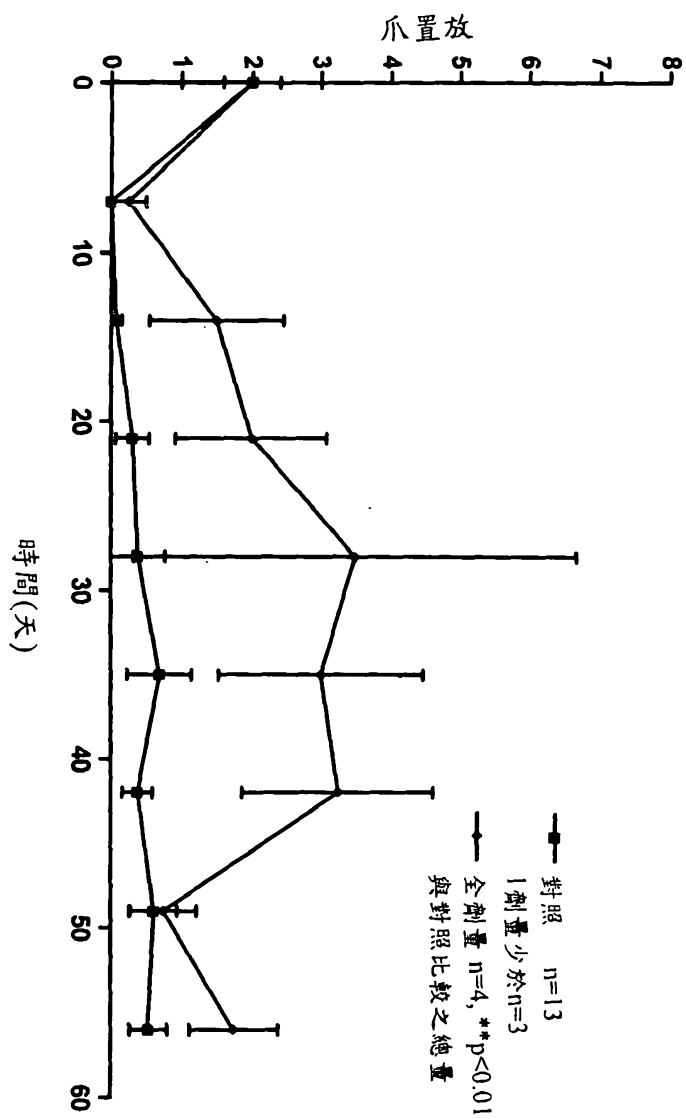


圖 11D

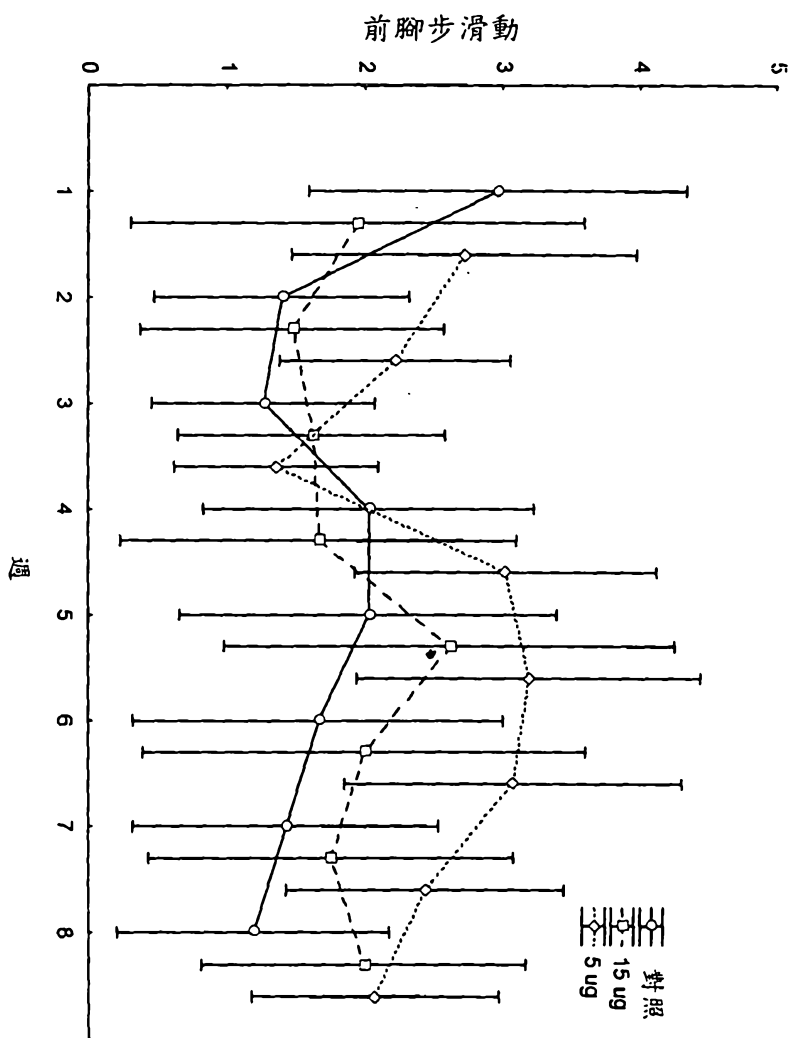


圖12

後腳步滑動

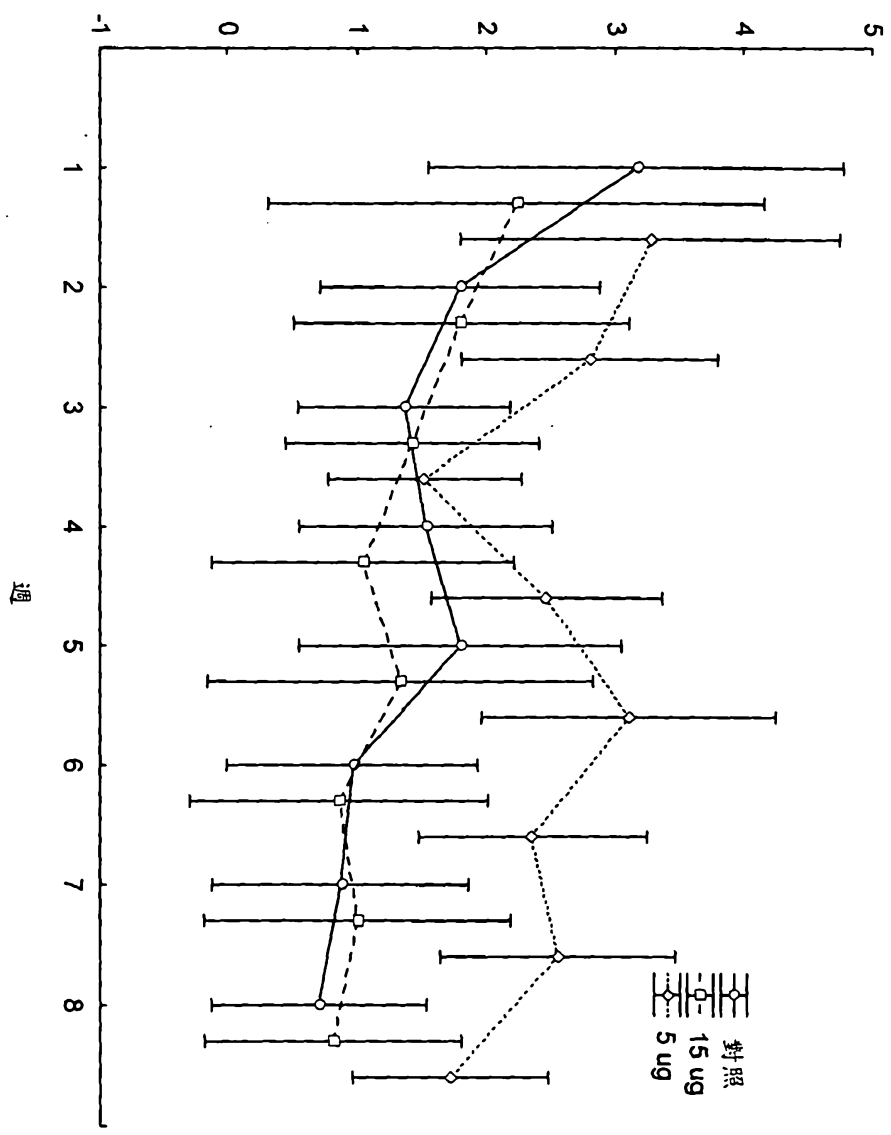


圖 13

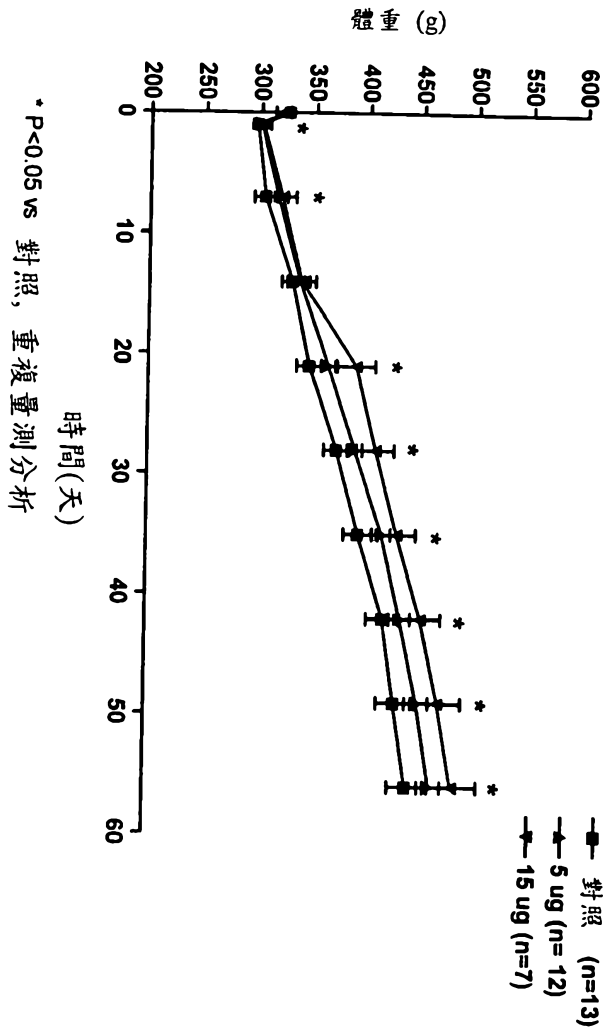


圖 14A

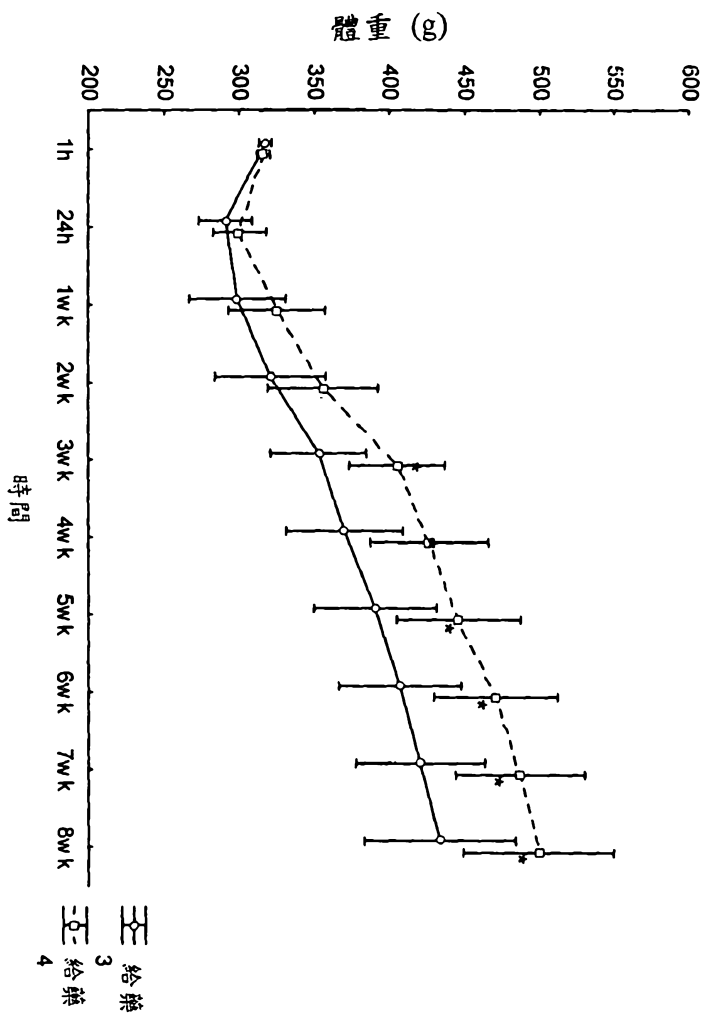


圖 14B

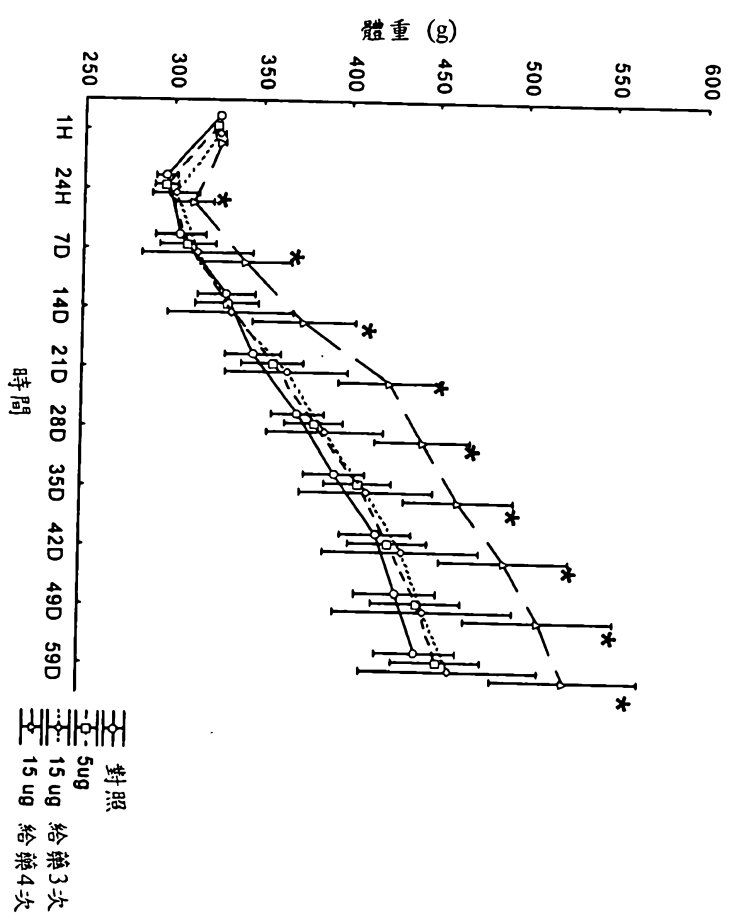


圖 14C

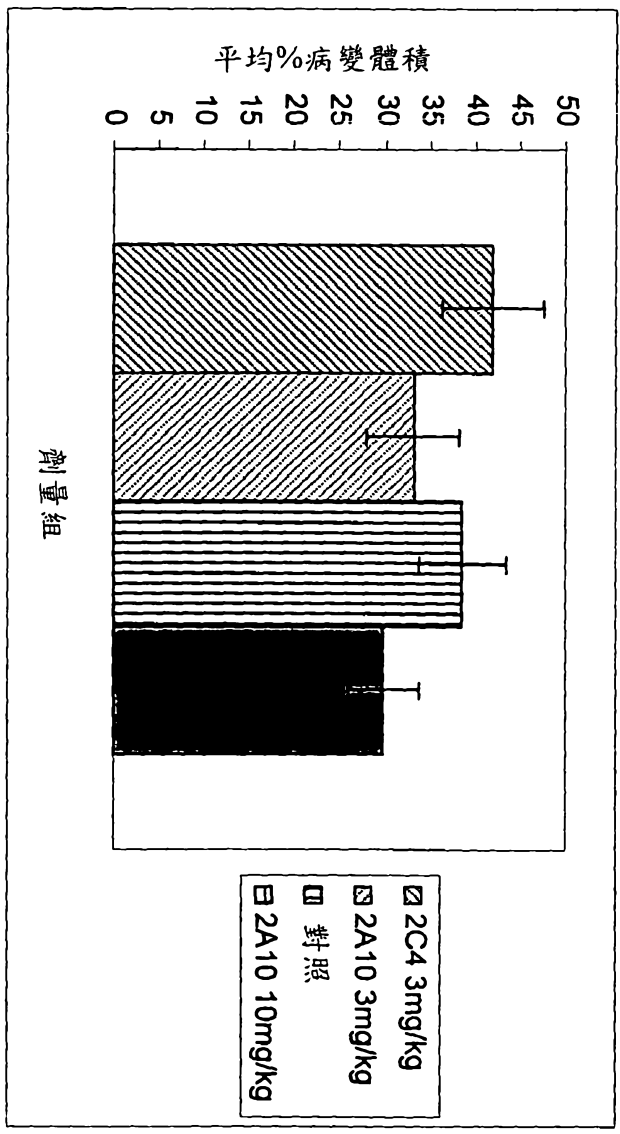


圖 15

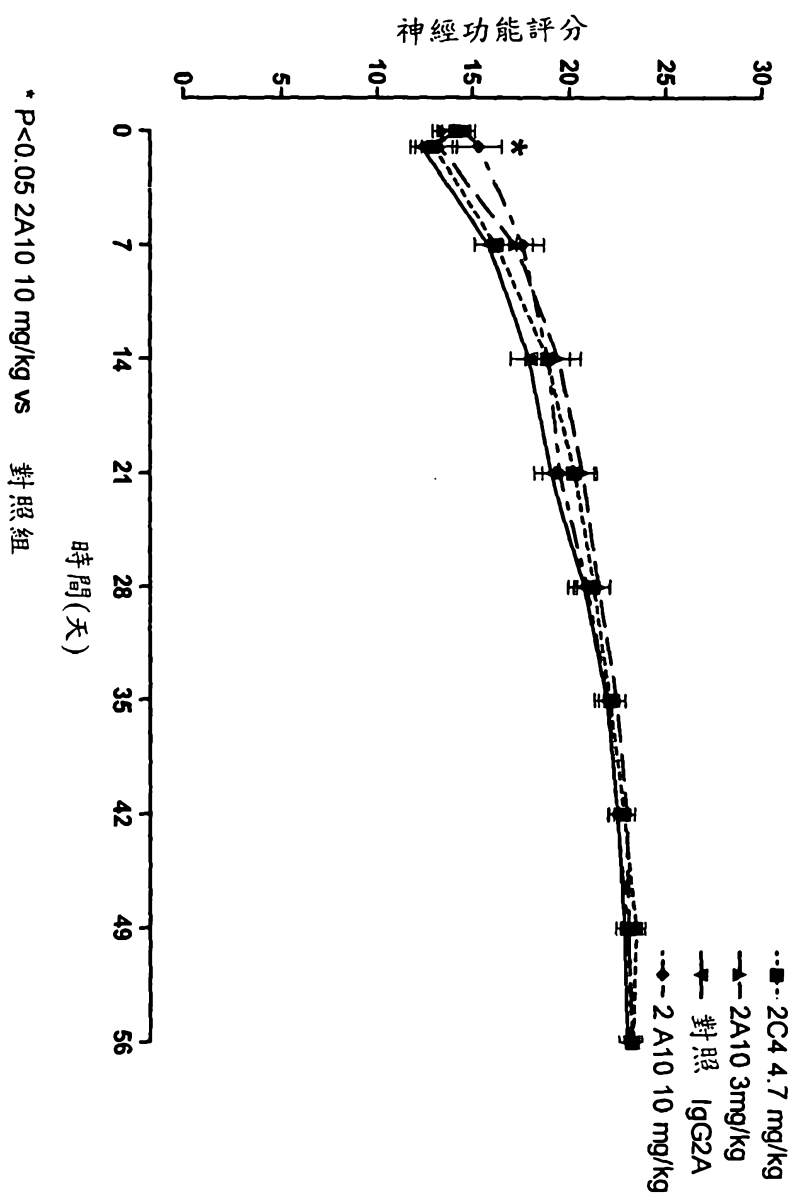


圖 16

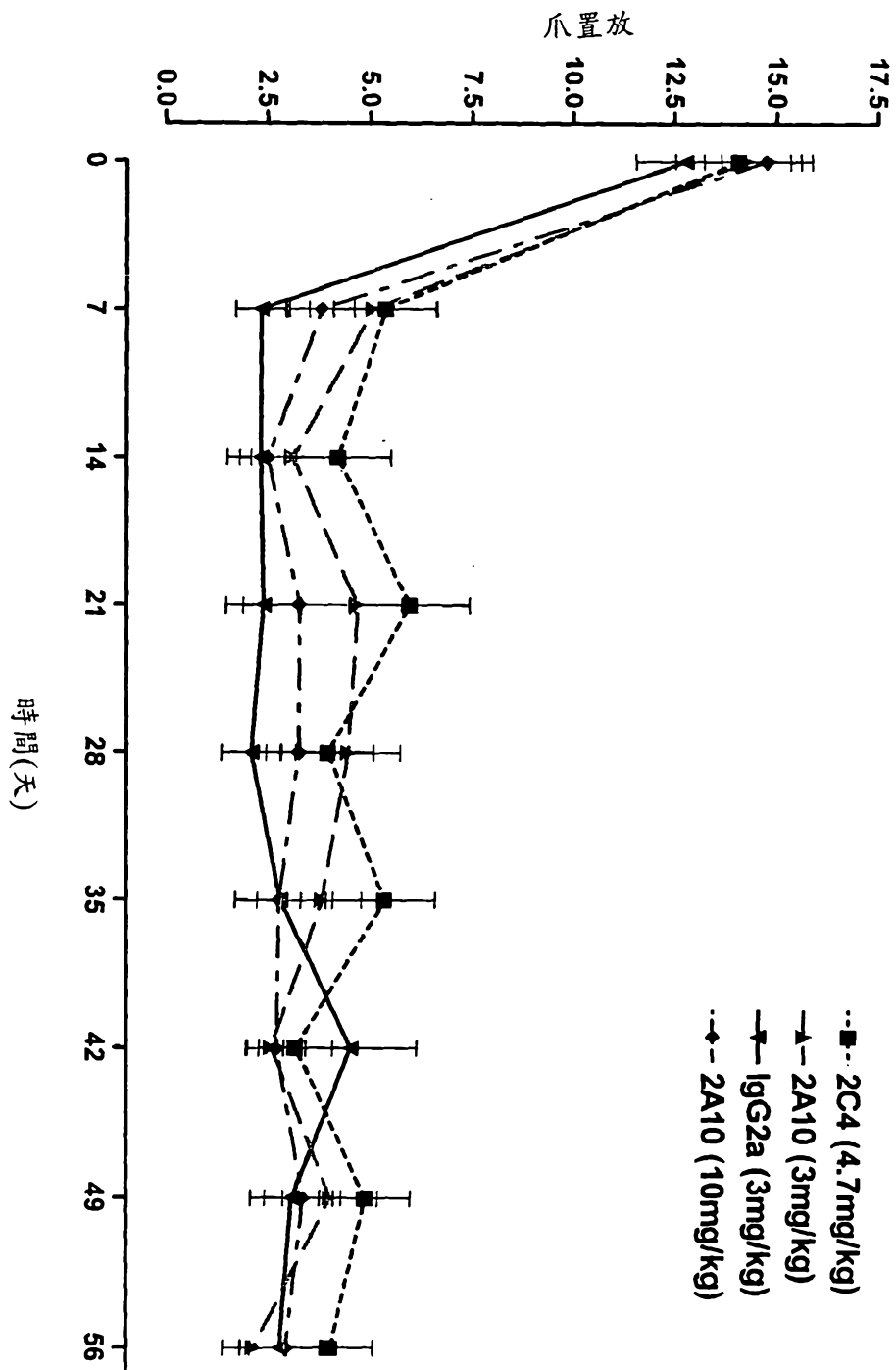


圖 17A

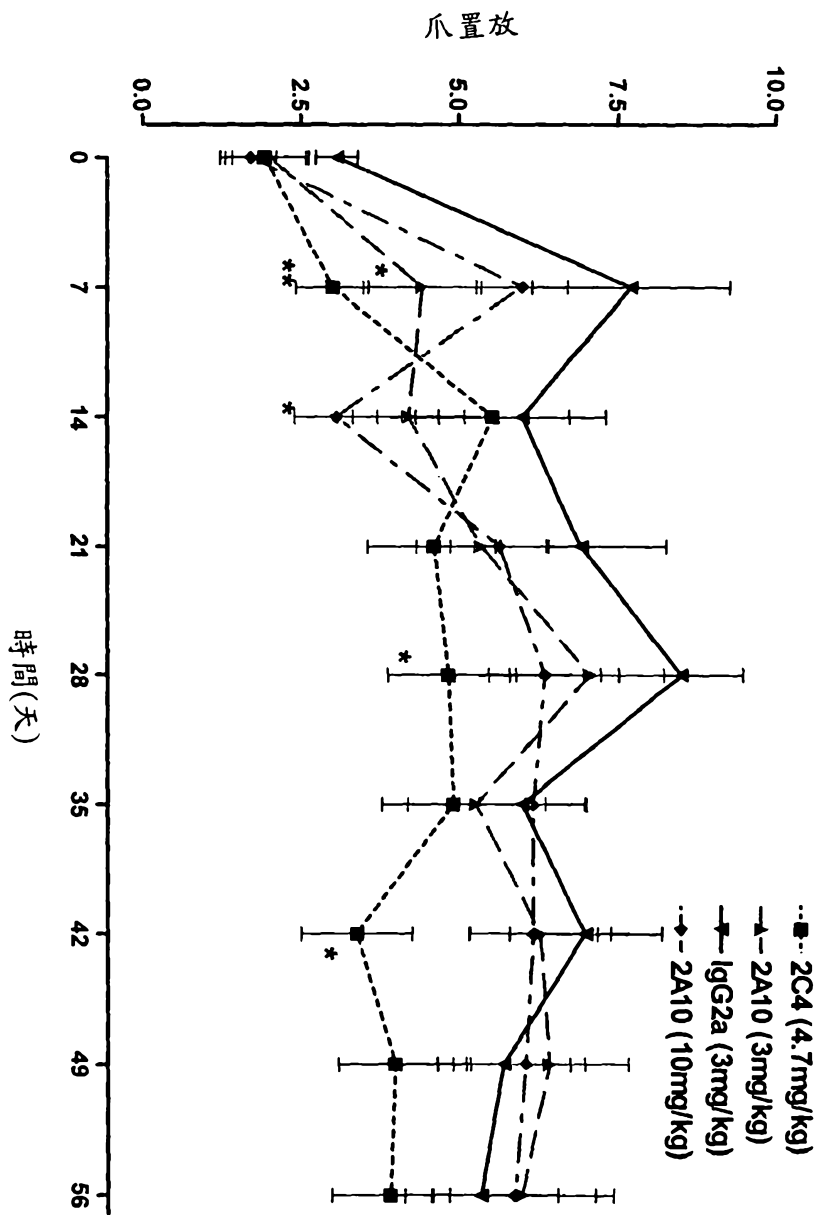


圖 17B

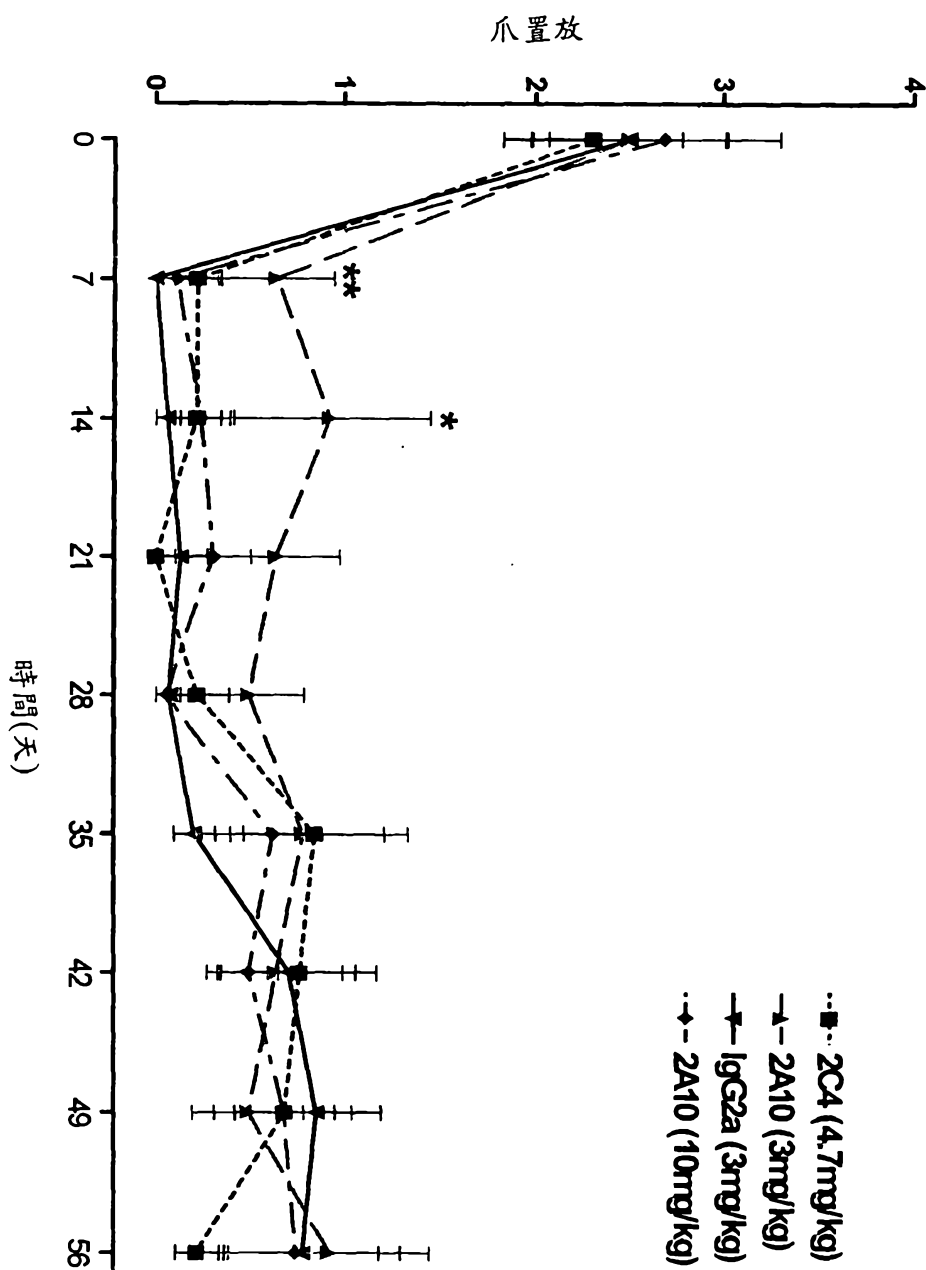
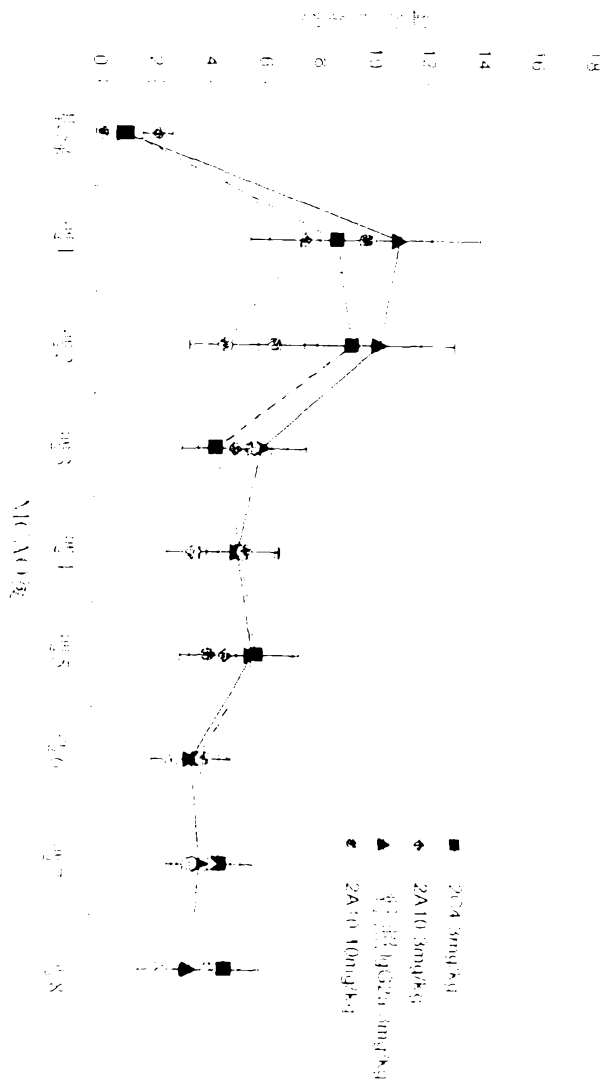


圖 17C

圖 18



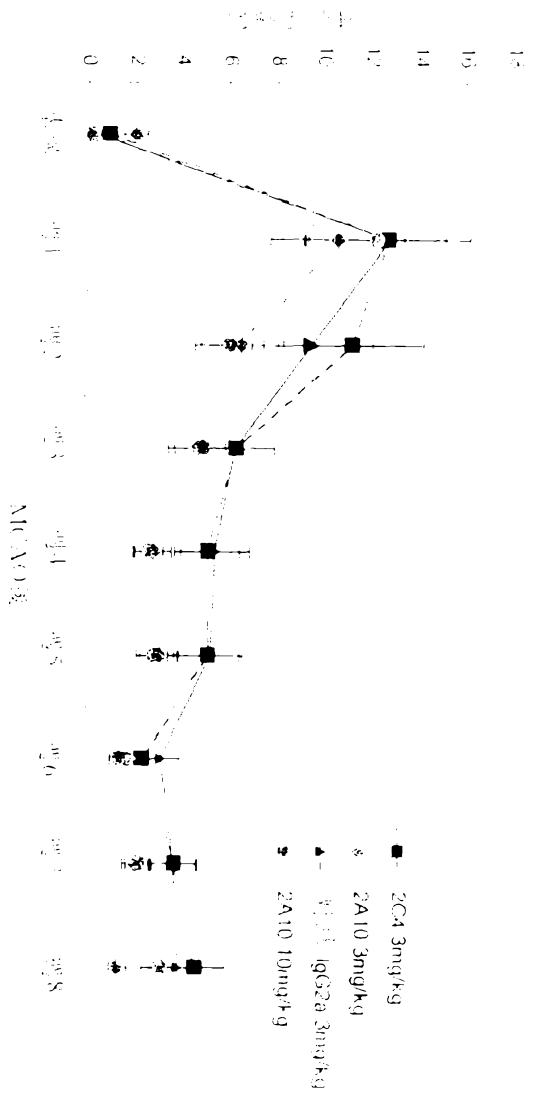


圖 19

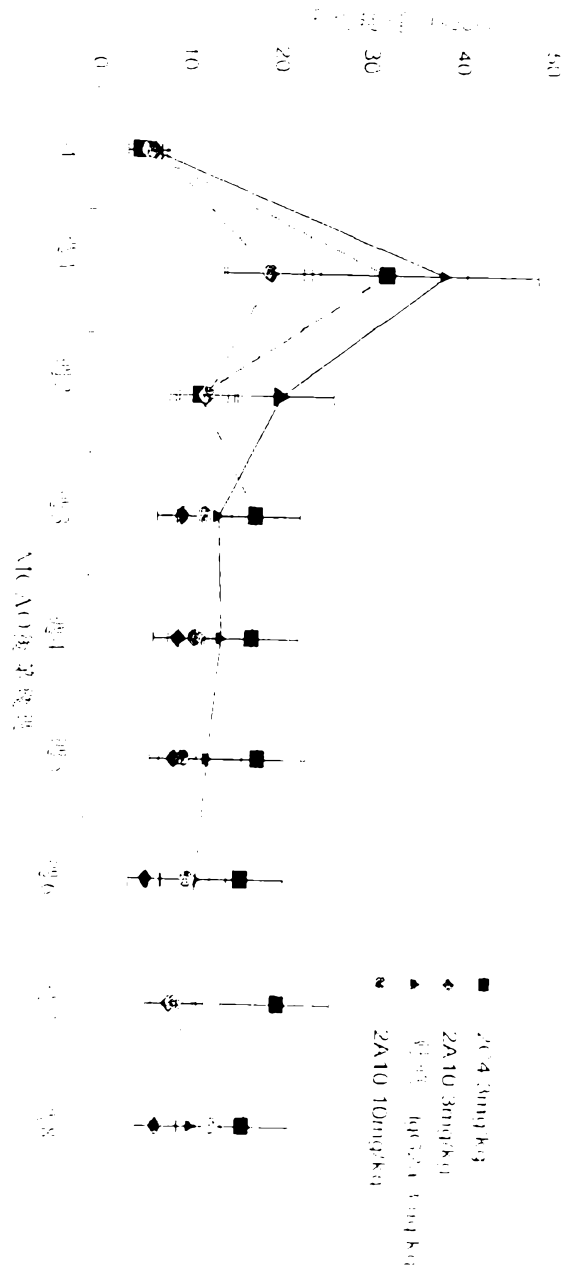


圖 20



图 21

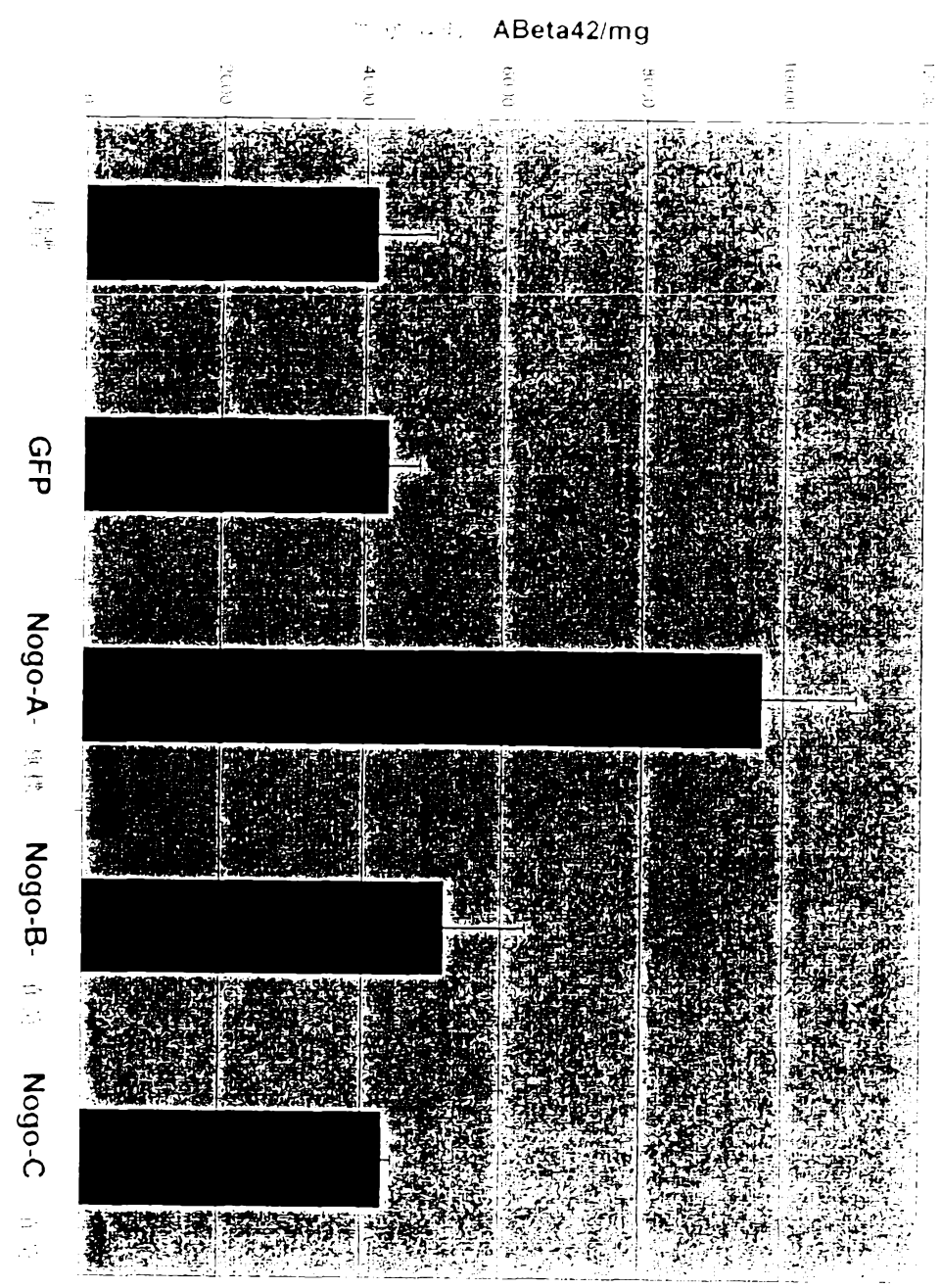




图 23

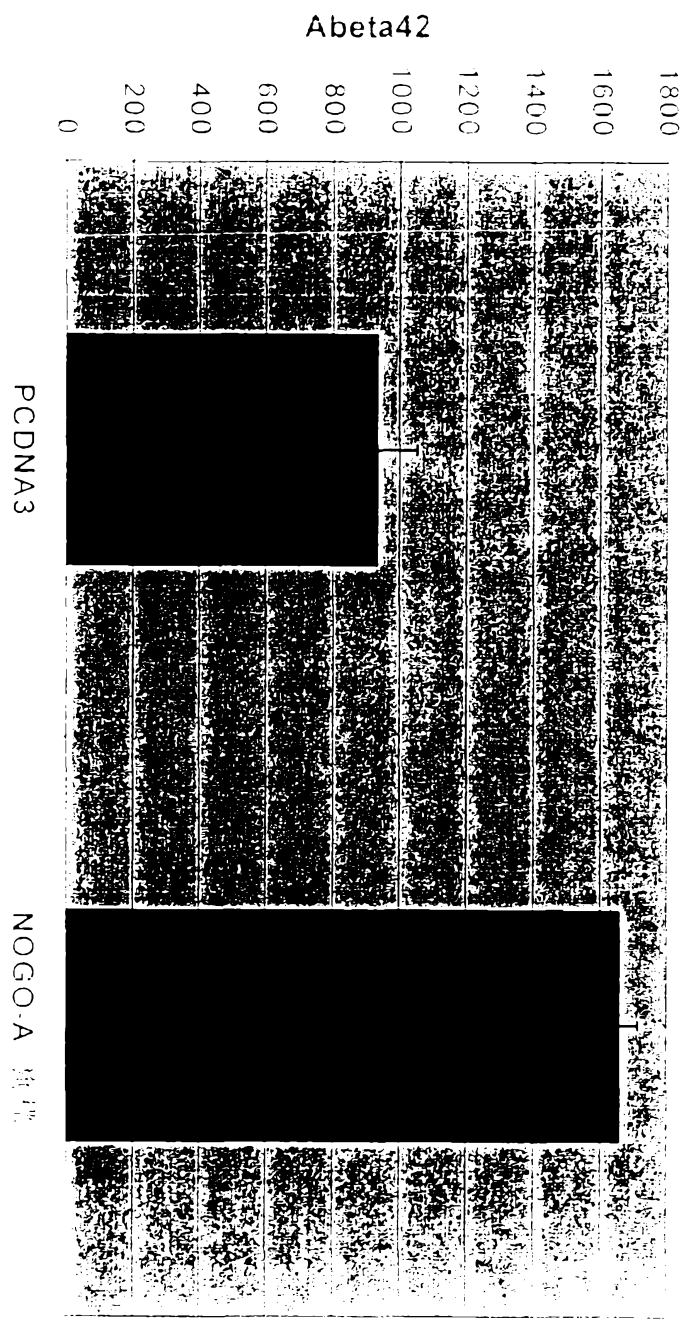


图 24

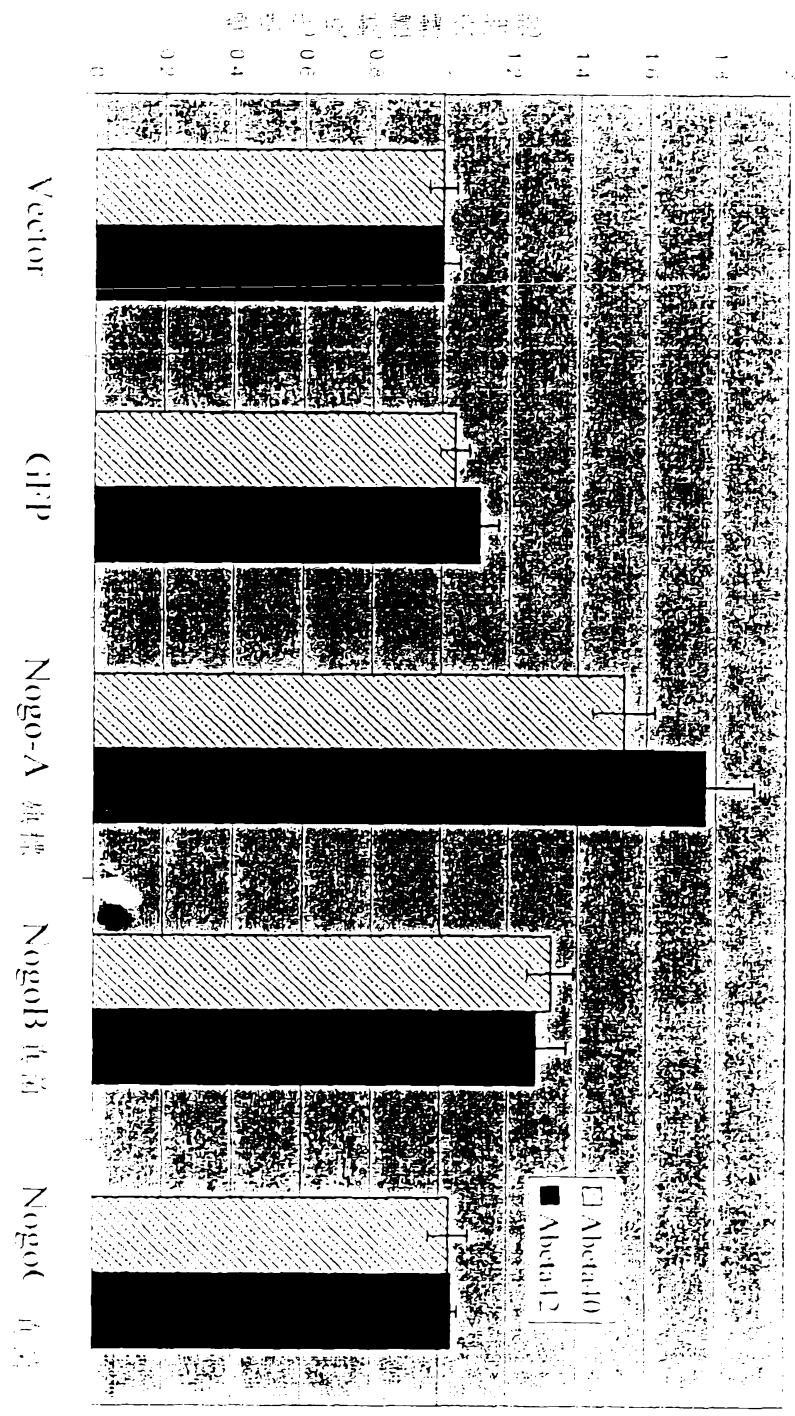


圖 25

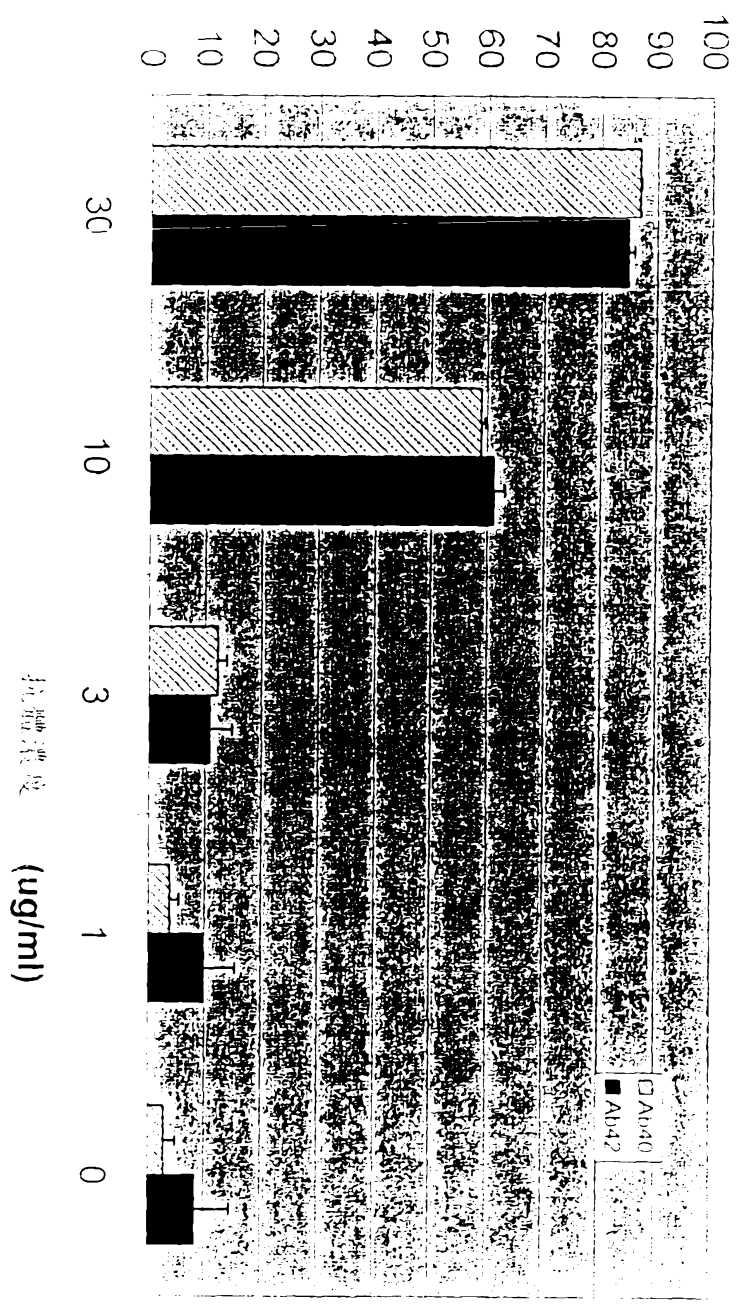


圖 26

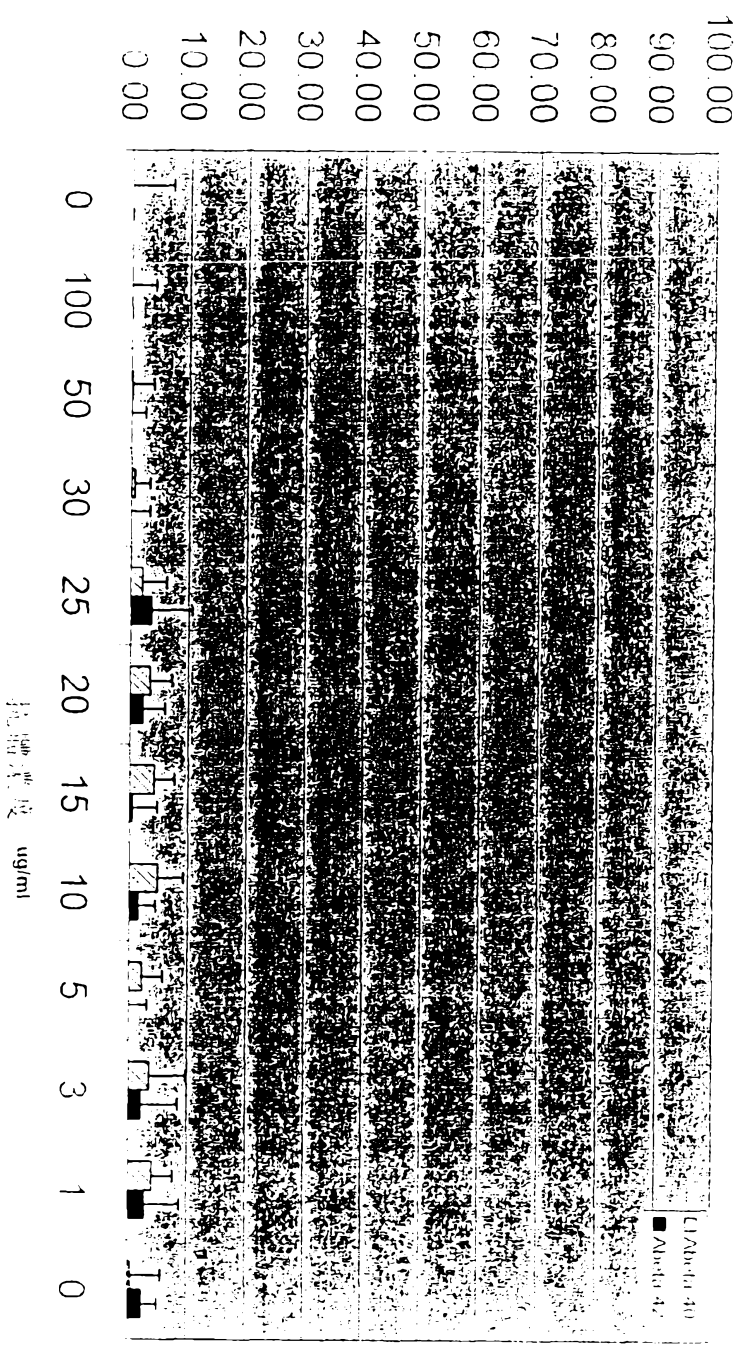


图 27

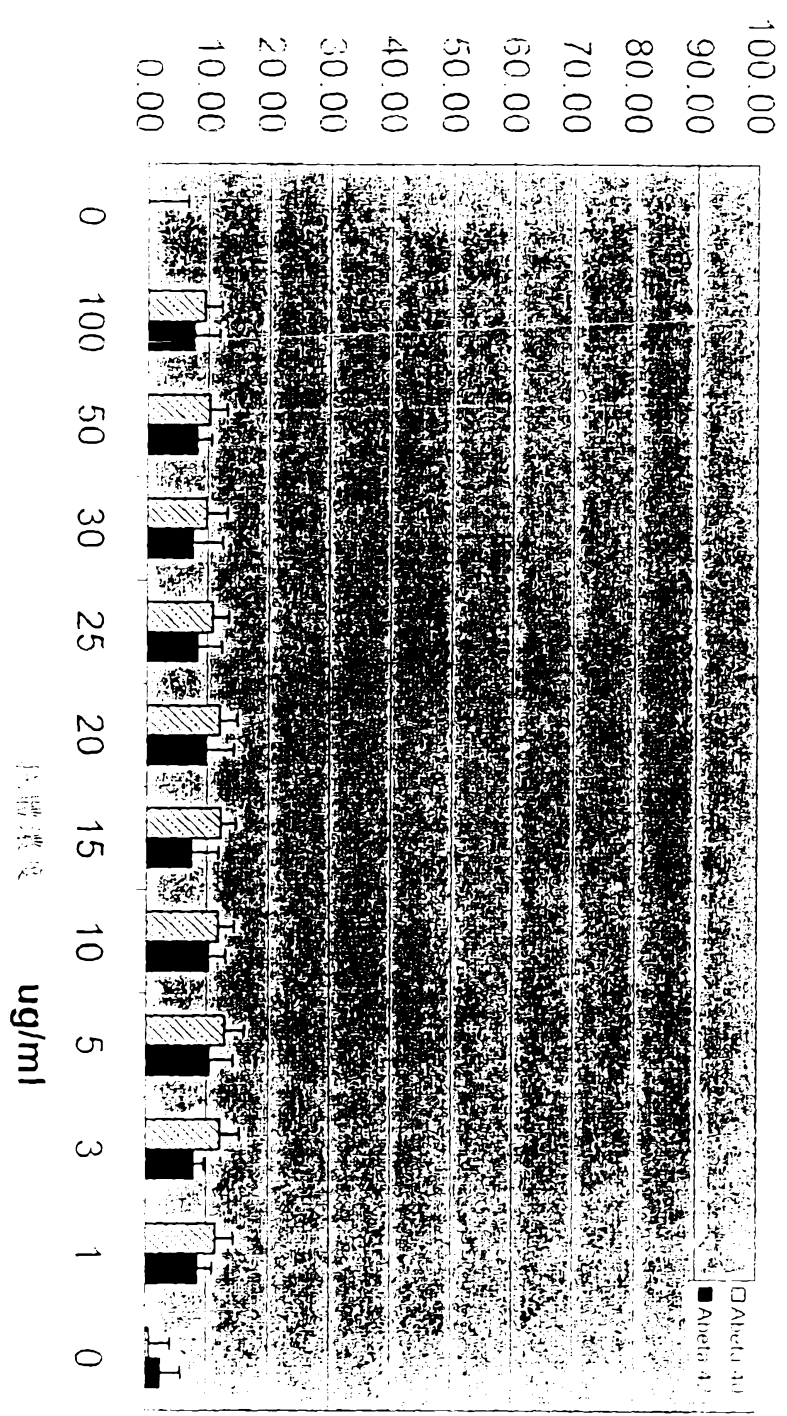


图 28

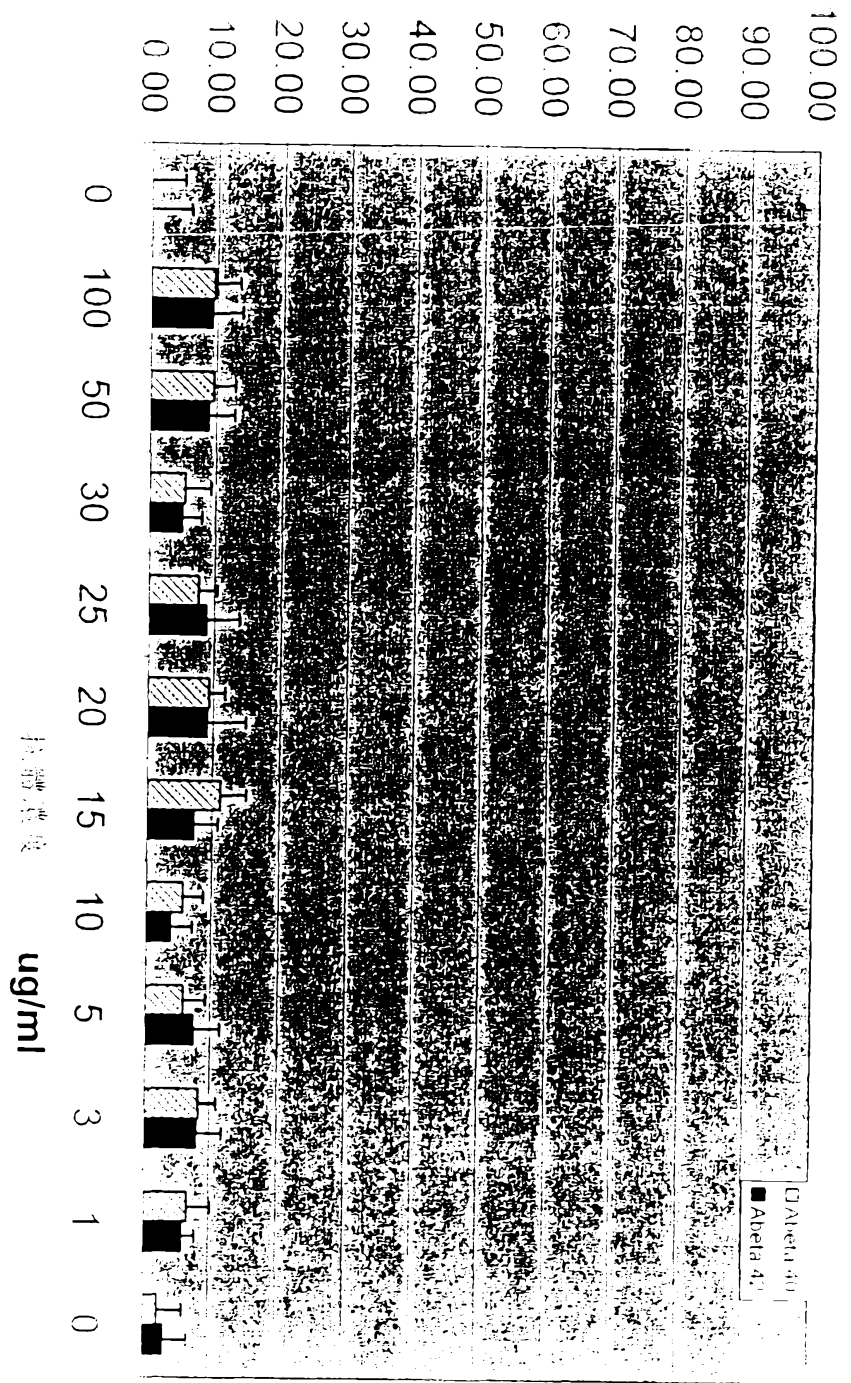


图 29

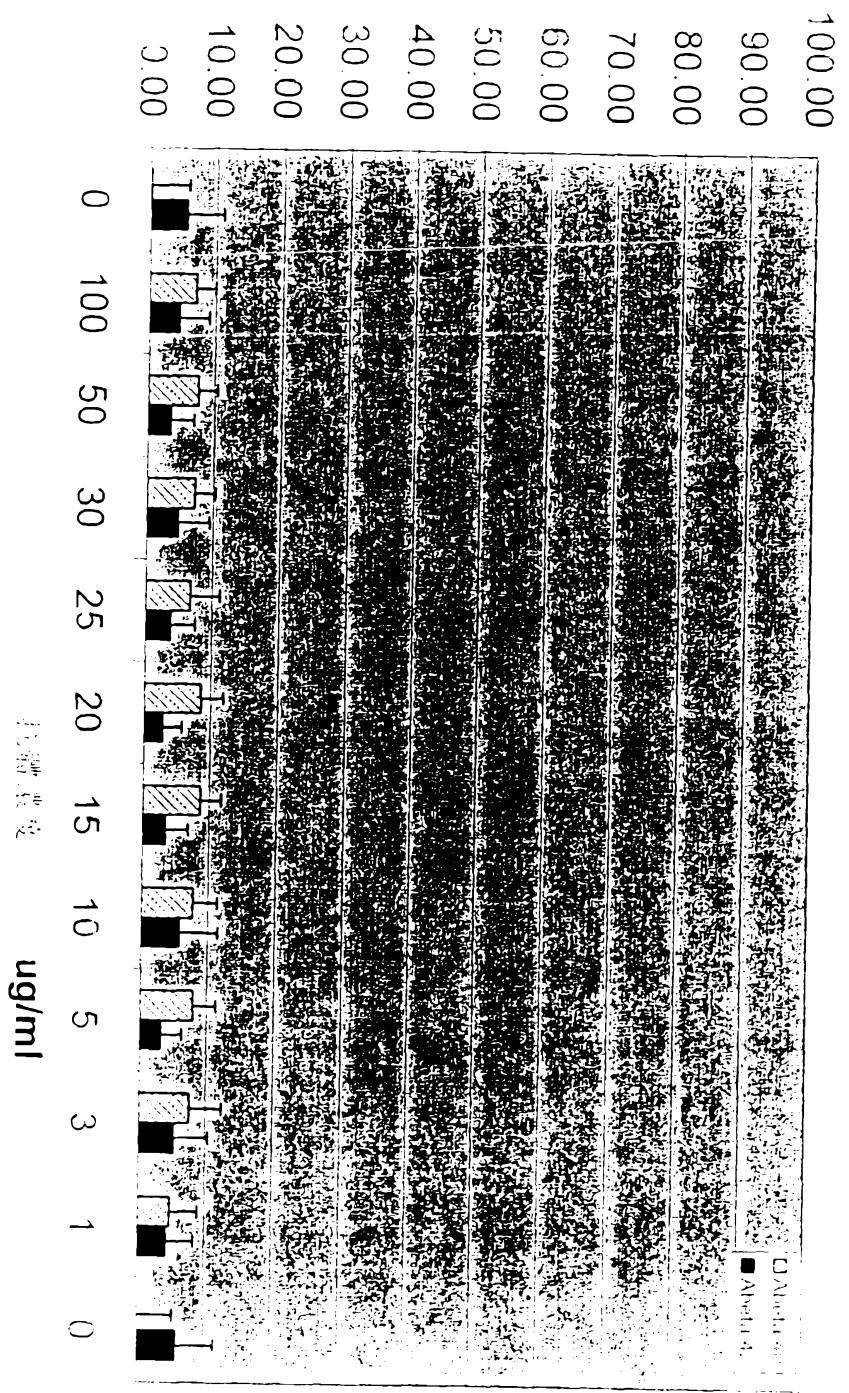


圖 30

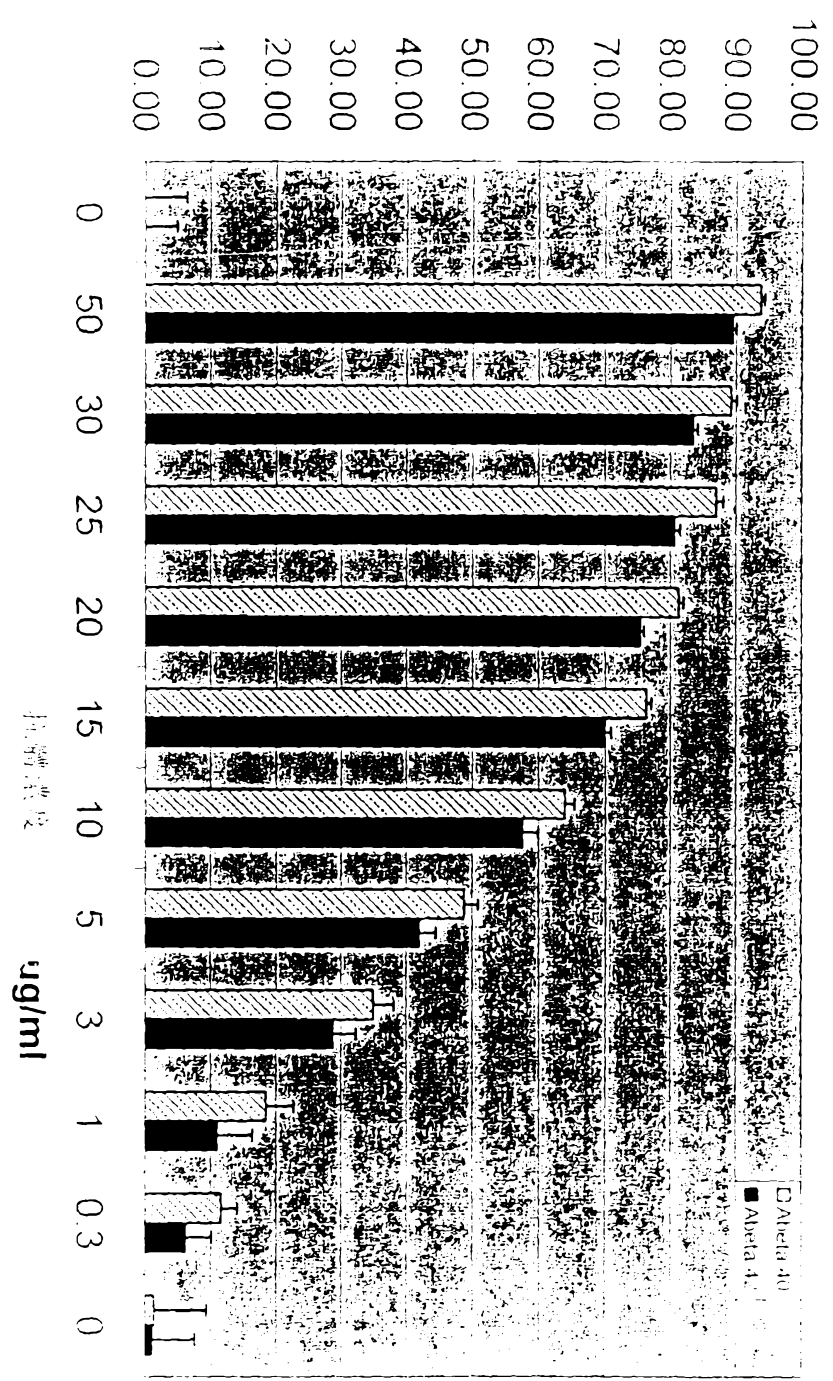


圖 31

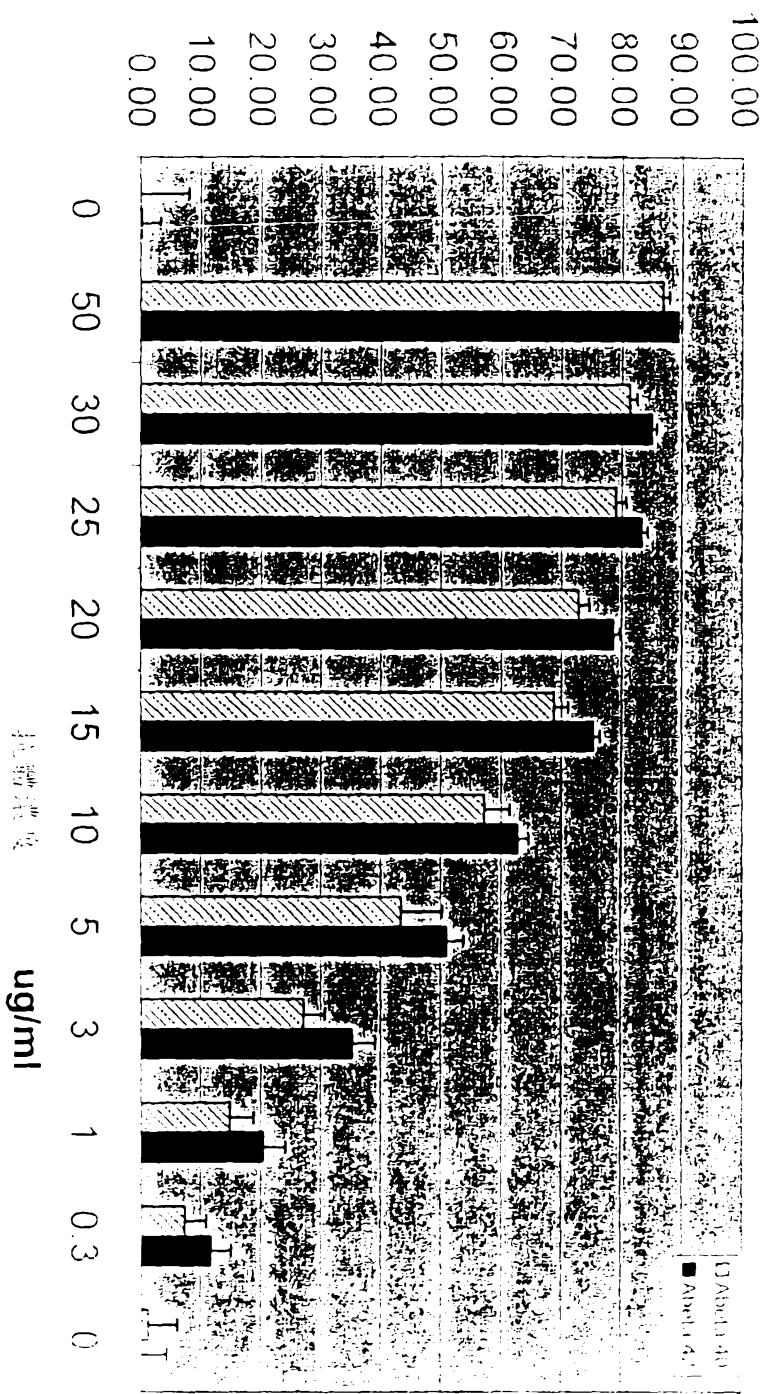


圖 32

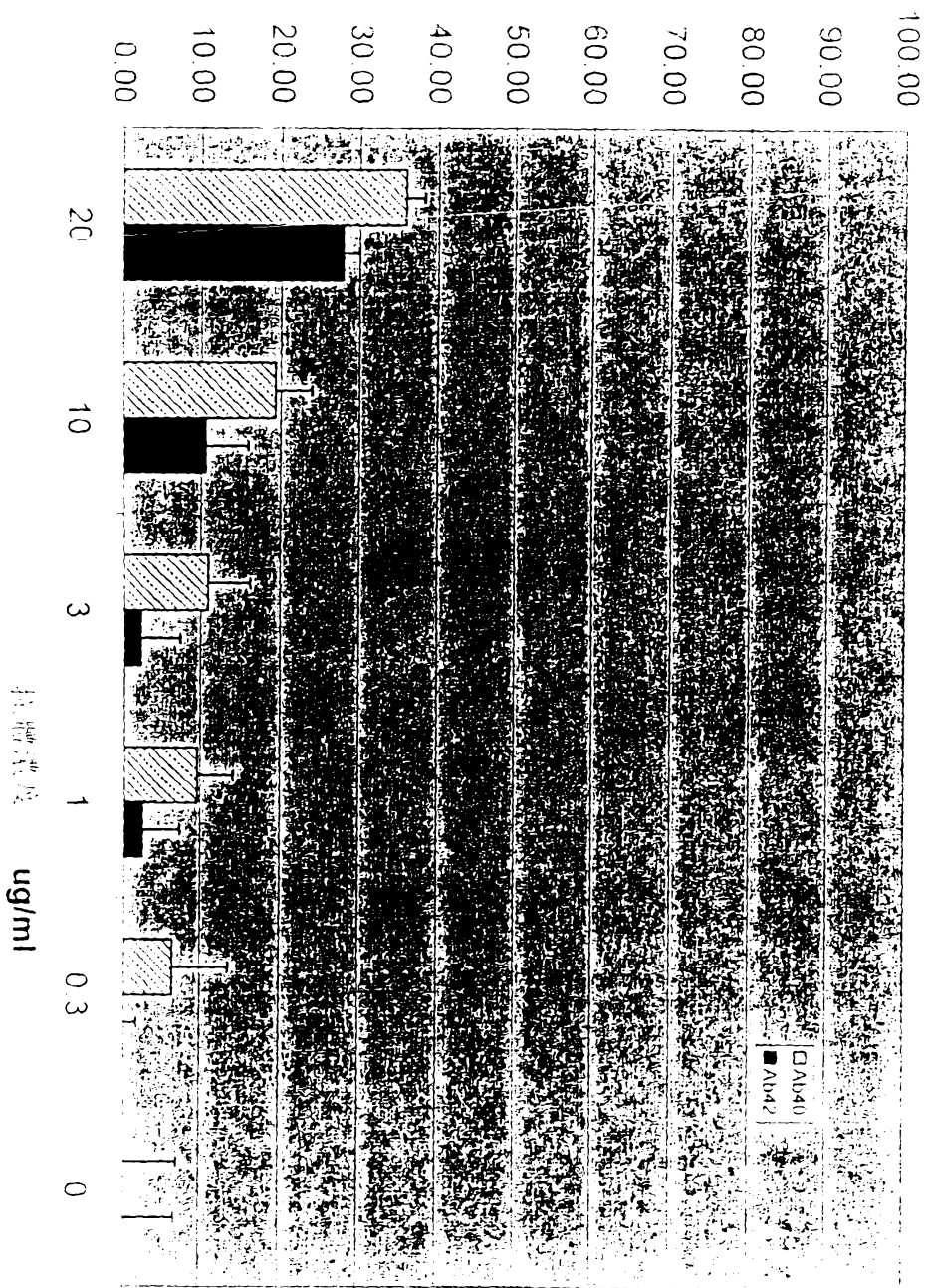


图 33

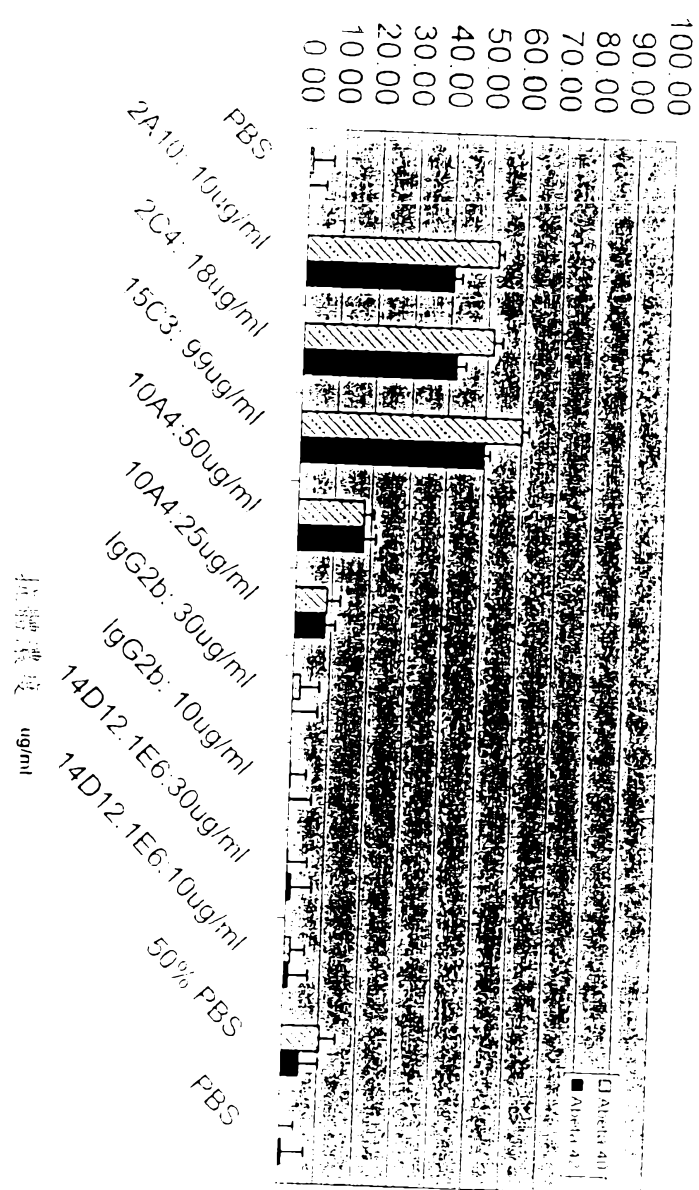


圖 34

混合牛人腦 Nogo

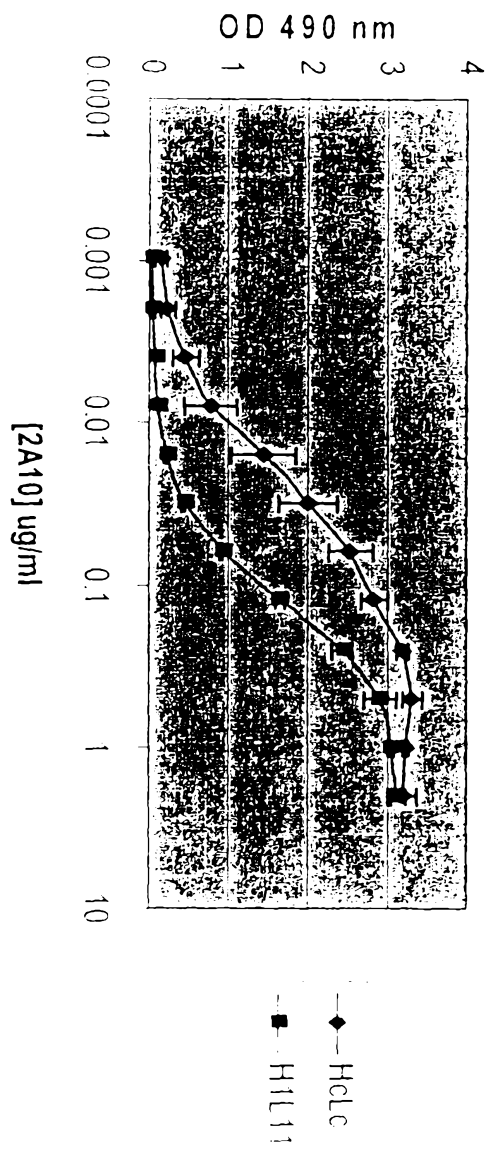


图 35A

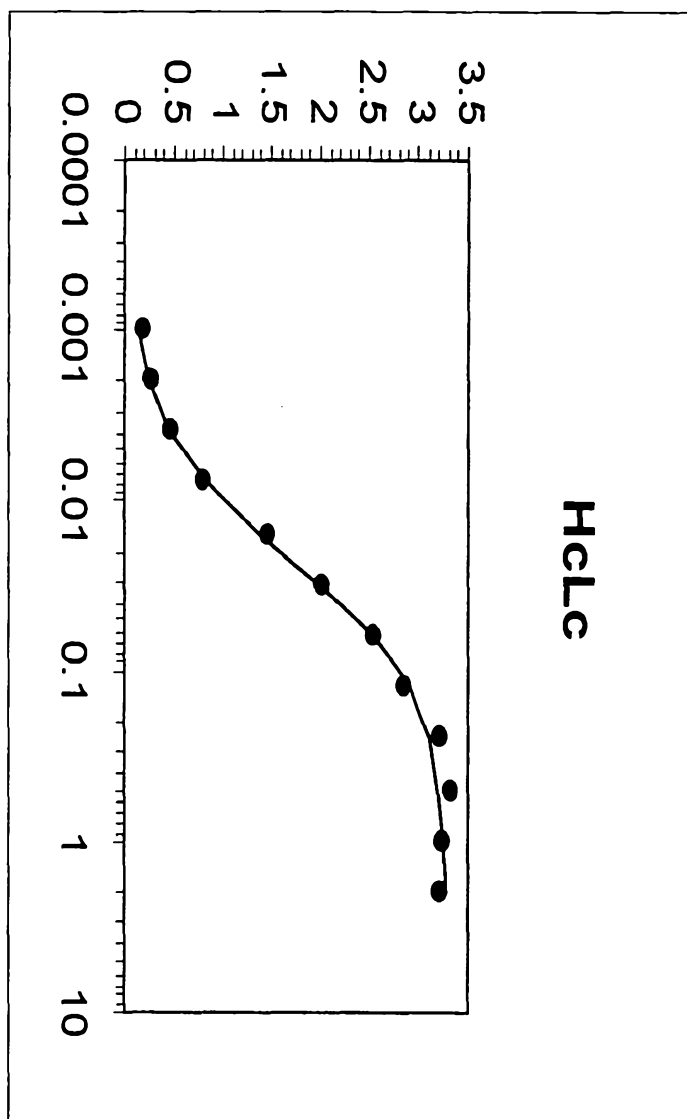


圖 35B

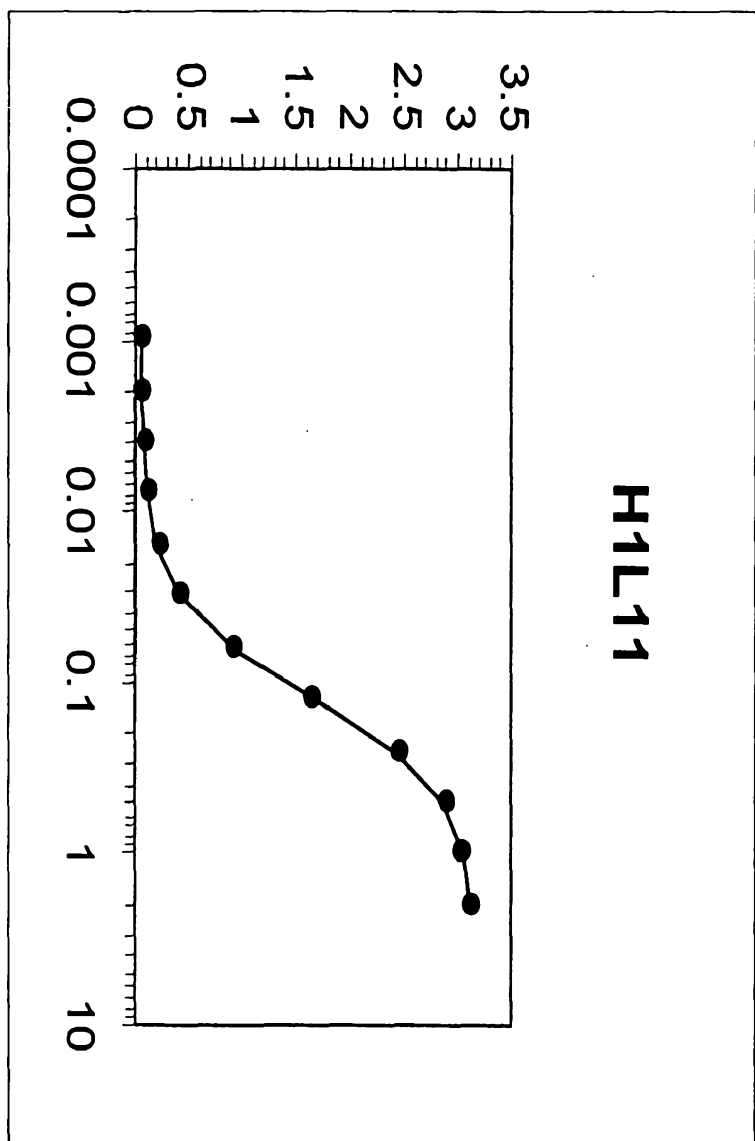


圖 35C

NogoAmyc (μg):

0 1 1.5 2 3 4 5

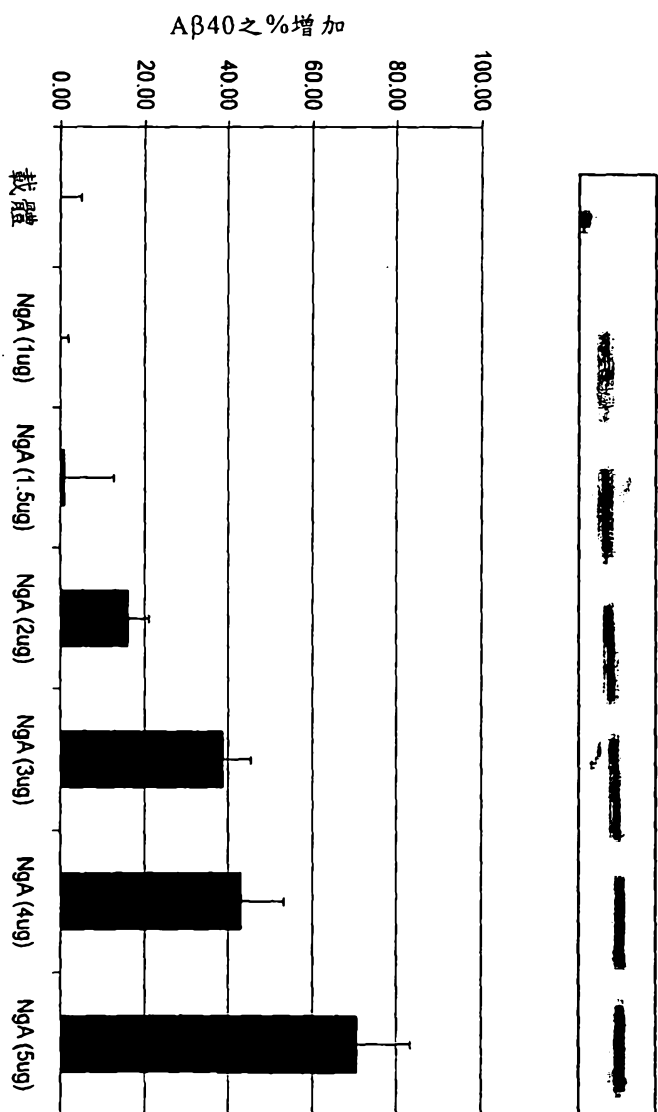


圖 36

七、指定代表圖：

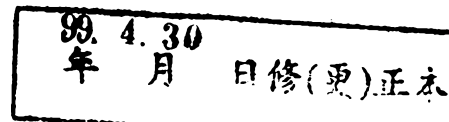
(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)



序列表

<110> 英商葛蘭素集團有限公司

<120> 免疫球蛋白

<130> PB60608

<140> TW 093139709

<141> 2004-12-20

<150> GB 0329711.6

<151> 2003-12-22

<160> 97

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Tyr	Lys	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
1			5						10					15	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

Gly Gln Gly Tyr
1

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 7

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

Phe Ser Cys Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

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

Gly

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

Glu Leu Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 13

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 14

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 15

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 16

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 17

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

Gly

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 18

Arg Phe Asp Tyr
1

<210> 19

<211> 48

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 19

aggctctagta agagtctcct atataaggat gggaagacat acttgaat

48

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 20

ttgatgtcca cccgtgcatc a

21

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 21

caacaacttg tagagtatcc gctcag

27

<210> 22

<211> 15

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 22
agctactgga tgcac 15

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 23
aatattaatc cttagcaatgg tggtaactaac tacaatgaga agttcaagag c 51

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 24
ggacagggct ac 12

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 25
agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttacct 48

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 26
aaagtttcca accgattttc t 21

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 27
tctcagagta cacatgttcc gctcacg 27

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 28
ttcagttgct atgccatgct t 21

<210> 29

<211> 51

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 29
tccattagtg atggtaggttag ttacacctac tatccagaca atgtaaaggg c 51

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 30

gaactacttt ttgactac

18

<210> 31

<211> 48

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 31

aggctagta agagtctcct gcatagtaat ggcaacactt acttgtat

48

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 32

cggatgtcca accttgcctc a

21

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 33

atgcaacatc tagaatatcc gctcaccg

27

<210> 34

<211> 15

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 34

agctactgga tgaac

15

<210> 35

<211> 51

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 35

cagatttacc ctggagatgg tgatactaac tacaacggaa agttcaaggg c

51

<210> 36

<211> 12

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 36

cgccttgact at

12

<210> 37

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys 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 Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys 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

Glu Leu Gly Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Cys Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 39

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Val Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 40

Asp Ile Val Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Asn Pro Val Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Lys Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu
 85 90 95

Val Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 41

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 42

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 43

<211> 339

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 43

caggccaac tgcagcagcc tgggactgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggaaat attaatccta gcaatgggtg tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggict attattgtga actgggacag 300
 ggctactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctctca 339

<210> 44

<211> 345

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 44

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tgctatgccca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggaaaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtgatg gtggtagtta cacctactat 180
 ccagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac 240
 ctgcaaatga gccatctgaa gcttgaggac acagccatgt attactgtgc aaaggaacta 300
 ctttttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

<210> 45

<211> 339

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 45

caggttcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaaag cttctggcta cgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggaaagg gtcttgagtg gatiggacag attatcctg gagatgggtga tactaactac 180
 aacggaaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc agtacgcttt 300
 gactattggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctca 339

<210> 46

<211> 336

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 46

gatattgtga taaccaggga tgaactctcc aatcctgtca cttctggaga atcagtttcc 60
 atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta tataaggatg ggaagacata ctigaattgg 120
 tttctgcaga gaccaggaca atctcctcag ctctgatct atttgatgtc caccctgca 180
 tcaggagtct cagaccggtt tagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac cctggaaatc 240

agtagagtga aggctgagga tgtgggtgtg tattactgtc aacaacttgt agagtatccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 47

<211> 336

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 47
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaccccttga cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaagatc acatgttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 48

<211> 336

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 48
gatattgtga tgactcaggc tgcacccctt gtacctgtca ctccctggaga gtcagtatcc 60
atctcttgca ggtctagtaa gagtctcttg catagtaalg gcaacactta ctgttattgg 120
ttctgcaga ggccaggcca gtctctcag ctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgia tgcaacatct agaatatccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 49

<211> 1407

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 49

```

aagcttgcca ccatgggatg gagctgtatc atcctctttt tggtagcagc agctacaggt    60
gtccactccc aggtccaact gcagcagcct gggactgaac tggtagaaccc tggggcttca    120
gtgaagctgt cctgcaaggc tcttggttac accttcacca gctactggat gcaactgggtg    180
aagcagaggc ctggacaagg ccttgagtgg attggaaata ttaatcctag caatgggtgt    240
actaactaca atgagaagtt caagagcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc    300
acagcctaca tgcagctcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttattgtgaa    360
ctgggacagg gctactgggg ccaaggcaca ctagtcaccg tctcctcagc caaaacaaca    420
gccccatcgg tctatccact gggccctgig tgtggagata caactggctc ctcggtgact    480
ctaggatgcc tggtaagggt ttatttcctt gagccagtga ccttgacctg gaactctgga    540
tcctgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc    600
agcagctcag tgactgtaac ctgcagcacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg    660
gccacccgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gccacaatc    720
aagccctgtc ctccatgcaa atgccagca cctaacctcc tgggtggccc atccgtcttc    780
atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagcccat agtcacatgt    840
gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccga gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac    900
gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg    960
gtggtcagtg ccctcccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc   1020
aaggtcaaca acaaagacct cccagcggcc atcgagagaa ccatctcaa acccaaaggg   1080
tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa   1140
caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg   1200
accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat   1260
ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat   1320
agctactcct gttcagtggc ccacgagggt ctgcacaatc accacacgac taagagcttc   1380

```

tcccggactc cgggtaaagt agaattc

1407

<210> 50

<211> 738

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 50

aagcttgcca ccatgaggtg ctctcttcag tttctggggg tgcttatggt ctggatctct 60

ggagtcagtg gggatattgt gataaccag gatgaactct ccaatcctgt cacitctgga 120

gaatcagttt ccatctcctg caggtctagt aagagtctcc tatataagga tgggaagaca 180

tacttgaatt ggtttctgca gagaccagga caatctctc agctcctgat ctatttgatg 240

tccaccctg catcaggagt ctgagaccgg tttagtggca gtgggtcagg aacagatttc 300

accctggaaa tcagtagagt gaaggctgag gatgtgggtg tgtattactg tcaacaactt 360

gtagagtatc cgctcacgtt cggtgctggg accaagctgg agctgaaaag tacggatgct 420

gcaccgactg tatccatctt cccaccatcc agtgagcagt taacatctgg agglgcctca 480

gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat 540

ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac agtggactg atcaggacag caaagacagc 600

acctacagca tgagcagcac cctcacgttg accaaggacg agtatgaacg acataacagc 660

tatacctgtg aggccactca caagacatca acttaccaca ttgtcaagag ctcaacagg 720

aatgagtgtt aagaattc 738

<210> 51

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 51
actagtcgac atgaaatgca gctgggtcat sttcttc 37

<210> 52

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 52
actagtcgac atgggatgga gctrtatcat sytctt 36

<210> 53

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 53
actagtcgac atgaagwtgt ggtaaactg ggttttt 37

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 54
actagtcgac atgractttg ggytcagctt grttt 35

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 55
actagtcgac atggactcca ggctcaattt agttttcctt 40

<210> 56

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 56
actagtcgac atggctgtcy trgsgctrct cttctgc 37

<210> 57

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 57

actagtcgac atggratgga gckggrtctt tmtctt

36

<210> 58

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 58

actagtcgac atgagagtgc tgattctttt gtg

33

<210> 59

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 59

actagtcgac atggmttggg tgtggamctt gctattcctg

40

<210> 60

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 60

actagtcgac atgggcagac ttacattctc attcctg

37

<210> 61

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 61

actagtcgac atggattttg ggctgatit ttttattg

38

<210> 62

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VH 引導序列前置引子

<400> 62

actagtcgac atgatggtgt taagtcttct gtacctg

37

<210> 63

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 63

actagtcgac atgaagtgc ctgttaggct gttggtgctg 40

<210> 64

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 64

actagtcgac atggagwcag acacactcct gytatgggt 39

<210> 65

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 65

actagtcgac atgagtgtgc tcactcaggt cctggcgttg 40

<210> 66

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 66

actagtcgac atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg 43

<210> 67

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 67

actagtcgac atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc

40

<210> 68

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 68

actagtcgac atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrgg

37

<210> 69

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 69

actagtcgac atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g

41

<210> 70

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 70

actagtcgac atgtggggay ctkittycmm ttttcaatt g 41

<210> 71

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 71

actagtcgac atggtrtccw casctcagtt ccttg 35

<210> 72

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 72

actagtcgac atgtatatat gtttgttgc tatttct 37

<210> 73

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 73

actagtcgac atggaagccc cagctcagct tctcttcc

38

<210> 74

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 VL 引導序列前置引子

<400> 74

actagtcgac atgaagtttc cttctcaact tctgctc

37

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 γ 1 恆定區反置引子

<400> 75

ggatcccggg ccagtgata gacagatg

28

<210> 76

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 γ 2b 恆定區反置引子

<400> 76

ggatcccggg agtggataga ctgatgg

27

<210> 77

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 κ 恆定區反置引子

<400> 77

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 78

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 2A10 VH 前置引子

<400> 78

actcataagc ttgccacat gggatggagc tglatcatcc tctttttggt ag

52

<210> 79

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH 反置引子

<400> 79

actatgacta gtgtgccttg gccccagtag

30

<210> 80

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VL 前置引子

<400> 80

actcataagc ttgccacat gaggtgctct cttcagtttc tg

42

<210> 81

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VL 反置引子

<400> 81

actatgcgta cgtttcagct ccagc.ttg

29

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CAMPATH-1H 訊號序列

<400> 82

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 83

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gln Trp Leu Val Ile Leu Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 84

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化 VH 構築體 H1

<400> 84

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Glu Leu Gly Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Gly Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 86

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化 VL 構築體 L11

<400> 86

Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu
 85 90 95

Val Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 87

<211> 201

<212> PRT

<213> 智人

<400> 87

Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu
 20 25 30

Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln
 35 40 45

Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile
 50 55 60

Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu
 85 90 95

Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile
 100 105 110

Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro
 115 120 125

Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro
 130 135 140

Asp His Ser Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val
 145 150 155 160

Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp
 165 170 175

Glu Thr Val Met Leu Val Lys Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu
 180 185 190

Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn Lys Glu
 195 200

<210> 88

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-NOGO 抗體重鏈

<400> 88

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Glu Leu Gly Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 195 200 205

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 210 215 220

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 89

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-NOGO 抗抗體輕鏈

<400> 89

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
 35 40 45

Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 90

<211> 1428

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼 SEQ ID NO: 88 之聚核苷

<400> 90

aagctttaca gttactcagc acacaggacc tcacatggg atggagctgt atcatcctct 60

tcttggtagc aacagctaca ggtgtccact cccaggtgca gctgggtcag tctggggctg 120

aggtgaagaa gcctggggcc tcagtgaagg tttcctgcaa ggcatctgga tacaccttca 180
 ccagctactg gatgcactgg gtgcgacagg cccctggaca agggcttgag tggatgggaa 240
 atattaatcc tagcaatggt ggtactaact acaatgagaa gttcaagagc agagtcacca 300
 tgaccagggga cacgtccaag agcacagtct acatggagct gagcagcctg agatctgagg 360
 acacggccgt gtattactgt gaaactgggac agggctactg gggccagggga aactagtca 420
 cagtctcctc agcctccacc aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga 480
 gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg 540
 tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc 600
 tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg 660
 gcaccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga 720
 aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac 780
 tcgcgggggc accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct 840
 cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca 900
 agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 960
 agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc 1020
 tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 1080
 aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat 1140
 cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc 1200
 ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca 1260
 cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca 1320
 agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 1380
 accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgaattc 1428

<210> 91

<211> 758

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼 SEQ ID NO: 89 之聚核苷

<400> 91

```

aagctttaca gttactcagc acacaggacc tcaccatggg atggagctgt atcatcctct    60
tcttggtagc aacagctaca ggtgtccact ccgatattgt gataaccag tctccactct    120
ccctgcccgt cacccttggg cagccggcct ccattctctg caggtctagt aagagtctcc    180
tatataagga tgggaagaca tacttgaatt ggtttcagca gaggccaggc caatctccac    240
agctcctaat ttatttgatg tccaccctg catctggggg cccagacaga ttcagcggcg    300
gtgggtcagg cactgatttc aactgaaaa tcagcagggt ggaggctgag gatgttgggg    360
tttattactg ccaacaactt gtagagtatc cgctcacgtt tggccagggg accaagctgg    420
agatcaaacg tacggggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt    480
tgaaatctgg aactgcctct gtigtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca    540
aagtacagtg gaaggaggac aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag    600
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag    660
actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg agctcgcccc    720
tcacaaagag cttcaacagg ggagagigtg aggaattc                                758
    
```

<210> 92

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HcLc 之重鏈序列

<400> 92

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1           5           10           15
    
```

```

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys
          20           25           30
    
```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Glu Leu Gly Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 195 200 205

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 210 215 220

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 93

<211> 1405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼 SEQ ID NO: 92 之聚核苷

<400> 93

```

aagcttgcca ccatgggatg gagctgtatc atcctctttt tggtagcagc agctacaggt    60
gtccactccc aggtccaact gcagcagcct gggactgaac tggtagaagc tggggcttca    120
gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggctac accttcacca gctactggat gcaactgggtg    180
aagcagaggc ctggacaagg ccttgagtgg attggaaata ttaatcctag caatggtggt    240
actaactaca atgagaagtt caagagcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc    300
acagcctaca tgcagctcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttatttgaa    360
ctgggacagg gctactgggg ccaaggcaca ctagtacag tctcctcagc ctccaccaag    420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccttc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc    480
ctgggctgcc tggtagaagg ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc    540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc    600
ctcagcagcg tggtagacct gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac    660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac    720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc    780
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc    840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggicaagt tcaactggta cgtggacggc    900
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtacct    960
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc    1020
aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg    1080
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac    1140
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcg cgtggagtgg    1200

```

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380

tcctgtctc cgggtaaag aattc 1405

<210> 94

<211> 239

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HcLc 之輕鏈序列

<400> 94

Met Arg Cys Ser Leu Gln Phe Leu Gly Val Leu Met Phe Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Val Ser Gly Asp Ile Val Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Asn Pro
 20 25 30

Val Thr Ser Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Lys Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 95

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼 SEQ ID NO: 94 之聚核苷

<400> 95
 aagcttgcca ccatgagggtg ctctcttcag tttctggggg tgcttatggt ctggatctct 60

ggagtcagtg gggatattgt gataaccag gatgaactct ccaatcctgt cacttctgga 120

gaatcagttt ccatctcctg caggctctagt aagagtcctc tatataagga tgggaagaca 180

tacttgaatt ggtttctgca gagaccagga caatctctc agctcctgat ctatttgatg 240

tccacccgtg catcaggagt ctccagaccgg ttttagtggca gtagggtcagg aacagatttc 300
accctggaaa tcagtagagt gaaggctgag gatgtgggtg tgtattactg tcaacaactt 360
gtagagtatc cgctcacgtt cggtgctggg accaagctgg agctgaaacg tacggtggct 420
gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct 480
gttgtgtgcc tgctgaataa ctctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggaggac 540
aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 600
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 660
tacgctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 720
ggagagtgtt aggaattc 738

<210> 96

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基元

<400> 96

Tyr Glu Asn Pro
1

<210> 97

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基元

<400> 97

Lys Lys Gln Asn
1

十、申請專利範圍：

1. 一種抗體，其包含下列各CDR：
輕鏈CDR: SEQ ID NO:1、2及3
重鏈CDR: SEQ ID NO:4、5及6，
或其功能性片段或類似物，其中該抗體、其功能性片段或類似物可結合至及中和人類NOGO-A。
2. 如請求項1之抗體，其係結合至人類NOGO-A蛋白質之胺基酸586至785間之區域。
3. 如請求項2之抗體，其係結合至人類NOGO-A之胺基酸586至685間之區域。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體，其係一單株抗體。
5. 如請求項1至3中任一項之抗體，其係一人類化或嵌合抗體。
6. 如請求項1之抗體，其中該重鏈可變區域包含SEQ ID NO:37所示之胺基酸序列。
7. 如請求項1或6之抗體，其中該輕鏈可變區域包含SEQ ID NO:40所示之胺基酸序列。
8. 如請求項1之抗體或其功能性片段或類似物，其包含一重鏈可變區域及一輕鏈可變區域，其該重鏈可變區域包含SEQ ID NO:37及人類重鏈之恆定區或其片段，且該輕鏈可變區域包含SEQ ID NO:40及人類輕鏈之恆定區或其片段。
9. 如請求項1至3、6及8中任一項之抗-NOGO-A抗體，其係用於治療人類中風、創傷性大腦損傷、脊髓損傷、阿茲

海默氏症 (Alzheimer's disease)、額顳葉失智症 (fronto-temporal dementia)(濤蛋白疾病 (tauopathy))、末梢神經疾病、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、亨丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease) 或多發性硬化症之方法。

10. 如請求項 1 至 3、6 及 8 中任一項之抗-NOGO-A 抗體，其係用於在身受或可能具有罹患中風、創傷性大腦損傷、脊髓損傷、阿茲海默氏症、額顳葉失智症(濤蛋白疾病)、末梢神經疾病、帕金森氏症、亨丁頓氏舞蹈症或多發性硬化症風險之病人抑制神經退化及/或促進功能恢復之方法。
11. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 至 8 中任一項之抗-NOGO-A 抗體、其功能性片段或類似物及一醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。
12. 一種如請求項 1 至 8 中任一項之抗-NOGO-A 抗體之用途，其係用於製備供治療 1 中風、創傷性大腦損傷、脊髓損傷、阿茲海默氏症、額顳葉失智症(濤蛋白疾病)、末梢神經疾病、帕金森氏症、亨丁頓氏舞蹈症或多發性硬化症之藥物。
13. 一種如請求項 1 至 8 中任一項之抗-NOGO-A 抗體之用途，其係用於製備可抑制罹患或可能具有罹患中風、創傷性大腦損傷、脊髓損傷、阿茲海默氏症、額顳葉失智症(濤蛋白疾病)、末梢神經疾病、帕金森氏症、亨丁頓氏舞蹈症或多發性硬化症風險之病人神經退化及/或可促進功能恢復之藥物。

14. 一種促進軸突發芽之活體外方法，其包含使人類軸突與如請求項1至8中任一項之抗-NOGO-A抗體接觸。