

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5674469号  
(P5674469)

(45) 発行日 平成27年2月25日(2015.2.25)

(24) 登録日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(51) Int.Cl.

F 1

**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**A61P 27/06** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

A 61 K 37/02 Z N A  
A 61 K 39/395 V  
A 61 K 39/395 D  
A 61 K 39/395 N  
A 61 K 31/713

請求項の数 15 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-528889 (P2010-528889)  
(86) (22) 出願日 平成20年10月10日 (2008.10.10)  
(65) 公表番号 特表2011-500566 (P2011-500566A)  
(43) 公表日 平成23年1月6日 (2011.1.6)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2008/011633  
(87) 國際公開番号 WO2009/048605  
(87) 國際公開日 平成21年4月16日 (2009.4.16)  
審査請求日 平成23年10月7日 (2011.10.7)  
(31) 優先権主張番号 60/979,338  
(32) 優先日 平成19年10月11日 (2007.10.11)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 592221528  
バイオジエン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
142, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 14  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100062409  
弁理士 安村 高明  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L I N G O - 1 アンタゴニストおよびTrkBアゴニストの投与を介して圧力誘導性の視神経障害を処置し、神経変性を防ぎ、ニューロン細胞の生存を促進する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

L I N G O - 1 アンタゴニストおよび担体を含む、眼内障を処置するための薬学的組成物であって、該組成物は、TrkBアゴニストと組み合わせて用いられることを特徴とし、ここで、

該 L I N G O - 1 アンタゴニストが、

(i) 可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドであって、L I N G O - 1 L R R ドメインもしくは L I N G O - 1 免疫グロブリン (Ig) ドメインを含む、可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチド；

(ii) L I N G O - 1 抗体もしくはその抗原結合断片；または

(iii) L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドであって、アンチセンスポリヌクレオチド、低分子干渉 RNA (siRNA) もしくは低分子ヘアピン RNA (shRNA) である、L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドであり、そして、

該 TrkB アゴニストが、

(i) TrkB アゴニストポリペプチドであって、BDNF ポリペプチドである、TrkB アゴニストポリペプチド；または

(ii) TrkB アゴニストポリヌクレオチドであって、BDNF ポリペプチドをコードする、TrkB アゴニストポリヌクレオチド

である、組成物。

10

20

## 【請求項 2】

前記 T r k B アゴニスト をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物であって、

該 T r k B アゴニスト が、

( i ) T r k B アゴニスト ポリペプチドであって、B D N F ポリペプチドである、T r k B アゴニスト ポリペプチド；または

( i i ) T r k B アゴニスト ポリヌクレオチドであって、B D N F ポリペプチドをコードする、T r k B アゴニスト ポリヌクレオチド

である、組成物。

## 【請求項 3】

T r k B アゴニストおよび担体を含む、縁内障を処置するための薬学的組成物であって、該組成物は、L I N G O - 1 アンタゴニストと組み合わせて用いられることを特徴とし、ここで、

該 L I N G O - 1 アンタゴニストが、

( i ) 可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドであって、L I N G O - 1 L R R ドメインもしくは L I N G O - 1 免疫グロブリン ( I g ) ドメインを含む、可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチド；

( i i ) L I N G O - 1 抗体もしくはその抗原結合断片；または

( i i i ) L I N G O - 1 アンタゴニスト ポリヌクレオチドであって、アンチセンス ポリヌクレオチド、低分子干渉 RNA ( s i R N A ) もしくは低分子ヘアピン RNA ( s h R N A ) である、L I N G O - 1 アンタゴニスト ポリヌクレオチド

であり、そして、

該 T r k B アゴニスト が、

( i ) T r k B アゴニスト ポリペプチドであって、B D N F ポリペプチドである、T r k B アゴニスト ポリペプチド；または

( i i ) T r k B アゴニスト ポリヌクレオチドであって、B D N F ポリペプチドをコードする、T r k B アゴニスト ポリヌクレオチド

である、組成物。

## 【請求項 4】

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 2、配列番号 2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 2 または配列番号 2 のアミノ酸 4 1 7 ~ 4 9 3 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、免疫グロブリン断片、血清アルブミン、標的化タンパク質、レポータータンパク質、または精製を容易にするタンパク質に融合される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記 L I N G O - 1 抗体が、以下：

## 【数 1】

1A7, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7,

3B5.230-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03),

36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12) および 1968 (L1a.13)

からなる群より選択される抗体と同じ L I N G O - 1 エピトープに結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記 L I N G O - 1 抗体が 1 A 7 である、請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

10

20

30

40

50

前記 s h R N A が、ヌクレオチド配列： U G A U C G U C A U C C U G C U A G A C U U C A A G A G A G U C U A G C A G G A U G A C G A U C U U U U U U C (配列番号 34) を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

ニューロンの生存を促進するためのインビトロの方法であって、該ニューロンを有効量の L I N G O - 1 アンタゴニストおよび T r k B アゴニストと接触させる工程を含み、ここで、

該 L I N G O - 1 アンタゴニストが、

( i ) 可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドであって、 L I N G O - 1 L R R ドメインもしくは L I N G O - 1 免疫グロブリン ( I g ) ドメインを含む、可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチド；

( i i ) L I N G O - 1 抗体もしくはその抗原結合断片；または  
( i i i ) L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドであって、アンチセンスポリヌクレオチド、低分子干渉 R N A ( s i R N A ) もしくは低分子ヘアピン R N A ( s h R N A ) である、 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチド  
であり、そして、

該 T r k B アゴニストが、

( i ) T r k B アゴニストポリペプチドであって、 B D N F ポリペプチドである、 T r k B アゴニストポリペプチド；または

( i i ) T r k B アゴニストポリヌクレオチドであって、 B D N F ポリペプチドをコードする、 T r k B アゴニストポリヌクレオチド  
である、方法。

【請求項 10】

細胞内での T r k B リン酸化を促進するためのインビトロの方法であって、 L I N G O - 1 と T r k B とを共発現する細胞を L I N G O - 1 アンタゴニストと接触させる工程を含み、ここで、

該 L I N G O - 1 アンタゴニストが、

( i ) 可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドであって、 L I N G O - 1 L R R ドメインもしくは L I N G O - 1 免疫グロブリン ( I g ) ドメインを含む、可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチド；

( i i ) L I N G O - 1 抗体もしくはその抗原結合断片；または  
( i i i ) L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドであって、アンチセンスポリヌクレオチド、低分子干渉 R N A ( s i R N A ) もしくは低分子ヘアピン R N A ( s h R N A ) である、 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチド  
である、方法。

【請求項 11】

前記細胞がニューロンである、請求項 1\_0 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ニューロンが網膜神経節細胞または有毛細胞である、請求項 9 または 1\_1 に記載の方法。

【請求項 13】

L I N G O - 1 アンタゴニストをさらに含む、請求項 3 に記載の組成物であって、  
該 L I N G O - 1 アンタゴニストが、

( i ) 可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドであって、 L I N G O - 1 L R R ドメインもしくは L I N G O - 1 免疫グロブリン ( I g ) ドメインを含む、可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチド；

( i i ) L I N G O - 1 抗体もしくはその抗原結合断片；または  
( i i i ) L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドであって、アンチセンスポリヌクレオチド、低分子干渉 R N A ( s i R N A ) もしくは低分子ヘアピン R N A ( s h R N A ) である、 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

である、組成物。

【請求項 1 4】

L I N G O - 1 抗体が L i 1 3 である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

L I N G O - 1 抗体が L i 3 3 である、請求項 6 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、神経学、神経生物学、分子生物学、および薬理学に関する。より詳細には、本発明は、L I N G O - 1 アンタゴニストおよびTrkBアゴニストを用いて、ニューロンの生存と再生を促進する方法に関する。さらに、本発明は、L I N G O - 1 アンタゴニストを用いて、圧力誘導性の視神経障害を処置する方法に関する。本発明はまた、一般に、L I N G O - 1 アンタゴニストを用いて、TrkB活性を増大させ、かつJNK経路のシグナル伝達を阻害する方法に関する。10

【背景技術】

【0 0 0 2】

視神経障害は、様々な臨床症状および病因を包含する眼科疾患群の1つである。緑内障は、視神経の病理学的变化、視神経円板に見られる病理学的变化、および視野喪失に相当する病理学的变化を含み、治療しないと失明する例示的な視神経障害である。緑内障は、眼圧の増大と関連するが、その他の要素も含んでいる。20

【0 0 0 3】

緑内障に対する現在の治療は、眼圧を下げるに向けられている。内科的治療としては、眼内液の産生を低下させるかまたはその流出を増大させる局所点眼薬または経口医薬品が挙げられる。しかしながら、緑内障に対するこれら薬物治療は、時に、頭痛、目のかすみ、アレルギー反応、心肺合併症に起因する死亡、およびその他の薬物との潜在的相互作用などの重大な副作用を伴う。外科的治療も用いられるが、それには多くの欠点もあり、成功率も低い。

【0 0 0 4】

したがって、緑内障、および網膜神経節細胞 (RGC) の変性または死を特徴とするその他の疾患を含む、圧力誘導性の視神経障害に対するさらなる処置法が依然として必要である。30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

本発明は、ニューロンにおいて、L I N G O - 1 がTrkBと相互作用し、これを阻害するという発見に基づく。眼圧上昇後、TrkBリガンドである脳由来神経栄養因子 (BDNF) が上方調節される。BDNFは、TrkBリン酸化および細胞生存シグナル伝達経路の活性化を促進する。しかしながら、L I N G O - 1 もまた、眼圧上昇後に上方調節される。本明細書に記載される実験は、L I N G O - 1 アンタゴニストを用いて、L I N G O - 1 がTrkBのリン酸化および活性化を阻害し、それによって細胞生存シグナル伝達経路を阻害することを示す。本明細書に記載される実験はまた、L I N G O - 1 が細胞死と関連するJNKシグナル伝達経路の活性化を促進することを示す。したがって、L I N G O - 1 のアンタゴニストおよびTrkBのアゴニストは細胞生存を促進する。40

【0 0 0 6】

これらの発見を基に、本発明は、一般にL I N G O - 1 アンタゴニストの投与によってL I N G O - 1 とTrkBの相互作用を阻害する方法に関する。本発明はまた、L I N G O - 1 アンタゴニストの投与によってTrkBリン酸化およびTrkBシグナル伝達を促進し、JNKリン酸化およびJNKシグナル伝達を阻害する方法に関する。さらに、本発明は、L I N G O - 1 アンタゴニストの投与によって網膜神経節細胞の生存を促進するかまたは圧力誘導性の視神経障害を処置する方法に関する。さらに、本発明は、L I N G O 50

- 1 アンタゴニストおよびTrkBアゴニストの投与によってニューロン細胞の生存を促進する方法に関する。ある実施形態において、本発明はまた、LINGO-1アンタゴニストおよびTrkBアゴニストの投与によってニューロン細胞死と関連する状態を処置する方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

ある実施形態において、本発明は、細胞内のLINGO-1とTrkBの相互作用を阻害する方法であって、LINGO-1とTrkBとを共発現する細胞をLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法を含む。その他の実施形態において、本発明は、細胞内のTrkBリン酸化またはTrkB経路のシグナル伝達を促進する方法であって、LINGO-1とTrkBとを共発現する細胞をLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法を含む。その他のある実施形態において、本発明は、TrkBリン酸化を促進する方法であって、CNSニューロンをLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法を含む。

10

【0008】

ある実施形態において、本発明は、細胞内のJNKリン酸化を促進する方法であって、LINGO-1およびJNKを発現する細胞をLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法を含む。その他の実施形態において、本発明は、JNKリン酸化を阻害する方法であって、CNSニューロンをLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法を提供する。

20

【0009】

ある実施形態において、本発明は、死の危険にさらされたニューロンの生存を促進する方法であって、該ニューロンを有効量のLINGO-1アンタゴニストおよびTrkBアゴニストと接触させる工程を含む方法を含む。

【0010】

その他の実施形態において、本発明は、圧力誘導性の眼神経障害の兆候または症状を示す哺乳動物の網膜神経節細胞の生存を促進する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に有効量のLINGO-1アンタゴニストおよび担体を投与する工程を含む方法を含む。本発明はまた、ニューロン細胞死と関連する疾患または障害を処置する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に有効量のLINGO-1アンタゴニストおよびTrkBアゴニストを投与する工程を含む方法を含む。いくつかの実施形態において、該哺乳類は縁内障であると診断されている。

30

【0011】

上記方法の様々な実施形態において、該TrkBアゴニストは、TrkBがニューロンの生存を促進する能力を増大させる任意の分子であってもよい。ある実施形態において、該TrkBアゴニストは、TrkBアゴニスト化合物、TrkBアゴニストポリペプチド、TrkBアゴニスト抗体もしくはその断片、TrkBアゴニストポリヌクレオチド、TrkBアプタマー、または2つ以上のTrkBアゴニストの組合せからなる群より選択される。

【0012】

40

ある実施形態において、該TrkBアゴニストはTrkBアゴニスト化合物である。本発明のあるTrkBアゴニスト化合物は、L-783、281、アデノシン、およびCGS 21680を含むが、これらに限定されない。さらに、該TrkBアゴニスト化合物は、ニューロトロフィンの極めて重要な領域を模倣する小分子であることができる。例えば、該小分子は、BDNFの-ターンループの模倣体であることができる。本発明に従って使用され得る小分子模倣体の特定の例は、米国公開出願第2007/0060526 A1号に開示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0013】

ある実施形態において、該TrkBアゴニストはTrkBアゴニストポリペプチドである。本発明のある種のTrkBアゴニストポリペプチドとしてはBDNF、NT-3、お

50

およびNT-4/5が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、該TrkBアゴニストポリペプチドは配列番号：4を含む。いくつかの実施形態において、該TrkBアゴニストは、非TrkBアゴニスト異種ポリペプチドまたは非TrkBアゴニスト異種ポリマーを含む融合ポリペプチドまたは結合体である。いくつかの実施形態において、該非TrkBアゴニストポリペプチドまたは非TrkBアゴニストポリマーは、ポリエチレングリコール、1-アシル-グリセロール誘導体、抗体Igペプチド、血清アルブミンペプチド、標的化ペプチド、レポーターペプチド、および精製を容易にするペプチドからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、該抗体Igペプチドは、ヒンジおよびFcペプチドである。

## 【0014】

10

代替の実施形態において、該TrkBアゴニストは、TrkBポリペプチドに結合する抗体またはその断片である。本発明の方法で使用されるTrkBアゴニスト抗体としては、6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12、および29D7が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0015】

その他の実施形態において、該TrkBアゴニストは、TrkBアゴニストポリヌクレオチド（例えば、ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチド、またはアプタマー）である。

## 【0016】

20

さらなる実施形態において、該TrkBアゴニストはTrkBアプタマーである。TrkBアプタマーは、TrkBに結合し、TrkBがニューロンの生存を増大させる能力を促進する小さいポリヌクレオチドである。

## 【0017】

30

上記方法の様々な実施形態において、該LINGO-1アンタゴニストは、LINGO-1がニューロンの生存を負に調節する能力、および/またはLINGO-1がTrkBに結合する能力、および/またはLINGO-1がTrkBリン酸化を阻害するかもしれない減少させる能力に干渉する任意の分子であってもよい。ある実施形態において、該LINGO-1アンタゴニストは、LINGO-1アンタゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその断片、LINGO-1アンタゴニストポリヌクレオチド（例えば、RNA干渉）、LINGO-1アプタマー、または2つ以上のLINGO-1アンタゴニストの組み合わせからなる群より選択される。

## 【0018】

40

ある実施形態において、該LINGO-1アンタゴニストポリペプチドは可溶性LINGO-1ポリペプチドである。本発明のある可溶性LINGO-1ポリペプチドとしては、以下のドメイン：(i) LINGO-1ロイシン-リッチリピート(LRR)ドメイン、(ii)LRRドメインのC末端のLINGO-1塩基性領域、および(iii)LINGO-1免疫グロブリン(Ig)ドメインのうちの1つ以上を含むかまたは欠く可溶性LINGO-1ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、該可溶性LINGO-1ポリペプチドは、LINGO-1 Igドメイン、LINGO-1 LRRドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインのうちの1つ以上を欠く。本発明のさらなるLINGO-1可溶性ポリペプチドとしては、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠くポリペプチドが挙げられる。いくつかの実施形態において、該可溶性LINGO-1ポリペプチドは、LINGO-1 LRRドメインを含み、かつLINGO-1 Igドメイン、LINGO-1塩基性領域、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを欠く。いくつかの実施形態において、該可溶性LINGO-1ポリペプチドは、配列番号：2のアミノ酸残基34～532または配列番号：2のアミノ酸残基36～532を含む。

## 【0019】

50

いくつかの実施形態において、該LINGO-1アンタゴニストは、非LINGO-1アンタゴニスト異種ポリペプチドを含む融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態に

おいて、該非 L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドは、抗体 I g ポリペプチド、血清アルブミンポリペプチド、標的化ポリペプチド、レポーターポリペプチド、および精製を容易にするポリペプチドからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、該抗体 I g ポリペプチドはヒンジおよび F c ポリペプチドである。

#### 【 0 0 2 0 】

代替の実施形態において、該 L I N G O - 1 アンタゴニストは、以下の L I N G O - 1 ドメイン：( i ) L I N G O - 1 ロイシン - リッチリピート ( L R R ) ドメイン、( i i ) L R R ドメインの C 末端の L I N G O - 1 塩基性領域、および( i i i ) L I N G O - 1 免疫グロブリン ( I g ) ドメインのうちの 1 つ以上を含む L I N G O - 1 ポリペプチドに結合する抗体またはその断片である。さらに、該 L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体またはその断片は、本明細書に記載されるような L I N G O - 1 ポリペプチド断片を含むポリペプチド内のエピトープに特異的に結合する。さらなる実施形態において、該 L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体またはその断片は、2 0 1 ' 、 3 A 3 、 3 A 6 、 3 B 5 、 1 A 7 、 1 D 5 、 1 G 7 、 2 B 1 0 、 2 C 1 1 、 2 F 3 、 3 P 1 B 1 . 1 F 9 、 3 P 1 D 1 0 . 2 C 3 、 3 P 1 E 1 1 . 3 B 7 、 3 P 2 C 6 . 3 G 1 0 . 2 H 7 、 3 P 2 C 9 . 2 G 4 、 3 P 4 A 6 . 1 D 9 、 3 P 4 A 1 . 2 B 9 、 3 P 4 C 2 . 2 D 2 、 3 P 4 C 5 . 1 D 8 、 3 P 4 C 8 . 2 G 9 、 6 P 4 F 4 . 1 D s 、 6 P 4 F 4 . 1 F 9 、 7 P 1 D 5 . 1 G 9 、 1 B 6 . 4 、 2 C 7 . 2 、 2 D 6 . 1 、 2 F 7 . 3 、 2 H 3 . 2 、 3 C 1 1 . 1 、 3 E 3 . 1 、 3 H 1 1 . 2 、 3 G 8 . 1 、 2 B 8 . 1 、 3 B 5 . 2 3 0 - C 1 2 ( L i 0 1 ) 、 3 8 - D 0 1 ( L i 0 2 ) 、 3 5 - E 0 4 ( L i 0 3 ) 、 3 6 - C 0 9 ( L i 0 4 ) 、 3 0 - A 1 1 ( L i 0 5 ) 、 3 4 - F 0 2 ( L i 0 6 ) 、 2 9 - E 0 7 ( L i 0 7 ) 、 3 4 - G 0 4 ( L i 0 8 ) 、 3 6 - A 1 2 ( L i 0 9 ) 、 2 8 - D 0 2 ( L i 1 0 ) 、 3 0 - B 0 1 ( L i 1 1 ) 、 3 4 - B 0 3 ( L i 1 2 ) 、 L i 1 3 、 L i 3 2 、 L i 3 3 、 L i 3 4 、 3 3 8 3 ( L 1 a . 1 ) 、 3 4 9 5 ( L 1 a . 2 ) 、 3 5 6 3 ( L 1 a . 3 ) 、 3 5 6 4 ( L 1 a . 4 ) 、 3 5 6 5 ( L 1 a . 5 ) 、 3 5 6 6 ( L 1 a . 6 ) 、 3 5 6 7 ( L 1 a . 7 ) 、 3 5 6 8 ( L 1 a . 8 ) 、 3 5 6 9 ( L 1 a . 9 ) 、 3 5 7 0 ( L 1 a . 1 0 ) 、 3 5 7 1 ( L 1 a . 1 1 ) 、 3 5 8 2 ( L 1 a . 1 2 ) 、 1 9 6 8 ( L 1 a . 1 3 ) 、 3 0 1 1 、 3 0 1 2 、 3 0 1 3 、 3 4 1 8 、 3 4 2 2 、 3 5 6 2 、 D 0 5 、 D 0 7 、 D 0 8 、 D 1 0 、 および D 1 1 からなる群より選択される。該 L I N G O - 1 アンタゴニストは、これらの抗体のいずれか 1 つの抗原結合断片または 2 つ以上の抗体もしくはそれらの断片の組み合わせであることができる。

#### 【 0 0 2 1 】

その他の実施形態において、該 L I N G O - 1 アンタゴニストは、アンチセンスポリヌクレオチド、アプタマー、リボザイム、低分子干渉 R N A ( s i R N A ) 、または低分子ヘアピン R N A ( s h R N A ) などの L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドである。

#### 【 0 0 2 2 】

さらなる実施形態において、該 L I N G O - 1 アンタゴニストは L I N G O - 1 アプタマーである。L I N G O - 1 アプタマーは、L I N G O - 1 に結合し、L I N G O - 1 と T r k B の相互作用に干渉し、かつ / または T r k B リン酸化を促進するもしくは増大させる、小さいポリペプチドまたはポリヌクレオチドである。

#### 【 0 0 2 3 】

上記方法のいくつかの実施形態において、該 T r k B アゴニストおよび / または L I N G O - 1 アンタゴニストは、( a ) 発現制御配列との作動可能な結合を通じて、該 T r k B アゴニストおよび / または該 L I N G O - 1 アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを C N S ニューロンに導入する工程；ならびに( b ) 該 T r k B アゴニストおよび / または L I N G O - 1 アンタゴニストを発現させる工程を含む方法によって投与される。いくつかの実施形態において、該 C N S ニューロンは哺乳動物内にあり、該導入する工程は、( a ) 発現制御配列との作動可能な結合を通じて、T r k B アゴニストおよび / または L I N G O - 1 アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを該哺乳動物に導入する

10

20

30

40

50

工程を含む。いくつかの実施形態において、培養宿主細胞は、処置される哺乳動物に由来する。ある実施形態において、該ポリヌクレオチドは、トランスフェクション、エレクトロポレーション、ウイルスによる形質導入、または直接的なマイクロインジェクションを介して、該宿主細胞またはCNSニューロンに導入される。

【0024】

ある実施形態において、該TrkBアゴニストおよび/またはLINGO-1アンタゴニストは、疾患、障害、もしくは損傷の部位またはその付近で、哺乳動物に投与されることができるポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、該ポリヌクレオチドは発現ベクターとして投与される。ある実施形態において、該ベクターは、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、エンテロウイルスベクター、ペストウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター（例えば、エプスタイン・バーウイルスベクター、または単純ヘルペスウイルスベクター）、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスベクター）、およびパルボウイルスからなる群より選択されるウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、該ベクターは、局所投与、眼内投与、および非経口投与（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、心腔内、皮下、皮内、髄腔内、腹腔内）からなる群より選択される経路によって投与される。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

細胞内でのLINGO-1とTrkBの相互作用を阻害する方法であって、LINGO-1とTrkBとを共発現する細胞をLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法。

(項目2)

細胞内でのTrkBリン酸化を促進する方法であって、LINGO-1とTrkBとを共発現する細胞をLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法。

(項目3)

TrkBリン酸化を促進する方法であって、CNSニューロンをLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法。

(項目4)

細胞内でのJNKリン酸化を阻害する方法であって、LINGO-1とJNKとを共発現する細胞をLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法。

(項目5)

JNKリン酸化を阻害する方法であって、CNSニューロンをLINGO-1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法。

(項目6)

死の危険にさらされたニューロンの生存を促進する方法であって、前記ニューロンを有効量のLINGO-1アンタゴニストおよびTrkBアゴニストと接触させる工程を含む方法。

(項目7)

圧力誘導性の眼神経障害の兆候または症状を示す哺乳動物の網膜神経節の生存を促進する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に治療有効量のLINGO-1アンタゴニストおよび担体を投与する工程を含む方法。

(項目8)

圧力誘導性の眼神経障害の兆候または症状を示す哺乳動物の網膜神経節の生存を促進する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に治療有効量のLINGO-1アンタゴニストとTrkBアゴニストの組み合わせを投与する工程を含む方法。

(項目9)

ニューロンの細胞死と関連する疾患または障害を処置する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に有効量のLINGO-1アンタゴニストおよびTrkBアゴニストを投与する工程を含む方法。

10

20

30

40

50

(項目10)

前記細胞を T r k B アゴニストと接触させる工程をさらに含む、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストが可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドを含む、項目1～10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、以下：

- (i) L I N G O Igドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (ii) L I N G O L R R ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (iii) L I N G O 細胞質ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (iv) L I N G O 膜貫通ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (v) 前記 L R R ドメインの C 末端の L I N G O 塩基性領域、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、および
- (vi) (i)～(v)の前記 L I N G O ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体のうちの少なくとも 2 つの組み合わせ、

からなる群より選択される L I N G O - 1 領域を含む、項目11記載の方法。

(項目13)

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、以下：

- (i) L I N G O Igドメイン、
- (ii) L I N G O L R R ドメイン、
- (iii) L I N G O 細胞質ドメイン、
- (iv) L I N G O 膜貫通ドメイン、
- (v) 前記 L R R ドメインの C 末端の L I N G O 塩基性領域、および
- (vi) (i)～(v)の前記 L I N G O - 1 ドメインのうちの少なくとも 2 つの組み合わせ、

からなる群より選択される L I N G O - 1 領域を欠く、項目11記載の方法。

(項目14)

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、L I N G O - 1 膜貫通ドメインおよび L I N G O 細胞質ドメインを欠く、項目13記載の方法。

(項目15)

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが以下：

- (i) L I N G O - 1 L R R ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、
- (ii) 前記 L R R ドメインの C 末端の L I N G O - 1 塩基性領域、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、および
- (iii) L I N G O - 1 免疫グロブリン (Ig) ドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、

を含む、項目11～14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、L I N G O - 1 L R R ドメインの少なくとも一部を含むが、L I N G O - 1 Ig ドメイン、L I N G O - 1 塩基性領域、L I N G O - 1 膜貫通ドメイン、および L I N G O - 1 細胞質ドメインを欠く、項目13または項目14記載の方法。

(項目17)

前記可溶性 L I N G O - 1 ポリペプチドが、以下からなる群より選択されるポリペプチド断片を含む、項目11～15のいずれか一項に記載の方法記載の方法：

- (i) 配列番号：2のアミノ酸1～33；
- (ii) 配列番号：2のアミノ酸1～35；
- (iii) 配列番号：2のアミノ酸34～64；
- (iv) 配列番号：2のアミノ酸36～64；

10

20

30

40

50

( v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 6 6 ~ 8 9 ;  
 ( v i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 9 0 ~ 1 1 3 ;  
 ( v i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 1 4 ~ 1 3 7 ;  
 ( v i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 3 8 ~ 1 6 1 ;  
 ( i x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 6 2 ~ 1 8 5 ;  
 ( x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 8 6 ~ 2 0 9 ;  
 ( x i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 2 1 0 ~ 2 3 3 ;  
 ( x i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 2 3 4 ~ 2 5 7 ;  
 ( x i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 2 5 8 ~ 2 8 1 ;  
 ( x i v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 2 8 2 ~ 3 0 5 ;  
 ( x v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 0 6 ~ 3 2 9 ;  
 ( x v i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 3 0 ~ 3 5 3 ;  
 ( x v i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 6 3 ~ 4 1 6 ;  
 ( x v i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 4 1 7 ~ 4 2 4 ;  
 ( x i x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 4 1 9 ~ 4 9 3 ;  
 ( x x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 4 9 4 ~ 5 5 1 ;  
 ( x x i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 6 4 ;  
 ( x x i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 8 9 ;  
 ( x x i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 1 1 3 ;  
 ( x x i v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 1 3 7 ;  
 ( x x v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 1 6 1 ;  
 ( x x v i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 1 8 5 ;  
 ( x x v i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 2 0 9 ;  
 ( x x v i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 2 3 3 ;  
 ( x x i x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 2 5 7 ;  
 ( x x x x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 2 8 1 ;  
 ( x x x x i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 3 0 5 ;  
 ( x x x x i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 3 2 9 ;  
 ( x x x x i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 3 5 3 ;  
 ( x x x x i v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 4 1 6 ;  
 ( x x x x v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 4 2 4 ;  
 ( x x x x v i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 4 9 3 ;  
 ( x x x x v i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 5 5 1 ;  
 ( x x x x v i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 5 3 1 ;  
 ( i L ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 1 ~ 5 3 2 ;  
 ( L i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 8 9 ;  
 ( L i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 1 1 3 ;  
 ( L i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 1 3 7 ;  
 ( L i v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 1 6 1 ;  
 ( L v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 1 8 5 ;  
 ( L v i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 2 0 9 ;  
 ( L v i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 2 3 3 ;  
 ( L v i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 2 5 7 ;  
 ( L i x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 2 8 1 ;  
 ( L x ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 3 0 5 ;  
 ( L x i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 3 2 9 ;  
 ( L x i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 3 5 3 ;  
 ( L x i i i ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 4 1 6 ;  
 ( L x i v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 4 2 4 ;  
 ( L x v ) 配列番号 : 2 のアミノ酸 3 4 ~ 4 9 3 ;

10

20

30

40

50

( L x v i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 5 1 ;	
( L x x i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 0 ;	
( L x x i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 1 ;	
( L x x i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 2 ;	
( L x x i v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 3 ;	
( L x x v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 4 ;	
( L x x v i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 5 ;	
( L x x v i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 6 ;	
( L x x v i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 7 ;	
( L x x i x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 8 ;	10
( L x x x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 9 ;	
( L x x x i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 0 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 1 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 2 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x i v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 3 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x v i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 5 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x v i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 2 ;	
( L x x x v i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 0 ~ 5 3 1 ;	
( L x x x i x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 1 ~ 5 3 1 ;	20
( L x x x x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 2 ~ 5 3 1 ;	
( L x x x x i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 3 ~ 5 3 1 ;	
( L x x x x i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 5 3 1 ;	
( L x x x x i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 5 ~ 5 3 1 ;	
( L x x x x i v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 1 ;	
( L x x x x v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 8 9 ;	
( L x x x x v i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 1 1 3 ;	
( L x x x x v i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 1 3 7 ;	
( L x x x x v i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 1 6 1 ;	
( L x x x x v c ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 1 8 5 ;	30
( c ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 2 0 9 ;	
( c i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 2 3 3 ;	
( c i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 2 5 7 ;	
( c i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 2 8 1 ;	
( c i v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 3 0 5 ;	
( c v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 3 2 9 ;	
( c v i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 3 5 3 ;	
( c v i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 4 1 6 ;	
( c v i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 4 2 4 ;	
( c i x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 4 9 3 ;	40
( c x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 5 1 ;	
( c x i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 0 ;	
( c x i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 1 ;	
( c x i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 2 ;	
( c x i v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 3 ;	
( c x v ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 4 ;	
( c x v i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 5 ;	
( c x v i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 6 ;	
( c x v i i i ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 7 ;	
( c x i x ) 配列番号：2 のアミノ酸 3 6 ~ 5 3 8 ;	50

(c x x) 配列番号：2のアミノ酸36～539；  
 (c x x i) 前記ポリペプチド断片のいずれかの変異体または誘導体、および  
 (c x x i i) 前記ポリペプチド断片、またはその変異体もしくは誘導体のいずれかのうちの少なくとも2つの組み合わせ。

(項目18)

前記可溶性LINGO-1ポリペプチドが、配列番号：2のアミノ酸34～532または配列番号：2のアミノ酸36～532を含む、項目17記載の方法。

(項目19)

前記可溶性LINGO-1ポリペプチドが、LINGO-1 Igドメイン、またはその断片、変異体、もしくは誘導体を含む、項目11～18のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目20)

前記可溶性LINGO-1ポリペプチドが、配列番号：2のアミノ酸417～493を含む、項目19記載の方法。

(項目21)

前記可溶性LINGO-1ポリペプチドが、非LINGO-1部分をさらに含む、項目11～20のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

前記非LINGO-1部分が、前記可溶性LINGO-1ポリペプチドに融合した異種ポリペプチドである、項目21記載の方法。

20

(項目23)

異種ポリペプチドが、免疫グロブリン断片、血清アルブミン、標的化タンパク質、レボータンパク質、および精製を容易にするタンパク質からなる群より選択される、項目22記載の方法。

(項目24)

前記異種ポリペプチドが免疫グロブリン断片である、項目23記載の方法。

(項目25)

前記免疫グロブリン断片がヒンジおよびFc領域を含む、項目24記載の方法。

(項目26)

前記可溶性LINGO-1ポリペプチドが、ポリマーに結合体化している、項目21～25のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目27)

前記ポリマーが、ポリアルキレンゲリコール、糖ポリマー、およびポリペプチドからなる群より選択される、項目26記載の方法。

(項目28)

前記ポリマーがポリアルキレンゲリコールである、項目27記載の方法。

(項目29)

前記ポリアルキレンゲリコールがポリエチレンゲリコール(PEG)である、項目28記載の方法。

(項目30)

前記可溶性LINGO-1ポリペプチドが、1つ、2つ、3つ、または4つのポリマーに結合体化している、項目26記載の方法。

40

(項目31)

前記ポリマーの総分子量が、5,000Da～100,000Daである、項目30記載の方法。

(項目32)

前記LINGO-1アンタゴニストが、LINGO-1抗体、またはその断片を含む、項目1～10のいずれか一項に記載の方法。

(項目33)

前記LINGO-1抗体またはその断片が、以下からなる群より選択されるポリペプチドから本質的になるエピトープに特異的に結合する、項目32記載の方法：

50

- (i) 配列番号：2のアミノ酸66～89；  
 (ii) 配列番号：2のアミノ酸66～113；  
 (iii) 配列番号：2のアミノ酸66～137；  
 (iv) 配列番号：2のアミノ酸90～113；  
 (v) 配列番号：2のアミノ酸114～137；  
 (vi) 配列番号：2のアミノ酸138～161；  
 (vii) 配列番号：2のアミノ酸162～185；  
 (viii) 配列番号：2のアミノ酸186～209；  
 (ix) 配列番号：2のアミノ酸210～233；  
 (x) 配列番号：2のアミノ酸234～257；  
 (xi) 配列番号：2のアミノ酸258～281；  
 (xii) 配列番号：2のアミノ酸282～305；  
 (xiii) 配列番号：2のアミノ酸306～329；  
 (xiv) 配列番号：2のアミノ酸330～353；  
 (xv) 配列番号：2のアミノ酸34～64；  
 (xvi) 配列番号：2のアミノ酸363～416；  
 (xvii) 前記ポリペプチド断片のいずれかの変異体または誘導体；および  
 (xviii) 前記ポリペプチド断片またはその変異体もしくは誘導体のいずれかのうちの2つ以上の組み合わせ。  
 (項目34) 20  
 前記Lingo-1抗体が、以下からなる群より選択される、項目32記載の方法：201'、3A3、3A6、3B5、1A7、1D5、1G7、2B10、2C11、2F3、3P1B1.1F9、3P1D10.2C3、3P1E11.3B7、3P2C6.3G10.2H7、3P2C9.2G4、3P4A6.1D9、3P4A1.2B9、3P4C2.2D2、3P4C5.1D8、3P4C8.2G9、6P4F4.1D5、6P4F4.1F9、7P1D5.1G9、1B6.4、2C7.2、2D6.1、2F7.3、2H3.2、3C11.1、3E3.1、3H11.2、3G8.1、2B8.1、3B5.230-C12(Li01)、38-D01(Li02)、35-E04(Li03)、36-C09(Li04)、30-A11(Li05)、34-F02(Li06)、29-E07(Li07)、34-G04(Li08)、36-A12(Li09)、28-D02(Li10)、30-B01(Li11)、34-B03(Li12)、Li13、Li32、Li33、Li34、3383(L1a.1)、3495(L1a.2)、3563(L1a.3)、3564(L1a.4)、3565(L1a.5)、3566(L1a.6)、3567(L1a.7)、3568(L1a.8)、3569(L1a.9)、3570(L1a.10)、3571(L1a.11)、3582(L1a.12)、1968(L1a.13)、3011、3012、3013、3418、3422、3562、D05、D07、D08、D10、およびD11。  
 (項目35) 30  
 前記Lingo-1抗体が1A7である、項目34記載の方法。  
 (項目36) 40  
 前記Lingo-1抗体が3B5である、項目34記載の方法。  
 (項目37)  
 前記Lingo-1アンタゴニストがLingo-1アンタゴニストポリヌクレオチドを含む、項目1～10のいずれか一項に記載の方法。  
 (項目38)  
 前記Lingo-1アンタゴニストポリヌクレオチドが以下：  
 (i) アンチセンスポリヌクレオチド；  
 (ii) リボザイム；  
 (iii) 低分子干渉RNA(siRNA)；および  
 (iv) 低分子ヘアピンRNA(shRNA)。  
 50

からなる群より選択される、項目 3 7 記載の方法。

(項目 3 9)

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドが、L I N G O - 1 m R N A のコード部分に相補的な少なくとも 10 塩基を含むアンチセンスポリヌクレオチドである、項目 3 8 記載の方法。

(項目 4 0)

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドがリボザイムである、項目 3 9 記載の方法。

(項目 4 1)

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドが s i R N A である、項目 3 8 記載の方法。

10

(項目 4 2)

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストポリヌクレオチドが s h R N A である、項目 3 8 記載の方法。

(項目 4 3)

前記 s h R N A が、ヌクレオチド配列：U G A U C G U C A U C C U G C U A G A

C U U C A A G A G A G U C U A G C A G G A U G A C G A U C U U U U U U C

(配列番号：3 4) を含む、項目 3 9 記載の方法。

(項目 4 4)

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストがアブタマーである、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 4 5)

前記接触させる工程が、(a) 発現制御配列との作動可能な結合によって前記 L I N G O - 1 アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを前記細胞または前記 C N S ニューロンに導入する工程、および (b) 前記 L I N G O - 1 アンタゴニストを発現させる工程を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記ポリヌクレオチドが、以下：

(a) トランスフェクション；

(b) エレクトロポレーション；

(c) 形質導入；および

(d) 直接的なマイクロインジェクション、

30

からなる群より選択される方法によって前記細胞に導入される、項目 4 5 記載の方法。

(項目 4 7)

前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターとして投与される、項目 4 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記発現ベクターがウイルスベクターである、項目 4 7 記載の方法。

(項目 4 9)

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、エンテロウイルスベクター、ペスキウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、およびパルボウイルスベクターからなる群より選択される、項目 4 8 記載の方法。

40

(項目 5 0)

前記ヘルペスウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクターおよびエプスタイン・バーウイルスベクターからなる群より選択される、項目 4 9 記載の方法。

(項目 5 1)

前記ポックスウイルスベクターがワクシニアウイルスベクターである、項目 4 9 記載の方法。

50

(項目 5 2 )

前記レンチウイルスベクターが p L L 3 . 7 である、項目 4 9 記載の方法。

(項目 5 3 )

前記パルボウイルスベクターがアデノ隨伴ウイルス ( A A V ) である、項目 4 9 記載の方法。

(項目 5 4 )

前記細胞、前記ニューロン、または前記 C N S ニューロンを、以下：

( i ) N G F アンタゴニスト；

( i i ) N g R 1 アンタゴニスト；

( i i i ) T A J アンタゴニスト；および

( i v ) O M g p アンタゴニスト、

からなる群より選択されるさらなるアンタゴニストと接触させる工程をさらに含む、項目 1 ~ 6 または 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5 )

以下：

( i ) N G F アンタゴニスト；

( i i ) N g R 1 アンタゴニスト；

( i i i ) T A J アンタゴニスト；および

( i v ) O M g p アンタゴニスト、

からなる群より選択されるさらなるアンタゴニストを投与する工程をさらに含む、項目 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 6 )

前記 T r k B アゴニストが T r k B アゴニスト化合物である、項目 6 、 8 、 9 、または 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 7 )

前記 T r k B アゴニスト化合物が、 L - 7 8 3 , 2 8 1 、アデノシン、および C G S 2 1 6 8 0 からなる群より選択される、項目 5 6 記載の方法。

(項目 5 8 )

前記 T r k B アゴニストが T r k B アゴニストポリペプチドである、項目 6 、 8 、 9 、または 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 9 )

前記 T r k B アゴニストポリペプチドが、 T r k B リガンド、 T r k B リガンドの断片、 T r k B リガンドの変異体、 T r k B ポリペプチド、 T r k B ポリペプチドの断片、または T r k B ポリペプチドの変異体からなる群より選択される、項目 5 8 記載の方法。

(項目 6 0 )

前記 T r k B アゴニストポリペプチドが B D N F ポリペプチドである、項目 5 9 記載の方法。

(項目 6 1 )

前記 T r k B アゴニストポリペプチドが非 T r k B アゴニスト部分をさらに含む、項目 5 8 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2 )

前記非 T r k B アゴニスト部分が、前記 T r k B アゴニストポリペプチドに融合した異種ポリペプチドである、項目 6 1 記載の方法。

(項目 6 3 )

前記非 T r k B アゴニスト部分が、免疫グロブリン断片、血清アルブミン、標的化タンパク質、レポータータンパク質、および精製を容易にするタンパク質からなる群より選択される、項目 6 1 または 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4 )

前記非 T r k B アゴニスト部分が免疫グロブリン断片である、項目 6 3 記載の方法。

(項目 6 5 )

10

20

30

40

50

前記免疫グロブリン断片がヒンジおよびFc領域を含む、項目63記載の方法。

(項目66)

前記TrkBアゴニストポリペプチドがポリマーに結合体化している、項目61記載の方法。

(項目67)

前記ポリマーが、ポリアルキレンゲリコール、糖ポリマー、およびポリペプチドからなる群より選択される、項目66記載の方法。

(項目68)

前記ポリマーがポリエチレンゲリコール(PEG)である、項目67記載の方法。

(項目69)

前記TrkBアゴニストポリペプチドが、1-アシル-グリセロール誘導体に結合体化している、項目61記載の方法。

(項目70)

前記TrkBアゴニストポリペプチドが、1つ、2つ、3つ、または4つのポリマーに結合体化している、項目66記載の方法。

(項目71)

前記ポリマーの総分子量が、5,000Da～100,000Daである、項目70記載の方法。

(項目72)

前記TrkBアゴニストが、TrkBアゴニスト抗体またはその断片である、項目6、8、9、または10のいずれか一項に記載の方法。

(項目73)

前記TrkBアゴニスト抗体またはその断片が、6E2、7F5、11E1、16E1、17D11、19E12、29D7、またはTrkBモノクローナル抗体からなる群より選択される、項目72記載の方法。

(項目74)

前記TrkBアゴニストがTrkBアゴニストポリヌクレオチドである、項目6、8、9、または10のいずれか一項に記載の方法。

(項目75)

前記TrkBアゴニストポリヌクレオチドが、ニューロトロフィンまたはその断片もしくは変異体をコードする、項目74記載の方法。

(項目76)

前記ニューロトロフィンがBDNFである、項目75記載の方法。

(項目77)

前記TrkBアゴニストがTrkBアゴニストアプタマーである、項目6、8、9、または10のいずれか一項に記載の方法。

(項目78)

前記細胞もしくはニューロンまたは前記CNSニューロンが哺乳動物内にあり、かつ前記接触させる工程が、有効量の前記LINGO-1アントゴニストまたは前記LINGO-1アントゴニストとTrkBアゴニストを、それを必要とする哺乳動物に投与する工程を含む、項目1～6または10のいずれか一項に記載の方法。

(項目79)

前記哺乳動物が、神経変性を伴う疾患、障害、または損傷を有すると診断されている、項目7～10または78のいずれか一項に記載の方法。

(項目80)

前記疾患、障害、または損傷が、縁内障である、項目79記載の方法。

(項目81)

前記TrkBアゴニストまたはLINGO-1アントゴニストの少なくとも1つが、ボーラス注射または慢性的注入によって投与される、項目7～10または78のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 8 2)

前記 T r k B アゴニストまたは L I N G O - 1 アンタゴニストの少なくとも 1 つが、中枢神経系に直接投与される、項目 7 ~ 1 0 または 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 3)

前記 T r k B アゴニストが、T r k B アゴニストポリヌクレオチドまたは T r k B アゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストアプタマーをコードするポリヌクレオチドからなる群より選択される、項目 6 、 8 、 9 、 1 0 、または 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 4)

前記接触させる工程または投与する工程が、( a ) 細胞に前記 T r k B アゴニストポリヌクレオチドまたは前記 T r k B アゴニストをコードするポリヌクレオチドを導入する工程、および( b ) 前記 T r k B アゴニストを発現させる工程を含む、項目 8 3 記載の方法。  
。

(項目 8 5)

前記ポリヌクレオチドが、以下：

( a ) トランスフェクション；

( b ) エレクトロポレーション；

( c ) 形質導入；および

( d ) 直接的なマイクロインジェクション、

からなる群より選択される方法によって前記細胞に導入される、項目 8 4 記載の方法。

20

(項目 8 6)

前記細胞が哺乳動物内にあり、かつ前記導入する工程が、( a ) 前記哺乳動物に前記 T r k B アゴニストポリヌクレオチドまたは前記 T r k B アゴニストをコードする前記ポリヌクレオチドを投与する工程、および( b ) 前記 T r k B アゴニストを発現させる工程を含む、項目 8 4 ~ 8 5 記載のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 7)

前記 T r k B アゴニストポリヌクレオチドまたは前記 T r k B アゴニストをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドを発現することができる培養宿主細胞に投与される、項目 8 3 記載の方法。

(項目 8 8)

前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターとして投与される、項目 8 4 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 8 9)

前記発現ベクターがウイルスベクターである、項目 8 8 記載の方法。

(項目 9 0)

前記ポリヌクレオチドが、前記疾患、障害、もしくは損傷の部位またはその付近で前記哺乳動物に導入される、項目 8 6 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 1)

前記培養宿主細胞が、( a ) レシピエント宿主細胞を、項目 8 3 記載の T r k B アゴニストポリヌクレオチドもしくは T r k B アゴニストをコードするポリヌクレオチドまたは項目 8 8 もしくは項目 8 9 記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトする工程、および( b ) 前記形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を培養する工程を含む方法によって作製される、項目 8 7 記載の方法。

40

(項目 9 2)

前記宿主細胞が処置される前記哺乳動物に由来する、項目 8 7 ~ 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 3)

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、エンテロウイルスベクター、ペスキウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイル

50

スペクター、およびパルボウイルスペクターからなる群より選択される、項目 8 9 記載の方法。

(項目 9 4 )

前記ヘルペスウイルスペクターが、単純ヘルペスウイルスペクターおよびエプスタイン・バーウイルスペクターからなる群より選択される、項目 9 3 記載の方法。

(項目 9 5 )

前記ポックスウイルスペクターがワクシニアウイルスペクターである、項目 9 3 記載の方法。

(項目 9 6 )

前記レンチウイルスペクターが p L L 3 . 7 である、項目 9 3 記載の方法。

10

(項目 9 7 )

前記パルボウイルスペクターがアデノ隨伴ウイルス ( A A V ) である、項目 9 3 記載の方法。

(項目 9 8 )

前記 T r k B アゴニストが、局所投与、眼内投与、硝子体内投与、非経口投与、髄腔内投与、硬膜下投与、皮下投与、またはカプセルインプラントを介するものからなる群より選択される経路によって投与される、項目 8 ~ 1 0 または 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 9 )

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストの少なくとも 1 つが、眼に直接投与される、項目 9 8 記載の方法。

20

(項目 1 0 0 )

前記 L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストの少なくとも 1 つが、カプセルインプラントを介して投与される、項目 9 8 記載の方法。

(項目 1 0 1 )

前記細胞もしくはニューロンまたは前記 C N S ニューロンが感覚ニューロンである、項目 1 ~ 6 または 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 2 )

前記感覚ニューロンが網膜神経節細胞 ( R G C ) である、項目 1 0 1 記載の方法。

(項目 1 0 3 )

30

前記哺乳動物が視神経障害に罹患している、項目 7 ~ 1 0 または 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 4 )

前記視神経障害が緑内障である、項目 1 0 3 記載の方法。

(項目 1 0 5 )

前記感覚ニューロンが有毛細胞である、項目 1 0 1 記載の方法。

(項目 1 0 6 )

前記哺乳動物が、 A L S 、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、糖尿病性神経障害、脳卒中、および聴力損失からなる群より選択される疾患または障害に罹患している、項目 9 または 7 8 記載の方法。

40

(項目 1 0 7 )

前記 L I N G O - 1 抗体が L i 3 3 である、項目 3 4 記載の方法。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0 0 2 5】

【図 1】実施例で使用された 2 週間 ( 図 1 A ) および 4 週間 ( 図 1 B ) の実験的高眼圧モデルの模式的概要。

【図 2】網膜フラットマウント標本の網膜神経節細胞 ( R G C ) を定量するために用いられた区分を示す概略図。 R G C を、  $2 0 0 \times 2 0 0 \mu m^2$  の接眼レンズグリッド下で、各

50

4半分の正中線に沿って、視神経円板からその境界まで500μm間隔で定量した。

【図3】レーザー光凝固前（上）およびその直後（下）の房水静脈の画像。

【図4】正常なラット網膜および損傷したラット網膜の切片におけるLINGO-1発現。

【図5】正常なラット網膜および損傷したラット網膜におけるLINGO-1のウエスタンプロットならびにその定量。

【図6】PBS、対照タンパク質、抗LINGO-1抗体（1A7）、または可溶性LINGO-1（LINGO-1-Fc）で処置した左眼（正常）および右眼（損傷）における眼圧の測定。

【図7】損傷し、PBS、対照タンパク質、1A7、またはLINGO-1-Fcで処置した2週間後および4週間後に生存しているRGCの数（図7A）および密度（図7B）の定量。

【図8】PBS、LINGO-1-Fc、または1A7で処置した正常動物および損傷動物におけるRGC（図8A）および内網状層細胞（図8B）の微細構造の画像。

【図9】インビトロで増殖し、かつ対照タンパク質、LINGO-1-Fc、BDNFと対照タンパク質、またはBDNFとLINGO-1-Fcにさらされた生存しているRGCの定量。

【図10】正常網膜、処置されていない損傷網膜、およびPBS、LINGO-1-Fc、または1A7で処置した損傷網膜におけるBDNFのウエスタンプロットならびにその定量。

【図11】PBS、抗BDNF抗体、1A7、1A7と抗BDNF抗体、LINGO-1-Fc、またはLINGO-1-Fcと抗BDNF抗体で処置した損傷眼におけるRGCの数（図11A）および密度（図11B）の定量。

【図12】TrkBとLINGO-1とを共発現する293細胞からの抗LINGO-1免疫沈降物におけるTrkBおよびLINGO-1のウエスタンプロット（図12A）。LINGO-1発現ありおよび発現なし、ならびにBDNF刺激ありおよび刺激なしの細胞からの抗TrkB免疫沈降物におけるホスホTrkB、トータルTrkB、およびLINGO-1のウエスタンプロットならびにその定量（図12B）。

【図13】正常網膜および損傷網膜のライセートからの抗TrkB、抗LINGO-1、および抗対照タンパク質による免疫沈降物におけるLINGO-1のウエスタンプロット（図13A）。網膜切片におけるLINGO-1およびホスホTrkBの免疫染色（図13B）。

【図14】正常眼およびPBS、LINGO-1-Fc、または1A7で処置した損傷眼におけるホスホTrkBおよびトータルTrkBのウエスタンプロットならびにその定量（図14A）。正常眼、およびBDNF、BDNFとLINGO-1-Fc、またはBDNFと1A7で処置した損傷眼におけるホスホTrkBおよびトータルTrkBのウエスタンプロット（図14B）。

【図15】正常眼およびLINGO-1-Fc処置ありまたは処置なしの損傷眼におけるホスホAktおよびトータルAktのウエスタンプロットならびにその定量。

【図16】網膜切片におけるpAkt免疫染色。

【図17】PBS、LY294002（PI3K/Akt経路の阻害剤）、LINGO-1-Fc、またはLY294002とLINGO-1-Fcで処置した損傷眼におけるRGCの数（図17A）および密度（図17B）の定量。

【図18】LINGO-1-FcとLY294002またはLY294002単独で処置した動物の左眼（正常）および右目（損傷）における眼圧の測定。

【図19】正常眼ならびにPBS、LINGO-1-Fc、および1A7で処置した損傷眼におけるホスホJNK-2、ホスホJNK-1、トータルJNK-2、およびトータルJNK-1のウエスタンプロットならびにその定量。

【図20】提案される分子機構を示す概略図。眼圧の上昇はLINGO-1とBDNF両方のレベルの増大を引き起こす。BDNFはTrkBのリン酸化および細胞生存シグナル

10

20

30

40

50

伝達経路の活性化を促進するが、L I N G O - 1はこの活性を阻害する。L I N G O - 1アンタゴニスト（例えば、1 A 7またはL I N G O - 1 - F c）は、B D N Fシグナル伝達に応答したT r k Bリン酸化を妨げるL I N G O - 1の能力に干渉することによって細胞生存を促進する。

【図21】正常眼およびP B SまたはL I N G O - 1 - F cで処置した損傷眼におけるG T P - R h o AおよびトータルR h o Aのウエスタンプロットならびにその定量。

【発明を実施するための形態】

【0026】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。不一致がある場合、定義を含む本出願が優先する。文脈上別途要求されない限り、単数形の用語は、複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。本明細書で言及される全ての出版物、特許、およびその他の参考文献は、あたかも各々の個々の出版物または特許出願が参照により組み入れられることが具体的かつ個別的に示されているかのように全ての目的のためにその全体が参照により組み入れられる。

【0027】

本明細書で記載される方法および材料と同様または同等の方法および材料を本発明の実施または試行で使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。材料、方法、および実施例は、実例であるに過ぎず、限定的であることが意図されない。本発明のその他の特色および利点は、詳細な説明および特許請求の範囲から明白である。

【0028】

本発明をさらに定義するために、以下の用語および定義を提供する。

【0029】

用語「1つの（a）」または「1つの（a n）」実体は、1つ以上のその実体を指すということに留意すべきである。例えば、「1つの免疫グロブリン分子」は、1つ以上の免疫グロブリン分子を表すと理解される。そのようなものとして、用語「1つの（a）」（または「1つの（a n）」）、「1つ以上の」、および「少なくとも1つの」は、本明細書で互換的に使用することができる。

【0030】

本明細書および特許請求の範囲の全体を通じて、語「含む（comprise）」、または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」などの変形は、任意の列挙された整数または整数の群を含むことを示すが、任意のその他の整数または整数の群を除外することは示さない。用語「含む（comprising）」は、包括的であるかまたは制限がなく、追加の、列挙されていない要素または方法工程を除外しない。語句「本質的に～からなる」は、指定の材料または工程、ならびに請求された発明の基本的な特徴および新規な特徴に大きく影響を与えない材料または工程を含むことを示す。本明細書で使用される場合、用語「～からなる」は、示された材料または方法工程のみを指す。

【0031】

本明細書で使用される場合、「治療的有効量」とは、所望の治療結果を達成するのに必要な投薬量および必要な期間で、有効な量を指す。治療結果は、例えば、症状の軽減、生存の延長、運動性の向上などであり得る。治療結果は、「治癒」である必要はない。

【0032】

本明細書で使用される場合、用語「処置（treatment）」または「処置する（treating）」は、疾患の症状を改善または軽減させるために動物に薬剤を投与することを指す。さらに、用語「処置」または「処置する」は、疾患の進行を防ぐために動物に薬剤を投与することを指す。

【0033】

本明細書で使用される場合、「予防的有効量」とは、所望の予防結果を達成するのに必

10

20

30

40

50

要な投薬量および必要な期間で、有効な量を指す。典型的には、疾患前または疾患の早期段階では、予防用量が対象に使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量よりも少ない。

#### 【0034】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」は、全長 c D N A 配列の核酸配列を含有することができ、非翻訳 5' 配列および 3' 配列、コード領域、またはならびにこの核酸配列の断片もしくは変異体を含んでもよい。ポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成されることができ、無修飾の R N A もしくは D N A または修飾された R N A もしくは D N A であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖 D N A および二本鎖 D N A 、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物である D N A 、一本鎖 R N A および二本鎖 R N A 、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域の混合物である R N A 、 D N A および R N A を含むハイブリッド分子（一本鎖、または、より典型的には二本鎖、もしくは一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であり得る）から構成されることができる。さらに、ポリヌクレオチドは、 R N A もしくは D N A または R N A と D N A の両方を含む三本鎖領域から構成されることができる。ポリヌクレオチドは、1 つ以上の修飾塩基または安定性のためにもしくはその他の理由のために修飾された D N A 骨格もしくは R N A 骨格も含んでもよい。「修飾」塩基としては、例えば、トリチル化塩基および非正規塩基（例えば、イノシン）が挙げられる。種々の修飾が、 D N A および R N A に対してなされ得る。したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学修飾、酵素修飾、または代謝修飾された形態を包含する。

10

20

#### 【0035】

本発明において、「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって互いに接続されたアミノ酸、すなわち、ペプチド同配体から構成されることができ、遺伝子にコードされた 20 個のアミノ酸以外のアミノ酸（例えば、非天然アミノ酸）を含んでもよい。本発明を説明するのに使用される場合、用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は、互換的に使用されてもよい。本発明のポリペプチドは、自然なプロセス（例えば、翻訳後処理）か、または当技術分野で周知である化学修飾技術のいずれかによって修飾されてもよい。このような修飾は、基礎的な教科書およびより詳細な論文、ならびに大量の研究文献に十分記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのいかなる場所でも生じることができる。同じ種類の修飾が、所与のポリペプチドのいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在し得るということが理解されよう。また、所与のポリペプチドは、多種類の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として、分岐状であってもよく、分岐の有無にかかわらず、環状であってもよい。環状、分岐状、および分岐環状のポリペプチドは、翻訳後の自然なプロセスから結果として得られてもよく、または合成法によって作製されてもよい。修飾としては、アセチル化、アシル化、 A D P - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 - カルボキシル化、グリコシル化、 G P I アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解処理、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質への転移 R N A 媒介型のアミノ酸付加（例えば、アルギニン化）、およびユビキチン化が挙げられる。（例えば、 Proteins - Structure And Molecular Properties , 第 2 版 , T . E . Creighton , W . H . Freeman and Company , New York (1993) ; Posttranslational Covalent Modification of Proteins , B . C . Johnson , 編 , Academic Press , New York , 1 - 12 頁 (1983) ; Seifter et al . , Meth Enzymol 182 : 626 - 6

30

40

50

46 ( 1990 ) ; Rattan et al. , Ann NY Acad Sci  
663 : 48 - 62 ( 1992 ) を参照のこと。 )

本発明の L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストに言及する場合、用語「断片」、「変異体」、「誘導体」、および「類似体」は、 L I N G O - 1 活性を阻害するかまたは T r k B 活性を促進する少なくともいくらかの能力を保持する任意のアンタゴニスト分子またはアゴニスト分子を含む。 L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストがなおその機能を果たす限り、本明細書に記載される L I N G O - 1 アンタゴニストおよび T r k B アゴニストには、断片、変異体、または誘導体分子がその中に含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。本発明の L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドまたは T r k B アゴニストポリペプチドには、 L I N G O - 1 または T r k B アゴニストのタンパク質分解性断片、欠失断片、および特に、動物に送達されたときに作用の部位により容易に到達する断片が含まれてもよい。ポリペプチド断片には、ネイティブポリペプチドの抗原性または免疫原性エピトープ（線状および三次元エピトープを含む）を含むポリペプチドの任意の部分がさらに含まれる。本発明の L I N G O - 1 ポリペプチドまたは T r k B アゴニストポリペプチドは、変異体 L I N G O - 1 または T r k B アゴニスト領域（上記のような断片を含む）、またアミノ酸の置換、欠失、または挿入のために改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでもよい。アレル変異体などの変異体は自然に生じてもよい。「アレル変異体」によって、生物の染色体上の所与の遺伝子座を占める別形態の遺伝子が意図される。Genes II , Lewin , B. , 編 , John Wiley & Sons , New York ( 1985 )。非天然の変異体が、当業者に公知の突然変異導入技術を用いて產生され得る。 L I N G O - 1 または T r k B アゴニストポリペプチドは、保存的もしくは非保存的なアミノ酸の置換、欠失、または付加を含んでもよい。本発明の L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストには、誘導体分子も含まれてよい。例えば、本発明の L I N G O - 1 または T r k B アゴニストポリペプチドには、ネイティブポリペプチドには見られない付加的な特色を示すように改変された L I N G O - 1 または T r k B アゴニスト領域が含まれてもよい。例として、融合タンパク質およびタンパク質結合体が挙げられる。

#### 【 0036 】

本発明において、「ポリペプチド断片」とは、 L I N G O - 1 または T r k B アゴニストポリペプチドの短いアミノ酸配列を指す。タンパク質断片は、「独立している」か、またはこの断片がその一部もしくは領域を形成するより大きいポリペプチドの中に含まれていてもよい。本発明のポリペプチド断片の代表例としては、例えば、約 5 アミノ酸長、約 10 アミノ酸長、約 15 アミノ酸長、約 20 アミノ酸長、約 30 アミノ酸長、約 40 アミノ酸長、約 50 アミノ酸長、約 60 アミノ酸長、約 70 アミノ酸長、約 80 アミノ酸長、約 90 アミノ酸長、および約 100 アミノ酸長以上を含む断片が挙げられる。

#### 【 0037 】

ある実施形態において、本明細書に開示される方法で使用される L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストは、「抗体」分子もしくは「免疫グロブリン」分子、またはそれらの免疫特異性断片であって、例えば、天然の抗体もしくは免疫グロブリン分子、または抗体分子と同様の様式で抗原に結合する改変抗体分子もしくは断片である。用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、本明細書で互換的に使用される。さらに、本発明の方法で使用される免疫グロブリン分子は、「免疫特異的」分子または「抗原特異的」分子または「抗原結合性」分子とも記載され、抗体分子およびその断片を指すよう互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常は、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系の基本的な免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、 Harlow et al. , Antibodies: A Laboratory Manual , ( Cold Spring Harbor Laboratory Press , 第 2 版 1988 ) を参照されたい。

#### 【 0038 】

10

20

30

40

50

以下により詳細に議論されるように、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に区別することができる5つの広範なクラスのポリペプチドを含む。5つのクラスは全て、明確に本発明の範囲内であり、以下の議論は、一般に、IgGクラスの免疫グロブリン分子に対するものである。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一な軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000~70,000の2つの同一な重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、典型的には、「Y」字の形状でジスルフィド結合により接続されており、そこでは、軽鎖が重鎖を腕木として支え(braeckete)、それが「Y」字の口の部分から始まって可変領域を通して続いている。

#### 【0039】

軽鎖と重鎖はともに、構造的および機能的に相同な領域に分けられる。用語「定常」および「可変」は、機能に関して用いられる。この点について、軽( $V_L$ )鎖部分と重( $V_H$ )鎖部分の両方の可変ドメインが抗原認識および抗原特異性を決定するということが理解されよう。逆に、軽鎖の定常ドメイン( $C_L$ )および重鎖の定常ドメイン( $C_H1$ 、 $C_H2$ 、または $C_H3$ )は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの付番は、抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠くなるにつれて増大する。N末端部分は可変領域であり、C末端部分に定常領域がある。 $C_H3$ ドメインおよび $C_L$ ドメインは実際に、それぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。

#### 【0040】

軽鎖は、カッパまたはラムダ(、)のいずれかとして分類される。各重鎖のクラスは、軽鎖または軽鎖のいずれかと結合し得る。通常、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子改変宿主細胞のいずれかで產生されるときに、軽鎖と重鎖は互いに共有結合し、2つの重鎖の「尾」部は、共有結合的なジスルフィド結合または非共有結合によって互いに結合する。重鎖において、アミノ酸配列は、Y字形の二股の端のN末端から各鎖の最後尾のC末端まで続いている。重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン(、 $\mu$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ )として分類され、それらの中にいくつかのサブクラス(例えば、1~4)があるということを当業者は理解するであろう。抗体の「クラス」をそれぞれ、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEと決定するのは、この鎖の性質である。免疫グロブリンのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>など)は、十分に特徴解析されており、機能特化を付与することが知られている。これらのクラスおよびアイソタイプの各々の修飾バージョンは、本開示を考慮すれば当業者に容易に識別され、したがって、本発明の範囲内である。

#### 【0041】

上で示されているように、可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、このエピトープに特異的に結合するのを可能にする。すなわち、抗体の $V_L$ ドメインと $V_H$ ドメインが組み合わさって、三次元の抗原結合部位を規定する可変領域が形成される。この4つの部分からなる抗体構造により、Y字の各腕の端に存在する抗原結合部位が形成される。より具体的には、抗原結合部位は、 $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖の各々の上の3つの相補性決定領域(CDR)によって規定される。いくつかの例(例えば、ラクダ科の種に由来するかまたはラクダ科の免疫グロブリンを基にして改変されたある種の免疫グロブリン分子)において、完全な免疫グロブリン分子が軽鎖を有さず、重鎖のみからなる場合がある。例えば、Hammers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993)を参照されたい。

#### 【0042】

天然抗体において、各抗原結合ドメインに存在する6つの「相補性決定領域」または「CDR」は、抗体が水性環境で3次元の立体配置を取るときに抗原結合ドメインを形成するよう特異的に位置付けられる、短い、非連続的なアミノ酸配列である。抗原結合ドメインの残りのアミノ酸(「フレームワーク」領域と呼ばれる)は、分子間変動性をあまり示さない。フレームワーク領域は、主としてシート立体構造を取り、CDRは、-シ

10

20

30

40

50

ート構造に接続し、時には、-シート構造の一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合的な相互作用によってCDRを正しい向きに位置付ける骨格を形成するように作用する。位置付けられたCDRによって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を規定する。この相補的表面は、抗体がそのコグネートなエピトープに非共有結合するのを促進する。正確に規定されているので、CDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸は、それぞれ、任意の所与の重鎖または軽鎖の可変領域について、当業者により容易に同定することができる(「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-911 (1987)を参照されたく、これらはその全体が参考により本明細書に組み入れられる)。

#### 【0043】

しかしながら、ラクダ科の種では、 $V_H$ Hと呼ばれる重鎖可変領域が完全なCDRを形成する。ラクダ科の $V_H$ H可変領域と従来抗体( $V_H$ )由来の可変領域の間の主な相違としては、(a) $V_H$ Hの対応する領域と比較して、 $V_H$ の軽鎖接触表面のアミノ酸がより疎水性であること、(b) $V_H$ HのCDR3がより長いこと、および(c) $V_H$ HのCDR1とCDR3の間のジスルフィド結合が高い頻度で出現することが挙げられる。

#### 【0044】

1つの実施形態において、本発明の方法で使用される抗原結合分子は、抗体分子の少なくとも1つの重鎖または軽鎖CDRを含む。別の実施形態において、本発明の方法で使用される抗原結合分子は、1つ以上の抗体分子由来の少なくとも2つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の方法で使用される抗原結合分子は、1つ以上の抗体分子由来の少なくとも3つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の方法で使用される抗原結合分子は、1つ以上の抗体分子由来の少なくとも4つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の方法で使用される抗原結合分子は、1つ以上の抗体分子由来の少なくとも5つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の方法で使用される抗原結合分子は、1つ以上の抗体分子由来の少なくとも6つのCDRを含む。本抗原結合分子に含めることができる少なくとも1つのCDRを含む例示的な抗体分子は、当技術分野で公知であり、例示的な分子が本明細書に記載されている。

#### 【0045】

本発明の方法で使用される抗体またはその免疫特異性断片としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、靈長類化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片(例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')2)、Fd、Fv、単鎖Fv(scfv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdfv)、VLドメインまたはVHドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリーによって產生された断片、ならびに抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本明細書に開示される結合分子に対する抗Id抗体を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。scfv分子は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。本発明の免疫グロブリン分子または抗体分子は、任意の種類(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、およびIgA<sub>2</sub>)、またはサブクラスの免疫グロブリン分子であることができる。

#### 【0046】

抗体断片(単鎖抗体を含む)は、単独でまたは以下のもの:ヒンジ領域、重鎖のC<sub>H</sub>1ドメイン、C<sub>H</sub>2ドメイン、およびC<sub>H</sub>3ドメイン、もしくは軽鎖のC<sub>L</sub>の全体もしくは一部と組み合わせて、可変領域を含んでもよい。可変領域とヒンジ領域、C<sub>H</sub>1ドメイン、C<sub>H</sub>2ドメイン、もしくはC<sub>H</sub>3ドメイン、またはC<sub>L</sub>ドメインとの任意の組み合わせをも含む抗原結合断片もまた、本発明に含まれる。本明細書に開示される方法で使用され

10

20

30

40

50

る抗体またはその免疫特異的断片は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源に由来するものであってもよい。抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、ロバ抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、モルモット抗体、ラクダ抗体、ラマ抗体、ウマ抗体、またはニワトリ抗体であることができる。別の実施形態において、可変領域は、コンドリクトイド (condrolecthoid) 起源 (例えば、サメ由来) であってもよい。本明細書で使用される場合、「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体または1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックであり以下、および例えば、Kucherlapatilによって米国特許第5,939,598号に記載されているように、内因性の免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体が含まれる。このような抗体には、1つ以上のアミノ酸置換を含む変異体も含まれる。10

#### 【0047】

本明細書で使用される場合、用語「重鎖部分」には、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。重鎖部分を含むポリペプチドは、C<sub>H</sub>1ドメイン、ヒンジ (例えば、上部、中央部、および/もしくは下部のヒンジ領域) ドメイン、C<sub>H</sub>2ドメイン、C<sub>H</sub>3ドメイン、またはそれらの変異体もしくは断片の少なくとも1つが含まれる。例えば、重鎖部分は、C<sub>H</sub>1ドメインを含むポリペプチド鎖；C<sub>H</sub>1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC<sub>H</sub>2ドメインを含むポリペプチド鎖；C<sub>H</sub>1ドメインおよびC<sub>H</sub>3ドメインを含むポリペプチド鎖；C<sub>H</sub>1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC<sub>H</sub>3ドメインを含むポリペプチド鎖、または、C<sub>H</sub>1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、C<sub>H</sub>2ドメイン、およびC<sub>H</sub>3ドメインを含むポリペプチド鎖を含んでもよい。また、重鎖部分には、C<sub>H</sub>3ドメインを含むポリペプチド鎖を含むポリペプチドが含まれてもよい。さらに、本発明で使用される結合ポリペプチドは、C<sub>H</sub>2ドメインの少なくとも一部 (例えば、C<sub>H</sub>2ドメインの全体または一部) を欠いていてもよい。上で示されているように、これらのドメイン (例えば、重鎖部分) を、天然に存在する免疫グロブリン分子とはアミノ酸配列が異なるように修飾し得るということが当業者によって理解されるであろう。20

#### 【0048】

本明細書に開示される方法で使用されるある種のLINGO-1アントゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片、またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片において、多量体の1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体の第2のポリペプチド鎖上の重鎖部分と同一である。あるいは、本発明の方法で使用される重鎖部分を含む单量体は同一ではない。例えば、各々の单量体が異なる標的結合部位を含み、例えば、二重特異性抗体を形成してもよい。30

#### 【0049】

本明細書に開示される方法で使用される結合ポリペプチドの重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、IgG<sub>1</sub>分子に由来するC<sub>H</sub>1ドメインとIgG<sub>3</sub>分子に由来するヒンジ領域とを含んでもよい。別の例において、重鎖部分は、一部IgG<sub>1</sub>分子に由来し、一部IgG<sub>3</sub>分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例においては、重鎖部分は、一部IgG<sub>1</sub>分子に由来し、一部IgG<sub>4</sub>分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。40

#### 【0050】

本明細書で使用される場合、用語「軽鎖部分」には、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。軽鎖部分は、V<sub>L</sub>ドメインまたはC<sub>L</sub>ドメインの少なくとも1つを含むことができる。

#### 【0051】

免疫グロブリンに由来するポリペプチド (例えば、免疫グロブリンの重鎖部分または軽鎖部分) の非天然の変異体をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸の置換、付加、または欠失が、コードされるタンパク質に導入されるように、免疫グロブリンのヌクレオチド配列の中に1つ以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を導入する50

ことによって作り出すことができる。突然変異を標準的な技術（例えば、部位特異的な突然変異導入およびPCRを介する突然変異導入）によって導入してもよい。保存的なアミノ酸置換を、1つ以上の非必須アミノ酸残基で行なうことができる。

#### 【0052】

また、本明細書に開示される方法で使用される抗体またはその免疫特異的断片は、本発明のポリペプチドに対するそれらの結合親和性について記載または特定される場合がある。いくつかの実施形態において、結合親和性は、 $5 \times 10^{-2}$  M、 $10^{-2}$  M、 $5 \times 10^{-3}$  M、 $10^{-3}$  M、 $5 \times 10^{-4}$  M、 $10^{-4}$  M、 $5 \times 10^{-5}$  M、 $10^{-5}$  M、 $5 \times 10^{-6}$  M、 $10^{-6}$  M、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M、 $10^{-8}$  M、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、 $10^{-13}$  M、 $5 \times 10^{-14}$  M、 $10^{-14}$  M、 $5 \times 10^{-15}$  M、または $10^{-15}$  M未満の解離定数すなわち $K_d$ を有する結合親和性である。  
10

#### 【0053】

本明細書に開示される方法で使用される抗体またはその免疫特異的断片は、本明細書に記載されるようなLINGO-1のアンタゴニストまたはTrkBのアゴニストとして作用する。例えば、本発明の方法で使用される抗体は、LINGO-1ポリペプチドの抑制的活性を阻止もしくは阻害するアンタゴニストとして、またはTrkBの活性を促進するアゴニストとして機能し得る。

#### 【0054】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、免疫反応性の領域または部位が第1の種から得られるかまたは第1の種に由来し、定常領域（インタクトであるか、部分的であるか、または本発明に従って修飾されたものであり得る）が第2の種から得られる、任意の抗体を意味するように適用される。ある実施形態において、標的結合領域または標的結合部位は、非ヒト源（例えば、マウスまたは靈長類）由来であり、定常領域はヒトのものである。  
20

#### 【0055】

本明細書で使用される場合、用語「改変抗体」は、重鎖もしくは軽鎖のいずれか、またはその両方の可変ドメインが、公知の特異性の抗体に由来する1つ以上のCDRの少なくとも部分的な置き換えによって改変されており、必要である場合には、部分的なフレームワーク領域の置き換えおよび配列の変化によって改変されている抗体を指す。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはさらには同じサブクラスの抗体に由来し得るが、CDRが、異なるクラスの抗体または異なる種由来の抗体に由来することが想定される。公知の特異性の非ヒト抗体に由来する1つ以上の「ドナー」CDRが、ヒトの重鎖または軽鎖のフレームワーク領域に接合されている改変抗体を、本明細書では「ヒト化抗体」と呼ぶ。1つの可変ドメインの抗原結合能を別のものに移すために、CDRの全てをドナー可変領域由来の完全なCDRと置き換えることが、必ずしも必要ではない場合がある。むしろ、標的結合部位の活性を維持するために必要である残基を移すことだけが必要である場合がある。例えば、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号に示されている説明を前提とすると、日常的な実験を行なうことによるか、または試行錯誤の試験によるかのいずれかによって、機能的な改変抗体またはヒト化抗体を得ることは、十分に当業者の能力の範囲内であろう。  
30  
40

#### 【0056】

本明細書で使用される場合、用語「連結された」、「融合された」、または「融合」は、互換的に使用される。これらの用語は、化学的結合または組換え手段を含む何らかの手段によって、さらに2つの要素または成分を1つに接続することを指す。「インフレームでの融合」とは、もとのORFの正確なリーディングフレームを維持する形で、2つ以上のオープンリーディングフレーム（ORF）を接続して、連続するより長いORFを形成させることを指す。したがって、得られる組換え融合タンパク質は、もとのORFによっ  
50

てコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含む単一のタンパク質である（これらのセグメントは、通常、天然ではそのように接続されていない）。したがって、リーディングフレームは、融合されたセグメント全体にわたって連続させられるが、セグメントは、例えば、インフレームのリンカー配列によって、物理的または空間的に分離させ得る。

## 【0057】

ポリペプチドの文脈において、「線状配列」または「配列」とは、アミノ末端からカルボキシル末端への方向のポリペプチド中のアミノ酸の順序であり、この場合、配列中で互いに隣接する残基が、ポリペプチドの一次構造において連続している。

## 【0058】

本明細書で使用される場合の用語「発現」は、DNA配列が、生化学物質（例えば、RNAまたはポリペプチド）を産生するために使用されるプロセスを指す。このプロセスには、遺伝子ノックダウン、および一過性発現と安定発現の両方を含むが、これらに限定されない、細胞内の遺伝子の機能的存在の任意の発現が含まれる。これには、遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)、転写RNA(tRNA)、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、または任意のその他のRNA産物への転写、およびそのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳が含まれるが、これらに限定されない。最終的な所望産物が生化学物質である場合、発現には、その生化学物質および任意の前駆体の生成が含まれる。

## 【0059】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」によって、診断、予後診断、または治療が所望される任意の対象、特に、哺乳動物対象が意味される。哺乳動物対象としては、ヒト、家畜動物、飼育動物、動物園の動物、競技用動物、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ウサギ、ラット、マウス）；霊長類（例えば、類人猿、サル、オランウータン、およびチンパンジー）；イヌ科（例えば、キツネおよびオオカミ）；ネコ科（例えば、ライオン、およびトラ）；ウマ科（例えば、ウマ、ロバ、およびシマウマ）；食用動物（例えば、ウシ、ブタ、およびヒツジ）；有蹄動物（例えば、シカおよびキリン）；クマなどが挙げられるが、これらに限定はされない。ある実施形態において、哺乳動物はヒト対象である。

## 【0060】

用語「RNA干渉」または「RNAi」は、siRNAによる遺伝子発現のサイレンシングまたは減少を指す。これは、その二重鎖領域がサイレンシングされる遺伝子の配列と相同であるsiRNAによって開始される、動物および植物における配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスである。遺伝子は、生物にとって内因性であっても、または外因性であってもよく、染色体に組み込まれて存在していても、またはゲノムに組み込まれないトランスフェクションベクター中に存在していてもよい。遺伝子の発現は、完全に阻害されるか、または部分的に阻害されるかのいずれかである。また、RNAiが標的RNAの機能を阻害すると考えてもよい。標的RNAの機能は、完全なものであっても、または部分的なものであってもよい。

## 【0061】

## LINGO-1 (Sp35/LRRN6)

天然のヒトLINGO-1は、614アミノ酸（配列番号：2）からなるグリコシル化された神経系特異的タンパク質である。ヒトLINGO-1ポリペプチドは、14個のロイシンリッチリピート（N末端およびC末端のキャップを含む）からなるLRRドメイン、Igドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む。細胞質ドメインは、カノニカルなチロシンリン酸化部位を含む。さらに、天然のLINGO-1タンパク質は、シグナル配列、LRRCTドメインとIgドメインの間の短い塩基性領域、およびIgドメインと細胞質ドメインの間の膜貫通ドメインを含む。ヒトLINGO-1遺伝子は、ほかに取り得る翻訳開始コドンを含み、そのため、6つの付加的なアミノ酸（MQVSKR；配列番号：7）がLINGO-1シグナル配列のN末端に存在する場合も、または存在

10

20

30

40

50

しない場合もある。表1に、配列番号：2の配列を基に、アミノ酸残基の番号に従って、L I N G O - 1のドメインおよびその他の領域を記載する。当業者が理解するように、以下に記載されたドメインの最初と最後の残基は、ドメインを決定するのに使用されるコンピュータモデリングプログラムまたは方法によって異なり得る。L I N G O - 1ポリペプチドは、P C T公開WO 2004/085648号および米国公開出願第2006/0009388 A1号により詳細に特徴解析されており、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0062】

【表1】

ドメインまたは領域	最初の残基	最後の残基
シグナル配列	1	33 または 35
LRRNT	34 または 36	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209
LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	414 または 416
塩基性	415 または 417	424
Ig	419	493
接続配列	494	551
膜貫通	552	576
細胞質	577	614

10

20

30

40

L I N G O - 1の組織分布および発生段階での発現はヒトおよびラットで研究されている。L I N G O - 1の生物学は、実験動物（ラット）モデルで研究されている。ノーザンプロットおよび免疫組織化学的染色によって決定されるように、ラットL I N G O - 1の発現は、神経系ニューロンおよび脳のオリゴデンドロサイトに局在する。ラットL I N G O - 1 mRNA発現のレベルは、発生的に調節されており、生後すぐに、すなわち、出生後約1日で最大になる。ラットの脊髄切断損傷モデルにおいて、R T - P C Rで決定されるように、L I N G O - 1は損傷部位で上方調節されている。さらに、L I N G O - 1は、N o g o 6 6 受容体（N o g o受容体）と相互作用することが示されている。例えば、国際特許出願第P C T / U S 2004/00832号、P C T公開WO 2004/08564号を参照されたい。

【0063】

50

L I N G O - 1 は、N o g o 受容体 - 1 - p 7 5 - T a j ニューロトロフィン受容体複合体のさらなる構成成分である。M i e t a l . , N a t N e u r o s c i . 7 : 2 2 1 - 2 2 8 ( 2 0 0 4 ) を参照されたく、これは参考により本明細書に組み入れられる。N o g o 受容体 1 とは異なり、L I N G O - 1 遺伝子発現は、脊髄の成体神経細胞が外傷性損傷にさらされたときに増大し、L I N G O - 1 がC N S の神経学的機能にとって重要な生物学的役割を有することを示唆している（同上）。

## 【 0 0 6 4 】

全長ヒト L I N G O - 1 分子のスクレオチド配列は以下の通りである。

## 【 0 0 6 5 】

## 【 数 1 】

10

ATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCCT  
 CCTCCTGCTGGTGTGGCTCAGTGTGTCAGGCTCGGCCACGGCTGCCCGCCCCGCT  
 GCGAGTGTCCGCCAGGACCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTGTGGCAGTC  
 CCCGAGGGCATTCCCCACCGAGACGCCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCGCATAAAAC  
 GCTCAACCAGGACGAGTGTGCCAGCTTCCCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGAGA  
 ACATCGTGAGCGCGTGGAGCCGGCGCTTCAACAAACCTCTCAACACCTCCGGACGCTG  
 GGTCTCCGAGCAACGCCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCTCAGCAGCAA  
 CCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAGATTGTTATCCTGCTGGACTACATGTTTC  
 AGGACCTGTACAACCTCAAGTCAGTCAACTGGAGGTTGGCAGAACATGACCTCGTCTACATCTCT  
 CACCGCGCCTTCAGCGGCCTCAACAGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAACATGCAACCT  
 GACCTCCATCCCCACCGAGGCCTGTCCCACCTGCACGCCCTCATCGTCCTGAGGCTCC  
 GGCACCTCAACATCAATGCCATCCGGACTACTCCTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAG  
 GTCTTGGAGATCTCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAACTGCCTCTACGG  
 CCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCCCTACCTGG  
 CCTGCGCCACCTAGTCTATCTCGCTTCCTCAACCTCTCAACACCCATCAGCACC  
 ATTGAGGGCTCCATGTTGATGAGCTGCTCCGGCTGCAGGAGATCCAGCTGGTGGCGG  
 GCAGCTGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCCTCCGCGCCTCAACTACCTGCCGTGCTCA  
 ATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCAACTGGAGGAATCAGTCTTCACTCGGTGGCAAC  
 CTGGAGACACTCATCCTGGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTCGGCTCTGTGGGT  
 GTTCCGGCGCCGCTGGCGCTCAACTCAACCGGAGCAGCCCACGTGCCACGCCCG  
 AGTTTGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCTGATGTGCTACTGCCAACTACTTC  
 ACCTGCGCCCGCGCCGCACTCCGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTGTGGACGAGGG  
 CCACACGGTGCAGTTGTGCCGGCGATGGCGACCCGCCGCCATCCTCTGGC  
 TCTCACCCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCAATGGCGGCTCACAGTCTTCCCT  
 GATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCAGGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCAT  
 CGCGGCCAACGCGGGCGCAACGACTCCATGCCGCCACCTGCATGTGCCAGCTACT  
 CGCCCGACTGCCCATCAGCCAACAAGACCTCGCTTCATCTCCAACCAGCCGGC  
 GAGGGAGAGGCCAACAGCACCCGCCACTGTGCCTTCCCTCGACATCAAGACCC  
 CATCATGCCACCACCATGGCTTCATCTCTTCCCTGGCGTGCCTCTTGCGCTGG  
 TGCTGCTGTTCTGGAGCCGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAACATCGAGATCGAG  
 TATGTGCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCAGCGCCCCGCAAGTTCAA  
 CATGAAGATGATATGA ( 配列番号1).

20

30

30

全長ヒト L I N G O - 1 ポリペプチドのポリペプチド配列は以下の通りである。

## 【 0 0 6 6 】

40

## 【 数 2 】

MLAGGVRSPSPPLLACWQPILLVLGSVLSGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRKVAV  
 PEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASFPHLEELNENIVSAVEPGAFNNLFNLRTL  
 GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNTLKDISENKIVILLDYMFQDLYNLKSLLEVGDNDLVYIS  
 HRAFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTEALSHLHGLIVLRLRHLNINAIRDYSFKRLYRLK  
 VLEISHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSITHCNLTAVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPIST  
 IEGSMLHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNYLRLVLSGNQLTTLEESVFHSVGN  
 LETLILDSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFNRQPTCATPEFVQGKEFKDFPDVLLPYF  
 TCRRARIRDRKAQQVFVDEGHTVQFVCRADGDPPPAILWLSPRKHLVSAKSNGRLTVFP

50

【0067】

【数3】

DTLEVRYAQVQDNGTYLCIAANAGGNDSPAHLHVRSYSPDWPQPNKTFAFISNQPG  
 EGEANSTRATVPFPFDIKTLIATTMGFISFLGVVLFCILVLLFLWSRGKGNTKHNIEIE  
 YVPRKSDAGISSADAPRKFNMKMI (配列番号2).

TrkB (NTRK2)

ニューロトロフィンは、ニューロンの分化、生存、および機能に関与する小さいファミリーの高度に相同な成長因子である。哺乳動物において、公知のニューロトロフィンは、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、ニューロトロフィン-4 (NT-4) (NT-4/5またはNT-5としても知られている)、ニューロトロフィン-6 (NT-6)、およびニューロトロフィン-7 (NT-7) である (Barbacid, J. of Neurobiol. 25: 1386-1403 (1994) および Nilsson et al., FEBS 424: 285-290 (1998))。ニューロトロフィンは、2つの受容体タイプ、すなわち、p75ニューロトロフィン受容体 (p75NTR) と、TrkB受容体ファミリーのチロシンキナーゼの3つの (哺乳動物の) メンバー (TrkA、TrkB、およびTrkC) に結合する。TrkB受容体細胞外ドメインへのニューロトロフィンの結合は、シグナル伝達経路を開始させる。ニューロトロフィンの結合は、受容体の二量体化および自己リン酸化を引き起こす。TrkBの自己リン酸化は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK)、ホスホリパーゼC- (PLC-)、およびホスファチジルイノシトール-3キナーゼ (PI3-K) を含む、シグナル伝達経路の活性化を引き起こす (Yamada, J. Pharmacol. Sci. 91: 267-270 (2003))。

【0068】

以下のヌクレオチド配列は、ヒトTrkB受容体のmRNAとして報告されたものであり、Genbankのアクセション番号NM\_006180である。

【0069】

【数4】

AAGACGGATTCTCAGACAAGGTTGCAAATGCCCGCAGCCATTTAACCGCACCCGC  
 AGAATAGTTACGGTTGTCACCCGACCCCTCCGGATCGCCTAATTGTCCCTAGTGAGAC  
 CCCGAGGCTCTGCCCGCGCTGGCTTCTCGTAGCTGGATGCATATCGTGCTCCGGCAG  
 CGCGGGCGCAGGGCACCGCTCGCGCACACCTAGCACACATGAACACCGCGAAGAGCTG  
 AACCAAGCACGGTTCCATTCAAAAAGGGAGACAGCCTCTACCGCGATTGTAGAAGAGA  
 CTGTGGTGTGAATTAGGGACCGGGAGGCCTGAACGGAGGAACGGTTCATCTTAGAGACT  
 AATTTCTGGAGTTCTGCCCTGCTCTCGCTCAGCCCTCACGTCACTTCGCCAGCAGTA  
 GCAGAGGGCGCGGGCGCTCCCGGAATTGGGTTGGAGCAGGAGCCTCGCTGGCTGCTT  
 CGCTCGCGCTCTACCGCGCTCAGTCCCCGGCGGTAGCAGGAGCCTGGACCCAGGCGCC  
 GGCAGGGCGTGGAGCGCCGGAGCCCCGGCTCGAGGTGCATACCGGACCCCCATTGCACT  
 AACAAAGGAATCTGCCGCCCCAGAGAGTCCGGAGCGCCGGCTGGAGCAGCGGTAGCGCCCCCTGTAAAGC  
 GGGCCATGCAGCGACGGCGCCGCGGGAGCTCCGAGCAGCGGTAGCGCCCCCTGTAAAGC  
 GGTCGCTATGCCGGGCCACTGTGAACCCCTGCCGCTGCCGGAACACTCTCGCTCCGG  
 ACCAGCTCAGCCTCTGATAAGCTGGACTCGGCACGCCGCAACAAGCACCAGGAGTTAA  
 GAGAGCCGAAGCGCAGGGAAGGCCCTCCCGCACGGGTGGGGAAAGCGGCCGGTCAGC  
 GCGGGGACAGGCACTCGGCTGGCACTGGCTGCTAGGGATGTCGCTGGATAAGGTGGC  
 ATGGACCCGCCATGGCGCGCTCTGGGCTTCTGCTGGCTGGTTGTGGCTCTGGAGGG  
 CCGCTTCCGCTGTCCCACGTCCTGCAAATGCAGTGCCTCTCGGATCTGGTGCAGCGACC  
 CTTCTCCTGGCATCGTGGCATTCCGAGATTGGAGCCTAACAGTGTAGATCCTGAGAAC  
 TCACCGAAATTTCATCGCAAACCAAGAAAAGGTTAGAAATCATCAACGAAGATGATGTTG  
 AAGCTTATGTGGGACTGAGAAATCTGACAATTGTGGATTCTGGATTAAAATTTGTGGCTC

【0070】

【数5】

ATAAAGCATTCTGAAAAACAGCAACCTGCAGCACATCAATTACCGAAACAAACTGA  
 CGAGTTGTCTAGGAAACATTCCGTACCTGACTTGTCTGAACGTGATCTGGTGGCA  
 ATCCATTACATGCTCCTGTGACATTATGTGGATCAAGACTCTCAAGAGGCTAAATCCA  
 GTCCAGACACTCAGGATTGTACTGCCTGAATGAAAGCAGCAAGAATATTCCCCTGGCAA  
 ACCTGCAGATAACCAATTGTGGTTGCCATCTGCAAATCTGGCCGACCTAACCTCACTG  
 TGGAGGAAGGAAAGTCTATCACATTATCCTGTAGTGTGGCAGGTGATCCGGTTCTAATA  
 TGTATTGGATGTTGTAACCTGGTTCCAAACATATGAATGAAACAAGCCACACACAGG  
 GCTCCTTAAGGATAACTAACATTCACTCGATGACAGTGGAAAGCAGATCTTGTGTGG  
 CGGAAAATCTGTAGGAGAAGATCAAGATTCTGTCAACCTCACTGTGCAATTGACCAA  
 CTATCACATTCTCGAATCTCAACCTCAGACCAACACTGGTGCATTCACTGTGA  
 AAGGCAACCCAAACCAACAGCGCTTCAGTGGTCTATAACGGGCAATATTGAATGAGTCCA  
 AATACATCTGTACTAAAATACATGTTACCAATCACACGGAGTACCAACGGCTGCCTCCAGC  
 TGGATAATCCCACATGAACAATGGGACTACACTCTAATAGCCAAGAATGAGTATG  
 GGAAGGATGAGAAACAGATTCTGCTCACTTCATGGGCTGGCTGGAATTGACGATGGT  
 CAAACCCAAATTATCCTGTAGTAATTATGAAGATTATGGAACTGCGAGCAATGACATCG  
 GGGACACCACGAACAGAAGTAATGAAATCCCTCCACAGACGTCACTGATAAAACGGTC  
 GGGAACATCTCGGTCTATGCTGGTGATTGCGTCTGTGGGGATTTCGCTTT  
 TGGTAATGCTGTTCTGCTTAAGTGGCAAGACACTCCAAGTTGGCATGAAAGATTCT  
 CATGGTTGGATTGGAAAGTAAAATCAAGACAAGGTGTTGGCCAGCCTCCGTTATCA  
 GCAATGATGATGACTCTGCCAGCCCACCTCCATCACATCTCAATGGGAGTAACACTCCAT  
 CTTCTCGGAAGGTGGCCAGATGCTGTCATTATTGAATGACCAAGATCCCTGTCATTG  
 AAAATCCCCAGTACTTGGCATACCAACAGTCAGCTCAAGCCAGACACATTTGTTCA  
 ACATCAAGCGACATAACATTGTTCTGAAAAGGGAGCTAGCGAAGGAGCCTTGGAAAAG  
 TGTTCTAGCTGAATGCTATAACCTCTGCTGAGCAGGACAAGATCTGGTGGCAGTGA  
 AGACCCCTGAAGGATGCCAGTGACAATGCACGCAAGGACTTCCACCGTGAGGCCAGCTCC  
 TGACCAACCTCCAGCATGAGCACATCGTCAAGTTCTATGGCGTCTGCGTGGAGGGCGACC  
 CCCTCATCATGGCTTTGAGTACATGAAGCATGGGACCTCAACAAGTTCTCAGGGCAC  
 ACGGCCCTGATGCCGTGCTGATGGCTGAGGGCAACCCGCCACGGAACGTGACGCA  
 AGATGCTGCATATAGCCCAGCAGATGCCGCGGGCATGGTCTACCTGGCTCCAGCA  
 TCGTGCACCGCGATTGGCACCAGGAACGTGCTGGTGGGGAGAACCTGCTGGTAAAA  
 TCGGGGACTTGGATGTCCCAGGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCGGTGGCC  
 ACACAAATGCTGCCATTGCTGGATGCCCTCAGAGAGCATCATGTACAGGAAATTACGA  
 CGGAAAGCGACGTCTGGAGCCTGGGGCTGTGTTGGAGATTTCACCTATGGCAAC  
 AGCCCTGGTACCAAGCTGTCAAACAAATGAGGTGATAGAGTGTATCACTCAGGGCGAGTCC  
 TGCAGCGACCCCGACGTGCCCTCAGGAGGTGATGAGCTGATGCTGGGTGCTGGCAGC  
 GAGAGCCCCACATGAGGAAGAACATCAAGGGCATCCATACCCCTCTCAGAACATTGGCCA  
 AGGCATCTCCGTCTACCTGGACATTCTAGGCTAGGGCCCTTCTCCAGACCGATCCT  
 CCCAACGTACTCCTCAGACGGCTGAGGAGTAACATTTAACTGCCGCTGGAGGCC  
 ACCAAGCTGCTCTCTTCACTGTACAGTATTAACATCAAAGACTCCGAGAACGCTCGA  
 GGGAAAGCAGTGTGACTTCTCATCCATAGACACAGTATTGACTCTTTGGCATTATC  
 TCTTCTCTCTTCCATCTCCCTGGTCTCTTTCTTTAAATTCTTTTC  
 TTTTTTTTCTGCTTCCCTGCTTCAGATTCTACCCCTTCTTGAATCAATCTGGCT  
 TCTGCATTACTATTAACCTGCTAGACAAAGCCTAACAAACGTAATTGTTATATCA  
 GCAGACACTCCAGTTGCCACCACAACAAATGCCTGTTGATTCTGCCTTGAT  
 GTGGATGAAAAAGGGAAACAAATATTCACTTAAACTTGTCACTTCTGCTGTACAG  
 ATATCGAGAGTTCTATGGATTCACTCTATTATTTATTATTACTGTTCTTATG  
 TTTTGGATGGCTTAAGCCTGTGTATAAAAAAGAAAACCTGTGTTCAATCTGTGAAGCCTT  
 TATCTATGGAGATTAAAACCAAGAGAGAGAACAGATTTATTATGAACCGCAATATGGAG  
 GAACAAAGACAACCAACTGGGATCAGCTGGTGTAGTCCCTACTTAGGAAATACTCAGCAA  
 CTGTTAGCTGGGAAGAATGTATTGGCACCTCCCTGAGGACCTTCTGAGGAGTAAA  
 AGACTACTGGCCTCTGTGCCATGGATGATTCTTCCCATCACCAAGAAATGATAGCGTGC

10

20

30

40

【0071】

## 【数6】

AGTAGAGAGCAAAGATGGCTCCGTGAGACACAAGATGGCGCATAGTGTGCTGGACACA  
 GTTTGTCTTCTGTTGATGATAGCACTGGTTGTTCTCAAGCGCTATCCACAGA  
 ACCTTGTCACCTCAGTTGAAAAGAGGTGGATTGATGTCAGAGCTATTGCGGGTCA  
 GGTGGGAAAGCCAAGAACTTGGAAAAGATAAGACAAGCTATAAATTGGAGGCAAGTT  
 TTTTACAATGAACCTTCAGATCTCACTTCCCTCCGACCCCTAACTCCATGCCACCCG  
 TCCTTTAAGTGTGCAAGAAAATTGTGCATGGTCTTCGTCGATTAATACCTTGTGCA  
 GACACTACTGCTCCAGACGTCGTTCCCTGATAGGTAGAGCAGATCCATAAAAGGTATG  
 ACTTATAACAATTAGGGGAAGCTAATGGAGTTATTAGCTGAGTATCAATGTCTGCGTT  
 GTACGGTGGTGTGGTTAATGAATATGGACCCCTGAAGCCTGAAATCCTCATCCACG  
 TCGAACCCACAGGACTGTGGGAAGGGCAGAACATCAATCCCTAACGGAAAGGAAACCTCACC  
 CTGAGGGCATCACATGCACTCATGTTAGTGTACACAGGTCAAGTCCCTGCTCTGGGCT  
 CTAGTTGGGAGAGTGGTTCACTCCAAAGTCAAAATACAAATTGGCACAGCATGCCAACGGGAGGCT  
 GTGCCAGACCAAGCACTGGAAGTGTGCTCTAGGCATAGTCATTGGTTTGCAAAAAGA  
 GGGCTCAAATTAAAGAAATTACAGCTATTGAATGGTCAGATATAACCAAGAAAGAA  
 AAATATTCTGTTCCCAAGAAAATTGCTACCCCTGAGGGGAATTGCTAAACTT  
 GACATCTTATAACATGAGCCAGATTGAAAGGGAGTGATTTCATTGATCTTAGGTGATG  
 TTATTTCATATTGTTCTGAAGGTGCGATAGCTCTGTTAGGTTTGCTTGCCTGCTGT  
 TAATTACTGGAACACCTTATTTCATTAAAGGCTTGAAAGCCAATTCTCAAAAATTCA  
 AAAGTGCAAATTAAACAGAACAAAAGGAAATTCACTGAGTAGCAACTGCAAGCGAGGGAGT  
 TGACAAGATAAACCTTACGTCATTCAAGTTATGCTGGCTATGAGAGATGAGAGTTG  
 GGTCGTTGTTCTTTGTTGATGATT ( 配列番号3) 20

以下のポリペプチド配列は、ヒト T r k B ポリペプチド配列（配列番号：3 のヌクレオチド 939 - 3455 によってコードされている）として報告されたものであり、 G e n b a n k のアクセション番号 N P \_ 0 0 6 1 7 1 を有する。

## 【0072】

## 【数7】

MSSWIRWHGPAMARLWGFCWLVVGFWRAAFACPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEP  
 NSVDPENITEIFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTIVDGLKFAHKFLKNSNLQHI  
 NFTRNKLTSLSRKHFRHLDLSELILVGNPFTCSCDIMWIQLQEAQSSPDTQDLYCLNES  
 SKNIPLANLQIPNCGLPSANLAAPNLVEEGKSITLSCSVAGDPVPNMYWDVGNLVSKHM  
 NETSHTQSLRITNISSDDSGKQISCVAEVLGEDQDSVNLTVHFAPTIITFLESPTSDHH  
 WCIPFTVKGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVTNHTEYHGCLQLDNPTHMNNGDYT  
 LIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPGLDDGANPNYPDVIYEDYGAANDIGDTTNRNSEIPST  
 DVTDKTGREHLSVYAVVVIASVVGFCLLVMLFLKLRHSKFGMKDFSWFGFKVKSROG  
 VGPASVISSNDDDSASPLHHISNGSNTPSSSEGGPDAVIIGMTKIPVIENPQYFGITNSQL  
 KPDTFVQHIKRHNIVLKRELGEAGFKVFLAECYNLCPEQDKILVAVKTLKDASDNARKD  
 FHREAELLTNLQHEHIVKFYGVCGVEGDPPLIMFEMKHDLNKFLRAHGPDAVLMAEGNP  
 PTELTQSQMLHIAQQIAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKIGDFGMSRDVYST  
 DYYRVGGHTMLPIRWMPPEIMYRKFTTESDVWSLGVLWEIFTYKQWPYQLSNEVIE  
 CITQGRVLQRPRTCPQEVEYELMLGCWQREPHMRKNIKGIGHLLQNLAKASPVYLDILG  
 ( 配列番号4) . 30

以下のヌクレオチド配列は、ラット T r k B 受容体の m R N A として報告されたものであり、 G e n b a n k のアクセション番号 N M \_ 0 1 2 7 3 1 である。

## 【0073】

10

20

30

40

【数8】

【 0 0 7 4 】

【数9】

CATGCAGCCGCCTTGTGGCTTGGAGCAGCAGCCGTGATGTTCCAGCCACTGTGAACCAT  
 TTGGTCAGCGCAACCTGCTCAGCCCCAGCACCGACAGGCTCAGCCTCTGGTACGCTCCT  
 CTCGGCGGGAGGCCATCAGCACCAAGCAGCAAGAGGGCTCAGGGAAAGGCCTCCCCCTCC  
 GGCGGGGGACGCCTGGCTCAGCGTAGGGACACGCACACTGACTGACTGGCACTGGCAGCT  
 CGGGATGTCGCCCTGGCGAGGGTGGCATGGACCCGCCATGGCGGGCTCTGGGCTTATG  
 10 CTTGCTGGTCTTGGGCTTCTGGAGGGCTCTTGCCTGCCATGTCCTGCAAATGCAG  
 CACCACTAGGATTGGTGTACCGAGCCTCTGGCATCGTGGCAATTCCGAGGTTGGA  
 ACCTAACAGCATTGACCCAGAGAACATCACCGAAATTCTCATTGCAAACCAAGAAAAGGTT  
 AGAAATCATCAATGAAGATGATGTCGAAGCTTACGTGGGCTGAAAACCTAACATTGT  
 GGATTCCGGCTTAAAGTTGGCTTACAAGGCCTTCTGAAGAACGGCAACCTGCGGCA  
 CATCAATTCACTCGAAACAAGCTGACGAGTTGTCCAGGAGACATTCCGCCACCTTGA  
 CTTGTCGACCTGATCCTGACGGTAATCCGTTACGTGTTCTGTGACATCATGGGCT  
 CAAGACTCTCCAGGAGACGAAATCCAGCCCCGACACTCAGGATTGTATTGCCTCAATGA  
 GAGCAGCAAGAATACCCCTTGGCAACCTGCAGATTCCAATTGTGGTCTGCCGTCTGC  
 ACGTCTGGCCGCTCTAACCTCACGGTGGAGGAAGGGAAAGTCTGTGACCATTCCCTGCAG  
 CGTCGGGGGTGACCCGCTCCCCACCTGTACTGGACGTTGGAAATTGGTTCAAACA  
 CATGAATGAAACAAGCCACACACAGGGCTCTTAAGGATAACAAACATTTCATCGGATGA  
 CAGTGGGAAACAAATCTCTTGTGGCAGAAAACCTCGTGGAGAAGATCAAGACTCTGT  
 20 GAACCTCACTGTGCATTTCACCAACCACATCACATTCTCGAATCTCAACCTCAGACCA  
 CCACTGGTGCATCCCATTCACTGTGAGAGGCAACCCCAAGCCAGCACCTCAGGGTCTA  
 CAACGGAGCCATACTGAATGAATCCAAGTACATCTGTACCAAAATACACGTACCAATCA  
 CACGGAGTACCAACGGCTGCCAGCTGGATAACCCACTCATATGAATAATGGAGACTA  
 CACCTTAATGGCCAAGAATGAATATGGGAAAGGACGAGAGACAGATTCTGCTCACTTCAT  
 GGGCCGGCTGGAGTTGACTATGAGACAAACCAATTACCCCTGAAGTCCTATGAAGA  
 CTGGACCACGCCACTGACATGGGGATACTACAAACAAAGTAATGAGATCCCTCCAC  
 30 GGATGTTGCTGACCAAACCAATCGGGAGCATCTCTGGTCTATGCTGTGGTGGTATTGC  
 CTCTGTGGTAGGATTCTGCTGCTGGTGTGCTCTGCTCAAGTTGGCGAGACATTC  
 CAAGTTGGCATGAAAGGCCAGCTCCGTACAGCAACGACGATGACTCTGCCAGCCC  
 TCTCCACCACATCTCAACGGGAGCAACACTCCGTTCTCGGAGGGCGGGCCGATGC  
 TGTGATCATGGGATGACCAAGATCCCTGTGATTGAAAACCCCCAGTACTTCGGTATCAC  
 CAACAGCCAGCTCAAGCCGGACACATTGTTACGACATCAAGAGACACAACATCGTTCT  
 GAAGAGGGAGCTGGAGAAGGAGCCTTGGAAAGTTCTAGCGGAGTGCTATAACCT  
 CTGCCCGAGCAGGATAAGATCCTGGTGGCGTGAAGACGCTGAAGGACGCCAGCGACAA  
 TGCTCGCAAGGACTTACCGGTCTGTGTGGAGGGCGACCCACTCATCGTCTTGAGTACAT  
 GAAGCACGGGACCTCAACAAGTTCTTAGGGCACACGGGCCAGATGCGAGTGCTGATGGC  
 AGAGGGTAACCGCCACCGAGCTGACGAGTCGAGATGCTGACATCGCTCAGCAAAT  
 CGCAGCAGGCATGGTCTACCTGGCATCCAAACACTCGTGCACCGAGACCTGCCACCCG  
 GAACTGCTGGTAGGAGAGAACCTGCTGGTAAAATTGGGACTTCGGGATGTCCGGGA  
 TGTATACAGCACCAGTACTACCGGGTTGGTGGCCACACAATGTTGCCATCCGATGGAT  
 GCCTCCAGAGAGCATCATGTACAGGAAATTACCAACCGAGAGTGACGCTGGAGCCTGG  
 AGTTGTGTTGGAGATCTCACCTACGGCAAGCAGCCCTGGTATCAGCTATCAAACAA  
 40 CGAGGTGATAGAATGCATACCCAGGGCAGAGTCCTCAGCGGCCCTCGCACGTGTCCCCA  
 GGAGGTGACGAGCTGATGCTGGATGCTGGCAGCGGGAAACCACACACAAGGAAGAACAT  
 CAAGAACATCCACACACTCCCTCAGAACCTGGCGAAGGGCGCCGTCTACCTGGACAT  
 CCTAGGGCTAGACTCCCTCTTCTCCAGACGGCCCTCCAAAGGCACCCCTCAGACCTCTT  
 AACTGCCGCTGATGTCACCACTTGTGCTCTGCTCTGACAGTGTAAACAAGACAAGG  
 AGCGGCTCTCCGGGTGAGGCAGTGGCAGTCGCACTTCCCATCCACAGACAGTATCGACTCGCT  
 TCTGGCTTGTGCTGCTTCTCCCTTGGTTGTTCTTCTTGTGCCATTCTCCATT  
 ATTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATCTATCTATCTATCT  
 ATTTATTATTATTATTATTGTCCTCACTGCTCATGGTCCCTCGCCCTCTCCTTGACC

【0075】

## 【数10】

GATCTGGCTTCTGTAACCTATTCACTGTACATAGACAAAGGCCTAACAAACCTGATT  
 GTTATATCAGCAGACACTCCAGTTGCCACCACAACATAACATGCCTGTGTATTCT  
 GCCTTGATGTGGATGAAAAAAAGGGAAAAAAATAATCAAACATCTGACTAAACCGTC  
 ACTTCCGATGTACAGACACGGGCGTTCTATGGATTCACTTCTATCTATCTATTATT  
 ATTTATCTATTATTATTCTCTTGTGTTCCGGTGGTTAGCCTGTGTATG  
 AGAAGGGAAAGTCATGTACAGTCTGGAAAACCTTATCTGTGGAAATGAAACCCAGAAG  
 GGGAAAGAAGCTTACCATAAAGCACAGCAGGAGTGAGACACAGAAAAGCCATTGGATCA  
 GCCAGAGTCCGTCTGCATAGGAAAACCCAGCAGCCATCAGGCTGGAGGATCATGTCGG  
 CACTGACCCCCGAGGACCTTCTGAGGAGGACACAGAAATGTTAAACTCTGCATCATGGAC  
 ACAGTTCCGATCACAGATACTGGCCTCAATGGAAAAAAAAACCCAGATA  
 GTTCTTGTGAGACCTGGACAGCACGTTAACATCCAGACATTGTGGTGGCACAGTGAC  
 AGAGTTGATGCATTCTCACGGGTTATTCTACAGAGCTTGTCAAGTCCAATGGAAGGA  
 GGTAGATTCTTGTTCAGATATGATTCGGAAAAACCGAGTCCTGACAAAGACAGGAGA  
 CACCTCAGTGGGAGGCAAGTTCTTACCTGGACTTCTCACACAGCAATTCTCAC  
 CCCCACCCCTCCACTCTCACCTGTCTGTAAGTGTGCAAACAAAAGTGTGCATGGTCTT  
 TGTCAGTTGATACCTTGTGCACCTCTGTGCAGAAACTGCTGTCTGCCCCTGTGGTA  
 CCCGATCAGTGGGGTAGATCCACGAAAGGTCTCATTAGGCCGCTTGGGAAGGTAACC  
 AGATCGGTAGCTGGAAAGCCTCCAGTAGGTGGCGAAGGGTGAGTGGGCTGCTGAAGC  
 CTGCATATCTTCACCCACCTCAAACCCACCAGGCTGCACAGGGACAGGCACAGGCCACC  
 CCTGAGGGACAGGAAAGCTCTTGGGATACCACCTGAGTTACATTCACTGCTGCTCAGG  
 TCAAGTCTCTCGCTGGGCTCTGTTGGGAGAATGGTTCATCCAACGCACTCATT  
 ATCAGGATTCTGTTTC ( 配列番号5) 10

以下のポリペプチド配列は、ラットTrkBポリペプチド配列（配列番号：5のヌクレオチド665-3130によってコードされている）として報告されたものであり、Genbankのアクセション番号NP\_036863を有する。

## 【0076】

## 【数11】

MSPWPRWHGPAMARLWGLCLLVLGFWRASLACPMSCSKSTTRIWCTEPSPGIVAFPRLEP  
 NSIDPENITEILIANQKRLEIINEDDVEAYVGLKNLTIVDGLKFVAYKAFLKNGNLRHI  
 NFTRNKLTSLSRRHFRHLDLSLILTGNPFTCSCDIMWLKTLQETKSSPDTQDLYCLNES  
 SKNTPLANLQIPNCGLPSARLAAPNLTVEEGKSVTISCSVGGDPLPTLYWDVGNLVSKHM  
 NETSHTQGSLRITNISSDDSGKQISCVAEVLGEDQDSVNLTVHFAPTTITFLESPTSDHH  
 WCIPFTVRGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHTVNHTEYHGCLQLDNPTHMNNGDYT  
 LMAKNEYGKDERQISAHFMGRPGVDYETNPNEYPEVLYEDWTTPTDIDGTTNKSNEIPSTD  
 VADQTNREHLSVYAVVVIASVVGFCLLVMLLLKLARHSKFGMKGPAWSIISNDDDSASPL  
 HHSNGSNTPSSSEGGPDAVIIGMTKIPVIENPQYFGITNSQLKPDTFVQHIKRHNIVLK  
 RELGEGAFGKVFLAECYNLCPEQDKILVAVKTLKDASDNARKDFHREAELLNLQHEHIV  
 KFYGVCVEGDPPLIMFEMKHDLNKFLRAHGPDAVLMAEGNPPTELTQSQLHIAQQIA  
 AGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKIGDFGMSRDVYSTDYYRVGGHTMLPIRWMP  
 PESIMYRKFTTESDVWSLGVLWEIFTYKGKQPWYQLSNNEVIECITQGRVLQRPRTCPQE  
 VYELMLGCWQREPHTRKNIKNIHTLLQNLAKASPVYLDILG ( 配列番号6) 30

表2に、配列番号：4を基に、アミノ酸残基の番号に従って、TrkBのドメインおよびその他の領域を記載する。当業者が理解するように、以下に記載されたドメインの最初と最後の残基は、ドメインを決定するのに使用されるコンピュータモデリングプログラムまたは方法によって異なり得る。

## 【0077】

20

40

【表2】

表2

ドメインまたは領域	最初の残基	最後の残基	
シグナルペプチド	1	31	
システインリッチ1	32	67	
LRR	68	139	
システインリッチ2	140	195	10
Ig様1	214	270	
Ig様2	301	365	
膜貫通	434	454	
チロシンキナーゼ 触媒ドメイン	552	828	

## L I N G O - 1 のアンタゴニストを用いる方法

本発明の1つの実施形態は、細胞内のL I N G O - 1とT r k Bの相互作用を阻害する方法であって、L I N G O - 1とT r k Bとを共発現する細胞をL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法を提供する。本発明の目的のためのL I N G O - 1アンタゴニストは、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチド、L I N G O - 1抗体、L I N G O - 1アンタゴニストポリヌクレオチド、L I N G O - 1アプタマー、または2つ以上のL I N G O - 1アンタゴニストの組み合わせであってもよい。

## 【0078】

本発明のさらなる実施形態には、L I N G O - 1アンタゴニストの非存在下でのT r k Bリン酸化のレベルと比べて、細胞内のT r k Bリン酸化を促進する方法であって、L I N G O - 1とT r k Bとを共発現する細胞をL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法が含まれる。同様に、本発明は、T r k Bシグナル伝達を促進する方法であって、L I N G O - 1とT r k Bとを共発現する細胞をL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法も提供する。本発明には、T r k Bリン酸化を促進する方法であって、C N SニューロンをL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法も含まれる。

## 【0079】

本発明のさらなる実施形態には、細胞内のJ N Kリン酸化を阻害する方法であって、L I N G O - 1とJ N Kとを共発現する細胞をL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法、およびJ N K経路のシグナル伝達を阻害する方法であって、L I N G O - 1とJ N Kとを共発現する細胞をL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法が含まれる。本発明による、J N Kリン酸化の阻害には、J N K - 1リン酸化の阻害、J N K - 2リン酸化の阻害、またはJ N K - 1およびJ N K - 2のリン酸化の阻害が含まれる。本発明による、J N Kリン酸化の阻害には、リン酸化J N Kタンパク質の全体量を減少させること、またはJ N Kタンパク質がリン酸化されたままの時間の長さを減少させることが含まれ得る。本発明には、J N Kリン酸化を阻害する方法であって、C N SニューロンをL I N G O - 1アンタゴニストと接触させる工程を含む方法も含まれる。

## 【0080】

本発明のさらなる実施形態は、圧力誘導性の眼神経障害の兆候または症状を示す哺乳動物の網膜神経節細胞の生存を促進する方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に有効量のL I N G O - 1アンタゴニストおよび担体を投与する工程を含む方法を提供する。1つの実施形態において、該圧力誘導性の眼神経障害は、緑内障である。

## 【0081】

10

20

30

40

50

## L I N G O - 1 のアンタゴニストおよびT r k B アゴニストを用いる方法

本発明のいくつかの方法において、L I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの両方が使用される。例えば、本発明の1つの実施形態には、死の危険にさらされているニューロンの生存を促進する方法であって、該ニューロンを有効量のL I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの組み合わせと接触させる工程を含む方法が含まれる。L I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの両方が使用される本発明の実施形態において、用語「有効量」は、所望の結果をもたらすのに十分であるL I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの組み合わせの量を指す。いくつかの例において、所望の効果をもたらすのに必要とされるL I N G O - 1 アンタゴニストの量は、L I N G O - 1 アンタゴニストが単独で使用されるときの方が、T r k B アゴニストと組み合わせて使用されるときよりも多い場合がある。10

## 【 0 0 8 2 】

本発明の別の実施形態は、ニューロンの細胞死と関連する疾患または障害を処置する方法であって、そのような処置を必要とする動物に有効量のL I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの組み合わせを投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの特定の実施形態において、疾患または障害は、圧力誘導性の視神経障害であることができる。本発明のさらなる実施形態には、ニューロンの細胞死を伴う状態の兆候または症状を示す哺乳動物のC N S ニューロンの再生または生存を促進する方法であって、該哺乳動物に有効量のL I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの組み合わせを投与する工程を含む方法が含まれる。20 本発明のいくつかの実施形態において、該疾患または障害は、A L S 、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、糖尿病性神経障害、脳卒中、または聴力損失である。別の特定の実施形態において、該C N S ニューロンは、網膜神経節または有毛細胞などの感覚ニューロンである。

## 【 0 0 8 3 】

L I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストの組み合わせの使用を含む本発明の実施形態において、L I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストとを単一組成物として投与することができ、または別々に投与することができる。さらに、L I N G O - 1 アンタゴニストとT r k B アゴニストとを同時にまたは連続的に投与することができる。30

## 【 0 0 8 4 】

## L I N G O - 1 アンタゴニスト化合物およびT r k B アゴニスト化合物

本発明の方法におけるL I N G O - 1 アンタゴニストには、アンタゴニスト化合物の非存在下でのL I N G O - 1 の活性と比較して、L I N G O - 1 の活性を阻害するかまたは減少させる任意の化学化合物または合成化合物が含まれる。

## 【 0 0 8 5 】

本発明の方法におけるT r k B アゴニストには、アゴニスト化合物の非存在下でのT r k B の状態と比較した場合に、T r k B の活性を促進するかもしくは増大させるまたはT r k B のリン酸化を促進するかもしくは増大させる任意の化学化合物または合成化合物が含まれる。40

## 【 0 0 8 6 】

T r k B アゴニスト化合物には、神経栄養因子模倣体が含まれるが、これらに限定されない。T r k B アゴニスト化合物には、P o l l a c k e t a l . C u r r . D r u g T a r g - C N S a n d N e u r o l . D i s o r d e r s 1 : 5 9 - 8 0 ( 2 0 0 2 ) ( これは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる ) に概説されているような、L - 7 8 3 , 2 8 1 、アデノシン、C G S 2 1 6 8 0 なども含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、T r k B アゴニスト化合物は、T r k B に選択的であり、T r k A またはT r k C を上回る程度にT r k B を活性化する。50

化する。いくつかの実施形態において、TrkBアゴニスト化合物は、TrkBに特異的であり、TrkAまたはTrkCを活性化しない。さらに、TrkBアゴニスト化合物は、ニューロトロフィンの極めて重要な領域を模倣する小分子であることもできる。例えば、該小分子は、BDNFの-ターンループの模倣体であることができる。本発明に従つて使用し得る小分子模倣体の特定の例は、米国公開出願第2007/0060526 A1号に開示されており、これはその全体が参考により本明細書に組み入れられる。

【0087】

当業者であれば、例えば、本明細書の他の場所に記載されているアッセイを用いてニューロンの生存を修飾する化合物をスクリーニングすることにより、本発明の方法で有用であるLINGO-1アンタゴニスト化合物およびTrkBアゴニスト化合物をスクリーニングし、試験する方法を知っているであろう。

10

【0088】

可溶性LINGO-1アンタゴニストポリペプチドおよびTrkBアゴニストポリペプチド

可溶性LINGO-1ポリペプチド

本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストには、天然のLINGO-1の生物学的機能を阻止するか、阻害するか、またはそれに干渉するポリペプチドが含まれる。具体的に、本発明の可溶性LINGO-1ポリペプチドには、可溶性LINGO-1ポリペプチドの断片、変異体、または誘導体が含まれる。上記の表1に、LINGO-1ポリペプチドの様々なドメインが記載されている。可溶性LINGO-1ポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠いており、典型的には、LINGO-1ポリペプチドの細胞内ドメインを欠いている。例えば、ある可溶性LINGO-1ポリペプチドは、LINGO-1の膜貫通ドメインを含むアミノ酸552～576および/またはLINGO-1の細胞内ドメインを含むアミノ酸577～614を欠いている。さらに、ある可溶性LINGO-1ポリペプチドは、LINGO-1ポリペプチドのLRRドメイン、Igドメイン、塩基性領域、および/または細胞内ドメイン全体（配列番号：2のアミノ酸34～532に対応する）を含む。当業者であれば理解するように、LINGO-1の細胞外ドメイン全体は、細胞外ドメインポリペプチドのC末端上またはN末端上のいずれかに付加的なまたはより少数のアミノ酸を含み得る。

20

【0089】

30

このようなものとして、本発明の方法で使用される可溶性LINGO-1ポリペプチドには、配列番号：2のアミノ酸41～525；配列番号：2のアミノ酸40～526；配列番号：2のアミノ酸39～527；配列番号：2のアミノ酸38～528；配列番号：2のアミノ酸37～529；配列番号：2のアミノ酸36～530；配列番号：2のアミノ酸35～531；配列番号：2のアミノ酸34～531；配列番号：2のアミノ酸46～520；配列番号：2のアミノ酸45～521；配列番号：2のアミノ酸44～522；配列番号：2のアミノ酸43～523；および配列番号：2のアミノ酸42～524、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるLINGO-1ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。LINGO-1ポリペプチドのアンタゴニストには、表1に記載されているようなドメインの任意の組み合わせが含まれてもよい。

40

【0090】

本発明の方法で使用されるさらなる可溶性LINGO-1ポリペプチドには、配列番号：2のアミノ酸1～33；配列番号：2のアミノ酸1～35；配列番号：2のアミノ酸34～64；配列番号：2のアミノ酸36～64；配列番号：2のアミノ酸66～89；配列番号：2のアミノ酸90～113；配列番号：2のアミノ酸114～137；配列番号：2のアミノ酸138～161；配列番号：2のアミノ酸162～185；配列番号：2のアミノ酸186～209；配列番号：2のアミノ酸210～233；配列番号：2のア

50

ミノ酸 234～257；配列番号：2のアミノ酸258～281；配列番号：2のアミノ酸282～305；配列番号：2のアミノ酸306～329；配列番号：2のアミノ酸330～353；配列番号：2のアミノ酸363～416；配列番号：2のアミノ酸417～424；配列番号：2のアミノ酸419～493；および配列番号：2のアミノ酸494～551、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるLINGO-1ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0091】

本発明の方法で使用されるさらなる可溶性LINGO-1ポリペプチドには、配列番号：2のアミノ酸1～33；配列番号：2のアミノ酸1～35；配列番号：2のアミノ酸1～64；配列番号：2のアミノ酸1～89；配列番号：2のアミノ酸1～113；配列番号：2のアミノ酸1～137；配列番号：2のアミノ酸1～161；配列番号：2のアミノ酸1～185；配列番号：2のアミノ酸1～209；配列番号：2のアミノ酸1～233；配列番号：2のアミノ酸1～257；配列番号：2のアミノ酸1～281；配列番号：2のアミノ酸1～305；配列番号：2のアミノ酸1～329；配列番号：2のアミノ酸1～353；配列番号：2のアミノ酸1～416；配列番号：2のアミノ酸1～424；配列番号：2のアミノ酸1～493；配列番号：2のアミノ酸1～551；配列番号：2のアミノ酸1～531；および配列番号：2のアミノ酸1～532、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるLINGO-1ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0092】

本発明の方法で使用されるまたさらなる可溶性LINGO-1ポリペプチドには、配列番号：2のアミノ酸34～64；配列番号：2のアミノ酸34～89；配列番号：2のアミノ酸34～113；配列番号：2のアミノ酸34～137；配列番号：2のアミノ酸34～161；配列番号：2のアミノ酸34～185；配列番号：2のアミノ酸34～209；配列番号：2のアミノ酸34～233；配列番号：2のアミノ酸34～257；配列番号：2のアミノ酸34～281；配列番号：2のアミノ酸34～305；配列番号：2のアミノ酸34～329；配列番号：2のアミノ酸34～353；配列番号：2のアミノ酸34～416；配列番号：2のアミノ酸34～424；配列番号：2のアミノ酸34～493；および配列番号：2のアミノ酸34～551、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるLINGO-1ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0093】

本発明の方法で使用されるさらなる可溶性LINGO-1ポリペプチドには、配列番号：2のアミノ酸34～530；配列番号：2のアミノ酸34～531；配列番号：2のアミノ酸34～532；配列番号：2のアミノ酸34～533；配列番号：2のアミノ酸34～534；配列番号：2のアミノ酸34～535；配列番号：2のアミノ酸34～536；配列番号：2のアミノ酸34～537；配列番号：2のアミノ酸34～538；配列番号：2のアミノ酸34～539；配列番号：2のアミノ酸30～532；配列番号：2のアミノ酸31～532；配列番号：2のアミノ酸32～532；配列番号：2のアミノ酸33～532；配列番号：2のアミノ酸34～532；配列番号：2のアミノ酸35～532；配列番号：2のアミノ酸36～532；配列番号：2のアミノ酸30～531；配列番号：2のアミノ酸31～531；配列番号：2のアミノ酸32～531；配列番号：2のアミノ酸33～531；配列番号：2のアミノ酸34～531；配列番号：2のアミノ酸35～531；および配列番号：2のアミノ酸36～531、もしくはこのような

10

20

30

40

50

ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなる LINGO-1 ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0094】

本発明の方法で使用されるまたさらなる可溶性 LINGO-1 ポリペプチドには、配列番号：2 のアミノ酸 36～64；配列番号：2 のアミノ酸 36～89；配列番号：2 のアミノ酸 36～113；配列番号：2 のアミノ酸 36～137；配列番号：2 のアミノ酸 36～161；配列番号：2 のアミノ酸 36～185；配列番号：2 のアミノ酸 36～209；配列番号：2 のアミノ酸 36～233；配列番号：2 のアミノ酸 36～257；配列番号：2 のアミノ酸 36～281；配列番号：2 のアミノ酸 36～305；配列番号：2 のアミノ酸 36～329；配列番号：2 のアミノ酸 36～353；配列番号：2 のアミノ酸 36～416；配列番号：2 のアミノ酸 36～424；配列番号：2 のアミノ酸 36～493；および配列番号：2 のアミノ酸 36～551、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなる LINGO-1 ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0095】

本発明の方法で使用されるさらなる可溶性 LINGO-1 ポリペプチドには、；配列番号：2 のアミノ酸 36～530；配列番号：2 のアミノ酸 36～531；配列番号：2 のアミノ酸 36～532；配列番号：2 のアミノ酸 36～533；配列番号：2 のアミノ酸 36～534；配列番号：2 のアミノ酸 36～535；配列番号：2 のアミノ酸 36～536；配列番号：2 のアミノ酸 36～537；配列番号：2 のアミノ酸 36～538；および配列番号：2 のアミノ酸 36～539、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなる LINGO-1 ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0096】

さらなる可溶性 LINGO-1 ポリペプチド、その断片、変異体、または誘導体には、LINGO-1 の Ig ドメインを含むポリペプチドが含まれる。例えば、配列番号：2 のアミノ酸 417～493；配列番号：2 のアミノ酸 417～494；配列番号：2 のアミノ酸 417～495；配列番号：2 のアミノ酸 417～496；配列番号：2 のアミノ酸 417～497；配列番号：2 のアミノ酸 417～498；配列番号：2 のアミノ酸 417～499；配列番号：2 のアミノ酸 417～500；配列番号：2 のアミノ酸 417～492；配列番号：2 のアミノ酸 417～491；配列番号：2 のアミノ酸 412～493；配列番号：2 のアミノ酸 413～493；配列番号：2 のアミノ酸 414～493；配列番号：2 のアミノ酸 415～493；配列番号：2 のアミノ酸 416～493；配列番号：2 のアミノ酸 411～493；配列番号：2 のアミノ酸 410～493；配列番号：2 のアミノ酸 410～494；配列番号：2 のアミノ酸 411～494；配列番号：2 のアミノ酸 412～494；配列番号：2 のアミノ酸 413～494；配列番号：2 のアミノ酸 414～494；配列番号：2 のアミノ酸 415～494；配列番号：2 のアミノ酸 416～494；配列番号：2 のアミノ酸 417～494；および配列番号：2 のアミノ酸 418～494、もしくはこのようなポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体を含むか、本質的に該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなるか、または該ポリペプチドもしくは該ポリペプチドの断片、変異体、もしくは誘導体からなる LINGO-1 ポリペプチド。

## 【0097】

本発明の方法で使用される可溶性 LINGO-1 ポリペプチドには、本明細書に開示さ

10

20

30

40

50

れる2つ以上の可溶性L I N G O - 1ポリペプチドの組み合わせも含まれる。本発明の方法で使用される2つ以上の可溶性L I N G O - 1ポリペプチドは、本明細書に開示される複数のL I N G O - 1可溶性ポリペプチドを含む単一のポリペプチドを形成するように1つに融合されてもよく、または本発明の方法で使用される組成物を含む個々の可溶性L I N G O - 1ポリペプチドであってもよい。

【0098】

本発明を実施するための様々な例示的な可溶性L I N G O - 1ポリペプチドならびにこれらの分子を得るための方法および材料は、以下に記載されており、かつ／または例えば、P C T公開WO 2004/085648号、同WO 2006/002437号、同WO 2007/0059793号、同WO 2007/008547号、同WO 2007/056161号、および同WO 2007/064882号、ならびに米国公開出願第2006/017673号に見出され得、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0099】

T r k B アゴニストポリペプチド

本発明の方法で使用されるT r k B アゴニストポリペプチドには、T r k B の活性を促進するか、増幅するか、増強させるか、または増大させることができる任意のポリペプチドが含まれる。このようなタンパク質には、B D N F 、N T - 3 、およびN T - 4 / 5などのニューロトロフィンを含むT r k B リガンドが含まれるが、これらに限定されない。さらに、本発明のT r k B アゴニストポリペプチドには、T r k B リガンドの断片、変異体、または誘導体、およびキメラのニューロトロフィン分子も含まれる。いくつかの実施形態において、T r k B リガンドポリペプチド、その断片、変異体、または誘導体は、二量体化または多量体化されている。本発明のT r k B アゴニストポリペプチドは、ホモ二量体またはヘテロ二量体として作用することができる。本発明のT r k B アゴニストポリペプチドには、I b a n e z e t a l . E M B O 7 2 : 1 2 : 2 2 8 1 - 2 2 9 3 ( 1 9 9 3 ) に開示されているパン - ニュートロフィン ( p a n - n e u t r o p h i n ) のようなパン - ニュートロフィンも含まれる。特に、本発明のT r k B アゴニストポリペプチドには、T r k B またはそのようなポリペプチドの変異体に結合するT r k B リガンドのドメインが含まれる。本発明の1つの特定の実施形態において、T r k B アゴニストは、脳由来神経栄養因子 ( B D N F ) 、またはその断片、変異体、もしくは誘導体である。

【0100】

本発明のT r k B アゴニストポリペプチドは、米国特許第7,205,387号に開示されているようなT r k B リガンドのヘアピンモチーフであってもよい。さらに、T r k B リガンドポリペプチド、その断片、変異体、または誘導体は、その他のタンパク質もしくはペプチド配列に融合していてもよく、かつ／または米国特許第5,770,577号に開示されているようなポリエチレンギリコールを含む水溶性のポリマーもしくは米国特許第6,800,607号に開示されているような1 - アシル - グリセロール誘導体に結合していてもよい。さらにまたは代わりに、T r k B リガンド、その断片または変異体は、投与時の安定性を増大させるために、例えば、米国特許第6,723,701号に記載されているようなより低い等電点を有する変異体を用いることによって改変することができる。T r k B リガンド、およびその断片または変異体は、例えば、「ミニニューロトロフィン」( 例えれば、W i l l i a m s e t a l . J B C 2 5 0 : 5 8 6 2 - 5 8 6 9 ( 2 0 0 4 ) に記載されているようなB A G ) を形成するように直列に配置し、環化することができる。

【0101】

さらに、本発明の方法で使用されるT r k B アゴニストポリペプチドには、T r k B リガンドポリペプチド、その断片、変異体、または誘導体が含まれるが、これらに限定されない。本発明の方法で使用されるT r k B リガンドポリペプチド、その断片、変異体、または誘導体には、免疫グロブリンドメインに融合した全長T r k B タンパク質を含むか、

10

20

30

40

50

本質的に該タンパク質からなるか、または該タンパク質からなるTrkBポリペプチド(例えば、IgGドメインに融合した配列番号：4のアミノ酸1～828；配列番号：4のアミノ酸32～828を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、または該アミノ酸からなるTrkBポリペプチド)も含まれる。また、本明細書に記載されるさらなるTrkBポリペプチド、その断片、変異体、または誘導体は、免疫グロブリンドメインに融合されてもよい。いくつかの実施形態において、本発明のTrkBポリペプチドは、二量体化または多量体化されてもよい。本発明のTrkBポリペプチドには、LINGO-1と相互作用せず、二量体化もしくは多量体化する増大した傾向を有し、内因性もしくは非内因性のリガンドに対する増大した親和性を有し、かつ/または配列番号：4のポリペプチドと比較して増大したキナーゼ活性を有するTrkBの断片、変異体、アイソフォーム、または誘導体も含まれる。10

#### 【0102】

本発明の方法で使用されるさらなるTrkBアゴニストポリペプチドには、本明細書に開示される2つ以上のTrkBアゴニストポリペプチドの組み合わせも含まれる。本発明の方法で使用される2つ以上のTrkBアゴニストポリペプチドは、本明細書に開示される複数のTrkBアゴニストポリペプチドを含む単一のポリペプチドを形成するように1つに融合されてもよく、または本発明の方法で使用される組成物を含む個々のTrkBアゴニストポリペプチドであってもよい。

#### 【0103】

可溶性LINGO-1アンタゴニストポリペプチドおよび/またはTrkBアゴニストポリペプチド20

本明細書に記載される本発明の方法で使用される可溶性LINGO-1アンタゴニストポリペプチドおよびTrkBアゴニストポリペプチドは、環状であってもよい。可溶性LINGO-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドの環化によって、線状ペプチドの立体構造的な自由が低下し、より構造的に拘束された分子が生じる。多くのペプチド環化方法が当技術分野で公知であり、例えば、ペプチドのN末端のアミノ酸残基とC末端のアミノ酸残基の間でのアミド結合の形成による「骨格対骨格」環化である。「骨格対骨格」環化の方法としては、2つの-チオアミノ酸残基(例えば、システイン、ホモシステイン)の間でのジスルフィド架橋の形成が挙げられる。本発明のある種の可溶性LINGO-1アンタゴニストペプチドおよびTrkBアゴニストペプチドには、環状のLINGO-1アンタゴニストポリペプチドおよびTrkBアゴニストポリペプチドを形成させるための、ペプチドのN末端およびC末端上の修飾が含まれる。このような修飾としては、システイン残基、アセチル化システイン残基、NH<sub>2</sub>部分を有するシステイン残基、およびビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。他のペプチド環化の方法は、Li & Roller, Curr. Top. Med. Chem. 3:325-341 (2002)に記載されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。30

#### 【0104】

本明細書に記載される可溶性LINGO-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドは、置換、挿入、または欠失などの様々な改変を有してもよい。例えば、置換としては、以下の置換、すなわち、配列番号：2のLINGO-1ポリペプチドの位置6のバリンからメチオニンへの置換；配列番号：2のLINGO-1ポリペプチドの位置294のセリンからグリシンへの置換；配列番号：2のLINGO-1ポリペプチドの位置348のバリンからアラニンへの置換；LINGO-1ポリペプチドの位置419のアルギニンからヒスチジンへの置換；位置456のアルギニンからグルタミン酸への置換；および配列番号：2の位置458のヒスチジンからバリンへの置換が挙げられるが、これらに限定されない。40

#### 【0105】

本明細書に記載される配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドに対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一である可溶性LIN50

G O - 1 アンタゴニストポリペプチドまたは T r k B アゴニストポリペプチドの対応する断片も企図される。

【 0 1 0 6 】

当技術分野で公知であるように、2つのポリペプチドの間の「配列同一性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列を第2のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。本明細書で議論される場合、任意の特定のポリペプチドが別のポリペプチドに対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一であるかどうかは、当技術分野で公知の方法およびコンピュータプログラム/ソフトウェア(例えば、BESTFITプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix(登録商標)用のバージョン8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)であるが、これに限定されない)を用いて決定することができる。BESTFITは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)の局所相同性アルゴリズムを用いて、2つの配列の間で相同性のある最良のセグメントを見つける。BESTFITまたは任意のその他の配列アラインメントプログラムを用いて、特定の配列が、本発明による参照配列に対して、例えば、95%同一であるかどうかを決定する場合、パラメータは当然、同一性のパーセンテージが参照ポリペプチド配列の全長にわたって計算されるよう、かつ参照配列中のアミノ酸の総数の5%までの相同性のギャップが許されるように設定される。

【 0 1 0 7 】

本発明の方法で使用される可溶性L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドおよびT r k B アゴニストポリペプチドには、2つ以上の可溶性L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドおよびT r k B アゴニストポリペプチドの任意の組み合わせが含まれてもよい。

【 0 1 0 8 】

抗体またはその抗原結合断片

1つの実施形態において、本発明の方法で使用される可溶性L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドおよびT r k B アゴニストポリペプチドには、L I N G O - 1 アンタゴニストまたはT r k B アゴニストである抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれる。例えば、ある種のL I N G O - 1 抗体またはT r k B 抗体が、C NSニューロンによって発現されるL I N G O - 1 またはT r k B に結合することによって、ニューロンの細胞生存が促進される。

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態において、L I N G O - 1 抗体は抗体1A7である。1A7抗体は、2006年7月7日に出願された国際出願P C T U S 0 6 / 2 6 2 7 1に記載されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。1A7抗体の配列を下記表に示す。

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

## 【表3】

表3-1A7抗体配列

	ポリペプチド配列	配列番号
VH	QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGL KWMGWINTDTGEPTYTEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNED TATYFCAREGVHFDYWQQGTTVTVSS	8
VL	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSVSYMHWYQQKSGTSPKR WIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSLTISMEAEDAATYYCQQW SSNPFTFGSGTKLEIK	9

本発明の抗体は、1A7抗体の1つ以上のCDRを含む抗体であることもできる。以下は、それぞれ、1A7抗体のVH CDR1領域、VH CDR2領域、およびVH CDR3領域の配列である：NYGMN（配列番号：10）、WINTDTGEPTYTEDFQG（配列番号：11）、およびEGVHFDY（配列番号：12）。以下は、それぞれ、1A7抗体のVL CDR1領域、VL CDR2領域、およびVL CDR3領域の配列である：SASSSVSYMHW（配列番号：13）、DTSKLAS（配列番号：14）、およびQQWSSNPFT（配列番号：15）。

## 【0111】

いくつかの実施形態において、LINGO-1抗体は、ハイブリドーマ2.P3B5.2から産生することができる、モノクローナル抗体3B5.2（3B5とも表す）である。2.P3B5.2ハイブリドーマは、2006年12月27日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) (Mannassas, VA)に寄託された。3B5抗体は、2007年1月9日に出願された米国仮特許出願第60/879,324号に記載されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。3.B5の配列を下記表に示す。

## 【0112】

## 【表4】

表4-3B5抗体配列

	ポリペプチド配列	配列番号
VH	QVQLQQPGAEVRPGETVKLSCRASGYTFTSYWMHWVKQRPGQQ LEWIGVIDPSDSYTNYNQKFRGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARPYYGSHWFFDVWGTGTTVTVSS	16
VL	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSRVSYVHWYQQKSGTSPKR WLYDTSNLASGVPARFGGNGSGTYSLTISMEAEDAATYYCQQW STNPPTFGGGTKLEIK	17

本発明の抗体は、3B5抗体の1つ以上のCDRを含む抗体であることもできる。以下は、それぞれ、3B5抗体のVH CDR1領域、VH CDR2領域、およびVH CDR3領域の配列である：SYWMHW（配列番号：18）、VIDPSDSYTNYNQKFRG（配列番号：19）、およびPYYGSHWFFDV（配列番号：20）。以下は、それぞれ、3B5抗体のVL CDR1領域、VL CDR2領域、およびVL CDR3領域の配列である：SASSRVSYVH（配列番号：21）、DTSNLAS（配列番号：22）、およびQWSSNPFT（配列番号：23）。

配列番号：22）、およびQ Q W S T N P P T（配列番号：23）。

【0113】

いくつかの実施形態において、L I N G O - 1抗体は、モノクローナル抗体L I 3 3である。L I 3 3抗体は、2007年1月9日に出願された米国仮特許出願第60/879,324号に記載されており、これはその全体が参考により本明細書に組み入れられる。L I 3 3抗体の配列を下記表に示す。

【0114】

【表5】

表5-LI33抗体配列

	ポリペプチド配列	配列番号
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYPMFWVRQAPGKGL EWVSWIGPSGGITKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT ATYYCAREGHNDWYFDLWGRGTLVTVSS	24
VL	DIQMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YDKWPLTFGGGTKEIK	25

10

20

本発明の抗体は、L I 3 3抗体の1つ以上のCDRを含む抗体であることもできる。以下は、それぞれ、L I 3 3抗体のV H C D R 1領域、V H C D R 2領域、およびV H C D R 3領域の配列である：I Y P M F（配列番号：26）、W I G P S G G I T K Y A D S V K G（配列番号：27）、およびE G H N D W Y F D L（配列番号：28）。以下は、それぞれ、L I 3 3抗体のV L C D R 1領域、V L C D R 2領域、およびV L C D R 3領域の配列である：R A S Q S V S S Y L A（配列番号：29）、D A S N R A T（配列番号：30）、およびQ Q Y D K W P L T（配列番号：31）。

【0115】

別の実施形態において、L I N G O - 1抗体は、7 . P 1 D 5 . 1 . G 9から產生することができる、モノクローナル抗体7 P 1 D 5 . 1 G 9である。7 . P 1 D 5 . 1 . G 9ハイブリドーマは、2006年12月27日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) (Mannassas, VA)に寄託された。7 . P 1 D 5 . 1 . G 9抗体は、に記載されている。

30

【0116】

本明細書に記載される方法で使用されるある種のL I N G O - 1アンタゴニスト抗体は、特定のL I N G O - 1ポリペプチドの断片またはドメインに特異的または優先的に結合する。このようなL I N G O - 1ポリペプチド断片には、配列番号：2のアミノ酸34～532；34～417、34～425、34～493、66～532、66～417（L R Rドメイン）、66～426、66～493、66～532、417～532、417～425（L I N G O - 1塩基性領域）、417～424（L I N G O - 1塩基性領域）、417～493、417～532、419～493（L I N G O - 1 I g領域）、もしくは425～532を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、もしくは該アミノ酸からなるL I N G O - 1ポリペプチド、または配列番号：2のアミノ酸34～532；34～417、34～425、34～493、66～532、66～417、66～426、66～493、66～532、417～532、417～425（L I N G O - 1塩基性領域）、417～493、417～532、419～493（L I N G O - 1 I g領域）、もしくは425～532に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%同一のL I N G O - 1変異体ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0117】

50

本発明の方法で使用されるある種の L I N G O - 1 特異的抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が結合するさらなる L I N G O - 1 ペプチド断片には、L I N G O - 1 の 1 つ以上のロイシンリッチリピート (L R R) を含むか、本質的に該リピートからなるか、または該リピートからなる断片が含まれるが、これらに限定されない。このような断片には、例えば、配列番号：2 のアミノ酸 66 ~ 89、66 ~ 113、66 ~ 137、90 ~ 113、114 ~ 137、138 ~ 161、162 ~ 185、186 ~ 209、210 ~ 233、234 ~ 257、258 ~ 281、282 ~ 305、306 ~ 329、もしくは 330 ~ 353 を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、または該アミノ酸からなる断片が含まれる。配列番号：2 のアミノ酸 66 ~ 89、66 ~ 113、90 ~ 113、114 ~ 137、138 ~ 161、162 ~ 185、186 ~ 209、210 ~ 233、234 ~ 257、258 ~ 281、282 ~ 305、306 ~ 329、または 330 ~ 353 に対して、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、または 95% 同一の変異体 L I N G O - 1 ポリペプチドの対応する断片も企図される。  
10

#### 【0118】

本発明のある種の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が結合するさらなる L I N G O - 1 ペプチド断片には、L I N G O - 1 の L R R に隣接する 1 つ以上のシステインリッチ領域を含むか、本質的に該領域からなるか、または該領域からなる断片が含まれるが、これらに限定されない。このような断片には、例えば、配列番号：2 のアミノ酸 34 ~ 64 (N 末端の L R R 隣接領域 (L R R N T)) を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、もしくは該アミノ酸からなる断片、または配列番号：2 のアミノ酸 363 ~ 416 (C 末端の L R R 隣接領域 (L R R C T)) を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、もしくは該アミノ酸からなる断片が含まれる。配列番号：2 のアミノ酸 34 ~ 64 および 363 ~ 416 に対して、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、または 95% 同一の変異体 L I N G O - 1 ポリペプチドの対応する断片も企図される。  
20

#### 【0119】

その他の実施形態において、本明細書に記載される方法で使用される L I N G O - 1 アンタゴニストには、L I N G O - 1 の少なくとも 1 つのエピトープに特異的または優先的に結合する抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれ、この場合、そのエピトープは、配列番号：2 の少なくとも約 4 ~ 5 個のアミノ酸、配列番号：2 の少なくとも 7 個、少なくとも 9 個、または少なくとも約 15 個 ~ 約 30 個のアミノ酸を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、または該アミノ酸からなる。記載されているような配列番号：2 の所与のエピトープのアミノ酸は、連続的であっても、または線状であってもよいが、そうである必要はない。ある実施形態において、L I N G O - 1 の少なくとも 1 つのエピトープは、細胞の表面上に発現されるかまたは例えば、I g G F c 領域に融合した可溶性断片として発現されるような L I N G O - 1 の細胞外ドメインによって形成される非線状エピトープを含むか、本質的に該エピトープからなるか、または該エピトープからなる。したがって、ある実施形態において、L I N G O - 1 の少なくとも 1 つのエピトープは、配列番号：2 の少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 25 個、約 15 個 ~ 約 30 個の、または少なくとも 10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個、55 個、60 個、65 個、70 個、75 個、80 個、85 個、90 個、95 個、もしくは 100 個の連続的または非連続的アミノ酸を含むか、本質的に該アミノ酸からなるか、または該アミノ酸からなり、この場合、非連続的アミノ酸は、タンパク質の折り畳みを通じてエピトープを形成する。  
30  
40

#### 【0120】

本明細書に記載される方法で使用されるある種の T r k B アゴニスト抗体は、特定の T r k B ポリペプチドの断片またはドメインに特異的または優先的に結合する。例えば、本発明の抗体は、T r k B の I g G - 1 領域または I g G - 2 領域内のエピトープに結合す  
50

ることができ、かつ IgG-1ドメインおよび/またはIgG-2ドメインのループ領域内の配列に結合することができる。本発明の抗体には、TrkB自己リン酸化を増大させる抗体も含まれる。TrkBアゴニスト抗体のある非限定的な例としては、BDNFなどのリガンドのTrkB受容体への結合を阻止するモノクローナル抗体、BDNFなどのリガンドのTrkB受容体への結合を部分的に阻止するモノクローナル抗体、BDNFなどのリガンドのTrkB受容体への結合を阻止しないモノクローナル抗体、およびBDNFなどのリガンドのTrkB受容体への結合を促進するかまたは増大させるモノクローナル抗体も挙げられるが、これらに限定されない。本発明のTrkBアゴニスト抗体には、BDNFなどのリガンドのTrkB受容体への結合に影響を及ぼさないモノクローナル抗体も含まれる。TrkBアゴニスト抗体のある非限定的な例としては、6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12、29D7(これらは、米国公開特許出願第2007/0059304号およびQuin et al., Jour. of Neuroscience. 26:9394-9403(2006)に記載されており、その各々が参照により本明細書に組み入れられる)ならびにこれらの抗体と同じエピトープに結合する抗体または抗原結合断片も挙げられる。本発明の方法で使用される例示的なTrkBアゴニスト抗体には、上記のTrkBアゴニスト抗体と同じTrkBエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片も含まれる。

#### 【0121】

本発明の方法で使用される例示的な抗体またはその断片には、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2006年7月7日に出願された国際出願PCT/US06/26271(「Sp35 Antibodies and Uses Thereof」という題でMいらに権利が付与されている)に記載されているような、201'、3A3、3A6、3B5、1A7、1D5、1G7、2B10、2C11、2F3、3P1B1.1F9、3P1D10.2C3、3P1E11.3B7、3P2C6.3G10.2H7、3P2C9.2G4、3P4A6.1D9、3P4A1.2B9、3P4C2.2D2、3P4C5.1D8、3P4C8.2G9、6P4F4.1Ds、6P4F4.1F9、7P1D5.1G9、1B6.4、2C7.2、2D6.1、2F7.3、2H3.2、3C11.1、3E3.1、3H11.2、3G8.1、2B8.1、3B5.230-0-C12(Li01)、38-D01(Li02)、35-E04(Li03)、36-C09(Li04)、30-A11(Li05)、34-F02(Li06)、29-E07(Li07)、34-G04(Li08)、36-A12(Li09)、28-D02(Li10)、30-B01(Li11)、34-B03(Li12)、Li13、Li32、Li33、Li34、3383(L1a.1)、3495(L1a.2)、3563(L1a.3)、3564(L1a.4)、3565(L1a.5)、3566(L1a.6)、3567(L1a.7)、3568(L1a.8)、3569(L1a.9)、3570(L1a.10)、3571(L1a.11)、3582(L1a.12)、1968(L1a.13)、3011、3012、3013、3418、3422、3562、D05、D07、D08、D10、およびD11からなる群より選択される参考モノクローナル抗体と同じLINGO-1エピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片も含まれる。

#### 【0122】

その他の実施形態において、本発明の方法で使用されるLINGO-1アントゴニストおよびTrkBアゴニストには、LINGO-1またはTrkBの少なくとも1つのエピトープに特異的または優先的に結合するLINGO-1抗体もしくはTrkB抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれ、この場合、エピトープは、上記のような、それぞれ、配列番号：2または配列番号：4の1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはそれより多くの連続的または非連続的アミノ酸に加えて、タンパク質を修飾する付加的な部分を含むか、本質的に該部分からなるか、または該部分からなる。例えば、LINGO-1抗体またはTrkB抗体が、未修飾バージョンのタンパク質に結合するよりも高い親和性で修飾された標的タンパク質に結合するように、炭水化物部分が含ま

れてもよい。あるいは、L I N G O - 1 抗体またはTrkB抗体は、未修飾バージョンの標的タンパク質には全く結合しない。

【0123】

ある実施形態において、本発明の方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストおよびTrkBアゴニストには、上記のL I N G O - 1 もしくはTrkBもしくは断片もしくは変異体の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する、すなわち、無関係なエピトープ、もしくはランダムなエピトープに結合するよりも容易にそのようなエピトープに結合するか；上記のL I N G O - 1 もしくはTrkBもしくは断片もしくは変異体の少なくとも1つのエピトープに優先的に結合する、すなわち、関連のあるエピトープ、同様のエピトープ、相同なエピトープ、もしくは類似するエピトープに結合するよりも容易にそのようなエピトープに結合するか；それ自体、上記のL I N G O - 1 もしくはTrkBもしくは断片もしくは変異体のあるエピトープに特異的もしくは優先的に結合する参照抗体の結合を競合的に阻害するか；または約 $5 \times 10^{-2}$  M、約 $10^{-2}$  M、約 $5 \times 10^{-3}$  M、約 $10^{-3}$  M、約 $5 \times 10^{-4}$  M、約 $10^{-4}$  M、約 $5 \times 10^{-5}$  M、約 $10^{-5}$  M、約 $5 \times 10^{-6}$  M、約 $10^{-6}$  M、約 $5 \times 10^{-7}$  M、約 $10^{-7}$  M、約 $5 \times 10^{-8}$  M、約 $10^{-8}$  M、約 $5 \times 10^{-9}$  M、約 $10^{-9}$  M、約 $5 \times 10^{-10}$  M、約 $10^{-10}$  M、約 $5 \times 10^{-11}$  M、約 $10^{-11}$  M、約 $5 \times 10^{-12}$  M、約 $10^{-12}$  M、約 $5 \times 10^{-13}$  M、約 $10^{-13}$  M、約 $5 \times 10^{-14}$  M、約 $10^{-14}$  M、約 $5 \times 10^{-15}$  M、もしくは約 $10^{-15}$  M未満の解離定数 $K_D$ を特徴とする親和性で、上記のL I N G O - 1 もしくはTrkBもしくは断片もしくは変異体の少なくとも1つのエピトープに結合する、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれる。特定の態様において、抗体またはその断片は、マウスL I N G O - 1 ポリペプチドもしくはその断片またはマウスTrkBポリペプチドもしくはその断片と比べて、ヒトL I N G O - 1 ポリペプチドもしくはその断片またはヒトTrkBポリペプチドもしくはその断片に優先的に結合する。

【0124】

抗体の結合解離定数の文脈で使用される場合、用語「約」は、抗体の親和性を測定するために利用される方法に固有の変動の程度を可能にする。例えば、使用される装置の精度のレベル、測定される試料の数に基づく標準誤差、および丸め誤差に応じて、用語「約 $10^{-2}$  M」には、例えば、0.05 Mから0.005 Mまでが含まれる場合がある。

【0125】

特定の実施形態において、本発明の方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストまたはTrkBアゴニストには、L I N G O - 1 ポリペプチドもしくはその断片もしくは変異体、またはTrkBポリペプチドもしくはその断片もしくは変異体に、 $5 \times 10^{-2}$ 秒 $^{-1}$ 以下、 $10^{-2}$ 秒 $^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-3}$ 秒 $^{-1}$ 以下、もしくは $10^{-3}$ 秒 $^{-1}$ 以下の解離速度定数( $k_{(off)}$ )で結合する本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれる。あるいは、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、L I N G O - 1 ポリペプチドまたはTrkBポリペプチドまたはその断片もしくは変異体に、 $5 \times 10^{-4}$ 秒 $^{-1}$ 以下、 $10^{-4}$ 秒 $^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-5}$ 秒 $^{-1}$ 以下、もしくは $10^{-5}$ 秒 $^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-6}$ 秒 $^{-1}$ 以下<sup>1</sup>、 $10^{-6}$ 秒 $^{-1}$ 以下、 $5 \times 10^{-7}$ 秒 $^{-1}$ 以下、もしくは $10^{-7}$ 秒 $^{-1}$ 以下の解離速度定数( $k_{(off)}$ )で結合する。

【0126】

その他の実施形態において、本発明の方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストまたはTrkBアゴニストには、L I N G O - 1 ポリペプチドもしくはその断片もしくは変異体、またはTrkBポリペプチドもしくはその断片もしくは変異体に、 $10^{-3}$  M $^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^{-3}$  M $^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 以上、 $10^{-4}$  M $^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 以上、もしくは $5 \times 10^{-4}$  M $^{-1}$ 秒 $^{-1}$ 以上の結合速度定数( $k_{(on)}$ )で結合する本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体が含まれる。あるいは、本発明の抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、L I N G O - 1 ポリペプチドもしくはその

10

20

30

40

50

断片もしくは変異体、またはTrkBポリペプチドもしくはその断片もしくは変異体に、 $10^5 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^5 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上、 $10^6 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^6 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上、もしくは $10^7 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上の結合速度定数( $k_{(on)}$ )で結合する。

【0127】

1つの実施形態において、本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体は、抗体分子またはその免疫特異的断片である。別途記載されなければ、本明細書に記載される場合、抗体に関する「その断片」は、免疫特異的断片、すなわち、抗原特異的断片を指す。1つの実施形態において、本発明の方法で使用される抗体は、二重特異性の結合分子、結合ポリペプチド、または抗体であり、例えば、二重特異性の抗体、ミニボディー、ドメイン欠失抗体、または2つ以上のエピトープ(例えば、2つ以上の抗原、もしくは同じ抗原上の2つ以上のエピトープ)に対して結合特異性を有する融合タンパク質である。1つの実施形態において、二重特異性抗体は、LINGO-1またはTrkB上の少なくとも1つのエピトープに特異的な少なくとも1つの結合ドメインを有する。二重特異性抗体は、LINGO-1またはTrkBの1つのエピトープに特異的な2つの標的結合ドメインと、第2の標的に特異的な2つの標的結合ドメインを有する四価抗体であり得る。したがって、四価二重特異性抗体は、各々の特異性について二価であり得る。

【0128】

本発明のある実施形態は、所望の生化学的特性(例えば、ほぼ同じ免疫原性の改変されていない抗体全体と比較した場合の、低下したエフェクター機能、非共有結合的に二量体化する能力、所望の部位に局在化する増大した能力、低下した血清半減期、または増大した血清半減期)を提供するように、定常領域ドメインの1つ以上の少なくとも一部が欠失されているかまたは別の方法で改変されている、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片の投与を含む。例えば、本明細書に記載される方法で使用されるある種の抗体は、ドメイン欠失抗体であり、これは、免疫グロブリン重鎖と同様のポリペプチド鎖を含むが、1つ以上の重鎖ドメインの少なくとも一部を欠いている。例えば、ある種の抗体において、修飾抗体の定常領域の1つのドメイン全体が欠失しており、例えば、C<sub>H</sub>2ドメインの全体または一部が欠失している。

【0129】

本明細書に記載される方法で使用されるある種のLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片において、Fc部分は、当技術分野で公知の技術を用いてエフェクター機能を減少させるように突然変異させてもよい。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性(点突然変異またはその他の手段による)によって、血液循環する修飾抗体のFc受容体結合が低下し、それによって、所望の作用の部位での局在化が増大し得る。その他の場合において、本発明と一致する定常領域の修飾によって、補体結合が和らげられ、それにより、結合体化した細胞毒素の血清半減期および非特異的会合が低下するということがあり得る。定常領域に対するその他の望ましい修飾には、効力、安全性、抗原結合、Fcエフェクター機能、安定性、および/または抗体産物の一貫性に影響を及ぼすために、グリコシル化を改変する(例えば、グリコシル化を低下させる)よう設計された突然変異が含まれる。さらなる望ましい修飾には、例えば、多量体形成に関与することが知られているかまたは予想されている残基の修飾によって、抗体の溶解性を改変する修飾が含まれる。定常領域のさらにその他の修飾を用いて、ジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を修飾してもよく、これにより、抗原特異性または抗体柔軟性の増大が原因で局在化の増強が可能になる。得られる修飾の生理学的プロファイル、バイオアベイラビリティー、およびその他の生化学的効果(例えば、局在化、生体分布、および血清半減期)は、過度の実験を行うことなく、周知の免疫学的技術を用いて、容易に測定および定量され得る。

【0130】

10

20

30

40

50

本明細書に開示される方法で使用される修飾された形態の抗体またはその免疫特異的断片は、当技術分野で公知の技術を用いて、前駆体またはもとの抗体全体から作製することができる。例示的な技術は、本明細書でさらに詳細に議論されている。

#### 【0131】

ある実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはT r k Bアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片の可変領域と定常領域の両方は、完全にヒトのものである。完全なヒト抗体は、当技術分野で公知でありかつ本明細書に記載されるような技術を用いて作製することができる。例えば、特異的抗原に対する完全なヒト抗体は、抗原によるチャレンジに応答してそのような抗体を産生するように修飾されているが、その内因性遺伝子座が不能にさせられているトランスジェニック動物に抗原を投与することによって調製することができる。そのような抗体を作製するのに使用することができる例示的な技術は、米国特許第6,150,584号；同第6,458,592号；同第6,420,140号に記載されている。その他の技術は当技術分野で公知である。完全なヒト抗体は、様々なディスプレイ技術（例えば、本明細書の他の場所でさらに詳細に記載されるような、ファージディスプレイ系またはその他のウイルスディスプレイ系）によって、同様に産生することができる。

#### 【0132】

本明細書に開示される方法で使用されるL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはT r k Bアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片は、当技術分野で公知である技術を用いて作製または製造することができる。ある実施形態において、抗体分子またはその断片は、「組換えによって産生される」、すなわち、組換えDNA技術を用いて産生される。抗体分子またはその断片を作製するための例示的な技術は、本明細書の他の場所でさらに詳細に議論されている。

#### 【0133】

本明細書の方法で使用されるL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはT r k Bアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片は、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって作製し得る。

#### 【0134】

ポリクローナル抗体は、当技術分野で周知の様々な手順によって産生することができる。例えば、L I N G O - 1免疫特異的断片またはT r k B免疫特異的断片を、ウサギ、マウス、ラットなどを含むが、これらに限定されない、様々な宿主動物に投与して、抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導することができる。免疫学的応答を増大させるために、宿主の種に応じて、様々なアジュバントを使用してもよい。これには、フロイトのアジュバント（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン）、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油状エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および有用である可能性があるヒトアジュバント（例えば、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）、およびコリネバクテリウム・バルブム（*Corynebacterium parvum*））が含まれるが、これらに限定はされない。このようなアジュバントもまた当技術分野で周知である。

#### 【0135】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当技術分野で公知の種々様々な技術を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知の技術、およびHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 (1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981) (該参考文献

10

20

30

40

50

はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)に教示されている技術を含むハイブリドーマ技術を用いて產生することができる。本明細書で使用される場合の用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術によって產生される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物、原核生物、またはファージのクローニングを含む、単一のクローニングに由来する抗体を指し、それが產生される方法を指すものではない。したがって、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術によって產生された抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術および組換え技術およびファージディスプレイ技術の使用を含む、当技術分野で公知の種々様々な技術を用いて調製することができる。

## 【0136】

10

1つの例において、当技術分野で認識されているプロトコルを用いて、関連抗原(例えば、精製されたL I N G O - 1抗原もしくはT r k B抗原、またはこのような抗原を含む細胞もしくは細胞抽出物)とアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって、抗体を哺乳動物で惹起する。この免疫化は、典型的には、活性化された脾臓細胞またはリンパ球からの抗原反応性抗体の產生を含む免疫応答を誘発する。得られる抗体を動物の血清から採取して、ポリクローナル調製物を提供し得るが、多くの場合、脾臓、リンパ節、または末梢血から個々のリンパ球を単離して、モノクローナル抗体(m A b)の均質な調製物を提供することが望ましい。リンパ球は、例えば、脾臓から得ることができる。

## 【0137】

20

この周知のプロセス(Kohler et al., Nature 256: 495 (1975))においては、抗原が注射された哺乳動物に由来する、比較的短期間しか生存できないか、または死ぬ運命にあるリンパ球が、不死化腫瘍細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)と融合させられ、それによって、不死であり、かつ遺伝子によってコードされるB細胞の抗体を產生することもできるハイブリッド細胞、すなわち、「ハイブリドーマ」が生じる。得られるハイブリッドは、単一の抗体の形成のための特異的な遺伝子を含む各々個別の株での選択、希釈、および再増殖によって、単一の遺伝的な株に分離される。これらは、所望の抗原に対して均質であり、それらの純粋な遺伝的血統に関して「モノクローナル」と呼ばれる抗体を產生する。

## 【0138】

30

典型的には、このように調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない、もとの骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含むことができる好適な培養培地中に播種し、その中で増殖させる。当業者は、ハイブリドーマの形成、選択、および増殖のための試薬、細胞株、および培地が、多くの供給源から市販されており、標準化されたプロトコルが十分に確立されているということを理解するであろう。通常、ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地を、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の產生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって產生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、放射免疫測定法(R I A)、または酵素結合免疫吸着法(E L I S A)のようなインビトロアッセイによって決定することができる。所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を產生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローニングを、限界希釈手順によってサブクローニングし、標準的な方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 59 - 103頁(1986))によって増殖させてもよい。サブクローニングによって分泌されたモノクローナル抗体を、培養培地、腹水、または血清から、例えば、プロテイン-A、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィーのような、従来の精製手順によって分離し得るということがさらに理解されるであろう。

## 【0139】

40

特異的エピトープを認識する抗体断片を公知の技術によって作製してもよい。例えば、F a b 断片およびF ( a b ' )<sub>2</sub>断片を、パパイン(F a b 断片を產生するため)またはペプシン(F ( a b ' )<sub>2</sub>断片を產生するため)などの酵素を用いて、免疫グロブリン分

50

子のタンパク質分解的切断によって產生してもよい。F(a b')<sub>2</sub>断片は、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のC<sub>H</sub>1ドメインを含む。

#### 【0140】

当業者は、抗体または抗体断片（例えば、抗原結合部位）をコードするDNAを抗体ファージライブラリーから取得し得るということも理解するであろう。特に、このようなファージを利用して、レパートリー抗体ライブラリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現された抗原結合ドメインをディスプレイさせることができる。関心となる抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて（例えば、標識された抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉させられた抗原を用いて）選択または同定することができる。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子I I Iまたは遺伝子V I I Iのいずれかのタンパク質に組換えによって融合させられた、Fab抗体ドメイン、Fv抗体ドメイン、またはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するファージから発現されたfd結合ドメインとM13結合ドメインとを含む纖維状ファージである。例示的な方法は、例えば、EP 368 684 B1号；米国特許第5,969,108号、Hoogenboom, H. R. and Chames, Immunol. Today 21:371 (2000)；Nagy et al. Nat. Med. 8:801 (2002)；Huie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682 (2001)；Lui et al., J. Mol. Biol. 315:1063 (2002)に示されており、これらは各々、参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの刊行物（例えば、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)）には、鎖シャッフリングによる高親和性ヒト抗体の產生、ならびに大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビオ組換えが記載されている。別の実施形態において、バクテリオファージの代わりに、ディスプレイプラットフォームとしてリボソームディスプレイを使用することができる（例えば、Hanes et al., Nat. Biotechnol. 18:1287 (2000)；Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750 (2001)；またはIrving et al., J. Immunol. Methods 248:31 (2001)を参照されたい）。また別の実施形態において、細胞表面ライブラリーを抗体についてスクリーニングすることができる（Boder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701 (2000)；Daugherty et al., J. Immunol. Methods 243:211 (2000)）。このような手順によって、モノクローナル抗体の単離とその後のクローニングのための伝統的なハイブリドーマ技術の代替法が提供される。

#### 【0141】

ファージディスプレイ法においては、機能的な抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を持つファージ粒子の表面上にディスプレイされる。特に、V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域をコードするDNA配列は、動物のcDNAライブラリー（例えば、ヒトもしくはマウスの、リンパ系組織のcDNAライブラリー）から、または合成のcDNAライブラリーから増幅される。ある実施形態において、V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域をコードするDNAは、PCRでscFvリンクによって1つに接続され、ファージミドベクター（例えば、p CANTAB 6またはp Comb 3 HSS）にクローニングされる。ベクターは大腸菌（E. coli）にエレクトロポレーションされ、大腸菌はヘルバーファージに感染させられる。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、fdとM13とを含む纖維状ファージであり、V<sub>H</sub>領域またはV<sub>L</sub>領域は、通常、ファージ遺伝子I I Iまたは遺伝子V I I Iのいずれかに組換えによって融合されている。関心となる抗原（すなわち、LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBポリペプチドまたはその断片）に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて（例えば、標識さ

れた抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を用いて)選択または同定することができる。

【0142】

抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法のさらなる例としては、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187:9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT出願番号PCT/GB91/01134号; PCT公開WO 90/02809号; WO 91/10737号; WO 92/01047号; WO 92/18619号; WO 93/11236号; WO 95/15982号; WO 95/20401号; ならびに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号、および同第5,969,108号に開示されている方法が挙げられ、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

【0143】

上記参考文献に記載されているように、ファージの選択後、ファージ由来の抗体コード領域を単離し、抗体全体(ヒト抗体を含む)、または任意のその他の所望の抗原結合断片を作製するために使用し、任意の所望の宿主(哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む)で発現させることができる。例えば、Fab、Fab'、およびFab<sub>2</sub>断片を組換えによって产生するための技術も、PCT公開WO 92/22324号; Mullinax et al., Biotechniques 12(6):864-869 (1992); およびSawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); およびBetter et al., Science 240:1041-1043 (1988) (該参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)に開示されている方法のような、当技術分野で公知の方法を用いて利用することができる。

30

【0144】

別の実施形態において、本発明の方法で使用される所望のモノクローナル抗体をコードするDNAを、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)容易に単離し、配列決定し得る。単離され、サブクローニングされたハイブリドーマ細胞は、このようなDNAのあり得る供給源としての役割を果たす。ひとたび単離すれば、DNAを発現ベクターの中に入れてもよく、これは、その後、別 の方法で免疫グロブリンを产生することはない原核生物または真核生物の宿主細胞(例えば、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞)にトランスフェクトされる。より具体的には、単離されたDNA(本明細書に記載されるように合成されたものであり得る)を用いて、1995年1月25日に出願されたNewmanらの米国特許第5,658,570号(これは参照により本明細書に組み入れられる)に記載されているような製造抗体のための定常領域および可変領域の配列をクローニングしてもよい。本質的に、これにより、選択された細胞からのRNAの抽出、cDNAへの変換、およびIg特異的プライマーを用いたPCRによる増幅が可能になる。この目的のために好適なプライマーも、米国特許第5,658,570号に記載されている。以下にさらに詳細に議論されるように、所望の抗体を発現する形質転換細胞を比較的大量に増殖させ、免疫グロブリンの臨床的および商業的な供給を提供し得る。

40

50

## 【0145】

特定の実施形態において、重鎖および／または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列を、当技術分野で周知である方法によって（例えば、その他の重鎖および軽鎖の可変領域の公知のアミノ酸配列と比較することによって）調べて、相補性決定領域（CDR）の配列を同定し、配列超可変性の領域を決定してもよい。日常的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRをフレームワーク領域に、例えば、ヒトのフレームワーク領域に挿入し、非ヒト抗体をヒト化してもよい。フレームワーク領域は、天然のフレームワーク領域、またはコンセンサスフレームワーク領域であってもよく、ヒトフレームワーク領域であってもよい（例えば、ヒトフレームワーク領域のリストについては、Chothia et al. , J. Mol. Biol. , 278 : 457 - 479 (1998) を参照されたい）。フレームワーク領域とCDRの組み合わせによって作製されるポリヌクレオチドは、所望のポリペプチド（例えば、LINGO-1）の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する抗体をコードしてもよい。1つ以上のアミノ酸置換をフレームワーク領域内に作製してもよく、このアミノ酸置換は、その抗原に対する抗体の結合を向上させ得る。さらに、このような方法を用いて、鎖内ジスルフィド結合に関する1つ以上の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製し、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体分子を作製してもよい。ポリヌクレオチドに対するその他の改変が本発明に包含されており、これらは当業者の能力の範囲内である。

## 【0146】

ある実施形態において、本発明に開示される方法で使用されるLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片は、処置される動物における（例えば、ヒトにおける）有害な免疫応答を誘発しない。1つの実施形態において、本発明に開示される方法で使用されるLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片は、当技術分野で認識されている技術を用いて、それらの免疫原性を低下させるように修飾することができる。例えば、抗体をヒト化し、靈長類化し、脱免疫化することができ、またはキメラ抗体を作製することができる。これらのタイプの抗体は、もとの抗体の抗原結合特性を保持または実質的に保持するが、ヒトにおいて免疫原性がより少ない非ヒト抗体、典型的には、マウス抗体または靈長類抗体から得られる。これを様々な方法によって達成してもよく、これには、（a）キメラ抗体を作製するために、ヒト定常領域上に非ヒト可変ドメインの全体を接合する工程；（b）極めて重要なフレームワーク残基を保持しているかもしくは保持していないヒトのフレームワーク領域および定常領域に1つ以上の非ヒト相補性決定領域（CDR）の少なくとも一部を接合する工程；または（c）表面残基の置き換えによって非ヒト可変ドメインの全体を移植する工程であるが、ヒト様部分でそれを「覆い隠す」工程が含まれる。このような方法は、Morrison et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 6851 - 6855 (1984) ; Morrison et al. , Adv. Immunol. 44 : 65 - 92 (1988) ; Verhoeven et al. , Science 239 : 1534 - 1536 (1988) ; Padlan, Molec. Immun. 28 : 489 - 498 (1991) ; Padlan, Molec. Immun. 31 : 169 - 217 (1994)、ならびに米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、および同第6,190,370号に開示されており、これらは全て、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0147】

脱免疫化を用いて、抗体の免疫原性を減少させることもできる。本明細書で使用される場合、用語「脱免疫化」には、T細胞エピトープを修飾するための抗体の改変が含まれる（例えば、WO 9852976 A1号、WO 0034317 A2号を参照のこと）。例えば、出発抗体に由来するV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列が解析され、ヒトT細胞エピトープが、相補性決定領域（CDR）および配列内のその他の重要な残基に関するエピトープの位置

10

20

30

40

50

を示す各々のV領域から「マップ」される。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープは、最終的な抗体の活性を変化させる危険性が低い代替のアミノ酸置換を同定するために解析される。アミノ酸置換の組み合わせを含む代替の様々なV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列が設計され、これらの配列は、様々な結合ポリペプチド（例えば、本明細書に開示される方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片またはT r k B アゴニスト抗体もしくはその免疫特異的断片）に実質的に組み込まれ、その後、これは、機能について試験される。典型的には、12個～24個の変異体抗体が作製され、試験される。その後、修飾されたV領域およびヒトC領域を含む完全な重鎖および軽鎖の遺伝子が、発現ベクターにクローニングされ、次に、プラスミドが抗体全体の產生のために細胞株に導入される。その後、抗体は、適当な生化学的アッセイおよび生物学的アッセイで比較され、最適な変異体が同定される。

#### 【0148】

キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子（例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域とを有する抗体）である。キメラ抗体を產生する方法は当技術分野で公知である。例えば、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., Biotechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); 米国特許第5,807,715号；同第4,816,567号；および同第4,816397号を参照されたく、これらは、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する1つ以上の相補性決定領域（CDR）とヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域とを有する、所望の抗原に結合する非ヒト種由來の抗体分子である。多くの場合、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基をCDRドナー抗体由來の対応する残基と置換し、抗原結合を変化させ、かつ抗原結合を潜在的に向上させる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって（例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDR残基とフレームワーク残基の相互作用のモデリング、および特定の位置の非正規フレームワーク残基を同定するための配列比較によって）同定される。（例えば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号；Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)を参照されたく、これらはその全体が参考により本明細書に組み入れられる。）抗体は、例えば、CDRの接合（欧州特許第239,400；PCT公開WO 91/09967号；米国特許第5,225,539号；同第5,530,101号；および同第5,585,089号）、ベニアーリング（veneering）または新しい表面を作ること（resurfacing）（欧州特許第EP 592,106号；欧州特許第519,596号；Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994)）、ならびに鎖シャッフリング（米国特許第5,565,332号）を含む、当技術分野で公知の種々の技術を用いてヒト化することができる。

#### 【0149】

組換え抗体を產生するためのまた別の極めて効率的な手段は、Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992)によって開示されている。具体的には、この技術によって、サルの可変ドメインとヒトの定常配列を含む靈長類化抗体の作製がもたらされる。この参考文献は、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。さらに、この技術は、同一出願人による米国特許第5,658,570号、同第5,693,780号、および同第5,756,096号にも記載されており、これらは各々、参考により本明細書に組み入れられる。

#### 【0150】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロ

10

20

30

40

50

プリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記のファージディスプレイ法を含む当技術分野で公知の種々の方法によって作製することができる。米国特許第4,444,887号、および第4,716,111号；ならびにPCT公開WO 98/46645号、WO 98/50433号、WO 98/24893号、WO 98/16654号、WO 96/34096号、WO 96/33735号、およびWO 91/10741号も参照されたく、これらは各自、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0151】

ヒト抗体は、機能的な内因性免疫グロブリンを発現することはできないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて產生することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子複合体を、マウスの胚性幹細胞に、ランダムにまたは相同組換えによって導入し得る。あるいは、ヒトの可変領域、定常領域、および多様性領域を、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入し得る。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別々に、またはこれと同時に、機能しないようにし得る。特に、JH領域のホモ接合型欠失によって、内因性の抗体の產生が妨げられる。修飾された胚性幹細胞を拡大し、胚盤胞にマイクロインジェクションして、キメラマウスを產生する。その後、キメラマウスを交配させ、ヒト抗体を発現するホモ接合型子孫を產生する。トランスジェニックマウスは、選択された抗原（例えば、所望の標的ポリペプチドの全体または一部）を用いて、通常の方法で免疫化される。抗原に対するモノクローナル抗体は、免疫化されたトランスジェニックマウスから、従来のハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリントランス遺伝子は、B細胞分化の間に再配置され、その後、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受ける。したがって、このような技術を用いて、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体、およびIgE抗体を產生することが可能である。ヒト抗体を產生するためのこの技術の概説については、Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995) を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を產生するためのこの技術、ならびにこのような抗体を產生するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、PCT公開WO 98/24893号；WO 96/34096号；WO 96/33735号；米国特許第5,413,923号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,669,825号；同第5,661,016号；同第5,545,806号；同第5,814,318号；および同第5,939,598号を参照されたく、これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) およびGenPharm (San Jose, Calif.) などの会社は、上記の技術と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事することができる。

#### 【0152】

SCIDマウスを用いてヒト抗体を作製する別の手段は、米国特許第5,811,524号に開示されており、これは、参照により本明細書に組み入れられる。これらのヒト抗体と関連する遺伝物質も、本明細書に記載されるように単離し、操作し得るということが明らかであろう。

#### 【0153】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体を、「ガイドされた選択」と呼ばれる技術を用いて作製することができる。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）は、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を導くために使用される（Jespers et al., Bio/Technology 12: 899-903 (1988)）。米国特許第5,565,332号も参照されたい。

#### 【0154】

あるいは、単鎖抗体の產生について記載されている技術（米国特許第4,694,77

10

20

30

40

50

8号; Bird, Science 242: 423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); および Ward et al., Nature 334: 544-554 (1989)) を適合させて、単鎖抗体を產生することができる。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介して Fv 領域の重鎖断片と軽鎖断片を連結させ、単鎖抗体を生じさせることによって形成される。機能的な Fv 断片を大腸菌内で組み立てるための技術も使用し得る (Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988))。単鎖 Fv および単鎖抗体を產生するのに使用することができる技術の例としては、米国特許第 4,946,778 号および第 5,258,498 号; Huston et al., Methods in Enzymology 203: 46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90: 7995-7999 (1993); ならびに Skerra et al., Science 240: 1038-1040 (1988) に記載されている技術が挙げられる。特に、ヒトにおける抗体のインビオ使用およびインビトロ検出アッセイを含む、いくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体を使用することができる。  
10

#### 【0155】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子に由来する遺伝子をスプライシングすることによって「キメラ抗体」を產生するために開発された技術 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314: 452-454 (1985)) を使用することができる。本明細書で使用される場合、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子 (例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域とを有する抗体 (例えば、ヒト化抗体)) である。  
20

#### 【0156】

また、LINGO-1 アンタゴニスト抗体または TrkB アゴニスト抗体は、内因性免疫グロブリンの產生ができないトランスジェニック動物 (例えば、マウス) で作製されたヒトまたは実質的にヒトの抗体であってもよい (例えば、米国特許第 6,075,181 号、同第 5,939,598 号、同第 5,591,669 号、および同第 5,589,369 号 (これらは各々、参照により本明細書に組み入れられる) を参照のこと)。例えば、キメラの、生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖接続領域のホモ接合型欠失によって、内因性抗体产生が完全に阻害がされることが記載されている。ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを、このような生殖系列突然変異体マウスに移入することによって、抗原チャレンジの際に、ヒト抗体の产生が生じる。  
30

#### 【0157】

別の実施形態において、リンパ球を顕微操作によって選択し、可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞を、免疫化した哺乳動物から単離し、インビトロで約 7 日間培養することができる。この培養物を、スクリーニング基準を満たす特異的 Ig G についてスクリーニングすることができる。陽性のウェルに由来する細胞を単離することができる。個々の Ig 產生 B 細胞を、FACS によるかまたは補体媒介性の溶血プラクターアッセイでそれらを同定することによって単離することができる。Ig 產生 B 細胞を、顕微操作してチューブに入れることができ、V<sub>H</sub> 遺伝子および V<sub>L</sub> 遺伝子を、例えば、RT-PCR を用いて増幅することができる。この V<sub>H</sub> 遺伝子および V<sub>L</sub> 遺伝子を抗体発現ベクターにクローニングし、発現のための細胞 (例えば、真核細胞または原核細胞) にトランسفエクトすることができる。  
40

#### 【0158】

あるいは、抗体产生細胞株を、当業者に周知の技術を用いて選択し、培養してもよい。このような技術は、種々の研究室用マニュアルおよび主要な刊行物に記載されている。この点において、以下に記載される本発明で使用するのに好適な技術は、Current  
50

Protocols in Immunology, Coligan et al., 編., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) に記載されており、これは、補遺を含むその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0159】

本明細書に開示される方法で使用される抗体を、抗体の合成（具体的には、化学合成）のための当技術分野で公知の任意の方法によるかまたは本明細書に記載されている組換え発現技術によって產生することができる。

【0160】

本発明の範囲は、抗原結合DNA配列のアレル、変異体、および突然変異の全てをさらに包含するということが理解されるであろう。

【0161】

周知の通り、RNAは、標準的な技術（例えば、グアニジンイソチオシアネート抽出および沈殿と、その後の遠心分離またはクロマトグラフィー）によって、もとのハイブリドーマ細胞からまたはその他の形質転換細胞から単離し得る。望ましい場合、mRNAは、標準的な技術（例えば、オリゴdTセルロース上でのクロマトグラフィー）によってトータルRNAから単離し得る。好適な技術は当技術分野でよく知られている。

【0162】

1つの実施形態において、本発明の方法で使用される抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、周知の方法に従って、逆転写酵素とDNAポリメラーゼとを用いて、同時にまたは別々にのいずれかで、作製し得る。PCRは、コンセンサス定常領域プライマーによるかまたは公開されている重鎖および軽鎖のDNA配列ならびにアミノ酸配列に基づくより特異的なプライマーによって開始させ得る。上で議論されているように、PCRは、抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNAクローニングを単離するためにも使用し得る。この場合、ライプラリーは、コンセンサスプライマーまたはより大きな相同プローブ（例えば、マウス定常領域プローブ）によってスクリーニングし得る。

【0163】

DNA（典型的にはプラスミドDNA）を、当技術分野で公知の技術を用いて細胞から単離し、例えば、組換えDNA技術に関する前述の参考文献に詳細に示されている標準的な周知の技術に従って、制限マップし、配列決定してもよい。もちろん、DNAを、単離のプロセスまたはその後の解析の間の任意の時点で、本発明に従って合成してもよい。

【0164】

抗体、またはその断片、誘導体、もしくは類似体（例えば、LINGO-1アンタゴニストもしくはTrkBアゴニストである抗体の重鎖もしくは軽鎖）の組換え発現には、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が必要である。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖もしくはその一部（重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインを含み得る）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子を產生するためのベクターを、当技術分野で周知の技術を用いた組換えDNA技術によって產生し得る。このように、抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを発現させることによってタンパク質を調製する方法が、本明細書に記載される。当業者に周知である方法を用いて、抗体をコードする配列、ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術、およびインビトロでの遺伝子組換えが挙げられる。したがって、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列（例えば、PCT公開WO 86/05807号；PCT公開WO 89/01036号；および米国特許第5,122,464号を参照のこと）を含んでもよく、抗体の可変ドメインが、重鎖または軽鎖全体の発現のためのその

10

20

30

40

50

ようなベクターにクローニングされてもよい。

【0165】

発現ベクターを従来技術によって宿主細胞に移入し、その後、トランスフェクトされた細胞を従来技術によって培養し、本明細書に記載される方法で使用される抗体を産生させる。したがって、本発明には、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞が含まれる。二本鎖抗体の発現についてのある実施形態においては、重鎖と軽鎖の両方をコードするベクターを、以下に詳細に記載されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のための宿主細胞で共発現させてもよい。

【0166】

種々の宿主発現ベクター系を利用して、本明細書の他の場所に記載されている方法で使用される抗体分子を発現させてもよい。

【0167】

第1のベクターが重鎖由来のポリペプチドをコードし、第2のベクターが軽鎖由来のポリペプチドをコードする、本発明の2つの発現ベクターを、宿主細胞に共トランスフェクトしてもよい。2つのベクターは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択マーカーを含んでもよい。あるいは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを使用してもよい。そのような状況では、毒性のない重鎖が過剰になるを避けるために、軽鎖を重鎖の前に有利に配置する (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1980))。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含んでもよい。

【0168】

本発明の抗体分子が組換えによって発現されると、これは、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野で公知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー(特に、プロテインAの後の特異的抗原に対する親和性によるもの)、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度によるかまたはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術により精製し得る。あるいは、本発明の抗体の親和性を増大させるための別な方法は、U.S. 2002 0123057 A1号に開示されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。

【0169】

1つの実施形態において、本発明の方法で使用される結合分子または抗原結合分子は、1つ以上のドメインが部分的または完全に欠失している合成の定常領域を含む(「ドメイン欠失抗体」)。ある実施形態において、適合する修飾抗体は、C<sub>H</sub>2ドメイン全体が除去されているドメイン欠失コンストラクトまたは変異体(C<sub>H</sub>2コンストラクト)を含む。その他の実施形態については、短い接続ペプチドを欠失したドメインに置き換えて、可変領域の動きに柔軟性および自由を与えてよい。当業者は、抗体の代謝速度に対するC<sub>H</sub>2ドメインの調節特性の理由から、このようなコンストラクトが特に有用であるということを理解するであろう。

【0170】

ある実施形態において、本明細書に開示される方法で使用される修飾抗体は、ミニボディーである。ミニボディーは当技術分野で記載されている方法を用いて作製することができる(例えば、米国特許5,837,821号、またはWO 94/09817 A1号を参照されたい)。

【0171】

別の実施形態において、本明細書に開示される方法で使用される修飾抗体は、当技術分野で公知であるC<sub>H</sub>2ドメイン欠失抗体である。ドメイン欠失コンストラクトは、IgG<sub>1</sub>ヒト定常ドメインをコードするベクター(例えば、Biogen IDEC Incorporated製)を用いて得ることができる(例えば、参照により本明細書に組み入

10

20

30

40

50

れられるWO02/060955A2号およびWO02/096948A2号を参照のこと)。この例示的なベクターは、C<sub>H</sub>2ドメインを欠失させ、ドメイン欠失IgG<sub>1</sub>定常領域を発現する合成ベクターを提供するために改変された。

#### 【0172】

1つの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその断片またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその断片は、単量体サブユニット間で会合することができる限り、数個、もしくはさらには1個のアミノ酸の欠失または置換を有する免疫グロブリン重鎖を含む。同様に、調整されるエフェクター機能(例えば、補体結合)を制御する1つ以上の定常領域ドメインの一部を単に欠失させることが望ましい場合もある。定常領域のこのような部分欠失は、本定常領域ドメインと関連するその他の望ましい機能を完全なままにしながらも、抗体の選択される特徴(血清半減期)を向上させ得る。さらに、上で指摘されているように、開示される抗体の定常領域は、得られるコンストラクトのプロファイルを増強させる1つ以上のアミノ酸の突然変異または置換によって合成され得る。この点において、修飾された抗体の立体配置および免疫原性プロファイルを実質的に維持しながらも、保存された結合部位によって提供される活性(例えば、Fc結合)を破壊することが可能であり得る。またその他の実施形態は、望ましい特徴(例えば、エフェクター機能)を増強させるための、またはより多くの細胞毒素もしくは炭水化物の結合を提供するための定常領域への1つ以上のアミノ酸の付加を含む。このような実施形態において、選択される定常領域ドメインに由来する特異的配列を挿入するかまたは複製することが望ましい場合がある。

10

20

#### 【0173】

本発明は、本明細書に記載される抗体分子(例えば、V<sub>H</sub>領域および/もしくはV<sub>L</sub>領域)の変異体(誘導体を含む)を含むか、本質的に該変異体からなるか、または該変異体からなる抗体の使用も提供する。この抗体またはその断片は、LINGO-1またはTrkBポリペプチドに免疫特異的に結合する。アミノ酸置換を生じる部位特異的突然変異導入およびPCRによって媒介される突然変異導入を含むが、これらに限定されない、当業者に公知の標準的な技術を用いて、結合分子をコードするヌクレオチド配列に突然変異を導入することができる。変異体(誘導体を含む)は、参照となるV<sub>H</sub>領域、V<sub>H</sub>CDR1、V<sub>H</sub>CDR2、V<sub>H</sub>CDR3、V<sub>L</sub>領域、V<sub>L</sub>CDR1、V<sub>L</sub>CDR2、またはV<sub>L</sub>CDR3と比べて、50個未満のアミノ酸の置換、40個未満のアミノ酸緒置換、30個未満のアミノ酸の置換、25個未満のアミノ酸の置換、20個未満のアミノ酸の置換、15個未満のアミノ酸の置換、10個未満のアミノ酸の置換、5個未満のアミノ酸の置換、4個未満のアミノ酸の置換、3個未満のアミノ酸の置換、または2個未満のアミノ酸の置換をコードすることができる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられている置換である。類似の電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、電荷を持たない極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、-分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。あるいは、突然変異は、コード配列の全体または一部に沿ってランダムに(例えば、飽和突然変異導入によって)導入することができ、得られる突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングして、活性を保持する突然変異体を同定することができる。

30

40

#### 【0174】

例えば、抗体分子のフレームワーク領域だけまたはCDR領域だけに突然変異を導入することが可能である。導入される突然変異は、サイレント突然変異または中性のミスセン

50

ス突然変異であってよく、すなわち、抗原に結合する抗体の能力に対して全く影響を及ぼさないかほとんど影響を及ぼさないものであってよい。これらのタイプの突然変異は、コドン使用を最適化するのに、またはハイブリドーマの抗体産生を向上させるのに有用であり得る。あるいは、非中性のミスセンス変異によって、抗原に結合する抗体の能力が変化する場合がある。ほとんどのサイレント突然変異または中性のミスセンス突然変異の位置がフレームワーク領域にある可能性が高いのに対し、ほとんどの非中性のミスセンス変異の位置は C D R にある可能性が高い。とはいっても、これは絶対条件ではない。当業者であれば、抗原結合活性が変化していないことまたは結合活性が変化していないこと（例えば、抗原結合活性の向上または抗体特異性の変化）のような所望の特性を有する突然変異体分子を設計し、試験することができるであろう。突然変異導入の後、コードされるタンパク質を日常的に行われているように発現させてもよく、コードされるタンパク質の機能的活性および／または生物学的活性を、本明細書に記載されている技術を用いて、または当技術分野で公知の技術を日常的に行なわれているように修正することによって決定することができる。10

#### 【 0 1 7 5 】

本発明の方法で使用されるさらなるアンタゴニストおよびアゴニストおよびその組み合せ

先に記載されたアゴニストおよびアンタゴニストに加えて、本発明の方法で使用されるさらなる T r k B アゴニストには、T r k B の活性を促進するか、増大させるか、もしくは増強させる任意のポリペプチド、抗体、化合物、またはヌクレオチドが含まれる。このようなアゴニストには、T r k B リガンド（例えば、脳由来神経栄養因子（B D N F））の T r k B 受容体への結合に干渉するかまたはこの結合を促進し、そのようなものとして B D N F アゴニストとも見なされるポリペプチド、抗体、化合物、またはヌクレオチドが含まれる。このような分子としては、リガンドと T r k B の間の相互作用を破壊する抗体、T r k B のペプチド模倣体アゴニスト、ならびにリガンド類似体（例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、5, 770, 577号、6, 077, 829号、6, 723, 701号、および6, 800, 607号に記載されている類似体）が挙げられるが、これらに限定されない。20

#### 【 0 1 7 6 】

本発明の方法で使用される本明細書に記載されるアンタゴニストおよびアゴニストを、組成物として様々な組み合せで投与してもよい。例えば、様々な T r k B アゴニストを L I N G O - 1 アンタゴニストと組み合せて使用してもよい。本発明の方法で使用される組成物には、複数の T r k B アゴニストおよび／または L I N G O - 1 アンタゴニストも含まれてよい。30

#### 【 0 1 7 7 】

さらに、本発明の方法で使用される組成物には、C N S で発現されるタンパク質（例えば、N o g o 受容体 1（N g R 1）、L I N G O - 1（L I N G O - 1）、T A J、またはオリゴデンドロサイト - ミエリン糖タンパク質（O M g p））のその他のアンタゴニストまたはアゴニストが含まれてもよい。N g R 1 のアンタゴニストは、米国公開第 2 0 0 2 / 0 0 7 7 2 9 5 号および第 2 0 0 5 / 0 2 7 1 6 5 5 A 1 号、ならびに国際出願公開 W O 0 1 / 5 1 5 2 0 号、W O 0 3 / 0 3 1 4 6 2 号、W O 2 0 0 4 / 0 1 4 3 1 1 号、および W O 2 0 0 5 / 0 1 6 9 5 5 号に記載されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。L I N G O - 1（L I N G O - 1）のアンタゴニストは、米国公開第 2 0 0 6 / 0 0 0 9 3 8 8 A 1 号および国際公開 W O 2 0 0 4 / 0 8 5 6 4 8 号に見出され得、これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。T A J アンタゴニストの例は、米国公開第 2 0 0 6 / 0 0 5 8 2 2 3 A 1 号に記載されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。O M g p アンタゴニストは、米国仮出願第 6 0 / 7 3 0, 3 5 7 号および第 6 0 / 7 3 5, 1 7 0 号に記載されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明の方法で使用される組成物には、任意の数および組み合せの T r k B アンタゴニスト、L4050

INGO-1アンタゴニスト、NGR1アンタゴニスト、TAJアンタゴニスト、およびOMgpアンタゴニストも含まれてよい。

【0178】

アプタマー

別の実施形態において、本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニストはアプタマーである。アプタマーは、固有の配列を有し、所望の標的（例えば、ポリペプチド）に特異的に結合する特性を有し、かつ所与の標的の特異的リガンドであるヌクレオチドまたはポリペプチドであることができる。本発明のヌクレオチドアプタマーには、LINGO-1またはTrkBに結合する二本鎖DNA分子および一本鎖RNA分子が含まれる。

10

【0179】

核酸アプタマーは、当技術分野で公知の技術を用いて（例えば、指數関数的濃縮によるリガンドの系統的進化（SELEX）プロセスによって）選択される。SELEXは、米国特許第5,475,096号、同第5,580,737号、同第5,567,588号、同第5,707,796号、同第5,763,177号、同第6,011,577号、および同第6,699,843号（これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる）に記載されているような標的分子に対する極めて特異的な結合を有する核酸分子のインビトロ進化のための方法である。アプタマーを同定するための別のスクリーニング法は、米国特許第5,270,163号に記載されており、これも参照により本明細書に組み入れられる。SELEXプロセスは、核酸が種々の二次元構造および三次元構造、ならびにヌクレオチド単量体内部で利用可能な化学的多用途性を形成して、その他の核酸分子およびポリペプチドを含む、ほとんど全ての化学的化合物（単量体であるかポリマーであるかを問わない）のリガンドとして作用する（リガンドとの特異的な結合対を形成する）能力に基づいている。任意のサイズまたは組成の分子が、標的としての役割を果たすことができる。

20

【0180】

SELEX法は、所望の結合親和性および選択性を達成するために、同じ一般的選択スキームを用いて、候補オリゴヌクレオチドの混合物から選択すること、ならびに結合、分配、および增幅を段階的に反復することを含む。核酸の混合物（ランダム化配列の断片を含むことができる）から出発し、SELEX法は、結合に好都合な条件下での混合物を標的と接触させる工程；標的分子に特異的に結合した核酸から結合していない核酸を分配する工程；核酸-標的複合体を解離させる工程；核酸-標的複合体から解離した核酸を増幅してリガンドが濃縮された核酸混合物を生じさせる工程を含む。標的分子に対して極めて特異的な高親和性核酸リガンドを得るのに望ましい回数だけ、これらの結合、分配、解離、および增幅の工程を繰り返す。

30

【0181】

ヌクレオチドアプタマーを、例えば、診断ツールとしてまたは特異的阻害剤として用いて、細胞内シグナル伝達および輸送経路を細かく調べることができる。James Curr. Opin. Pharmacol. 1:540-546 (2001)を参照されたい。ヌクレオチドアプタマーは親和性および特異性が高いので、ヌクレオチドアプタマーは薬物発見の良好な候補となっている。例えば、リシン毒素に対するアプタマーンタゴニストが単離されており、これはナノモル範囲のIC50値を有する。Hesselberth JR et al. J Biol Chem 275:4937-4942 (2000)を参照されたい。また、ヌクレオチドアプタマーを、感染性疾患、悪性腫瘍、およびウイルス表面タンパク質に対して用いて、細胞の感染性を低下させてよい。

40

【0182】

本発明の方法で使用されるヌクレオチドアプタマーを、他のポリヌクレオチドについて本明細書に記載されているように（例えば、骨格もしくは塩基を修飾することによるかまたはペプチドに結合体化することによって）修飾してもよい。

50

## 【0183】

L I N G O - 1 または T r k B のタンパク質構造を用いると、S E L E X プロセスを用いて L I N G O - 1 または T r k B に作用するアプタマーをスクリーニングすることにより、L I N G O - 1 媒介性のプロセスを阻害するかまたは T r k B 媒介性のプロセスを促進するアプタマーの同定が可能になるであろう（これらのプロセスは、例えば、L I N G O - 1 または T r k B 媒介性の細胞生存の促進である）。

## 【0184】

本発明の方法で使用されるポリペプチドアプタマーは、L I N G O - 1 に結合し、その作用を阻止する能力について選択されたランダムペプチドである。ポリペプチドアプタマーには、両端でタンパク質骨格に結合している短い可変ペプチドドメインが含まれてもよい。この二重の構造的拘束により、ペプチドアプタマーの結合親和性は、抗体の結合親和性に匹敵するレベル（ナノモル範囲）まで大いに増大する。例えば、H o p p e - S e y l e r F e t a l . J . M o l . M e d . 7 8 ( 8 ) : 4 2 6 - 4 3 0 ( 2 0 0 0 ) を参照されたい。短い可変ペプチドの長さは、典型的には、約 1 0 ~ 2 0 アミノ酸であり、骨格は、良好な溶解性および緻密度（c o m p a c i t y ）特性を有する任意のタンパク質であってもよい。骨格タンパク質の 1 つの非限定的な例は、大腸菌タンパク質チオレドキシン - A である。例えば、C o h e n B A e t a l . P N A S 9 5 ( 2 4 ) : 1 4 2 7 2 - 1 4 2 7 7 ( 1 9 9 8 ) を参照されたい。本発明の方法で使用されるポリペプチドアプタマーのさらなる非限定的な例は、リガンド調節性のペプチドアプタマー（L i R P A ）である。L i R P A 骨格は、3 つのタンパク質ドメイン : F K 5 0 6 結合タンパク質（F K B P ）、F R B P - ラバマイシン結合ドメイン（F R B ）、およびグルタチオン - S - トランスフェラーゼ（G S T ）から構成され得る。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、B i n k o w s k i B F e t a l . , C h e m & B i o l 1 2 ( 7 ) : 8 4 7 - 8 5 5 ( 2 0 0 5 ) を参照されたい。

## 【0185】

ポリペプチドアプタマーは、タンパク質機能の最も有力な阻害剤として作用するペプチドまたは小ポリペプチドである。ペプチドアプタマーは、標的タンパク質に特異的に結合し、それらの機能的能力を阻止する。K o l o n i n e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 5 : 1 4 , 2 6 6 - 1 4 , 2 7 1 ( 1 9 9 8 ) 。高い親和性および特異性で標的タンパク質に結合するペプチドアプタマーは、当技術分野で公知の種々の技術によって単離することができる。ペプチドアプタマーは、酵母ツー・ハイブリッドスクリーン（X u , C . W . , e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 4 : 1 2 , 4 7 3 - 1 2 , 4 7 8 ( 1 9 9 7 ) ）によるかまたはリボソームディスプレイ（H a n e s e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 4 : 4 9 3 7 - 4 9 4 2 ( 1 9 9 7 ) ）によって、ランダムなペプチドライブラリーから単離することができる。ペプチドアプタマーは、ファージライブラリー（H o o g e n b o o m , H . R . , e t a l . I m m u n o t e c h n o l o g y 4 : 1 - 2 0 ( 1 9 9 8 ) ）または化学的に生成されたペプチドライブラリーからも単離することができる。ペプチドアプタマーを合成する手段が難しいために、これらの使用はポリヌクレオチドアプタマーよりも複雑になるが、ペプチドアプタマーは無限の化学的多様性を有する。

## 【0186】

本発明の方法で使用されるペプチドアプタマーを、その他のポリペプチドについて本明細書の他の場所で記載されているように修飾（例えば、ポリマーに結合体化またはタンパク質に融合）してもよい。

## 【0187】

融合タンパク質ならびに結合体化されたポリペプチド、アプタマー、化合物、および抗体

本明細書に開示される方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドま

10

20

30

40

50

たはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、Lingo-1アンタゴニスト化合物またはTrkBアゴニスト化合物、およびLingo-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体をさらに、異種ポリペプチドのN末端もしくはC末端に組換えによって融合するか、またはポリペプチドもしくはその他の組成物に化学的に結合体化（共有結合および非共有結合を含む）してもよい。例えば、Lingo-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、Lingo-1アンタゴニスト化合物またはTrkBアゴニスト化合物、およびLingo-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体を、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、または毒素）に組換えによって融合させるかまたは結合体化してもよい。例えば、PCT公開WO 92/08495号；WO 91/14438号；WO 89/12624号；米国特許第5,314,995号；および欧州特許第396,387号を参照されたい。  
10

#### 【0188】

本明細書に開示される方法で使用されるLingo-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、Lingo-1アンタゴニスト化合物またはTrkBアゴニスト化合物、およびLingo-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体には、すなわち、Lingo-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、Lingo-1アンタゴニスト化合物もしくはTrkBアゴニスト化合物、またはLingo-1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体によるLingo-1またはTrkBの生物学的機能の阻害が共有結合によって妨げられるように、任意の種類の分子の共有結合によって修飾されている誘導体が含まれる。限定としてではなく、例として、本発明のLingo-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、Lingo-1アンタゴニスト化合物またはTrkBアゴニスト化合物、およびLingo-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体を、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質との会合などによって、修飾してもよい。多くの化学修飾をいずれも、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに限定されない、公知の技術によって実行してもよい。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含んでもよい。  
20

#### 【0189】

本明細書に開示される方法で使用されるLingo-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、Lingo-1アンタゴニスト化合物またはTrkBアゴニスト化合物、およびLingo-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合（すなわち、ペプチド同配体）によって互いに接続されているアミノ酸から構成できること、遺伝子にコードされる20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。Lingo-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチド、Lingo-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、およびLingo-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体は、自然なプロセス（例えば、翻訳後処理）によって、または当技術分野で周知である化学修飾技術によって修飾してもよい。このような修飾は、基礎的な教科書およびより詳細な論文、ならびに大量の研究文献に十分記載されている。修飾は、Lingo-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチドもしくはLingo-1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体（ペプチド骨  
30  
40  
50

格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端もしくはカルボキシル末端を含む)の、または炭水化物などの部分の、いかなる場所でも生じることができる。同じ種類の修飾が、所与の LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、LINGO-1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、または LINGO-1 アンタゴニスト抗体もしくは TrkB アゴニスト抗体のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在し得るということが理解されよう。また、所与の LIN GO-1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、LIN GO-1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、または LIN GO-1 アンタゴニスト抗体もしくは TrkB アゴニスト抗体は、多種類の修飾を含んでもよい。LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、LINGO-1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、または LINGO-1 アンタゴニスト抗体もしくは TrkB アゴニスト抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として、分岐状であってもよく、分岐の有無にかかわらず、環状であってもよい。環状、分岐状、および分岐環状の LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドまたは TrkB アゴニストポリペプチド、LINGO-1 アンタゴニストアプタマーまたは TrkB アゴニストアプタマー、および LINGO-1 アンタゴニスト抗体または TrkB アゴニスト抗体は、翻訳後の自然のプロセスから結果として得られてもよく、または合成法によって作製されてもよい。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、-カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質への転移 RNA 媒介型のアミノ酸付加(例えば、アルギニン化)、およびユビキチン化が挙げられる(例えば、Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 第2版, (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson 編, Academic Press, New York, 1-12頁(1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182: 626-646. (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663: 48-62 (1992)を参照のこと)。

### 【0190】

本発明は、LINGO-1 機能を阻害するかもしくは減少させる、または TrkB 機能を増大させるかもしくは促進する、LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、LINGO-1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、または LINGO-1 アンタゴニスト抗体融合体もしくは TrkB アゴニスト抗体融合体を含むか、本質的にこれらからなるか、またはこれらからなる融合タンパク質も提供する。いくつかの実施形態において、LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、LINGO-1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、または LINGO-1 アンタゴニスト抗体もしくは TrkB アゴニスト抗体が融合している異種ポリペプチドは、機能のために有用であるか、または LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチドもしくは LINGO-1 アンタゴニスト抗体もしくは TrkB アゴニスト抗体を標的するのに有用である。本発明のある実施形態において、例えば、BDNF ポリペプチドを異種ポリペプチド部分に融合して、TrkB アゴニスト融合ポリペプチドを形成させるように、可溶性 LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドまたは TrkB アゴニストポリペプチド(例えば、LRR ドメイン、Ig ドメイン、または(配

列番号：2のアミノ酸34～532に対応する)細胞外ドメイン全体を含むL I N G O - 1ポリペプチド)を異種ポリペプチド部分に融合して、L I N G O - 1アンタゴニスト融合ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドを形成させる。L I N G O - 1アンタゴニスト融合タンパク質またはTrkBアゴニスト融合タンパク質、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、およびL I N G O - 1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体を用いて、様々な目的(例えば、血清半減期の増大、バイオアベイラビリティーの向上、特異的な器官または組織型へのインビポ標的化、組換え発現効率の向上、宿主細胞による分泌の向上、精製の容易さ、およびより高い結合力)を果たすことができる。達成されるべき目的によって、異種部分は、不活性であることもできまたは生物学的活性があることもできる。また、異種部分は、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、もしくはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体に安定に融合されるよう、またはインビトロもしくはインビボで切断可能であるように、選択することができる。これらのその他の目的を果たす異種部分は、当技術分野で公知である。

#### 【0191】

L I N G O - 1アンタゴニスト融合ポリペプチドもしくはTrkBアゴニスト融合ポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体の発現の代わりとして、選定された異種部分を前形成させ、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体に化学的に結合体化することができる。多くの場合、選定された異種部分は、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体に融合されようと、結合体化されようと、同じように機能するであろう。それゆえに、異種アミノ酸配列についての以下の議論においては、別途言及されない限り、異種配列は、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体に、融合タンパク質の形態または化学的結合体として接続することができるということが理解されるべきである。

#### 【0192】

薬理学的活性のあるポリペプチド(例えば、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体)は、しばしば、迅速なインビボクリアランスを示し、体内での治療的有効濃度を達成するために多くの用量を必要とする。さらに、約60kDaよりも小さいポリペプチドは、糸球体濾過を受ける可能性があり、これは、時として腎毒性を引き起こす。比較的小さいポリペプチド(例えば、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体)の融合または結合を利用して、このような腎毒性の危険性を低下させるかまたは回避することができる。治療的ポリペプチドのインビボ安定性(すなわち、血清半減期)を増大させるための、様々な異種アミノ酸配列(すなわち、ポリペプチド部分または「担体」)は公知である。

#### 【0193】

半減期が長く、インビボ分布が広く、酵素的機能または免疫学的機能が欠如しているという理由から、本質的に全長のヒト血清アルブミン(HSA)、またはHSA断片が、異

10

20

30

40

50

種部分としてよく使用される。Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1904-08 (1992) およびSyed et al., Blood 89: 3243-52 (1997) に教示されている方法および材料のような方法および材料を適用することにより、HSAを用いて、LINGO-1アンタゴニスト融合ポリペプチドもしくはTrkBアゴニスト融合ポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体、またはLINGO-1アンタゴニストポリペプチド／抗体結合体もしくはTrkBアゴニストポリペプチド／抗体結合体を形成させることができる。これは、LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分によって薬理学的活性を示しながら、一方で、顕著に増大した（例えば、10倍～100倍より高い）インビオ安定性を示す。HSAのC末端を、可溶性LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分のN末端に融合することができる。HSAは天然に分泌されているタンパク質なので、融合タンパク質を真核生物（例えば、哺乳動物）の発現系で産生させると、HSAシグナル配列を利用して、可溶性LINGO-1融合タンパク質またはTrkBアゴニスト融合タンパク質を培養培地中に分泌させることができる。  
10

#### 【0194】

ある実施形態において、本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーまたはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト化合物またはTrkBアゴニスト化合物、LINGO-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体、およびその抗体断片は、標的化部分をさらに含む。標的化部分には、身体のある部分（例えば、脳またはその中のコンパートメント）への局在化を導くタンパク質またはペプチドが含まれる。ある実施形態において、本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト化合物もしくはTrkBアゴニスト化合物、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片、またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその抗体断片を、脳標的化部分に結合または融合させる。脳標的化部分を、共有結合的に（例えば、直接的な、翻訳による融合、もしくは直接的かもしくはスペーサー分子（任意で切断可能であり得る）を介するかのいずれかの化学的連結によって）結合させるか、または非共有結合的に（例えば、アビジン、ビオチン、プロテインA、IgGなどの可逆的相互作用を通じて）結合させる。その他の実施形態において、本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト化合物もしくはTrkBアゴニスト化合物、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片、またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその抗体断片を、1つ以上の脳標的化部分に結合させる。さらなる実施形態において、脳標的化部分を、複数の、本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト化合物もしくはTrkBアゴニスト化合物、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片、またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその抗体断片に結合させる。  
20  
30  
40

#### 【0195】

LINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト化合物もしくはTrkBアゴニスト化合物、LINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片、またはTrkBアゴニスト抗体もしくはその抗体断片と関連する脳標的化部分は、そのようなLINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、LINGO-1アンタゴニスト化合物もしく  
50

は TrkB アゴニスト化合物、 LINGO - 1 アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片、または TrkB アゴニスト抗体もしくはその抗体断片の脳送達を増強させる。タンパク質または治療剤に融合したときに、このタンパク質または治療剤を、血液脳関門 ( BBB ) を通して送達する多くのポリペプチドが記載されている。非限定的な例としては、単ドメイン抗体 FC5 ( Abulrob et al. J. Neurochem. 95, 1201 - 1214 ( 2005 ) ) ; ヒトイヌスリン受容体に対するモノクローナル抗体である、 mAB 83 - 14 ( Pardridge et al. Pharmacol. Res. 12, 807 - 816 ( 1995 ) ) ; ヒトトランスフェリン受容体 ( hTfR ) に結合する B2 、 B6 、および B8 ペプチド ( Xia et al. J. Virol. 74, 11359 - 11366 ( 2000 ) ) ; トランスフェリン受容体に対する OX26 モノクローナル抗体 ( Pardridge et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 66 - 70 ( 1991 ) ) ; ならびに米国特許第 6,306,365 号の配列番号 : 1 ~ 18 が挙げられる。上記の参考文献の内容は、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

#### 【 0196 】

LINGO - 1 組成物または TrkB 組成物の増強された脳送達は、当技術分野で十分確立された多くの手段によって決定される。例えば、脳標的化部分に連結されている放射性標識、酵素標識、もしくは蛍光標識された LINGO - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、 LINGO - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、 LINGO - 1 アンタゴニスト化合物もしくは TrkB アゴニスト化合物、 LINGO - 1 アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片、または TrkB アゴニスト抗体もしくはその抗体断片を動物に投与すること ; 脳局在を決定すること ; および脳標的化部分と関連していない同等に放射性標識された LINGO - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは TrkB アゴニストポリペプチド、 LINGO - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは TrkB アゴニストアプタマー、 LINGO - 1 アンタゴニスト化合物もしくは TrkB アゴニスト化合物、 LINGO - 1 アンタゴニスト抗体もしくはその抗体断片と局在を比較すること。増強された標的化を決定するその他の手段は、上記の参考文献に記載されている。

#### 【 0197 】

シグナル配列は、小胞体の膜を横断するタンパク質の輸送を開始するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである。免疫融合体 ( immunofusion ) を構築するのに有用なシグナル配列としては、抗体軽鎖シグナル配列、例えば、抗体 14.18 ( Giles et al. J. Immunol. Meth. 125 : 191 - 202 ( 1989 ) ) 、抗体重鎖シグナル配列、例えば、 MOPC141 抗体重鎖シグナル配列 ( Sakano et al. , Nature 286 : 5774 ( 1980 ) ) が挙げられる。あるいは、他のシグナル配列を使用することができる。例えば、 Watson, Nucl. Acids Res. 12 : 5145 ( 1984 ) を参照されたい。シグナルペプチドは、通常、シグナルペプチダーゼによって小胞体の内腔で切断される。これにより、 Fc 領域と可溶性 LINGO - 1 部分または TrkB アゴニスト部分とを含む免疫融合体の分泌が生じる。

#### 【 0198 】

いくつかの実施形態において、 DNA 配列は、分泌力セットと LINGO - 1 部分または TrkB アゴニスト部分との間のタンパク質分解的切断部位をコードしてもよい。例えば、コードされる融合タンパク質のタンパク質分解的切断のための、このような切断部位が提供され、それにより、標的タンパク質から Fc ドメインが分離されてもよい。有用なタンパク質分解的切断部位には、トリプシン、プラスミン、トロンビン、第 Xa 因子、またはエンテロキナーゼ K のようなタンパク質分解酵素によって認識されるアミノ酸配列が含まれる。

#### 【 0199 】

10

20

30

40

50

分泌力セットは、複製可能な発現ベクターに組み入れることができる。有用なベクターとしては、線状核酸、プラスミド、ファージミド、コスミドなどが挙げられる。例示的な発現ベクターは p d C であり、その中で、免疫融合体DNAの転写は、ヒトサイトメガロウイルスのエンハンサーおよびプロモーターの制御下に置かれている。例えば、Lo et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1088: 712 (1991); および Lo et al., *Protein Engineering* 11: 495 - 500 (1998) を参照されたい。適切な宿主細胞を、可溶性 LINGO-1 ポリペプチドまたは TrkB アゴニストポリペプチドをコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトすることができ、可溶性 LINGO-1 ポリペプチドまたは TrkB アゴニストポリペプチドの発現および分泌のために使用することができる。典型的に使用される宿主細胞としては、不死化ハイブリドーマ細胞、骨髄腫細胞、293 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa 細胞、および COS 細胞が挙げられる。

#### 【0200】

1つの実施形態において、可溶性 LINGO-1 アンタゴニストポリペプチドまたは TrkB アゴニストポリペプチドは、ヒンジおよびFc領域（すなわち、Ig重鎖定常領域のC末端部分）に融合される。TrkB アゴニスト - Fc 融合体の LINGO-1 - Fc の潜在的な利点としては、溶解性、インビオ安定性、および多価性（例えば、二量体化）が挙げられる。使用されるFc領域は、IgA、IgD、またはIgGのFc領域（ヒンジ - CH2 - CH3）であることができる。あるいは、それは、IgEまたはIgMのFc領域（ヒンジ - CH2 - CH3 - CH4）であることができる。IgG Fc領域（例えば、IgG1 Fc領域またはIgG4 Fc領域）が通常使用される。1つの実施形態において、IgG Fcを化学的に規定するパパイン切断部位（すなわち、重鎖定常領域の最初の残基を Kabat システムによる 114 と考えて、残基 216）のすぐ上流にあるヒンジ領域に始まる配列、またはその他の免疫グロブリンの類似の部位が、融合体で使用される。融合がなされる正確な部位は、重要ではない。特定の部位は周知であり、分子の生物学的活性、分泌、または結合特徴を最適化するために選択され得る。Fc融合体をコードするDNAを構築および発現するための材料および方法は、当技術分野で公知であり、過度の実験をすることなく、可溶性 LINGO-1 アンタゴニスト融合体または TrkB アゴニスト融合体を得るために適用することができる。本発明のいくつかの実施形態は、LINGO-1 アンタゴニスト融合タンパク質または TrkB アゴニスト融合タンパク質（例えば、Capon et al., 米国特許第 5,428,130 号および第 5,565,335 号に記載されている融合タンパク質）を利用する。

#### 【0201】

完全にインタクトの、野生型 Fc 領域は、本発明の方法で使用される Fc 融合タンパク質において、通常は不要でかつ望ましくないエフェクター機能を示す。それゆえに、ある結合部位を、典型的には、分泌力セットの構築の間に Fc 領域から欠失させる。例えば、軽鎖との共発現は必要ないので、重鎖結合タンパク質 BiP の結合部位 (Hendershot et al., *Immunol. Today* 5: 111 - 14 (1987)) を、この部位が免疫融合体の効率的な分泌に干渉しないように、IgE の Fc 領域の CH2 ドメインから欠失させる。膜貫通ドメインの配列（例えば、IgM に存在する配列）も通常欠失させる。

#### 【0202】

IgG1 Fc 領域が最もよく使用される。あるいは、免疫グロブリン (-2、-3、および -4) のその他のサブクラスの Fc 領域を、分泌力セットで使用することができる。免疫グロブリン -1 の IgG1 Fc 領域は、通常は分泌力セットで使用され、ヒンジ領域、CH2 領域、および CH3 領域の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態において、免疫グロブリン -1 の Fc 領域は、CH2 が欠失している Fc であり、これには、ヒンジ領域の一部と CH3 領域が含まれるが、CH2 領域は含まれない。CH2 が欠失している Fc は、Gillis et al. *Hum. Antibod.* 50

. Hybridomas 1:47 (1990) によって記載されている。いくつかの実施形態において、IgA、IgD、IgE、またはIgMのFc領域が使用される。

【0203】

LINGO-1-アンタゴニスト-Fc融合タンパク質またはTrkB-アゴニスト-Fc融合タンパク質は、いくつかの異なる立体配置で構築することができる。1つの立体配置において、可溶性LINGO-1部分またはTrkB-アゴニスト部分のC末端は、Fcヒンジ部分のN末端に直接融合される。わずかに異なる立体配置において、短いポリペプチド（例えば、2~10個のアミノ酸）が、可溶性LINGO-1部分またはTrkB-アゴニスト部分のN末端とFc部分のC末端の間で、融合体に組み込まれる。このようなリンカーは立体構造上の柔軟性を提供し、この柔軟性がいくつかの状況下で生物学的活性を向上させ得る。ヒンジ領域の十分な部分がFc部分に保持されている場合、LINGO-1-Fc融合体またはTrkB-アゴニスト-Fc融合体は二量体化し、それによって二価の分子を形成する。単量体Fc融合体の均質な集団は、単一特異性の二価二量体を生じさせる。各々が異なる特異性を有する2つの単量体Fc融合体の混合物は、二重特異性の二価二量体を生じさせる。

【0204】

対応するアミノ反応基およびチオール反応基を含む多数のクロスリンカーのいずれかを用いて、LINGO-1アンタゴニストポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドを血清アルブミンに連結させることができる。好適なリンカーの例としては、チオール反応性マレイミド（例えば、SMCC、AMAS、BMP5、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、およびGMB5）を挿入するアミノ反応性クロスリンカーが挙げられる。他の好適なリンカーは、チオール反応性ハロアセテート基（例えば、SBAP、SIA、SIAB）を挿入する。還元性の連結を生じさせるためのスルフヒドリル基との反応のための保護チオールまたは非保護チオールを提供するリンカーとしては、SPDP、SMPt、SATa、およびSATPが挙げられる。このような試薬は市販されている（例えば、Pierce Chemicals）。

【0205】

結合体に、可溶性LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドのN末端、または血清アルブミン上のチオール部分が含まれる必要はない。例えば、可溶性LINGO-1-アルブミン融合体またはTrkBアゴニスト-アルブミン融合体は、遺伝子改変技術を用いて得ることができる。この場合、可溶性LINGO-1部分またはTrkB-アゴニスト部分を、そのN末端、C末端、またはこれらの両方で、血清アルブミン遺伝子に融合させる。

【0206】

可溶性LINGO-1部分もしくはTrkBアゴニスト部分の精製または同定をしやすくするために、可溶性LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドを、N末端またはC末端で、異種ペプチドに融合させることができる。例えば、市販のクロマトグラフィー媒体を用いて精製しやすくするために、ヒスチジンタグを、可溶性LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドに融合させることができる。さらに、エピトープタグにより、可溶性LINGO-1融合ポリペプチドまたはTrkBアゴニスト融合ポリペプチドを、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリックスを用いた親和性精製によって容易に精製することができる。このような精製タグの多くの例は、当技術分野で公知であり、ポリ-ヒスチジン（poly-his）タグまたはポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；インフルエンザ赤血球凝集素（HA）タグポリペプチドと、その抗体12CA5（Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)；c-mycタグと、それに対する8F9抗体、3C7抗体、6E10抗体、G4抗体、B7抗体、および9E10抗体（Van et al., Mol. Cell. Bio. 5:3610-3616 (1985)）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグと、その抗体（Paborsky et al.

10

20

30

40

50

, Protein Engineering J (6) : 547 - 553 (1990) )を含むが、これらに限定されない。その他のタグポリペプチドとしては、Flagペプチド(Hopp et al., Biotechnology 6: 1204 - 1210 (1988)) ; KT3エピトープペプチド(Martin et al., Science 255: 192 - 194 (1992)) ; -チューブリンエピトープペプチド(Skinner et al., J. Biol. Chem. 266: 15163 - 15166 (1991)) ; およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ(Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393 - 6397 (1990))が挙げられる。タグは、抗体によって認識され、かつ可溶性LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドの機能に干渉しない任意のペプチドエピトープであることができる。  
10

#### 【0207】

本発明のいくつかの実施形態において、可溶性LINGO-1融合コンストラクトまたはTrkBアゴニスト融合コンストラクトを用いて、細菌内での可溶性LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分の産生を増強させる。このようなコンストラクトにおいては、通常高レベルで発現および/または分泌される細菌タンパク質を、可溶性LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドのN末端融合パートナーとして利用する。例えば、Smith et al., Gene 67: 31 (1988) ; Hopp et al., Biotechnology 6: 1204 (1988) ; La Vallie et al., Biotechnology 11: 187 (1993) を参照されたい。  
20

#### 【0208】

可溶性LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分を好適な融合パートナーのアミノ末端およびカルボキシ末端で融合させることにより、二価形態または四価形態の可溶性LINGO-1ポリペプチドまたはTrkBアゴニストポリペプチドを得ることができる。例えば、可溶性LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分をIg部分のアミノ末端およびカルボキシ末端に融合させて、2つの可溶性LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分を含む二価单量体ポリペプチドを産生することができる。これらの单量体のうちの2つが二量体化すると、Ig部分により、四価形態の可溶性LINGO-1タンパク質またはTrkBアゴニストタンパク質が得られる。このような多価形態を用いて、標的にに対する結合親和性の増大を達成することができる。多価形態の可溶性LINGO-1またはTrkBアゴニストは、可溶性LINGO-1部分またはTrkBアゴニスト部分を直列に配置してコンカテマーを形成させることによって得ることもでき、コンカテマーは、単独で利用するかまたは融合パートナー(例えば、IgもしくはHSA)に融合させることができる。  
30

#### 【0209】

##### 結合体化ポリマー(ポリペプチド以外)

本発明のいくつかの実施形態は、可溶性LINGO-1ポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、TrkBアゴニスト化合物、またはアンタゴニスト性LINGO-1抗体もしくはアゴニスト性TrkB抗体を含む。この場合、1つ以上のポリマーは、本発明の方法で使用されるLINGO-1ポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1化合物もしくはTrkBアゴニスト化合物、LINGO-1アプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはLINGO-1抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体に結合体化(共有結合)される。このような結合体化に好適なポリマーの例としては、ポリペプチド(上で議論されている)、アプタマー、糖ポリマー、およびポリアルキレングリコール鎖が挙げられる。以下のもの、すなわち、溶解性、安定性、またはバイオアベイラビリティーのうちの1つ以上を向上させる目的のために、ポリマーは、典型的には、可溶性LINGO-1ポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペ  
40  
50

プチド、可溶性 L I N G O - 1 アプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、 T r k B アゴニスト化合物、または L I N G O - 1 抗体もしくは T r k B 抗体に結合体化されるが、必ずしもその必要はない。

【 0 2 1 0 】

L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニスト化合物、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマー、もしくは L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体、または T r k B アゴニストポリペプチド、 T r k B アゴニスト化合物、 T r k B アゴニストアプタマー、もしくは T r k B アゴニスト抗体への結合体化に通常使用されるポリマーのクラスはポリアルキレングリコールである。ポリエチレングリコール ( P E G ) が最も頻繁に使用される。 P E G 部分 ( 例えは、 1 、 2 、 3 、 4 、または 5 P E G ポリマー ) を、各々の L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、もしくは L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体、または T r k B アゴニスト化合物に結合体化させて、 L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、 L I N G O - 1 アンタゴニスト化合物もしくは T r k B アゴニスト化合物、または L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体単独と比較して、血清半減期を増大させることができる。 P E G 部分は非抗原性で、本質的には生物学的に不活性である。本発明の実施に使用される P E G 部分は分岐していても、または分岐していないてもよい。

10

20

【 0 2 1 1 】

L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、 L I N G O - 1 アンタゴニスト化合物もしくは T r k B アゴニスト化合物、または L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体に結合される P E G 部分の数、および個々の P E G 鎖の分子量は様々であり得る。一般に、ポリマーの分子量が大きければ大きいほど、少ない数のポリマー鎖がポリペプチドに結合される。通常、 L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニスト化合物もしくは T r k B アゴニスト化合物、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、または L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体に結合される総ポリマー質量は、 20 k D a ~ 40 k D a である。したがって、 1 個のポリマー鎖を結合させる場合、この鎖の分子量は、通常 20 ~ 40 k D a である。 2 個の鎖を結合させる場合、各鎖の分子量は、通常 10 ~ 20 k D a である。 3 個の鎖を結合させる場合、分子量は、通常 7 ~ 14 k D a である。

30

【 0 2 1 2 】

ポリマー ( 例えは、 P E G ) は、ポリペプチド上の任意の好適な露出している反応基を介して L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、または L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体に連結させることができる。露出している反応基は、例えは、 N 末端アミノ基、または内部リジン残基の アミノ基、またはこれらの両方であることができる。活性化されたポリマーは、 L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、または L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体上の任意の遊離のアミノ基で反応し、共有結合することができる。遊離のカルボン酸基、好適に活性化されたカルボニル基、ヒドロキシル、グアニジル、イミダゾル、酸化された炭水化物部分、および L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドもしくは T r k B アゴニストポリペプチド、 L I N G O - 1 アンタゴニストアプタマーもしくは T r k B アゴニストアプタマー、または L I N G O - 1 アンタゴニスト抗体もしくは T r k B アゴニスト抗体のメルカプト基

40

50

(利用できる場合)も、ポリマーの結合のための反応基として使用することができる。

【0213】

結合反応において、典型的には、ポリペプチドの濃度に応じて、1モルのポリペプチド当たり約1.0～約10モルの活性化されたポリマーが利用される。通常、選定される割合は、この反応の最大化と、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチドまたはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体の所望の薬理学的活性を損なう可能性がある副反応(多くの場合は非特異的である)の最小化との間のバランスを示す。いくつかの実施形態において、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体の(例えば、本明細書に記載されるアッセイのいずれかで示されるかまたは当技術分野で公知である)生物学的活性の少なくとも50%が保持され、いくつかの実施形態において、ほぼ100%が保持される。

【0214】

ポリマーは、従来の化学反応を用いて、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体に結合体化することができる。例えば、ポリアルキレンゲリコール部分を、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体のリジンアミノ基に結合体化させることができる。リジン側鎖への結合は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の活性エステル(例えば、PEGスクシンイミジルスクシネット(SS-PEG)およびスクシンイミジルプロピオネート(SPA-PEG))を用いて行うことができる。好適なポリアルキレンゲリコール部分としては、例えば、カルボキシメチル-NHSおよびノルロイシン-NHS、SCが挙げられる。これらの試薬は市販されている。さらなるアミン反応性PEGリンカーで、スクシンイミジル部分を置換することができる。これらには、例えば、イソチオシアネート、ニトロフェニルカルボネート(PNP)、エポキシド、ベンゾトリアゾルカルボネート、SC-PEG、トレシレート、アルデヒド、エポキシド、カルボニルイミダゾル、およびPNPカルボネートが含まれる。条件は、通常、反応の選択性および程度を最大化するように最適化される。反応条件のこのような最適化は、当業者の能力の範囲内である。

【0215】

PEG化は、当技術分野で公知のPEG化反応のいずれかによって実行することができる。例えば、Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992)、および欧州特許出願EP 0 154 316号およびEP 0 401 384号を参照されたい。PEG化は、反応性ポリエチレンゲリコール分子(または、類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を用いて実行してもよい。

【0216】

アシル化によるPEG化は、通常、ポリエチレンゲリコールの活性エステル誘導体の反応を含む。任意の反応性PEG分子を、PEG化に利用することができる。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)にエステル化されたPEGは、頻繁に用いられる活性化PEGエステルである。本明細書で使用される場合、「アシル化」には、治療用タンパク質と水溶性ポリマー(例えば、PEG)の間の以下のタイプの結合、すなわち、アミド結合、カルバメート結合、ウレタン結合などが含まれるが、これらに限定されない。Bioc conjugate Chem. 5:133-140, 1994を参照されたい。反応パラメータは、通常、可溶性L I N G O - 1ポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、可溶性L I N G O - 1アプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、または可溶性L I N G O - 1抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体を損傷させるかまたは不

10

20

30

30

40

50

活化する温度条件、溶媒条件、およびpH条件を避けるように選択される。

【0217】

通常、接続している結合はアミドであり、得られる生成物の少なくとも95%が、モノ-、ジ-、またはトリ-PEG化される。しかしながら、PEG化の程度がより高いいくつかの種が、使用される特異的な反応条件に応じた量で形成される場合がある。任意で、精製されたPEG化種は、混合物から、特に、未反応の種から、従来の精製法（例えば、透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性交換クロマトグラフィー、および電気泳動を含む）によって分離される。

【0218】

アルキル化によるPEG化は、通常、PEGの末端アルデヒド誘導体を、LINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体と還元剤の存在下で反応させる工程が含まれる。さらに、実質的にLINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体のN末端アミノ基だけをPEG化（すなわち、モノ-PEG化タンパク質）するのに有利に働くように、反応条件を操作することができる。モノ-PEG化またはポリ-PEG化のいずれの場合においても、PEG基は、典型的には、-CH<sub>2</sub>-NH-基を介してタンパク質に結合される。特に-CH<sub>2</sub>-基に関して、このタイプの結合は「アルキル」結合として知られている。

10

【0219】

N末端に標的化されたモノ-PEG化生成物を生じさせるための還元アルキル化を介する誘導体化は、誘導体化に利用できる異なるタイプの1級アミノ基（N末端に対するリジン）の異なる反応性を利用する。この反応は、リジン残基の-NH-アミノ基とタンパク質のN末端アミノ基の-NH-アミノ基の間のpKaの差を利用することができるpHで行われる。このような選択的な誘導体化によって、アルデヒドのような反応基を含む水溶性ポリマーのタンパク質への結合が制御される。ポリマーとの結合体化は、主にタンパク質のN末端で起こり、他の反応基（例えば、リジン側鎖のアミノ基）の顕著な修飾は生じない。

30

【0220】

アシル化とアルキル化の両方のアプローチで使用されるポリマー分子は、水溶性ポリマーの中から選択される。選択されるポリマーは、典型的には、単一の反応基（例えば、アシル化のための活性エステル、またはアルキル化のためのアルデヒド）を有するように修飾され、その結果、重合の程度は、本発明の方法で提供されるように制御し得る。例示的な反応性PEGアルデヒドは、水安定性のポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはそのモノC1~C10アルコキシもしくはアリールオキシ誘導体である（例えば、Harris et al.、米国特許第5,252,714号を参照のこと）。ポリマーは分岐していてもよく、または分岐していないてもよい。アシル化反応について、選択されるポリマーは、典型的には、単一の反応性エステル基を有する。還元アルキル化について、選択されるポリマーは、典型的には、単一の反応性アルデヒド基を有する。通常、水溶性ポリマーは、天然に存在するグリコシル残基からは選択されない。なぜなら、これらは、通常は、哺乳動物の組換え発現系によってより好都合に行われるからである。

40

【0221】

PEG化されたLINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、PEG化されたLINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBアゴニストアプタマー、またはPEG化されたLINGO-1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体を調製する方法には、通常、(a)分子が1つ以上のPEG基に結合する条件下で、LINGO-1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、LINGO-1アンタゴニストアプタマーもしくはTrkBア

50

ゴニストアップタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体を、ポリエチレングリコール（例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、および（b）反応産物（単数または複数）を得る工程が含まれる。一般に、アシル化反応についての最適な反応条件は、公知のパラメータと所望の結果に基づいてケース・バイ・ケースで決定される。例えば、通常、PEG：タンパク質の比が大きければ大きいほど、ポリ-PEG化産物の割合は大きくなる。

【0222】

モノ-ポリマー/可溶性L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはモノ-ポリマー/TrkBアゴニストポリペプチド、モノ-ポリマー/L I N G O - 1アンタゴニストアップタマーもしくはモノ-ポリマー/TrkBアゴニストアップタマー、またはモノ-ポリマー/アンタゴニスト性L I N G O - 1抗体もしくはモノ-ポリマー/アゴニスト性TrkB抗体の実質的に均質な集団を產生するための還元アルキル化には、通常、（a）ポリペプチドまたは抗体のN末端アミノ基の選択的な修飾を可能にするのに好適なpHで、還元アルキル化条件下で、L I N G O - 1アンタゴニストタンパク質もしくはTrkBアゴニストタンパク質またはL I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチドを反応性PEG分子と反応させる工程；および（b）反応産物を得る工程が含まれる。

10

【0223】

モノ-ポリマー/可溶性L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはモノ-ポリマー/TrkBアゴニストポリペプチド、モノ-ポリマー/L I N G O - 1アンタゴニストアップタマーもしくはモノ-ポリマー/TrkBアゴニストアップタマー、またはモノ-ポリマー/アンタゴニスト性L I N G O - 1抗体もしくはモノ-ポリマー/アゴニスト性TrkB抗体の実質的に均質な集団について、還元アルキル化反応条件は、ポリペプチドまたは抗体のN末端への水溶性ポリマー部分の選択的結合を可能にする条件である。このような反応条件は、通常、リジン側鎖のアミノ基とN末端アミノ基の間にpKaの差をもたらす。本発明の目的のために、pHは、通常3~9、典型的には、3~6の範囲にある。

20

【0224】

L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアップタマーもしくはTrkBアゴニストアップタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはTrkBアゴニスト抗体は、タグ（例えば、タンパク質分解によって後で放出することができる部分）を含むことができる。したがって、リジンとN末端の両方と反応する低分子量のリンカー（例えば、Traut試薬（Pierce））で修飾されたHisタグを最初に反応させ、その後、このHisタグを放出することにより、リジン部分を選択的に修飾することができる。その後、ポリペプチドは、チオール反応性頭部基（例えば、マレイミド基、ビニルスルホン基、ハロアセテート基、または遊離SHもしくは保護SH）を含むPEGで選択的に修飾することができる遊離SH基を含む。

30

【0225】

Traut試薬は、PEG結合のための特異的部位を構成する任意のリンカーで置き換えることができる。例えば、Traut試薬は、SPDP、SMPT、SATA、またはSATP（Pierce）で置き換えることができる。同様に、タンパク質を、マレイミドを挿入するアミン反応性リンカー（例えば、SMCC、AMAS、BMPs、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、もしくはGMBs）、ハロアセテート基（S BAP、SIA、SIAB）、またはビニルスルホン基と反応させることができ、得られる生成物を、遊離SHを含むPEGと反応させることができる。

40

【0226】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレングリコール部分を、本発明の方法で使用されるL I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアップタマーもしくはTrkBアゴニストアップタマー

50

、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはT r k Bアゴニスト抗体のシスティン基に結合体化させる。結合体化は、例えば、マレイミド基、ビニルスルホン基、ハロアセテート基、またはチオール基を用いて行なうことができる。

【0227】

任意で、L I N G O - 1アンタゴニストポリペプチドもしくはT r k Bアゴニストポリペプチド、L I N G O - 1アンタゴニストアプタマーもしくはT r k Bアゴニストアプタマー、またはL I N G O - 1アンタゴニスト抗体もしくはT r k Bアゴニスト抗体を、不安定な結合を介してポリエチレングリコール部分と結合体化させる。不安定な結合は、例えば、生化学的加水分解、タンパク質分解、またはスルフヒドリルによる切断において切断することができる。例えば、この結合は、インビボ(生理学的)条件下で切断することができる。

10

【0228】

反応基がN末端のアミノ基上にある場合、反応は、通常、約pH5~8(例えば、pH5、pH6、pH7、またはpH8)で生物学的活性材料を不活性なポリマーと反応させるのに使用される任意の好適な方法によって起こり得る。通常、このプロセスは、活性化されたポリマーを調製する工程、およびその後、タンパク質を活性化したポリマーと反応させて、製剤に好適な可溶性タンパク質を産生する工程を含む。

【0229】

L I N G O - 1アンタゴニストポリヌクレオチドおよびT r k Bアゴニストポリヌクレオチド

20

L I N G O - 1アンタゴニストポリヌクレオチド

本発明の方法におけるL I N G O - 1アンタゴニストには、L I N G O - 1をコードするポリヌクレオチドに特異的に結合する核酸分子を含むL I N G O - 1アンタゴニストポリヌクレオチドが含まれる。L I N G O - 1ポリヌクレオチドアンタゴニストは、通常、L I N G O - 1の発現を妨げる(ノックダウン)。L I N G O - 1アンタゴニストとしては、アンチセンス分子、リボザイム、s i R N A、s h R N A、R N A iが挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、このような結合分子は、動物に別々に投与される(例えば、O' Connor, J. Neurochem. 56:560 (1991)を参照のこと)が、このような結合分子はまた、宿主細胞によって取り込まれかつインビボで発現されるポリヌクレオチドからインビボで発現されてもよい。例えば、Oligodeoxyribonucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)も参照されたい。

30

【0230】

R N A iとは、標的化されたm R N Aの発現に干渉するR N Aの発現を指す。具体的には、R N A iは、s i R N A(短い干渉R N A)を介した特異的m R N A(例えば、L I N G O - 1またはT r k B)との相互作用によって標的化遺伝子をサイレンシングする。その後、d s R N A複合体は、細胞による分解の標的とされる。さらなるR N A i分子としては、低分子ヘアピンR N A(s h R N A);また、低分子干渉ヘアピンも挙げられる。s h R N A分子は、ループによって接続された標的遺伝子由来のセンス配列およびアンチセンス配列を含む。s h R N Aは、核から細胞質に輸送され、m R N Aとともに分解される。P o l I I I プロモーターまたはU 6 プロモーターを用いて、R N A iのためのR N Aを発現させることができる。本発明のいくつかの実施形態において、s h R N Aは、レンチウイルスベクター(例えば、p L L 3 . 7)から発現される。

40

【0231】

R N A iは、それらの「標的」m R N Aに対する配列特異的相同性を有する二本鎖R N A(d s R N A)分子によって媒介される(Caplen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747 (2001))。ショウジョウバエ(Drosophila)の無細胞ライセートでの生化学的実験により、R N A依存性の遺伝子サイレンシングのメディエーターが21~25個のヌクレ

50

オチドの「低分子干渉」RNA二重鎖(siRNA)であることが示されている。したがって、siRNA分子は、本発明の方法において有利に使用される。siRNAは、DICERとして知られるリボヌクレアーゼによるdsRNAの処理に由来する(Bernstein et al., *Nature* 409: 363-366 (2001))。siRNA二重鎖産物はRISC(RNAによって誘導されるサイレンシング複合体)と呼ばれる多タンパク質siRNA複合体に動員されるようである。任意の特定の理論に束縛されることを望まないが、RISCは標的mRNAに導かれ、そこでは、siRNA二重鎖が配列特異的に相互作用して、触媒様式で切断を媒介すると考えられる(Bernstein et al., *Nature* 409: 363-366 (2001); Boutla et al., *Curr Biol* 11: 1776-1780 (2001)).

【0232】

RNAiは、遺伝子機能を解析するため、および非限定的な例としてニューロン(Krichevsky et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11926-11929 (2002))を含む哺乳動物細胞の必須の遺伝子を同定するために使用されている(Elbashir et al., *Methods* 26: 199-213 (2002); Harborth et al., *J Cell Sci* 114: 4557-4565 (2001))。RNAiは、治療法、例えば、ポリオウイルス(Gitlin et al., *Nature* 418: 379-380 (2002))およびHIV(Capodici et al., *J Immunol* 169: 5196-5201 (2002))を含むが、これらに限定されない、ウイルスの感染、複製、および/もしくは増殖の阻害または阻止、ならびにオンコジーン(例えば、bcr-abl遺伝子; Scherr et al., *Blood* 101(4): 1566-9 (2002))の発現の低下についても評価されている。RNAiは、哺乳動物(マウス)および両生類(ゼノパス(*Xenopus*))の胚(それぞれ、Calegari et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14236-14240 (2002); およびZhou, et al., *Nucleic Acids Res* 30: 1664-1669 (2002))、ならびに出生後のマウス(Lewis et al., *Nat Genet* 32: 107-108 (2002))において遺伝子発現を調節するために、ならびに成体トランスジェニックマウスにおいてトランス遺伝子の発現を低下させるために(McCaffrey et al., *Nature* 418: 38-39 (2002))使用されている。細胞培養物中およびインビボで、siRNAの効力および特異性を決定する方法が記載されている(例えば、Bertrand et al., *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1000-1004 (2002); Lassus et al., *Sci STKE* 2002(147): PL13 (2002); およびLeirdal et al., *Biochem Biophys Res Commun* 295: 744-748 (2002)を参照されたい)。

【0233】

RNAiを媒介する分子(siRNAを含むが、これに限定されない)は、化学合成によって(Hohjoh, *FEBS Lett* 521: 195-199 (2002))、dsRNAの加水分解によって(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 9942-9947 (2002))、T7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロ転写によって(Donzeet et al., *Nucleic Acids Res* 30: e46, (2002); Yuet al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6047-6052 (2002))、および大腸菌リボヌクレアーゼIIIのようなヌクレアーゼを用いた二本鎖RNAの加水分解によって(Yang et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9942-9947 (2002))、インビトロ

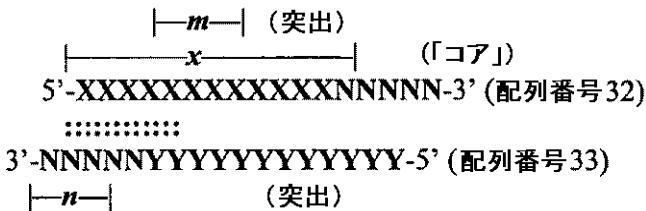
で產生することができる。

【0234】

s i R N A 分子はまた、2つのオリゴヌクレオチドを互いにアニーリングさせることによって形成させてもよく、典型的には、以下の一般的構造を有する。この構造は、二本鎖部分と一本鎖部分の両方を含む。

【0235】

【化1】



式中、N、X、およびYはヌクレオチドであり；XとYは水素結合しており；「：」は2塩基間の水素結合を示し；xは1～約100の間の値を有する自然数であり；かつmとnは、0～約100の間の値を独立して有する整数全体である。いくつかの実施形態において、N、X、およびYは、独立して、A、G、C、およびTまたはUである。非天然の塩基およびヌクレオチドは、特に、合成のs i R N A（すなわち、アニーリングする2つのオリゴヌクレオチドの産物）の場合に存在することができる。二本鎖の中心部分は「コア」と呼ばれ、測定単位として塩基対（bp）を有する。一本鎖部分は突出であり、測定単位としてのヌクレオチド（nt）を有する。示される突出は3'突出であるが、5'突出を有する分子もまた本発明の範囲に含まれる。突出を有さないs i R N A分子（すなわち、m = 0およびn = 0）、ならびにコアの一方に突出を有するが、他方には有さない（例えば、m = 0およびn = 1、またはその逆の）s i R N A分子もまた、本発明の範囲に含まれる。

【0236】

最初、R N A i 技術は、哺乳動物系に容易に適用できると思われていなかった。これは、哺乳動物では、d s R N Aがd s R N Aによって活性化されるタンパク質キナーゼ（PKR）を活性化し、アポトーシスのカスケードと細胞死とを生じさせるからである（Der et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3279-3283 (1997)）。さらに、d s R N Aが哺乳動物細胞のインターフェロンカスケードを活性化し、これもまた、細胞生理学の変化をもたらすことができる事が以前から知られている（Colby et al. , Annu. Rev. Microbiol. 25:333 (1971) ; Kleinschmidt et al. , Annu. Rev. Biochem. 41:517 (1972) ; Lamson et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58:782 (1967) ; Lomniczki et al. , J. Gen. Virol. 8:55 (1970) ; およびYounger et al. , J. Bacteriol. 92:862 (1966)）。しかしながら、d s R N Aによって媒介されるPKRとインターフェロンカスケードの活性化には、約30塩基対よりも長いd s R N Aが必要である。対照的に、30塩基対未満の長さのd s R N Aは、哺乳動物細胞でR N A iを生じることが示されている（Caplen et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747 (2001)）。したがって、より長いd s R N A分子と関連する望ましくない非特異的効果は、より長いd s R N Aを実質的に含まない短いR N Aを調製することによって回避することができると期待される。

【0237】

s i R N Aに関する参考文献：Bernstein et al. , Nature 409:363-366 (2001) ; Boutla et al. , Curr. B

10

20

30

40

50

iol 11:1776-1780 (2001); Cullen, Nat Immunol. 3:597-599 (2002); Caplen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747 (2001); Hamilton et al., Science 286:950-952 (1999); Nagase et al., DNA Res. 6:63-70 (1999); Napoli et al., Plant Cell 2:279-289 (1990); Nicholson et al., Mamm. Genome 13:67-73 (2002); Parrish et al., Mol Cell 16:1077-1087 (2000); Romano et al., Mol Microbiol 6:3343-3353 (1992); Tabara et al., Cell 99:123-132 (1999); 10 および Tuschl, Chem Biochem. 2:239-245 (2001)。

#### 【0238】

Paddisonら(Genes & Dev. 16:948-958 (2002))は、RNAiを生じさせるための手段として、折り畳まれてヘアピンになった小さいRNA分子を使用した。したがって、このような低分子ヘアピンRNA(shRNA)分子もまた、本発明の方法で有利に使用される。機能的なshRNAのシステムおよびループの長さは様々である。システムの長さは、約25~約30ntの範囲であることができ、ループのサイズは、4~約25ntの範囲であることができ、サイレンシング活性には影響を及ぼさない。任意の特定の理論によって束縛されることを望まないが、これらのshRNAは、DicerリボヌクレアーゼのdsRNA産物に似ており、いずれにしても、特異的遺伝子の発現を阻害する同じ能力を有すると考えられる。 20

#### 【0239】

アンチセンス技術を用いて、アンチセンスDNAもしくはRNAを介して、または三重らせんの形成を介して遺伝子発現を制御することができる。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)で議論されている。三重らせんの形成は、例えば、Lee et al., Nucleic Acids Research 6:3013 (1979); Cooney et al., Science 241:456 (1988); 30 および Dervan et al., Science 251:1300 (1991)で議論されている。この方法は、相補的なDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

#### 【0240】

例えば、LINGO-1をコードするポリヌクレオチドの5'コード部分を用いて、約10~40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計し得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関する遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それにより、転写および標的タンパク質の産生を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子の標的ポリペプチドへの翻訳を阻止する。 40

#### 【0241】

1つの実施形態において、LINGO-1遺伝子に特異的なアンチセンス核酸は、外因性配列からの転写によって細胞内で產生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写されて、アンチセンス核酸(RNA)が產生される。このようなベクターは、転写されて所望のアンチセンスRNAを產生することができる限りは、エピソームのままであることができ、または染色体に組み込まれるようになることができる。このようなベクターは、当技術分野で標準的な組換えDNA技術の方法によって構築することができる。ベクターは、脊椎動物細胞内での複製および発現に使用される、プラスミド、ウイルス、または当技術分野で公知のその他のものであることができる。アンチセンス分子の発現は、脊椎動 50

物、特に、ヒト細胞（例えば、本明細書の他の場所に記載されている細胞）で作用することができるが当技術分野で公知の任意のプロモーターによることができる。

【0242】

アンチセンス分子の完全な相補性は必要とされない。L I N G O - 1 をコードするRNAの少なくとも一部に相補的な配列とは、RNAとハイブリダイズし、安定な二重鎖を形成することができるので十分な相補性を有する配列を意味する。または、三本鎖の形成がアッセイされる場合もある。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度とアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が長ければ長いほど、より多くの塩基ミスマッチを含み得るが、依然として安定な二重鎖（または場合によっては三重鎖）を形成し得る。当業者は、標準的な手順を使用することによって許容できるミスマッチの程度を特定し、ハイブリダイズした複合体の融点を決定することができる。

10

【0243】

メッセンジャーRNAの5'末端に相補的であるオリゴヌクレオチド（例えば、5'非翻訳配列まで、A U G 開始コドンを含む）は、翻訳を阻害するのに最も効率よく作用するはずである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列も、同様に、mRNAの翻訳を阻害するのに効果的であることが示されている。例えば、一般に、Wagner, R., Nature 372: 333 - 335 (1994) を参照されたい。したがって、5'または3'のいずれかの非翻訳非コード領域に相補的なオリゴヌクレオチドをアンチセンスアプローチで用いて、L I N G O - 1 の翻訳を阻害することができる。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドには、A U G 開始コドンの相補体が含まれるべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、あまり有効ではない翻訳阻害因子であるが、本発明に従って使用することができる。アンチセンス核酸は、少なくとも、6ヌクレオチド長であるべきであり、いくつかの実施形態において、6～約50ヌクレオチド長の範囲のオリゴヌクレオチドである。特異的な態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも50ヌクレオチドである。

20

【0244】

また別の実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、-アノマーオリゴヌクレオチドである。-アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的RNAとの特異的な二本鎖ハイブリッドを形成するが、このハイブリッドの中では、通常の状況とは反対に、鎖が互いに並行に走る (Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625 - 6641 (1987))。オリゴヌクレオチドは、2' - 0 - メチルリボヌクレオチド (Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131 - 6148 (1987))、またはキメラRNA-DNA類似体 (Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327 - 330 (1987)) である。

30

【0245】

本明細書に開示される方法で使用されるポリヌクレオチド組成物には、触媒RNA、またはリボザイムがさらに含まれる（例えば、1990年10月4日に公開されたPCT国際公開WO 90/11364号；Sarver et al., Science 247: 1222 - 1225 (1990) を参照のこと）。本発明のいくつかの実施形態において、ハンマーへッド型リボザイムが使用される。ハンマーへッド型リボザイムは、標的mRNAとの相補的塩基対を形成する隣接領域によって決定付けられる位置でmRNAを切断する。標的mRNAが以下の2塩基の配列：5' - U G - 3' を有することが唯一の必要条件である。ハンマーへッド型リボザイムの構築および产生は当技術分野で周知であり、Haseloff and Gerlach, Nature 334: 585 - 591 (1988) に、より十分に記載されている。切断認識部位が標的mRNAの5'末端付近に位置するように、すなわち、効率を増大させ、非機能的なmRNA転写物の細胞内蓄積を最小限に抑えるように、リボザイムを改変することができる。

40

50

## 【0246】

アンチセンスアプローチと同様に、本明細書に開示される方法で使用されるリボザイムは、（例えば、安定性、標的化などの向上のために）修飾されたオリゴヌクレオチドから構成されることができ、かつインビボで L I N G O - 1 を発現する細胞に送達されてもよい。リボザイムをコードする DNA コンストラクトは、アンチセンスをコードする DNA の導入について上で記載したのと同じ方法で細胞内に導入してもよい。1つの送達方法は、トランスフェクトされた細胞が、内因性 L I N G O - 1 のメッセージを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを產生するように、例えば、p o 1 I I I プロモーターまたは p o 1 I I プロモーターのような、強力な構成的プロモーターの制御下でリボザイムを「コードする」DNA コンストラクトを使用することを含む。リボザイムは、アンチセンス分子とは異なり、触媒的であるので、より低い細胞内濃度が効率に必要である。10

## 【0247】

## TrkB アゴニストポリヌクレオチド

本発明の方法で使用される TrkB アゴニストには、TrkB ポリペプチド、その断片、アイソフォーム、または変異体をコードする核酸分子を含む TrkB アゴニストポリヌクレオチドが含まれる。本発明の TrkB アゴニストポリヌクレオチドには、TrkB リガンドポリペプチド、その断片、アイソフォーム、または変異体をコードする核酸分子も含まれる。いくつかの実施形態において、TrkB アゴニストポリヌクレオチドは、BDNF をコードする。TrkB アゴニストポリヌクレオチドには、本発明の TrkB アゴニストポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドが含まれる。20

## 【0248】

L I N G O - 1 アンタゴニストポリペプチドおよび / または TrkB アゴニストポリペプチド

本明細書に開示される方法で使用されるポリヌクレオチド（上記のアプタマーを含む）は、一本鎖もしくは二本鎖の、DNA または RNA、またはそのキメラ混合物もしくは誘導体もしくは修飾バージョンであることができる。例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションなどを向上させるために、ポリヌクレオチドを、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で修飾することができる。ポリヌクレオチドには、ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞受容体を標的化するため）、または細胞膜を横断する輸送を促進する薬剤（例えば、Let singer et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 : 6553 - 6556 (1989) ; Lemaire et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. 84 : 648 - 652 (1987) ）；1988年12月15日に公開された PCT 公開 WO 88 / 09810 号を参照のこと）もしくは血液脳関門を横断する輸送を促進する薬剤（例えば、1988年4月25日に公開された PCT 公開 WO 89 / 10134 号を参照のこと）、ハイブリダイゼーション誘発性の切断剤（例えば、Krol et al. , BioTechniques 6 : 958 - 976 (1988) を参照のこと）、または挿入剤（例えば、Zon, Pharm. Res. 5 : 539 - 549 (1988) を参照のこと）のような、その他の付加基が含まれてもよい。この目的を達成するために、ポリヌクレオチドを、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発性の架橋結合剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発性の切断剤など）に結合体化してもよい。3040

## 【0249】

本明細書に開示される方法で使用されるポリヌクレオチド（アプタマーを含む）は、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、- D - ガラクトシルクエオシン、イノシン、N - 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシ50

トシン、5 - メチルシトシン、N - 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、- D - マンノシルクエオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N - 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(ν)、ウイブトキソシン、シードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(ν)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 (3 - アミノ - 3 - N 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない基からなる群より選択される少なくとも1つの修飾された塩基部分を含んでもよい。

10

## 【0250】

本明細書に開示される方法で使用されるポリヌクレオチド(アブタマーを含む)は、アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシリロース、およびヘキソースを含むが、これらに限定されない群より選択される少なくとも1つの修飾された糖部分も含んでもよい。

## 【0251】

また別の実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるポリヌクレオチド(アブタマーを含む)は、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホルアミドチオエート、ホスホルアミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール、またはそれらの類似体を含むが、これらに限定されない群より選択される少なくとも1つの修飾されたリン酸骨格を含む。

20

## 【0252】

本発明の方法で使用されるポリヌクレオチド(アブタマーを含む)を、当技術分野で公知の標準的な方法によって、例えば、自動DNA合成装置(例えば、Biosearch、Applied Biosystemsなどから市販されているもの)を使用することによって合成してもよい。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを、Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)の方法によって合成し得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドを、制御された孔ガラスポリマー支持体(Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55:7448 - 7451 (1988))などを使用することによって調製することができる。

30

## 【0253】

## ベクターおよび宿主細胞

宿主発現系とは、それによって目的のコード配列が産生され、その後精製されるビヒクルを表すが、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされたときに、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞をも表す。これらには、抗体コード配列を含む組換えベクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌、バチルス・スブチリス(B. subtilis))のような微生物；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロマイセス属(Saccharomyces)、ピキア属(Pichia))；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)に感染したかもしくは抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現コンストラクトを持つ哺乳動物細胞系(例えば、COS細胞、CHO細胞、BLK細胞、293細胞、3T3細胞)が含まれるが、これらに限定されない。細菌細胞(例えば、大腸菌)、または真核細胞(特に、組換え抗体分子全体の発現用のもの)が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例

40

50

えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーター要素のようないべクターと組み合わされた、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO））は、抗体のための効果的な発現系である（Foecking et al. ., Gene 45: 101 (1986); Cockett et al. ., Bio/Technology 8: 2 (1990)）。

【0254】

細菌系においては、発現される抗体分子に意図される用途に応じて、多数の発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体分子の薬学的組成物の作製のために、大量のこのようなタンパク質が産生される場合には、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましい場合がある。このようなベクターとしては、大腸菌発現ベクター pUR278 (Rutherford et al. ., EMBO J. 2: 1791 (1983)) (この場合、融合タンパク質を産生するように、抗体コード配列は個々に、 lacZ コード領域とインフレームでベクター中にライゲートされ得る) ; pINベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 73: 3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509 (1989) ) などが挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクターを用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合と、それに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解させた細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物を GST 部分から放出することができるよう、トロンビンまたは第 Xa 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0255】

昆虫系においては、アウトグラファ・カリフォルニカ (Autographa californica) 核多角体病ウイルス (AcNPV) が、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして典型的に使用される。このウイルスはヨトウガ (Sphodoptera frugiperda) 細胞内で増殖する。抗体コード配列をウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）中に個々にクローニングし、AcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に配置し得る。

【0256】

哺乳動物宿主細胞においては、多くのウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合には、目的の抗体コード配列を、アデノウイルス転写 / 翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターおよびトリパータイトリーダー配列）に連結させ得る。その後、このキメラ遺伝子を、インビトロまたはインビボでの組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入し得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域 E1 または E3）での挿入によって、感染宿主内で生存可能でありかつ抗体分子を発現することができる組換えウイルスが得られる（例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359 (1984) を参照のこと）。また、特異的な開始シグナルが、挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳に必要とされる場合もある。これらのシグナルには、ATG 開始コドンと隣接配列が含まれる。さらに、挿入物全体の翻訳を確実にするために、開始コドンは、所望のコード配列のリーディングフレームと同調していなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源のものであり、天然でも合成でもあり得る。発現の効率は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含めることによって増強させ得る（Bittner et al. ., Methods in Enzymol. 153: 51-544 (1987) を参照のこと）。

【0257】

さらに、挿入された配列の発現を調整するか、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を修飾および処理する宿主細胞株を選定し得る。タンパク質産物のこのような修飾（

10

20

30

40

50

例えば、グリコシル化）および処理（例えば、切断）は、タンパク質の機能に重要である場合がある。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後処理および修飾の特徴的かつ特異的な機構を有する。発現される外来タンパク質の正確な修飾および処理を確実にするよう、適切な細胞株または宿主系を選定することができる。この目的のために、一次転写物の適切な処理、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞機構を保有する真核生物宿主細胞を使用し得る。このような哺乳動物宿主細胞としては、C H O、VER Y、B H K、He La、C O S、M D C K、2 9 3、3 T 3、W I 3 8、ならびに特に、例えば、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 0、およびT 4 7 Dなどの乳ガン細胞株、ならびに例えば、C R L 7 0 3 0 およびH s 5 7 8 B s tなどの正常乳腺細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0258】

組換えタンパク質の長期にわたる高収率の産生のために、安定発現を使用し得る。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞株を変更し得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりもむしろ、適当な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）によって制御されるD N A、および選択マーカーで、宿主細胞を形質転換することができる。外来D N Aの導入後、変更された細胞を強化培地で1～2日間増殖させることができ、その後、選択培地に移す。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がそれらの染色体にプラスミドを安定に組み込み、フォーカスを形成するまで増殖することを可能にし、次にそれをクローニングし、細胞株へと拡大することができる。この方法は、抗体分子を安定に発現する細胞株を変更するために有利に使用し得る。

20

## 【0259】

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子（Wigler et al. , C e 1 1 1 1 : 2 2 3 (1977)）、ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Lowy et al. , Cell 2 2 : 8 1 7 (1980)）を含むが、これらに限定されない、多くの選択系を使用してもよく、それぞれ、tk-細胞、hprt-細胞、またはaprt-細胞で用いることができる。また、代謝拮抗物質耐性を、以下の遺伝子の選択の基礎として用いることができる：dhfr（メトトレキセートに対する耐性を付与する）（Wigler et al. , Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)；O'Hare et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)）；gpt（ミコフェノール酸に対する耐性を付与する）（Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)；neo（アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与する）（Clinical Pharmacy 12:488-505；Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)；Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)；Mulligan, Science 260:926-932 (1993)；およびMorgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)；TIB TECH 11(5):155-215 (1993年5月)；ならびに、hygro（これは、ハイグロマイシンに対する耐性を付与する）（Santerre et al. , Gene 30:147 (1984)）。使用することができる組換えD N A技術についての当技術分野で一般に公知の方法は、Ausubelら（編），Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)；ならびにDracop

30

40

50

olisら(編), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)の第12章および第13章; Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)に記載されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0260】

抗体分子の発現レベルは、ベクターの増幅によって増大させることができる(総説としては、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, 第3巻 (1987)を参照されたい)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能である場合には、宿主細胞の培養液中に存在するインヒビターのレベルの増大により、マーカー遺伝子のコピー数が増大する。増幅される領域は抗体遺伝子と関連しているので、抗体の產生も増大する(Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983))。

【0261】

LINGO-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニストをコードする核酸を含むベクターを用いて、本発明の方法で使用されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドも产生し得る。ベクターおよびそのような核酸が作動可能に連結される発現制御配列の選定は、所望される機能特性(例えば、タンパク質発現)、および形質転換される宿主細胞に依存する。

【0262】

作動可能に連結されたコード配列の発現を調節するのに有用な発現制御エレメントは、当技術分野で公知である。例として、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、分泌シグナル、およびその他の調節エレメントが挙げられるが、これらに限定されない。誘導性プロモーターが使用される場合、それは、例えば、宿主細胞培地中の栄養状態の変化、または温度の変化によって制御することができる。

【0263】

ベクターは、原核生物のレブリコン、すなわち、細菌宿主細胞において染色体外で組換えDNA分子の自律的複製および維持を導く能力を有するDNA配列を含むことができる。このようなレブリコンは当技術分野で周知である。さらに、原核生物のレブリコンを含むベクターは、その発現が検出可能なマーカー(例えば、薬物耐性)を付与する遺伝子も含み得る。細菌の薬物耐性遺伝子の例は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与する遺伝子である。

【0264】

原核生物のレブリコンを含むベクターは、細菌宿主細胞内のコード遺伝子配列の発現を導くための原核生物またはバクテリオファージのプロモーターも含むことができる。細菌宿主と適合するプロモーター配列は、典型的には、発現されるDNAセグメントの挿入のための好都合な制限部位を含むプラスミドベクター中に提供される。このようなプラスミドベクターの例は、pUC8、pUC9、pBR322、およびpBR329(BioRad)、pPL、およびpKK223(Pharmacia)である。任意の好適な原核生物宿主を用いて、本発明の方法で使用されるタンパク質をコードする組換えDNA分子を発現させることができる。

【0265】

本発明の目的のために、数多くの発現ベクター系を利用することができる。例えば、1つのクラスのベクターは、動物ウイルス(例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス(RSV、MMTV、もしくはMOMLV)、またはSV40ウイルス)に由来するDNAエレメントを利用している。その他は、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロン

性の系の使用を含む。さらに、それらの染色体にDNAを組み込んでいる細胞を、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択し得る。マーカーは、栄養要求性宿主に対する原栄養性(protootrophy)、殺生物剤耐性(例えば、抗生物質)、または銅などの重金属に対する耐性を提供し得る。選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結させることができるか、または共形質転換によって同じ細胞内に導入することができるかのいずれかである。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子が選択マーカー遺伝子の例である(Southern et al., J. Mol. Anal. Genet. 1: 327-341 (1982))。さらなるエレメントが、mRNAの最適な合成に必要である場合もある。これらのエレメントとしては、シグナル配列またはスプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルが挙げられ得る。

#### 【0266】

1つの実施形態において、NEOSPLAと呼ばれる発現ベクター(参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,159,730号)を使用し得る。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー、マウス-グロビン主要プロモーター、SV40複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエキソン1とエキソン2、ジヒドロ葉酸レダクター遺伝子、およびリーダー配列を含む。このベクターは、CHO細胞にトランスフェクションし、その後、G418を含有する培地で選択し、メトトレキセートで増幅させると、非常に高いレベルの発現をもたらすことが分かっている。もちろん、真核細胞内で発現を誘発することができる任意の発現ベクターを、本発明で使用し得る。好適なベクターの例としては、プラスミドpCDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRC/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、およびpZeoSv2(Invitrogen, San Diego, CAから入手可能)、ならびにプラスミドpCI(Promega, Madison, WIから入手可能)が挙げられるが、これらに限定されない。

さらなる真核細胞発現ベクターは当技術分野で公知であり、市販されている。典型的には、このようなベクターは、所望のDNAセグメントを挿入するための好都合な制限部位を含む。例示的なベクターとしては、pSVLおよびpKSV-10(Pharmacia)、pBPV-1、pml2d(International Biotechnologies)、pTDT1(ATCC 31255)、レトロウイルス発現ベクターpMIGおよびpLL3.7、アデノウイルスシャトルベクターpDC315、ならびにAAVベクターが挙げられる。その他の例示的なベクター系は、例えば、米国特許第6,413,777号に開示されている。

#### 【0267】

一般に、好適に高いレベルのアンタゴニストを発現する細胞について、多数の形質転換細胞をスクリーニングすることは、例えば、ロボットによるシステムによって実行することができる日常的な実験である。

#### 【0268】

哺乳動物宿主細胞発現のために頻繁に使用される調節配列としては、例えば、レトロウイルスLTRに由来するプロモーターとエンハンサー、サイトメガロウイルス(CMV)に由来するプロモーターとエンハンサー(例えば、CMVプロモーター/エンハンサー)、サルウイルス40(SV40)に由来するプロモーターとエンハンサー(例えば、SV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルスに由来するプロモーターとエンハンサー(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(Adm1P))、ポリオーマに由来するプロモーターとエンハンサーのような、哺乳動物細胞内での高レベルのタンパク質発現を導くウイルスエレメント、ならびに例えば、ネイティブの免疫グロブリンおよびアクチンのプロモーターのような強力な哺乳動物プロモーターが挙げられる。ウイルスの調節エレメント、およびその配列のさらなる説明については、例えば、Stinski、米国特許第5,168,062号; Bell、米国特許第4,510,245号; およびS

10

20

30

30

40

50

chaffner、米国特許第4,968,615号を参照されたい。

【0269】

組換え発現ベクターは、宿主細胞内でベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子を運び得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞を選択しやすくする（例えば、*Axe1*、米国特許第4,399,216号；同第4,634,665号、および同第5,179,017号を参照のこと）。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、薬物（例えば、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキセート）に対する耐性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。頻繁に使用される選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（メトトレキセート選択／増幅と共にdhfr-細胞で使用される）およびneo遺伝子（G418選択用）が挙げられる。10

【0270】

LINGO-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニストをコードするベクターを好適な宿主細胞の形質転換に使用することができる。形質転換は、任意の好適な方法によるものであることができる。哺乳動物細胞に外因性DNAを導入する方法は当技術分野で周知であり、デキストランによって媒介されるトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレンによって媒介されるトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームの中へのポリヌクレオチドのカプセル化を介するトランスフェクション、および核へのDNAの直接的なマイクロインジェクションが含まれる。さらに、核酸分子をウイルスベクターによって哺乳動物細胞に導入してもよい。また、哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞内に導入されるべき外来DNAを含む組換えウイルスによって形質導入されてもよい。20

【0271】

本発明の方法で使用されるLINGO-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニストの発現のための宿主細胞は、原核生物であってもよく、または真核生物であってもよい。例示的な真核生物宿主細胞としては、酵母細胞ならびに哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（ATCCアクセッション番号CCL61）、NIH Swissマウス胚細胞NIH-3T3（ATCCアクセッション番号CRL1658）、およびベビーハムスター腎臓細胞（BHK）が挙げられるがこれらに限定されない。その他の有用な真核生物宿主細胞としては、昆虫細胞および植物細胞が挙げられる。例示的な原核生物宿主細胞は、大腸菌およびストレプトミセス属（*Streptomyces*）である。30

【0272】

宿主細胞の形質転換は、利用されるベクターおよび宿主細胞に適している従来の方法によって遂行することができる。原核生物宿主細胞の形質転換については、エレクトロポレーションおよび塩処理方法を利用することができます（Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-14 (1972)）。脊椎動物細胞の形質転換については、エレクトロポレーション、陽イオン性脂質、または塩処理方法を利用することができます。例えば、Graham et al., Virology 52:456-467 (1973); Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-76 (1979)を参照されたい。40

【0273】

ある実施形態において、タンパク質発現のために使用される宿主細胞株は、哺乳動物起源のものであることができる。当業者は、所望の遺伝子産物がその中で発現されるのに最も適している特定の宿主細胞株を決定する能力があると考えられる。例示的な哺乳動物宿主細胞株としては、NSO、SP2細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、A549細胞、DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣株、DHFR-）、HELA（ヒト子宮頸癌）、CVI（サル腎臓株）、COS（SV40 T抗原を有するCVIの派生物50

)、R 1 6 1 0 (チャイニーズハムスター線維芽細胞)、B A L B C / 3 T 3 (マウス線維芽細胞)、H A K (ハムスター腎臓株)、S P 2 / O (マウス骨髄腫)、P 3 x 6 3 - A g 3 . 6 5 3 (マウス骨髄腫)、B F A - 1 c 1 B P T (ウシ内皮細胞)、R A J I (ヒトリンパ球)、ならびに2 9 3 (ヒト腎臓)が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明の方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストまたはT r k B アゴニストの発現のための宿主細胞は、原核生物であってもよい。例示的な原核生物宿主細胞は、大腸菌およびストレプトミセス属である。宿主細胞株は、典型的には、商業サービス、A merican T issue C ulture C ollection、または発表された文献から入手可能である。

## 【0274】

10

産生細胞株からのポリペプチドの発現を、公知の技術を用いて増強させることができる。例えば、グルタミン合成酵素 (G S) 系は、ある条件下で発現を増強させるのに一般に用いられる。例えば、欧洲特許第0 2 1 6 8 4 6 号、同第0 2 5 6 0 5 5 号、および同第0 3 2 3 9 9 7 号、ならびに欧洲特許出願第8 9 3 0 3 9 6 4 . 4 を参照されたい。

## 【0275】

## 遺伝子治療

L I N G O - 1 およびある種のT r k B アゴニスト (例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、およびアプタマー) は、ニューロンの変性、死、もしくは再生欠如と関連する疾患、障害、または損傷の処置に対する遺伝子治療アプローチを用いて、哺乳動物 (例えば、ヒト患者) においてインビボで產生させることができる。これには、好適な発現制御配列に作動可能に連結された好適なL I N G O - 1 アンタゴニストおよび/またはT r k B アゴニストをコードする核酸の投与が含まれる。通常、これらの配列は、ウイルスベクターに組み込まれる。このような遺伝子治療のための好適なウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、エンテロウイルスベクター、ペスチウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター (例えば、エプスタイン・バーウイルスベクター、または単純ヘルペスウイルスベクター)、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター (例えば、ワクシニアウイルスベクター)、およびパルボウイルスベクターが挙げられる。ウイルスベクターは、複製欠損ウイルスベクターであることができる。それらのE 1 遺伝子またはE 3 遺伝子に欠失を有するアデノウイルスベクターが、典型的に使用される。アデノウイルスベクターが使用される場合、ベクターは通常、選択マーカー遺伝子を有さない。

20

## 【0276】

30

## 薬学的組成物および投与法

本発明の方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストまたはT r k B アゴニストは、哺乳動物 (ヒトを含む) に投与される薬学的組成物に処方されてもよい。本発明の方法で使用される薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含み、これには、例えば、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質 (例えば、ヒト血清アルブミン)、緩衝物質 (例えば、リン酸塩)、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質 (例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩)、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂が含まれる。

40

## 【0277】

本発明の方法で使用される組成物は、任意の好適な方法で (例えば、非経口的に、脳室内に、経口的に、吸入噴霧によって、局所的に、直腸に、鼻腔に、舌下に、腫に、または埋め込まれたリザーバーを介して) 投与してもよい。本明細書で使用される場合の用語「非経口」には、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病変

50

内、および頭蓋内への注射または注入技術が含まれる。先に記載されたように、本発明の方法で使用される L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストは、神経系で作用し、ニューロンの生存を促進する。したがって、本発明の方法においては、 L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストは、それらが血液脳関門を横断するような方法で投与される。この横断は、 L I N G O - 1 アンタゴニスト分子もしくは T r k B アゴニスト分子自体に固有の物理化学的特性によって、薬学的組成物中のその他の成分によって、または血液脳関門を破るために機械的装置（針、カニューレ、もしくは外科手術用の器具）の使用からもたらされ得る。 L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストが血液脳関門を本来横断しない分子（例えば、横断を促進する部分に対する融合体）である場合、好適な投与経路は、例えば、髄腔内または頭蓋内であり、例えば、 M S の慢性病変内に直接である。 L I N G O - 1 アンタゴニストまたは T r k B アゴニストが血液脳関門を本来横断する分子である場合、投与経路は、以下に記載される様々な経路のうちの 1 つ以上であり得る。

【 0 2 7 8 】

本発明の方法で使用される組成物の滅菌注射可能形態は、水性懸濁液であってもよく、または油性懸濁液であってもよい。これらの懸濁液は、好適な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて当技術分野で公知の技術に従って処方し得る。滅菌注射可能調製物はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤もしくは溶媒中の、滅菌注射可能溶液または滅菌注射可能懸濁液（例えば、1, 3 - ブタンジオール中の懸濁液）であってもよい。利用し得る許容されるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンガー溶液、および等張性の塩化ナトリウム溶液が含まれる。さらに、滅菌不揮発性油は、溶媒または懸濁媒体として従来利用されている。この目的のために、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性の不揮発性油を利用し得る。脂肪酸（例えば、オレイン酸およびそのグリセリド誘導体）は、特に、ポリオキシエチレン化されたバージョンの薬学的に許容される天然油（例えば、オリーブ油またはヒマシ油）がそうであるように、注射可能物の調製に有用である。これらの油の溶液または懸濁液は、長鎖アルコールの希釈剤または分散剤（例えば、カルボキシメチルセルロースまたは乳濁液および懸濁液を含む薬学的に許容される投薬形態の製剤で一般に使用される同様の分散剤）も含んでよい。その他的一般に使用されるサーファクタント（例えば、 T w e e n 、 S p a n 、およびその他の乳化剤）またはバイオアベイラビリティー増強剤（薬学的に許容される固体、液体、もしくはその他の投薬形態の製造で一般に使用されるもの）も、処方の目的のために使用してよい。

【 0 2 7 9 】

非経口製剤は、単回ボーラス投与量、注入、または負荷ボーラス投与量と、それに続く維持投与量であってもよい。これらの組成物は、特定の固定された間隔もしくは可変の間隔（例えば、1日に1回）、または「必要に応じた」基準で投与してもよい。

【 0 2 8 0 】

本発明の方法で使用されるある薬学的組成物を、許容される投薬形態（例えば、カプセル、錠剤、水性懸濁液または溶液を含む）で経口投与してもよい。また、ある薬学的組成物を、鼻腔用のエアロゾルまたは吸入により投与してもよい。このような組成物を、ベンジルアルコールもしくその他の好適な防腐剤、バイオアベイラビリティー増強するための吸収促進剤、および / またはその他の従来の可溶化剤もしくは分散剤を利用して、生理食塩水中の溶液として調製してもよい。

【 0 2 8 1 】

単回投薬形態を產生するために担体材料と組み合わせ得る L I N G O - 1 アンタゴニストおよび / または T r k B アゴニストの量は、処置される宿主、使用されるアンタゴニストの種類、および特定の投与様式によって異なる。組成物は、単回用量、複数回用量として、または設定された期間にわたって注入として投与し得る。また、投薬レジメンを調整して、最適な所望の応答（例えば、治療応答または予防応答）を提供し得る。

【 0 2 8 2 】

本発明の方法は、「治療有効量」もしくは「予防有効量」の L I N G O - 1 アンタゴニ

10

20

30

40

50

ストまたはTrkBアゴニストを使用する。このような治療有効量または予防有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重のような要因によって異なり得る。治療有効量または予防有効量は、治療的に有益な効果がいかなる毒性効果または有害効果をも上回る量である。

【0283】

任意の特定の患者についての具体的な投薬量および処置レジメンは、様々な要因に依存し、これらには、使用される特定のLINGO-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニスト、患者の年齢、体重、全般的な健康、性別、および食事、ならびに投与の時機、排出の速度、薬剤の併用、ならびに処置されている特定の疾患の重症度が含まれる。医療介護者によるそのような要因の判断は、当業者の能力の範囲内である。この量は、処置される個々の患者、投与の経路、製剤の種類、使用される化合物の特徴、疾患の重症度、および所望の効果にも依存する。使用される量は、当技術分野で周知の薬理学的および薬物動態的原理によって決定することができる。

10

【0284】

本発明の方法において、LINGO-1アンタゴニストまたはTrkBアゴニストは、通常、神経系に、脳室内にまたは髄腔内に（例えば、MSの慢性病変内に）直接的に投与される。本発明の方法による投与のための組成物は、1日当たり0.001~10mg/kg体重の投与量のLINGO-1アンタゴニストポリペプチドが投与されるように処方することができる。本発明のいくつかの実施形態において、投薬量は、1日当たり0.01~1.0mg/kg体重である。いくつかの実施形態において、投薬量は、1日当たり0.001~0.5mg/kg体重である。

20

【0285】

LINGO-1アンタゴニスト抗体またはTrkBアゴニスト抗体による処置のために、投薬量は、例えば、宿主体重に対して、約0.0001~100mg/kg、より通常は、0.01~5mg/kg（例えば、0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kgなど）の範囲であり得る。例えば、投薬量は、体重に対して、1mg/kgもしくは10mg/kg、または1~10mg/kgの範囲内、任意で少なくとも1mg/kgであり得る。上記の範囲の中間の用量もまた、本発明の範囲内にあることが意図される。対象は、このような用量を毎日、1日おきに、毎週、または実験的解析によって決定された任意のその他のスケジュールに従って投与することができる。例示的な処置は、例えば、少なくとも6か月間の長期にわたる複数回投薬での投与を伴う。さらなる例示的な処置レジメンは、2週間に1回または1か月に1回または3~6か月に1回の投与を伴う。例示的な投薬スケジュールとしては、連日の1~10mg/kgまたは15mg/kg、1日おきに30mg/kgまたは毎週60mg/kgが挙げられる。いくつかの方法において、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与される。この場合、投与される各々の抗体の投薬量は、示された範囲内に収まる。

30

【0286】

ある実施形態において、対象は、LINGO-1アンタゴニストポリヌクレオチドまたはTrkBアゴニストポリヌクレオチドをコードする核酸分子で処置することができる。核酸の用量は、患者1人当たり約10ng~1g、100ng~100mg、1μg~10mg、または30~300μg DNAの範囲である。感染性ウイルスベクターの用量は、投与1回当たり10~100ビリオン、またはそれより多くで変化する。

40

【0287】

ある実施形態において、LINGO-1アンタゴニストは、競合アッセイまたは免疫沈降アッセイで測定された場合、LINGO-1アンタゴニストの非存在下でのLINGO-1とTrkBの相互作用と比較して、LINGO-1とTrkBの相互作用を少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%阻止するのに有効な量で投与され得る。

50

## 【0288】

ある実施形態において、L I N G O - 1 アンタゴニストは、L I N G O - 1 アンタゴニストの非存在下でのリン酸化TrkBの量と比較して、TrkBのリン酸化を少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%促進するのに有効な量で投与され得る。

## 【0289】

ある実施形態において、L I N G O - 1 アンタゴニストは、L I N G O - 1 アンタゴニストの非存在下でのリン酸化JNKの量と比較して、JNKのリン酸化を少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少するのに有効な量で投与され得る。

10

## 【0290】

ある実施形態において、TrkBアゴニストおよびL I N G O - 1 アンタゴニストは、未処置のCNSニューロンまたは哺乳動物における生存ニューロンの数と比較して、少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、または1000%の生存ニューロンの数の増大によってCNSニューロンの生存を促進するのに有効な量で投与され得る。

20

## 【0291】

補助的な活性化合物もまた、本発明の方法で使用される組成物に組み入れができる。例えば、可溶性L I N G O - 1 ポリペプチドもしくはTrkBアゴニストポリペプチドまたは可溶性L I N G O - 1 融合タンパク質もしくはTrkBアゴニスト融合タンパク質を、1つ以上のさらなる治療剤と一緒に処方し、かつ/または一緒に投与し得る。

## 【0292】

本発明は、選択された標的組織へのL I N G O - 1 アンタゴニストまたはTrkBアゴニストの任意の好適な送達方法を包含し、これには、水性溶液のボーラス注射または制御放出システムの埋め込みが含まれる。制御放出インプラントの使用は、反復注射の必要性を低下させる。

30

## 【0293】

本発明の方法で使用されるL I N G O - 1 アンタゴニストまたはTrkBアゴニストは、脳に直接注入し得る。化合物の脳への直接的な注入のための様々なインプラントが公知であり、神経学的障害に苦しむヒト患者への治療用化合物の送達に有効である。これらには、ポンプを使用する脳への慢性的な注入、定位固定されて埋め込まれた一時的な侵入カテーテル、永久的な頭蓋内カテーテルインプラント、および外科的に埋めこまれた生体分解性インプラントが含まれる。例えば、Gill et al., 上記; Scharfen et al., 「High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas」, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24(4):583-591 (1992); Gaspar et al., 「Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas」, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 43(5):977-982 (1999); Bellezza et al., 「Stereotactic Interstitial Brachytherapy」(Gildenberg et al., Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery, McGraw-Hill (1998)), 第66章, 577-580頁; およびBrem et al., 「The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Fol」

40

50

owed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial」, J. Neuro-Oncology 26:11 1-23 (1995) を参照されたい。

【0294】

組成物はまた、化合物の好適な送達系または支持系として機能する生体適合性担体材料に分散された LINGO-1 アンタゴニストまたは TrkB アゴニストを含んでもよい。徐放性担体の好適な例としては、坐剤またはカプセルのような成型された製品の形態の半透性ポリマー・マトリックスが挙げられる。埋め込み可能なマトリックスまたはマイクロカプセル型の徐放性マトリックスとしては、ポリ乳酸（米国特許第3,773,319号；欧州特許第58,481号）、L-グルタミン酸と -エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman et al., Biopolymers 22:547-56 (1985)）；ポリ(2-ヒドロキシエチル-メトアクリレート)、エチレン酢酸ビニル（Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981)；Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)、またはポリ-D-(-)-3ヒドロキシ酪酸（EP 133,988）が挙げられる。

【0295】

本発明のいくつかの実施形態において、LINGO-1 アンタゴニストまたは TrkB アゴニストは、脳の適当な領域への直接的注入によって患者に投与される。例えば、Gill et al., 「Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease」, Nature Med. 9:589-95 (2003) を参照されたい。代替の技術が利用可能であり、本発明による LINGO-1 アンタゴニストを投与するために適用し得る。例えば、カテーテルまたはインプラントの定位固定設置を、Riechert-Munding ユニットおよび ZD (Zamorano-Dujovny) の多目的局在化ユニットを用いて遂行することができる。120ml のオムニパーク、350mg のヨウ素 / ml を注射する、コントラスト増強型コンピュータ断像撮影法 (CT) スキャン (2mm のスライス厚を有する) は、三次元多平面処理プラニング (STP, Fischer, Freiburg, Germany) を可能にすることができる。この機器は、明確な標的確認のために CT と MRI の標的情情報を統合し、磁気共鳴イメージング検討に基づくプラニングを可能にする。

【0296】

GE CTスキャナー (General Electric Company, Milwaukee, WI) と共に使用するために修正された Leksell 定位固定システム (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) および Brown-Roberts-Wells (BRW) 定位固定システム (Radiionics, Burlington, MA) をこの目的のために使用することができる。したがって、埋め込みをする日の朝に、BRW 定位固定フレームの輪状の基部リングを患者の頭蓋骨に取り付けることができる。連続 CT 切片は、基部プレートにクランプで固定されたグラファイト製のロッドローカライザーフレームを用いて (標的組織) 領域全体にわたって 3mm の間隔で得ることができる。コンピュータ化された処置プラニングプログラムを、グラファイト製のロッドイメージの CT 座標を用いて、VAX 11/780 コンピュータ (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) で実行し、CT 空間と BRW 空間の間をマップすることができる。

【0297】

本明細書に記載されるような障害の処置方法は、典型的には、ヒトで使用される前に、所望の治療活性または予防活性について、インビトロで試験され、その後、許容される動物モデルにおいてインビトロで試験される。好適な動物モデル (トランスジェニック動物を

10

20

30

40

50

含む)は当業者に周知である。例えば、L I N G O - 1 アンタゴニストまたはTrkBアゴニストの生存効果を実証するためのインビトロアッセイが本明細書に記載されている。最後に、インビオ試験は、L I N G O - 1 アンタゴニストもしくはTrkBアゴニストを発現するトランスジェニックマウスを作製することによるかまたはL I N G O - 1 アンタゴニストもしくはTrkBアゴニストを本明細書に記載されるようなモデルにおいてマウスもしくはラットに投与することによって行なうことができる。

【0298】

本発明の実施は、別途示されない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技術(これらは、当業者の能力の範囲内である)を利用する。このような技術は文献で十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(3巻セット), J. Sambrook, D. W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001); Genes VIII, B. Lewin, Prentice Hall(2003); PCR Primer, C.W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, CSHL Press(2003); DNA Cloning, D. N. Glover編, 第I巻および第II巻(1985); Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications(Methods in Molecular Biology), P. Herdewijn(編), Humana Press(2004); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第4版, R. I. Freshney, Wiley-Liss(2000); Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait(編), (1984); Mullis et al., 米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins編. (1984); Nucleic Acid Hybridization, M. L. M. Anderson, Springer(1999); Animal Cell Culture and Technology, 第2版, M. Butler, BIOS Scientific Publishers(2004); Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach(Practical Approach Series), J. Woodward, IRI Pr(1992); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins(編)(1984); Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); A Practical Guide To Molecular Cloning, 第3版, B. Perbal, John Wiley & Sons Inc. (1988); 専門書, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., N. Y.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos編, Cold Spring Harbor Laboratory(1987); Methods In Enzymology, 第154巻および第155巻, Wu et al. (編); Immunological Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer and Walker, (編), Academic Press, London(1987); Handbook Of Experimental Immunology, 第I-IV巻, D. M. Weir and C. C. Blackwell(編), (1986); Immunology Meth 10 20 30 40 50

ods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques (4巻セット), 初版, I. Lefkovits, Academic Press (1997); Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002); ならびにAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)を参照されたい。

#### 【0299】

抗体工学の一般的な原理は、Antibody Engineering: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), B.L. Lo (編), Humana Press (2003); Antibody engineering, R. Kontermann and S. Dubel (編), Springer Verlag (2001); Antibody Engineering, 第2版, C.A.K. Borrebaeck (編), Oxford Univ. Press (1995) に示されている。タンパク質工学の一般的な原理は、Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al. (編), IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995) に示されている。抗体および抗体-ハブテン結合の一般的な原理は、Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Nisonoff, A., Molecular Immunology, 第2版, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); およびSteward, M. W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984) に示されている。さらに、当技術分野で公知の、具体的には記載されない標準的な免疫学の方法は、通常、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al. (編), Immunochemical Protocols (Methods in Molecular Biology), 第2版, J. D. Pound (編), Humana Press (1998); Weir's Handbook of Experimental Immunology, 第5版, D. M. Weir (編), Blackwell Publishers (1996); Methods in Cellular Immunology, 第2版, R. Fernandez-Botran, CRC Press (2001); Basic, and Clinical Immunology, 第8版, Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)、およびMishell and Shiigi (編), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980) に記載のものと同様である。

#### 【0300】

免疫学の一般的な原理を示す標準的な参考文献としては、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J.; Kuby Immunology, 第4版, R. A. Goldsby, et al., H. Freeman & Co. (2000); Basic and Clinical Immunology, M. Peakman, et al., Churchill Livingstone 50

(1997) ; Immunology, 第6版, I. Roitt, et al., Mosby, London (2001) ; Cellular and Molecular Immunology, 第5版; A.K. Abbas, A.H. Lichtman, Elsevier - Health Sciences Division (2005) ; Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques (4巻セット), 初版, I. Lefkovits, Academic Press (1997) Immunology, 第5版, R.A. Goldsby, et al., W.H. Freeman (2002) ; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第3版, J.W. Goding, Academic Press (1996) ; Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982) ; Kennett, R., et al. (編), Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980) ; Campbell, A., 「Monoclonal Antibody Technology」(Burden, R., et al. (編), Laboratory Techniques in Biochemistry)、およびMolecular Biology, 第13巻, Elsevier, Amsterdam (1984) が挙げられる。

### 【0301】

上で引用されている全ての参考文献、および本明細書に引用されている全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

### 【実施例】

#### 【0302】

##### 材料および方法

組換えLINGO-1-Fcおよび抗LINGO-1モノクローナル抗体の作製

LINGO-1-Fc (LINGO-1-Fcタンパク質)を以前に記載されているように調製した (Mi et al., Nat. Neurosci. 7: 221-228 (2004))。ヒトLINGO-1の残基1~532をヒトIgG1のヒンジおよびFc領域に融合し、CHO細胞で発現させた。ヒトIgG1(対照タンパク質)は、Protos Immunoresearch (San Francisco, CA) から購入した。抗LINGO-1 mab 1A7を、LINGO-1-Fcで免疫化したマウスで作製した。ハイブリドーマ細胞株をDMEM中で増殖させ、抗体をプロテインAセファロースにより精製した。MOPC21マウスIgG(対照タンパク質)は、Protos Immunoresearch (San Francisco, CA) から購入した。

#### 【0303】

##### 高眼圧モデル

実験は、実験動物の管理および使用に関する米国国立衛生研究所指針 (NIH刊行物第80-23号) (1996年改訂)に従って行ない、香港大学動物倫理委員会の承認を受けた。体重約250gの成体メスのSprague-Dawley (SD) ラットを使用した。標準的な実験ケージ当たり3匹でラットを飼育し、餌と水を自由に与えて12時間の明暗周期(午前7:00/午後7:00)で維持した。全ての操作は、ケタミン(80mg/kg)とキシラジン(8mg/kg)の腹腔内注射で麻酔した動物で行なった。全ての操作の前に0.5%アルカイン(Alcon-Couvreur, Belgium)を眼に適用し、処置後の感染を防止するために殺菌目薬(Tobres [トブラマイシン 0.3%], Alcon-Couvreur, Belgium)を使用した。手術後7日間、痛みを和らげるために、飲料水中のリマディル(0.025mg/ml)を

使用した。

【0304】

慢性高血圧モデルを用いて、実験的緑内障を誘導した。SDラットは、右眼の上強膜静脈および角膜縁静脈に、出力1000mW、スポットサイズ500~100μm、および持続時間0.1秒で、アルゴンレーザー光凝固を受けた(Ji et al., Eur. J. Neurosci. 19: 265-212 (2004); Woldemussie et al., Invest. Ophthalmol. 42: 2849-2855 (2001))。約90個のスポットを3つの上強膜静脈に当て、70個のスポットを角膜縁静脈周辺に当てた。7日後に、再接続した血流を遮断するために2回目のレーザー手術を行なった。動物の左眼を対側対照として用い、それに対しては操作を行なわなかった。動物を、最初のレーザー被爆後、2週間または4週間生存させた後、屠殺した。Tonopen XL Tonometerをレーザー手術後の異なる時点で用いて、右眼および左眼のIOPを測定した。各眼について、10回の測定の平均値を得た。屠殺の4日前に、RGCのFG標識を行なった。頭蓋骨および皮質の小片を取り除いた後、両方の上丘(SC)を剥き出しにし、FG(6%v/v、Fluorochrome、Denver、CO)で浸した1枚のGel foam(Pharmacia & Upjohn)をSCの表面に置いた。FGは、無傷のRGCを逆行性標識した。12匹の動物をPBSで処置し、最初のレーザー被爆後4週間、生存させた。その他の実験群の全てにおいて、10匹の動物を使用した。緑内障モデルの手順を図1にまとめる。

【0305】

1回目のレーザー処置の後、動物はすぐに、2μgのLINGO-1-Fc、2μgの1A7、または2μgの対照タンパク質を含むPBSの硝子体内注射を受けた。4週間の緑内障モデルでは、タンパク質を、週に1回再注射した。RGCの計数の間、研究者の先入観を避けるために、処置が分からないようにした。動物は全て、麻酔の過剰摂取により安楽死させた。

【0306】

所定の時点で、ラットを麻酔の過剰摂取により屠殺した。各動物の両眼を摘出し、4%パラホルムアルデヒド中で60分間固定した。網膜をフラットマウント標本として調製し、FG標識されたRGCを、記載されているような紫外フィルター(励起波長=330~380nm)を用いて蛍光顕微鏡下で計数した(Cheung et al., Mol. Cell. Neurosci. 25: 383-393 (2004); Ji et al., Eur. J. Neurosci. 19: 265-272 (2004))。RGCを、200×200μm<sup>2</sup>の接眼レンズグリッド下で、各4半分の正中線に沿って、視神経円板からその境界まで500μm間隔で定量した(図2)。各4半分の8つの顕微鏡視野、および4つの4半分について網膜当たり合計32個を計数したが、これは、各網膜面積の約3~3.2%に相当した。RGCの損失パーセントを測定し、異なる処置の生存効果を調べた。データは、対側の無傷の眼と比較した損傷した眼のRGC損失の相対的割合(対側%、平均+標準偏差)に換算して表した。

【0307】

透過電子顕微鏡法のための組織処理

2mmの網膜の断片を、PBS、可溶性LINGO-1、または1A7で処置した正常群および2週間の緑内障群から得た。それらを、Karnovsky電子顕微鏡(EM)固定液中に4で2~4時間置いた。0.1Mリン酸緩衝液(PB)中で洗浄した後、組織試料を0.1M PB中の1%四酸化オスミウム中で後固定し、その後、エタノール中で脱水し、Eponに包埋した。半薄(1μm)切片を、LKBナイフメーカーで作製されたガラスナイフ付きのReichert-Jungウルトラミクロトームを用いて各々のブロックから得た。これらの切片をトルイジンブルーで染色した。銀色の干渉色を有する超薄切片を得、Reynoldsクエン酸鉛と酢酸ウラニルで染色し、電子顕微鏡で調べた。

【0308】

10

20

30

40

50

## 初代 RGC 培養

P7 Long-Evans ラットの眼を取り除き、解離培地 (DM; 90 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、30 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、5.8 mM MgCl<sub>2</sub>、0.25 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM HEPES、0.001% フェノールレッド) (Furshpan and Potter, 1989) 中に置いた。眼から網膜を取り除き、15 U/ml パパイン (Washington, NJ)、1 mM L-システイン、0.5 mM EDTA、0.005% DNase I を含有する 2 ml の DM 中、37 °C で 30 分間インキュベートした。網膜を DM 中で 2 回すすぎ、10 mg/ml オボムコイドプロテーゼ阻害剤、10 mg/ml ウシ血清アルブミン (両方とも Washington 製) を含有する 2 ml の DM に再懸濁し、2 ml の血清学的ピペットを用いて 10 ~ 15 回穏やかにすり潰した。解離した細胞を 1000 rpm で 5 分間ペレット化し、Meyer-Frankel (Meyer-Franke et al., Neuron 15: 805-819 (1995)) (Neurobasal, Invitrogen 製の 1 x B27、5 μM フォルスコリン、60 nM T3、1 mM ピルビン酸塩、2 mM グルタミン酸塩) から改変された 2 ml の増殖培地に再懸濁し、血球計で計数した。細胞を、50,000 細胞/cm<sup>2</sup> の密度で、ポリ-D-リジンとラミニン (BD Biosciences, Bedford, MA) でコーティングされた BD Biocoat 96 ウェル組織培養プレート中にプレーティングし、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 3 日間増殖させた。プレーティングの時点で、ヒト IgG1 (10 μg/ml)、LINGO-1-Fc (10 μg/ml) のみ、ヒト IgG1 と 25 ng/ml BDNF、または LINGO-1 Fc と BDNF の 4 通りのウェルで細胞を処置した。

## 【0309】

細胞を、-20 °C、メタノール中で、15 分間固定し、PBS 中で 2 回すすぎ、5% 正常ヤギ血清を含有する PBS 中で 1 時間ブロッキングした。細胞を、Thy 1.1 抗体 (Serotec、クローンOX-7、PBS 中 1:40) 中で、一晩 4 °C でインキュベートし、PBS 中で 5 分間、3 回すすぎ、Alexa594 が結合体化されたヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes, Eugene, OR; 1:1000) 中で 1 時間インキュベートし、PBS 中で 5 分間、3 回すすぎだ。

## 【0310】

Zeiss axiovert 倒立顕微鏡を用いた落射蛍光顕微鏡法により RGC を同定した。各ウェルの表面全体を落射蛍光下に目視で見渡し、生存している RGC を計数した。ニューロンの形態を有しかつ細胞体直径の 3 倍の最小長を有する少なくとも 1 つの突起を持つ Thy 1.1 陽性細胞のみを計数した。

## 【0311】

## LINGO-1 および p-TrkB の免疫組織化学

屠殺の 4 日前に、RGC を FG で逆行性標識した。0.9% 生理食塩水の経心腔的灌流に続いて損傷させた 2 週間後に眼を摘出し、次に 4% PFA 中で 4 時間、後固定した。10 ミクロン厚の凍結切片をマウス抗 LINGO-1 抗体 (Biogen)、ウサギ抗-ホスホ TrkB (Tyr785) 抗体 (B. Sun 博士, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Shanghai, China からの贈呈品) (Ji et al., Nat. Neurosci. 8: 164-172 (2005)) とインキュベートし、次いで Alexa 標識二次抗体で処置した。洗浄後、これらの切片を、蛍光マウント媒体 (Dako Cytoplast) を用いて標本作製し、Carl Zeiss LSM 510 META 共焦点顕微鏡の下で解析した。

## 【0312】

## ウェスタンプロッティング

網膜の LINGO-1、BDNF、または p-TrkB を測定するために、動物を、レーザー凝固の 2 週間後に安樂死させた。Akt リン酸化の時間的プロファイルを評価するために、LINGO-1-Fc または PBS で処置した動物を、レーザー凝固の 6 時間後

10

20

30

40

50

、1日後、および5日後に、安楽死させた。TrkBリン酸化に対する損傷、BDNF、およびLINGO-1Fcまたは1A7の効果を測定するために、本発明者らは、BDNF (5 µg/眼、組換えヒトBDNF; Regeneron Pharmaceutical, Tarrytown, NY) またはLINGO-1-Fcもしくは1A7 (2 µg/眼) と組み合わせたBDNFを、レーザー凝固と同じ時点で硝子体内に注射し、その後、5日後に、動物を安楽死させた。網膜を解剖し、10%プロテアーゼ阻害剤カクテルと1%ホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma製) が補充された溶解緩衝液 (10 mM Tris pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA) 中でホモジナイズした。13,000 rpmで30分間遠心分離して細胞残屑を除去した後、Bio-Rad DCタンパク質アッセイキット (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて、上清のタンパク質濃度を測定した。個々の動物からの40~80 µgアリコートのタンパク質を、6~12.5% SDS-PAGEアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、PVDF膜に転写した。この膜を、0.1% Tween 20を含有するTris緩衝生理食塩水 (TBST) 中の5%脱脂粉乳と2%ウシ血清アルブミン (BSA) で、室温で1時間ブロッキングした。マウス抗LINGO-1抗体 (Biogen)、ウサギ抗BDNF抗体 (Chemicon)、マウス抗ホスホAkt抗体 (1:1000)、ウサギトータルAkt抗体 (1:1000)、抗ホスホJNK抗体 (1:1000)、トータルJNK抗体 (Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ホスホTrkB抗体 (Tyr785) (1:1000) (B. Sun博士, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Shanghai, Chinaからの贈呈品) (Ji et al., Nat. Neurosci. 8: 164-172 (2005))、およびニワトリIgYトータルTrkB抗体 (Promega) (1:100)とのインキュベーションを一晩4度行なった。洗浄後、この膜を、5%脱脂粉乳と2%BSAとを含有するTBST中の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体二次抗体と室温で1時間インキュベートした。増強化学発光法 (ECL, Amersham) を用いて免疫反応性のタンパク質を検出した。アクチンに対するモノクローナルヤギ抗体 (1:1000、C-11, Santa Cruz Biotechnology) を用いて、タンパク質ローディングを制御した。Labworksゲルドキュメンテーション (UVP, Inc, Upland, CA) を用いたデンシティメトリー・スキャニングによって、各バンドの強度を定量した。ウェスタンプロッティング用の実験は全て、各群につき3~5匹の動物を用いて行ない、個々の動物として試料をゲル上に走らせた。タンパク質レベルを、最終的には、正常な網膜の総タンパク質と比較した相対値として表した。

### 【0313】

LINGO-1およびTrkBの免疫沈降およびウェスタンプロッティング HAタグ付き全長ヒトLINGO-1、mycタグ付き全長ヒトTrkB、またはLINGO-1/TrkBの組み合わせを293T細胞 (100 mMディッシュ) にトランスフェクトした。48時間後に細胞を回収し、1 ml RIPA緩衝液 (50 mM Tris, pH 7.2、1% Triton X-100、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、150 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、5%グリセロール) 中で、4度で30分間溶解させた。14,000 × gで15分間遠心分離した後、上清を、プロテインA/Gプラスセファロースビーズ (Santa Cruz Biotechnology, CA) と4度で1時間インキュベートした。その後、ブレクリアードしたライセートを抗LINGO-1抗体 (Biogen Idec) と4度で1時間インキュベートし、次いでプロテインA/Gセファロースビーズを1時間添加した。ビーズを、1% Triton緩衝液 (50 mM HEPES、pH 7.5、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、1% Triton X-100、および10%グリセロール) で3回洗浄し、Laemmli試料緩衝液中で煮沸し、4~20% SDS-PAGEにかけ、抗TrkB抗体 (Myc, Roche) または抗LINGO-1抗体 (HA, Roche) を用いたウェスタンプロッティングにより解析した。また、

正常ラットまたは2週間の高眼圧ラット由来の網膜ライセートを、抗TrkB抗体（Chemicon）、抗LINGO-1抗体（Upstate）、または非特異的抗体を用いて4で一晩免疫沈降し、抗LINGO-1抗体（Upstate）を用いたウェスタンプロットティングにより解析した。

【0314】

Neuroscreen-1細胞（PC12細胞のサブクローニング株、Cellomics）または過剰発現された安定なHA-LINGO1を有するNeuroscreen細胞に、TrkBレンチウイルスを2日間感染させた。細胞を一晩血清飢餓状態にした後、無血清培地中で0分間または30分間、BDNFにさらした。細胞ライセートをpan-TrkB抗体（Santa Cruz, sc-139）により免疫沈降し、その後、ホスホTrkB用の抗ホスホTyrosine抗体またはトータルTrkB用の抗TrkB抗体（Santa Cruz）のいずれかを用いたウェスタンプロットティングにより評価した。また、細胞ライセートを、LINGO-1発現（HA, Roche）についてのウェスタンプロットティングによって評価した。

【0315】

統計

2群間の比較のためのスチューデントのt検定を用いるか、または3群以上の比較のための一方向の分散分析（ANOVA）と、それに続く事後検定（スチューデント-ニューマン-クールズ）によって、統計解析を行なった。

【0316】

実施例1

ラット緑内障モデルにおけるLINGO-1の発現増大

LINGO-1の発現をラット緑内障モデルで調べた。このモデルでは、アルゴンレーザーを用いて、角膜縁と上強膜のドレナージ血管（drainage vessel）の光凝固によって房水の流れを遮断し、眼圧（IOP）の確実な増大をもたらした（図1参照）。

【0317】

高眼圧状態を発生させるために、角膜縁静脈および3つの上強膜静脈に、アルゴンレーザーを用いて7日間の間隔で2回光凝固を施した。レーザー光凝固の前および直後の房水静脈の検討により、図3に示すような、静脈血流の顕著な減少が明らかとなった。

【0318】

正常なラット網膜切片および損傷したラット網膜切片でLINGO-1発現を調べた。正常な網膜神経節細胞（RGC）は、低レベルのLINGO-1の染色を表したが、レーザー凝固の2週間後に、はるかに強いLINGO-1に対する免疫反応性がRGCで生じた。標識されたRGCの数と標識の強度は両方とも増大した（図4参照）。（用語「レーザー凝固後」とは、「1回目のレーザー凝固後」を意味する。）

これらの知見をウェスタンプロットティングで確認し、これにより、LINGO-1発現は、正常網膜では低かったが、損傷の2週間後に1.6倍にまで増大することが示された（ $P < 0.05$ ）（図5参照）。

【0319】

実施例2

LINGO-1アンタゴニストは眼圧に影響を及ぼすことなく神経保護剤として作用する

圧力またはニューロンの生存の変化を測定することによって、実験的高眼圧をモニタリングすることができる。したがって、眼圧とRGC生存の両方に対するLINGO-1アンタゴニストの効果を調べた。動物に、上記のような、レーザー処置を受けさせ、その後にLINGO-1-Fc、1A7、または対照タンパク質の硝子体内注射を受けさせた。

【0320】

処置した眼および処置していない眼の眼圧（IOP）をモニタリングした。処置した動

10

20

30

40

50

物の対側左眼のIOPは、約13mmHgであり（図6参照）、実験を通して同じレベルのままであった。4つの群全てのレーザー処置した右眼のIOPは、最初のレーザー手術後に増大し、約22mmHgに達し、屠殺するまでこのレベルのままであった。これらの実験条件下では、LINGO-1-Fcおよび中和抗LINGO-1抗体mAb 1A7による処置は、IOPを下げなかつた（図6参照）。

### 【0321】

LINGO-1アンタゴニストは、実際、ニューロンの生存に影響を及ぼした。まず、レーザー損傷の2週間後に生存しているRGCを定量した。両眼の網膜を調製し、生存しているRGCを計数した。PBS処置群および対照タンパク質処置群における、レーザー凝固の2週間後のRGC損失は、それぞれ、 $13.93 \pm 1.44\%$ および $12.37 \pm 1.84\%$ であった（図7A参照）。LINGO-1-Fcの注射は、RGC損失を防いだ。LINGO-1-Fcで処置した網膜は、 $0.09 \pm 1.47\%$ のRGC損失しか有さなかつた（PBS対照群およびヒトIgG対照群と比較して、 $P < 0.001$ ）。同様に、mAb 1A7処置は、RGC損失を $1.46 \pm 1.32\%$ に制限した（対照群と比較して、 $P < 0.001$ ）。

### 【0322】

RGCの長期生存に対するLINGO-1アンタゴニストの効果を調べるために、LINGO-1-Fcおよび中和LINGO-1抗体1A7を、週に1回、硝子体内に注射し、動物を4週間生存させた。この結果（図7A参照）により、LINGO-1-Fcアンタゴニストによる処置は、レーザー凝固の4週間後、損傷したRGCの損失を、 $20.09 \pm 1.36\%$ （PBS対照）から、LINGO-1-Fcについては $5.98 \pm 0.83\%$ （ $P < 0.001$ ）に、1A7については $4.73 \pm 1.72\%$ （ $P < 0.001$ ）に有意に低下させるということが示された。

### 【0323】

RGC生存に関するデータを、各群についての平均密度（細胞数/mm<sup>2</sup>）としても示す（図7B参照）。レーザー凝固の2、4、8、および12週間後の本発明者らのラット緑内障モデルにおけるRGCの死に関するこれまでの研究により、RGCの損失が、4週間後に最大レベルに達するということが示された（Li et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2951-2958 (2006)）。対照的に、LINGO-1-Fcおよび1A7の顕著な神経保護は、レーザー凝固の4週間後に観察された。毛様体神経栄養因子（CNTF）処置（図示せず）とは異なり、LINGO-1-Fcも抗LINGO-1抗体も、長期生存実験で白内障を引き起こさなかつた。

### 【0324】

また、電子顕微鏡法を用いて、LINGO-1アンタゴニストの効果を評価した。図8Aに示されているように、眼圧上昇の2週間後、PBSで処置したRGCの中には、不規則な核または壊れてさえもいる核を有し、ミトコンドリアが膨張および溶解しているものがあつた。粗面小胞体（ER）とゴルジ体の損失を示すものもあつた。対照的に、可溶性LINGO-1および1A7で処置した眼は、典型的な網膜神経節細胞の特徴を維持し、正常なERとゴルジ体を有していた。RGC、アマルシン（amarine）細胞、および双極細胞が接続している、内網状層（ IPL）の細胞のオルガネラも調べた。LINGO-1または1A7で処置した動物は、ほとんど正常な軸索と樹状突起を維持していたが、これに比べて、PBSで処置した動物の細胞は、より膨張した軸索と樹状突起の内部にオルガネラが少なかつた（図8B参照）。さらに、PBSで処置した動物のシナプスが、細くはなるが、分かれていないと状態のままであるのに対し、LINGO-1-Fcまたは1A7の処置を受けた網膜は、正常なシナプスの特徴を維持した。

### 【0325】

#### 実施例3

LINGO-1アンタゴニスト単独ではインビトロでの網膜神経節細胞の生存が促進されない

10

20

30

40

50

RGC生存に対するLINGO-1-Fcの効果をさらに研究するために、RGC初代培養系を用いた(Meyer-Franke et al., *Neuron*, 15: 805-819 (1995))。解離した網膜培養物を、対照タンパク質またはLINGO-1-Fcの存在下で3日間増殖させた。RGCのマーカーである、Thy1.1免疫染色によって、初代RGCを同定し、計数した。これらの実験条件下における、インビオでの明白な神経保護活性とは異なり、LINGO-1-Fc処置単独では、培養RGCの生存が促進されなかった(図9参照)。

### 【0326】

#### 実施例4

LINGO-1はBDNF経路に作用する

10

脳由来神経栄養因子(BDNF)の存在下におけるインビトロでのRGCの生存に対するLINGO-1アンタゴニストの効果も調べた。BDNFの存在下で、LINGO-1アンタゴニストは、RGCの生存を促進することができた。RGCを実施例3と同様に増殖させ、BDNFと対照タンパク質またはBDNFとLINGO-1-Fcのいずれかで処置した。BDNFの存在下では、対照タンパク質で処置した細胞でよりも有意に大きいパーセンテージの、LINGO-1-Fcで処置した細胞での細胞生存。インビオでは、動物の網膜が内因性BDNFにさらされているのに対し、RGC培養物はいかなるBDNFも有さなかったという事実に加えて、この結果は、LINGO-1-Fcが、BDNFに対する応答を調整することによって、RGCを救済するということ、および/またはLINGO-1-Fcが、ニューロトロフィン受容体を増強することによって、生存を間接的に増大させることを示す。

20

### 【0327】

したがって、網膜でのLINGO-1-FcとBDNFの関係を調べるために、ウェスタンプロットティングを用いて、高眼圧ラットの網膜でBDNFを測定した。これまでの研究により、正常なラット網膜は、BDNFを発現するということが示された(Rudzinski et al., *J. Neurobiol.* 58: 341-351 (2004))。本結果により、正常網膜での低レベルのBDNFが示された( $P < 0.05$ 、図10)。しかしながら、BDNFレベルは、レーザー凝固の2週間後に、3倍よりも大きく増大し( $P < 0.05$ )、これまでの報告結果(Rudzinski et al., *J. Neurobiol.* 58: 341-351 (2004))と一致した。したがって、レーザー凝固は、内因性のニューロトロフィン応答を活性化した。しかしながら、図7に示されているように、この応答は、ニューロンの損傷を完全に保護するには不十分であった。眼圧上昇後のLINGO-1-Fcおよび1A7による処置は、PBS対照群と比較してBDNFの高いレベルを変化させなかった(正常と比較して $P < 0.05$ 、図10)。これらの結果とインビトロのデータにより、LINGO-1-Fcまたは1A7が、BDNFに対する応答を調整し、網膜の内因性BDNFの神経保護活性を強化するということが示される。

30

### 【0328】

LINGO-1-Fcおよび1A7の存在下で、中和抗BDNF抗体も注射した。これらの実験では、0日目にレーザー凝固および/または2 $\mu$ gのLINGO-1-Fcもしくは1A7を1回投与した後、0、3、7、および10日目に、3 $\mu$ gの抗BDNF抗体(Chemicon)を、実験用の眼に硝子体内注射した。このラットを2週間で安樂死させ、FG標識されたRGCを計数した。

40

### 【0329】

抗BDNF抗体は、レーザー凝固の2週間後に、LINGO-1-Fc( $P = 0.002$ )または1A7( $P = 0.004$ )の保護機能を有意に覆した。PBS群と抗BDNF抗体群の間またはPBS群とLINGO-1-Fcもしくは1A7と組み合わせた抗BDNF抗体群の間でRGC損失に差はなかった(図11A)。このデータを、RGCの平均密度(細胞数/ $\text{mm}^2$ )としても示す(図11B参照)。各群におけるタンパク質は、眼圧に対して効果がない。これらの結果により、LINGO-1-Fcまたは1A7が、網

50

膜の増大した内因性BDNFを強化することによって、損傷したRGCを救済するということがさらに確認された。

### 【0330】

#### 実施例5

LINGO-1はTrkBに結合し、これを負に調節する

図4に示されているように、LINGO-1-Fcは、BDNFに対する応答を調整することによって、その神経保護活性を発揮する。LINGO-1とBDNF受容体TrkBの関係を、免疫沈降法とイムノプロッティング法を用いて調べた。ニューロトロフィンは、2つの異なるクラスの受容体である、Trkファミリーの受容体チロシンキナーゼおよびp75<sup>NT</sup>Rを活性化し、次にこれらが多くの下流のシグナル伝達経路を活性化する。Trk受容体には、TrkA、B、およびCが含まれる。BDNFはTrkBを活性化する(Huang and Reichardt, 2003, Annu. Rev. Biochem. 72: 609-642; Huang and Reichardt, 2001, Annu. Rev. Neurosci. 24: 677-736)。網膜で優位を占めるTrk受容体はTrkBであるということが、これまでに示されている(Cui et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 1954-1964 (2002))。

### 【0331】

LINGO-1がTrkBと直接相互作用するかどうかを明らかにするために、TrkBとLINGO-1とを共発現するトランスフェクトされた293T細胞由来の細胞ライセートを調べた。ライセートを抗LINGO-1抗体で免疫沈降し、抗TrkB抗体または抗LINGO-1抗体をウェスタンプロッティングに用いた。本発明者らの結果は、TrkBが、抗LINGO-1抗体によって、TrkBとLINGO-1の両方を共発現する293T細胞から免疫沈降されるということを示した(図12A)。これは、LINGO-1がTrkBに結合することを示す。さらに、LINGO-1発現細胞株にTrkBレンチウイルスを2日間トランスフェクトし、この細胞をBDNFで処置した。ライセートを汎TrkB抗体を用いて免疫沈降し、その後、ホスホTrkB(p-TrkB)とトータルTrkBのレベルをウェスタンプロッティングによって評価した。トータルTrkBは、全ての群でほぼ同じレベルのままであった(図12B)。BDNF刺激は、LINGO-1の非存在下でリン酸化TrkBの増大をもたらした(図12Bのレーン3および4)。しかしながら、p-TrkBのレベルは、BDNF刺激後、LINGO-1の存在下でより低かった(図12Bのレーン7および8、P < 0.05)。これらの結果は、LINGO-1がTrkBに結合し、ニューロトロフィンがTrkBに結合した後のTrkBの活性化を制限するということを示す。LINGO-1はこのようにTrkB受容体の機能を調整し、BDNF-TrkB系の神経保護活性の負の調節因子として作用する。

### 【0332】

LINGO-1とTrkBがインビボでRGCから共免疫沈降するかどうかを明らかにするために、正常ラットまたは2週間の高眼圧ラット由来の網膜ライセートを、抗TrkB抗体、抗LINGO-1抗体、または非特異的抗体で免疫沈降し、抗LINGO-1抗体をウェスタンプロッティングに用いた。LINGO-1は、抗TrkB抗体で網膜ライセートから共免疫沈降され、LINGO-1が正常網膜でTrkBと相互作用することを示した。さらに、高眼圧を誘導した2週間後、LINGO-1はTrkBに構成的に結合していた(図13)。RGCにおけるLINGO-1とTrkBの共局在も調べた。LINGO-1とp-TrkBを、FGで逆行性標識したRGCに共発現させた。図13Bは、高眼圧の誘導と1A7による処置の2週間後の網膜におけるLINGO-1とp-TrkBの共局在の代表的な写真を示す。

### 【0333】

高眼圧モデルにおけるLINGO-1-Fcおよび1A7の機構をさらに評価するために、TrkB活性化に対するLINGO-1-Fcおよび1A7の効果をウェスタンプロッティングで評価した。正常なラット網膜は、高レベルのトータルTrkBを発現してい

た(図14A)。このトータルTrkBレベルは、高眼圧を誘導した2週間後、対照群とLingo-1-Fc群または1A7群の間で差がなかった(図14A)。しかしながら、Lingo-1-Fcまたは1A7の投与は、レーザー処置の2週間後、対照タンパク質よりも有意に大きくp-TrkBレベルを上方調節し(図14A)、Lingo-1-Fcおよび1A7処置が、内因性レベルのBDNFの存在下でTrkBの活性化を可能にするということを示した。レーザー凝固後、BDNFを注射した。トータルTrkBレベルは、眼をBDNF単独で処置したか、またはBDNFをLingo-1-Fcもしくは1A7と組み合わせて処置したかにかかわらず、網膜のレーザー凝固の5日後まで、同じレベルにとどまった(図14B)。BDNF処置単独で、p-TrkBレベルは増大したが、その変化は、処置の5日後に、統計的有意ではなかった。しかしながら、Lingo-1-Fcまたは1A7と組み合わせたBDNFは、網膜のp-TrkBレベルを有意に増大させた(図14B)。

#### 【0334】

これらの知見は、BDNF刺激単独ではTrkB受容体の限られた活性化しか生じないということを示す。これは、外因性BDNFを添加したときにも当てはまった。しかしながら、Lingo-1-Fcまたは1A7で処置することによりこの制限が緩和された。これらの結果は、Lingo-1がTrkBと結合し、BDNFがTrkBに結合した後のTrkB活性化を負に調節するということを示すインピトロの結果と一致する。Lingo-1-Fcおよび1A7処置は、BDNFによるTrkB受容体の活性化を増大させることによって、神経保護活性を促進する。

#### 【0335】

##### 実施例6

Lingo-1アンタゴニストは眼圧上昇後のAkt活性化を増大させる

BDNFによるTrkB受容体の活性化は、PI-3キナーゼ(PIK3)を含むいくつかの下流のシグナル伝達経路を開始させる。PI3Kによるセリン473とトレオニン308のリン酸化は、ニューロンにとっての重要な生存シグナルである(Brazil et al., Cell 111: 293-303 (2002))。実施例4および5に示されているように、Lingo-1-Fcおよび1A7は、BDNFおよびそのコグネート受容体TrkBの機能を調節する。さらに、レーザー凝固手術後の様々な時点でのトータルAktとpAkt(活性型のAkt)を測定することによって、PI3K/Aktシグナル伝達経路に対するLingo-1-Fcの効果を調べた。ウェスタンプロット解析により、トータルAktレベルはレーザー凝固の5日後まで変化しない状態のままであることが明らかとなった(図15)。pAktレベルは、正常対照網膜では低かったが、レーザー処置の6時間後までに5倍に増大し、その後、レーザー凝固後1日目から5日目にかけて下落した。pAktレベルにおける同様のベル型応答は、視神経切断後に、これまでに報告されている(Cheung et al., Mol. Cell Neurosci. 25: 383-393 (2004))。Lingo-1-Fcで処置した網膜において、pAktのレベルは、同様のパターンに従い、レーザー凝固後6時間でピークに達し、その後、5日間かけて下落した。しかしながら、5日目のpAktのレベルは、Lingo-1-Fcで処置した網膜の方が、PBSで処置した対照網膜よりも有意に高かった( $P < 0.05$ 、図15)。したがって、Lingo-1-Fcによる処置は、Aktシグナル伝達に影響を及ぼす。

#### 【0336】

pAktレベルの変化が、RGCには生じるが、網膜のその他の細胞には生じないことを確認するために、pAkt局在を網膜の免疫組織化学的研究によって調べた。pAkt免疫反応性は、FGで逆行性標識されたRGCのみで見られ、pAkt局在は、レーザー損傷とLingo-1-Fcによる処置の後、変化しなかった。図16は、レーザー凝固とLingo-1-Fcによる処置の6時間後の網膜のpAkt免疫標識の代表的な写真を示す。

#### 【0337】

10

20

30

40

50

損傷後の L I N G O - 1 - F c の神経保護活性における p A k t の役割をさらに調べるために、P I 3 K / A k t 経路の阻害剤 L Y 2 9 4 0 0 2 ( L Y , C a l b i o c h e m ) の効果を観察した。これらの実験では、10 mM L Y 2 9 4 0 0 2 を 100 % ジメチルスルホキシド ( D M S O ; S i g m a ) に溶かし、次に、滅菌 P B S を用いて 2 mM に希釈した。最初のレーザー光凝固を右眼に施した後、0、3、7、および 10 日目に、2 mM L Y 2 9 4 0 0 2 または 2  $\mu$  l ビヒクリ ( P B S 中の 20 % D M S O ) を硝子体内に注射した。動物を 14 日目に安楽死させ、F G 標識された R G C を計数した。

#### 【 0 3 3 8 】

L I N G O - 1 - F c が、眼圧上昇後 2 週間で R G C 生存を促進したのに対し、L I N G O - 1 - F c と L Y 2 9 4 0 0 2 の組み合わせは、神経保護活性の効果を無効にした ( 図 17 A )。R G C の損失は、L I N G O - 1 - F c で処置した眼における 0.09  $\pm$  1.47 % から L I N G O - 1 - F c および L Y 2 9 4 0 0 2 で処置した眼における 9.0  $\pm$  1.6 % まで増大した ( P = 0.004 )。データを、R G C の密度によって示す ( 図 17 B )。L Y 2 9 4 0 0 2 単独でも、L I N G O - 1 - F c との組み合わせでも、眼圧が下がらなかった ( 図 18 )。

#### 【 0 3 3 9 】

##### 実施例 7

L I N G O - 1 アンタゴニストは眼圧上昇後の c - J u n N 末端キナーゼ活性を減少させる

J N K 経路は、種々の細胞ストレスによって活性化することができる。つい最近、リン酸化 J N K がヒトおよび実験的なラット緑内障網膜で検出され、J N K の活性化が R G C の死と時間的に関連していた ( T e z e l e t a l . I n v e s t . O p t h a m o l . V i s . S c i . 4 4 : 3 0 2 5 - 3 0 3 3 ( 2 0 0 3 ) )。最近の知見により、リン酸化 J N K が、I O P 上昇後、R G C にあるということも確認された。トータルの J N K - 1 および J N K - 2 のレベルは、眼圧上昇の 5 日後まで変化しない状態のままであった ( 図 19 )。リン酸化 J N K - 1、2 は正常網膜では少なく、その後、5 日後に、8 倍を上回るまで増大する。ラット緑内障モデルでの I O P 上昇後の p - J N K レベルにおける同様の応答が、免疫組織化学によってこれまでに報告されている。L I N G O - 1 - F c または 1 A 7 による処置後、J N K の活性化はほぼ正常レベルまで低下した ( P < 0.01 ) ( 図 19 )。これらの結果は、L I N G O - 1 アンタゴニストが、J N K シグナル伝達経路の活性化を阻害することによって、損傷した R G C を救済し得るということを示す。

#### 【 0 3 4 0 】

##### 実施例 8

L I N G O - 1 アンタゴニストは眼圧上昇後の R h o A 活性化を減少させる

R h o は N g R 1 - L I N G O - 1 - p 7 5 / T R O Y 複合体の下流で作用し、J N K は R h o 活性化の下流の結果としてリン酸化されるので、L I N G O - 1 アンタゴニストが眼圧上昇後の R h o の活性に影響を及ぼすかどうかを明らかにするための実験も行なった。R h o 活性は、G T P - R h o A レベルを評価することによって評価することができ、その場合、G T P - R h o A レベルの増大は、R h o 活性の増大と関連する。低レベルの G T P - R h o A が正常網膜で観察され、G T P - R h o A レベルは、レーザー凝固の 5 日後にはほぼ 2 倍に増大した ( 正常群と比較して p < 0.05 ) ( 図 21 )。対照的に、L I N G O - 1 - F c で処置した網膜は、高レベルの G T P - R h o A を基礎レベルまで有意に低下させた ( P B S 群と比較して p < 0.05 ) ( 図 21 )。これらの結果は、L I N G O - 1 - F c が R h o A 活性化を阻害することによって神経保護活性を発揮するということを示唆する。

#### 【 0 3 4 1 】

本発明は、記載される具体的な実施形態により範囲を限定されるべきではなく、これらの実施形態は、本発明の個々の態様の 1 つの例証であることが意図されており、機能的に等価な任意の組成物または方法が本発明の範囲内である。実際、本明細書に示されかつ記

10

20

30

40

50

載されている修正のほかに、本発明の様々な修正が、前述の説明および添付の図から当業者には明白となるであろう。このような修正は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【 0 3 4 2 】

本明細書に言及される刊行物および特許出願は全て、各個別の刊行物または特許出願が具体的かつ個別的に参照により組み入れられることが示されるのと同じ程度まで参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 3 4 3 】

発明の詳細な説明の項は、特許請求の範囲を解釈するために用いられることが意図されるが、発明の概要および要旨の項は、そのように意図されないということが理解されるべきである。発明の概要および要約の項は、本発明らによって企図されるような本発明の1つ以上の例示的な実施形態を示し得るが、必ずしもその全てを示すわけではなく、したがって、本発明および添付の特許請求の範囲を限定することが決して意図されない。

10

【 図 2 】

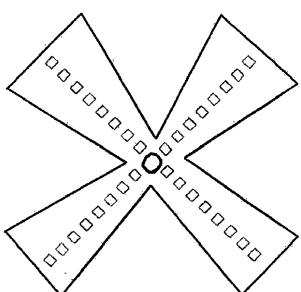
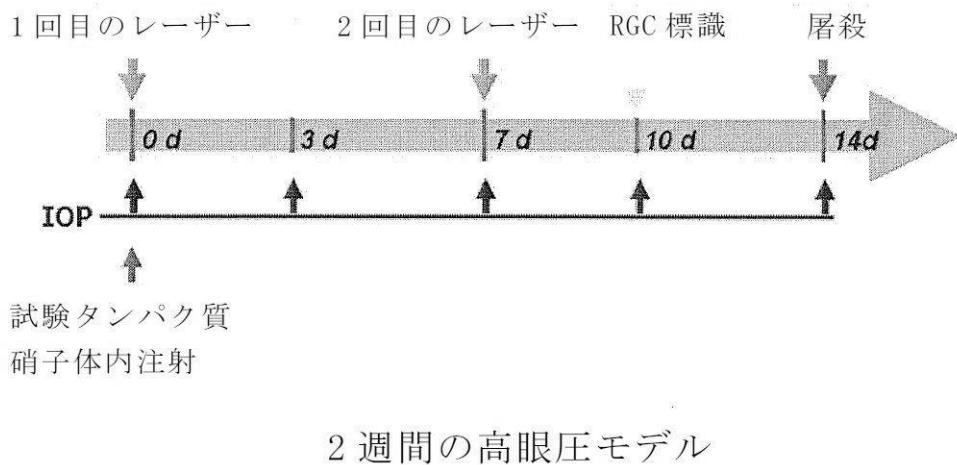


Fig. 2

【図1】

A



B

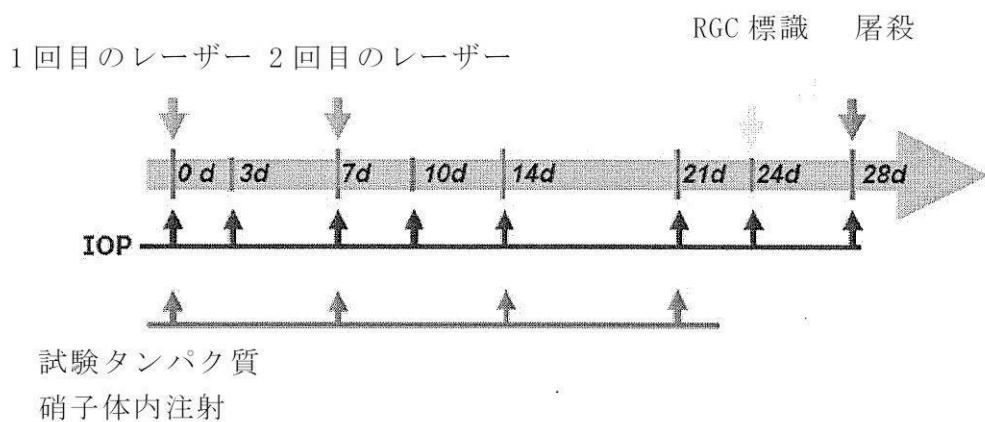


図 1

【図3】

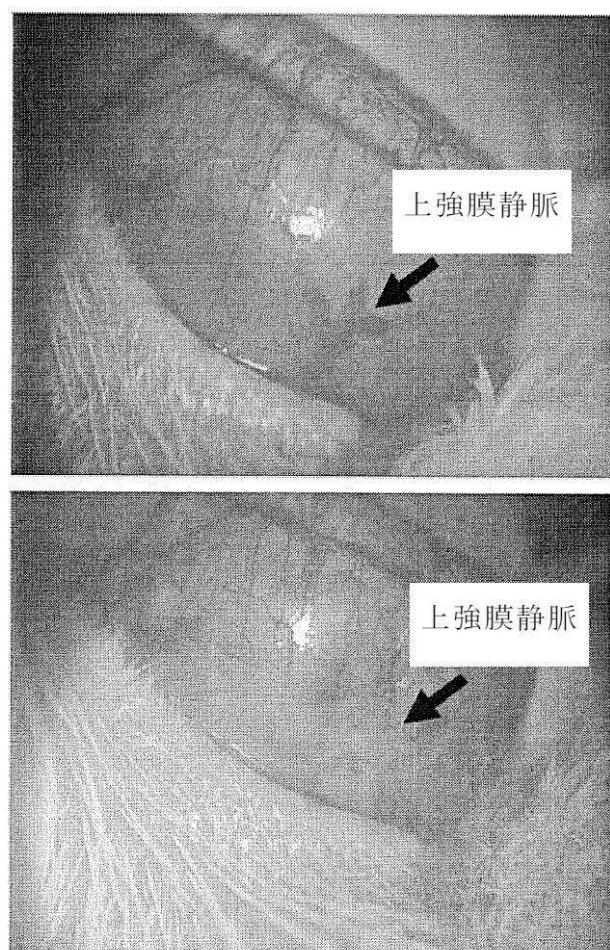
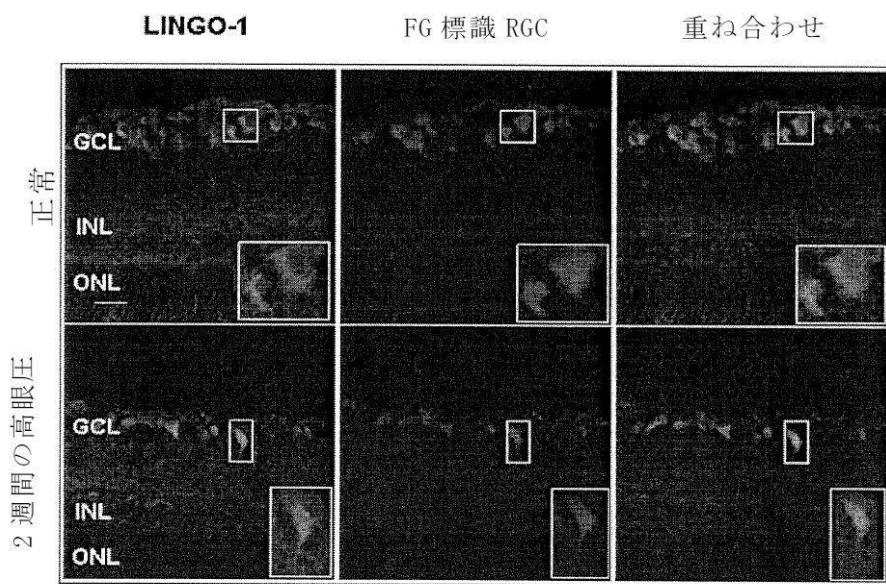


図3

【図4】

A



B

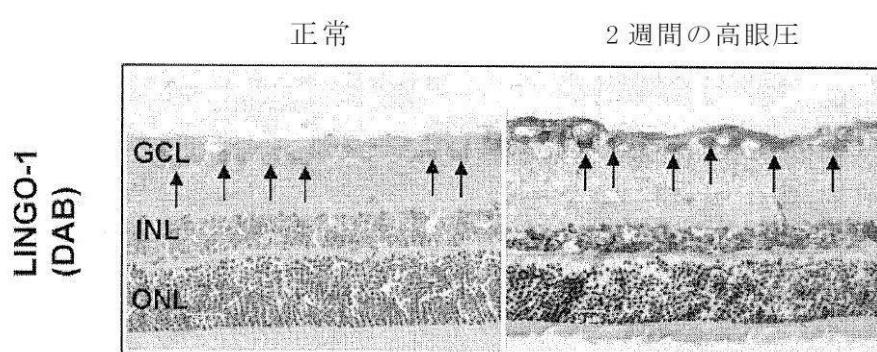


図4

【図5】

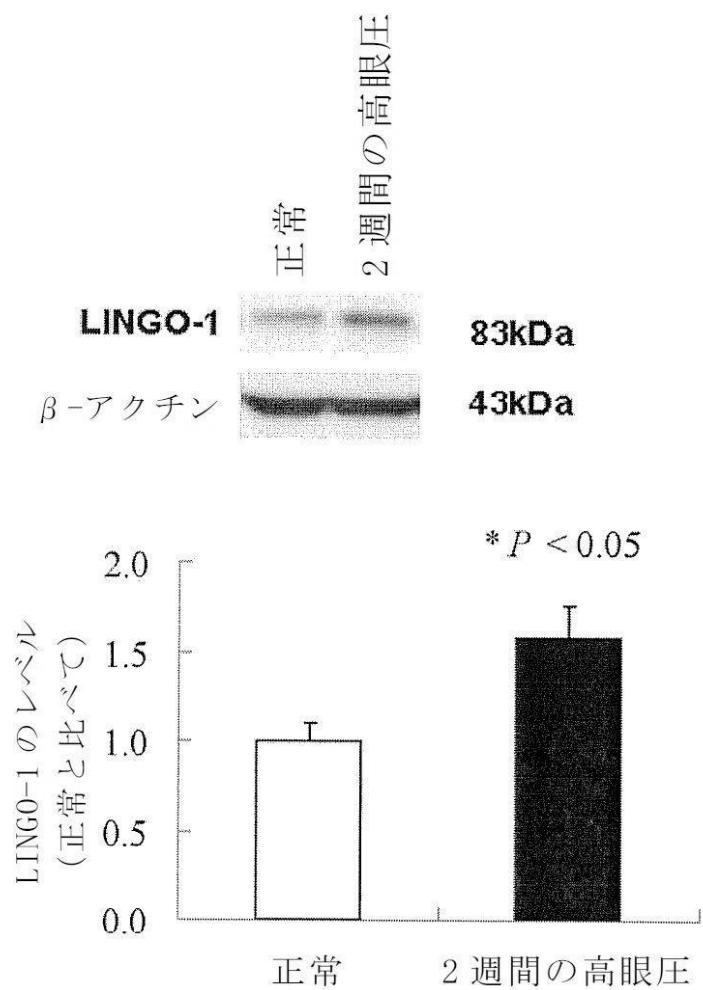


図5

【図6】

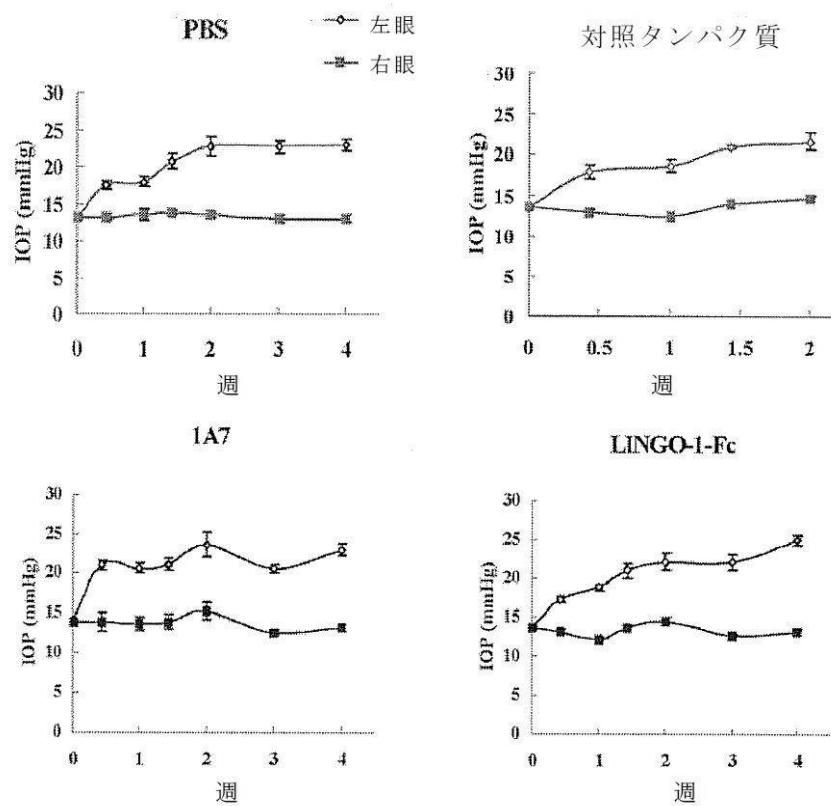
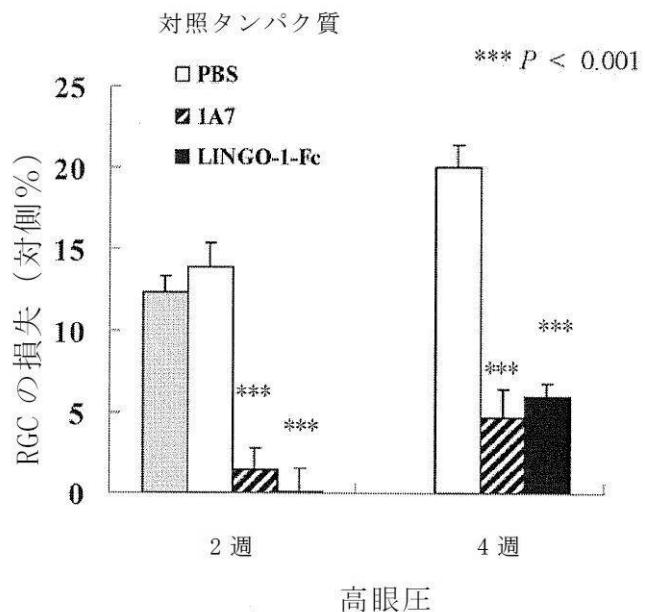


図 6

【図7】

A



B

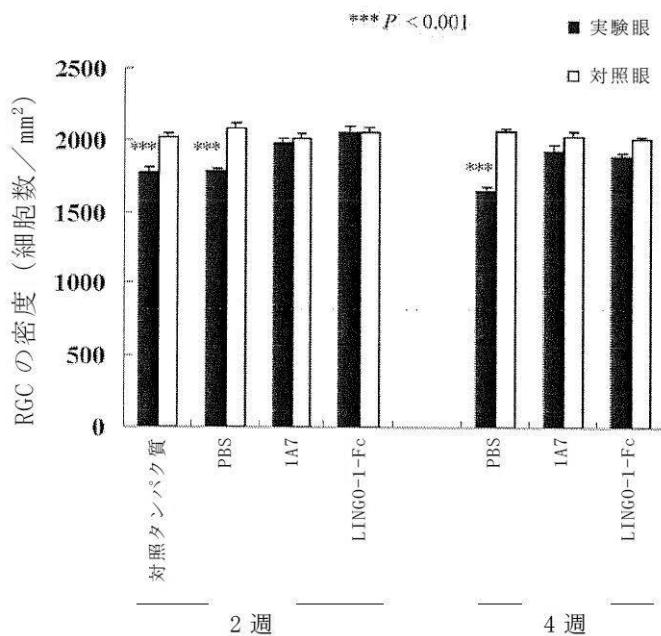
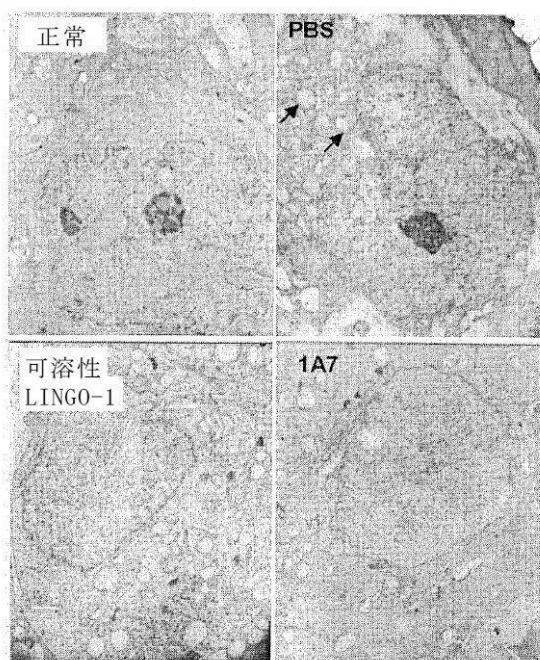


図7

【図8】

**A**

網膜神経節細胞

**B**

内網状層

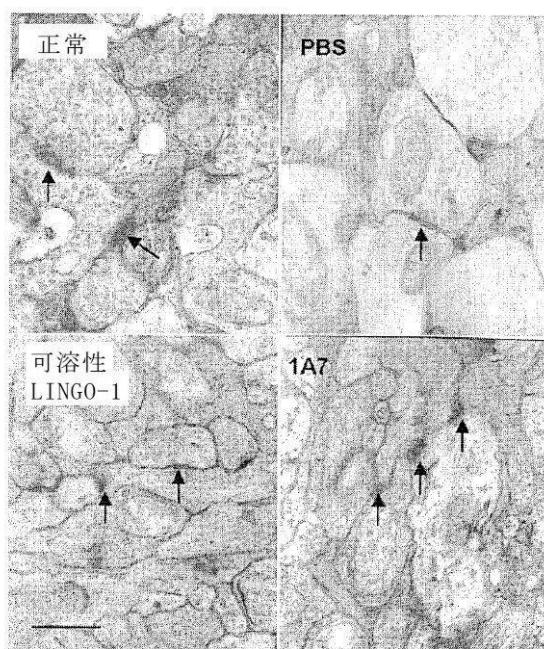


図8

【図9】

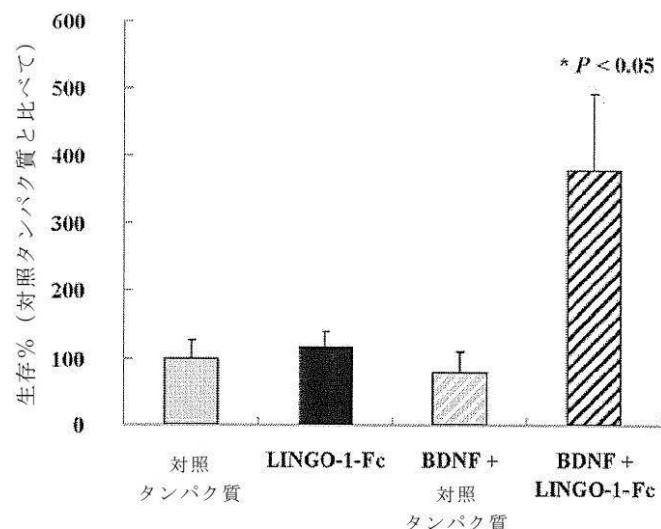


図 9

【図 10】

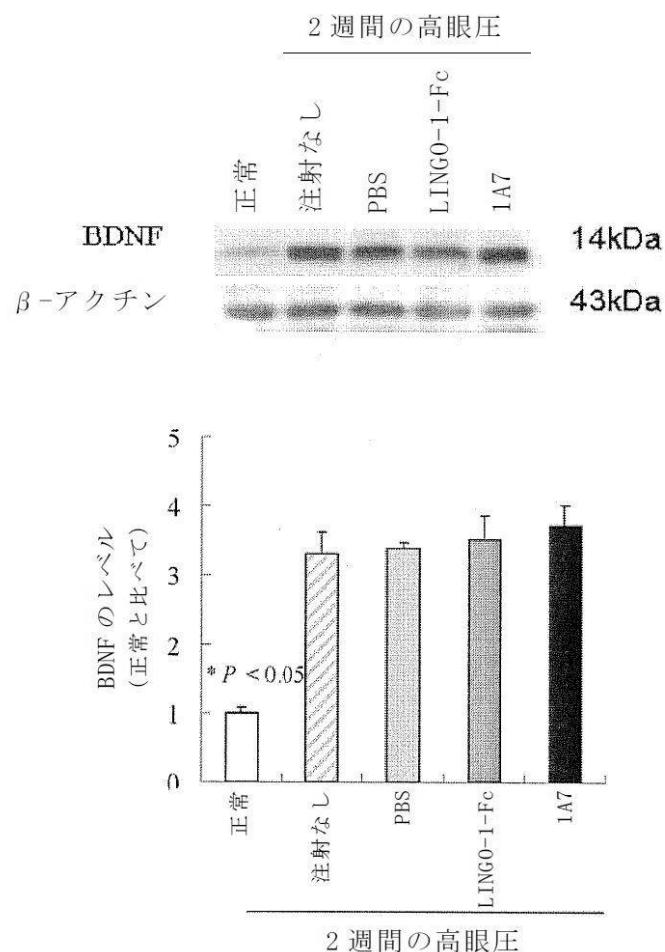
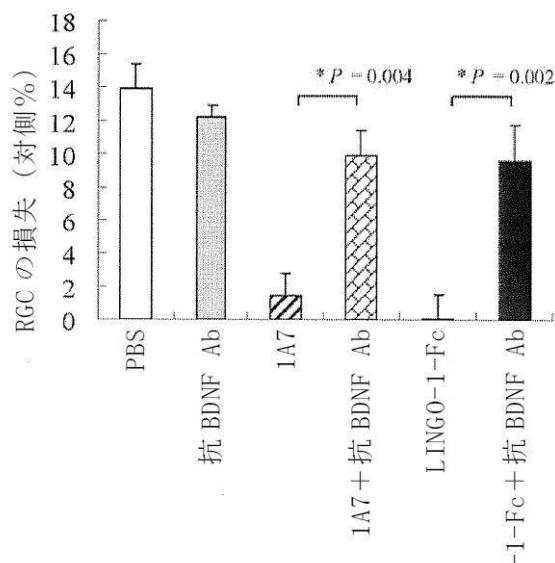


図 10

【図 11】

A



B

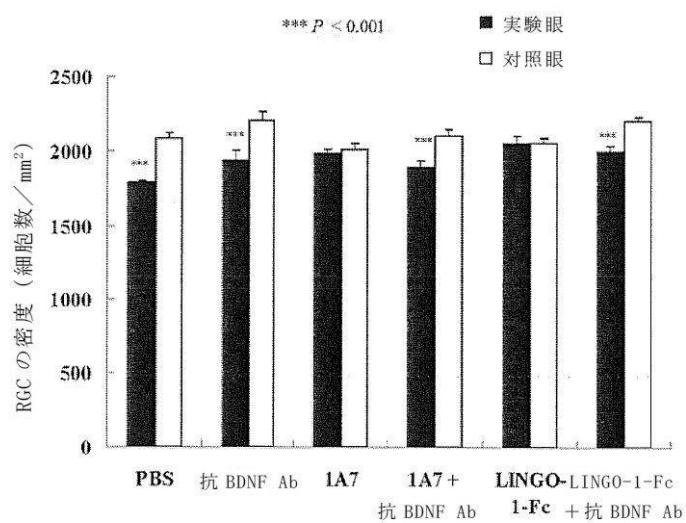
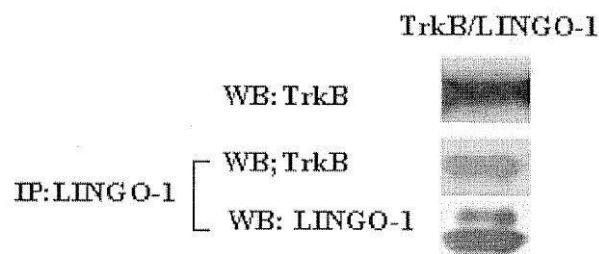


図 11

【図12】

A



B

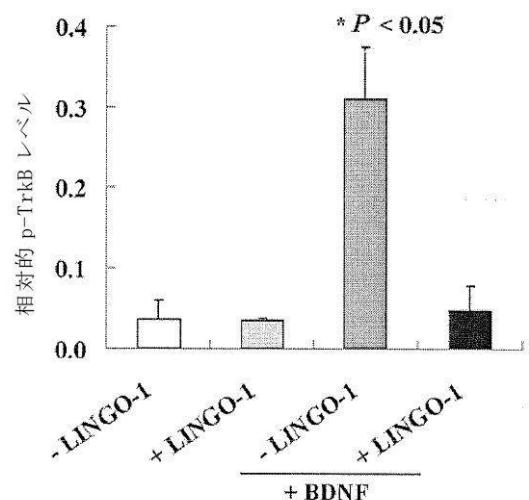
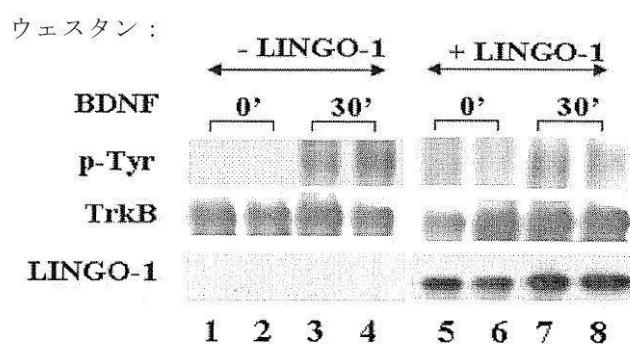
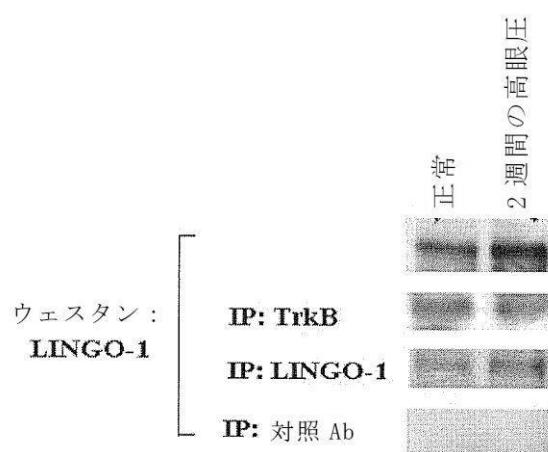


図12

【図 13】

A



B

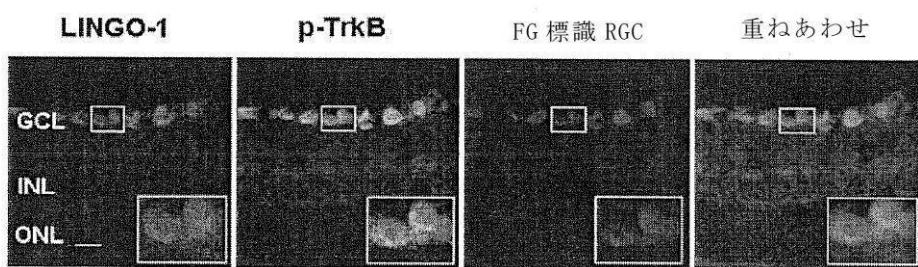


図 13

【図14】

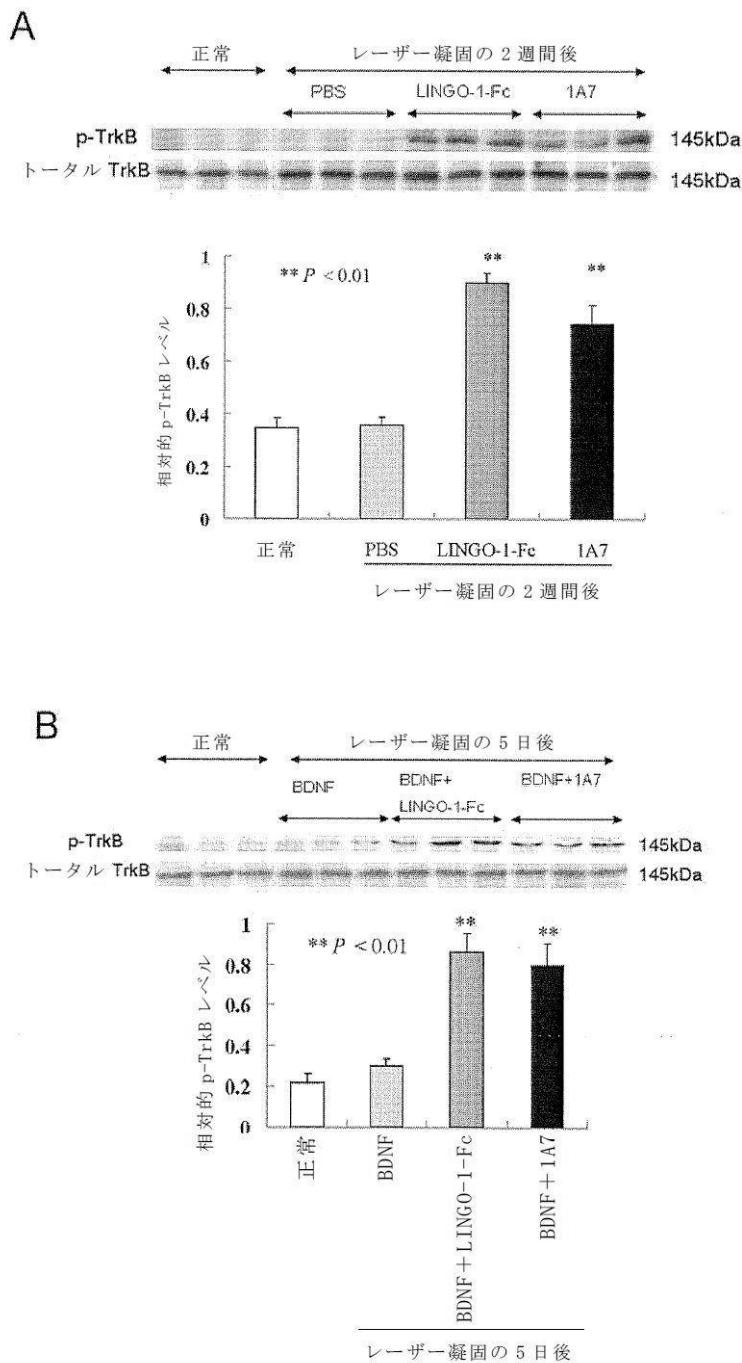


図 14

【図15】

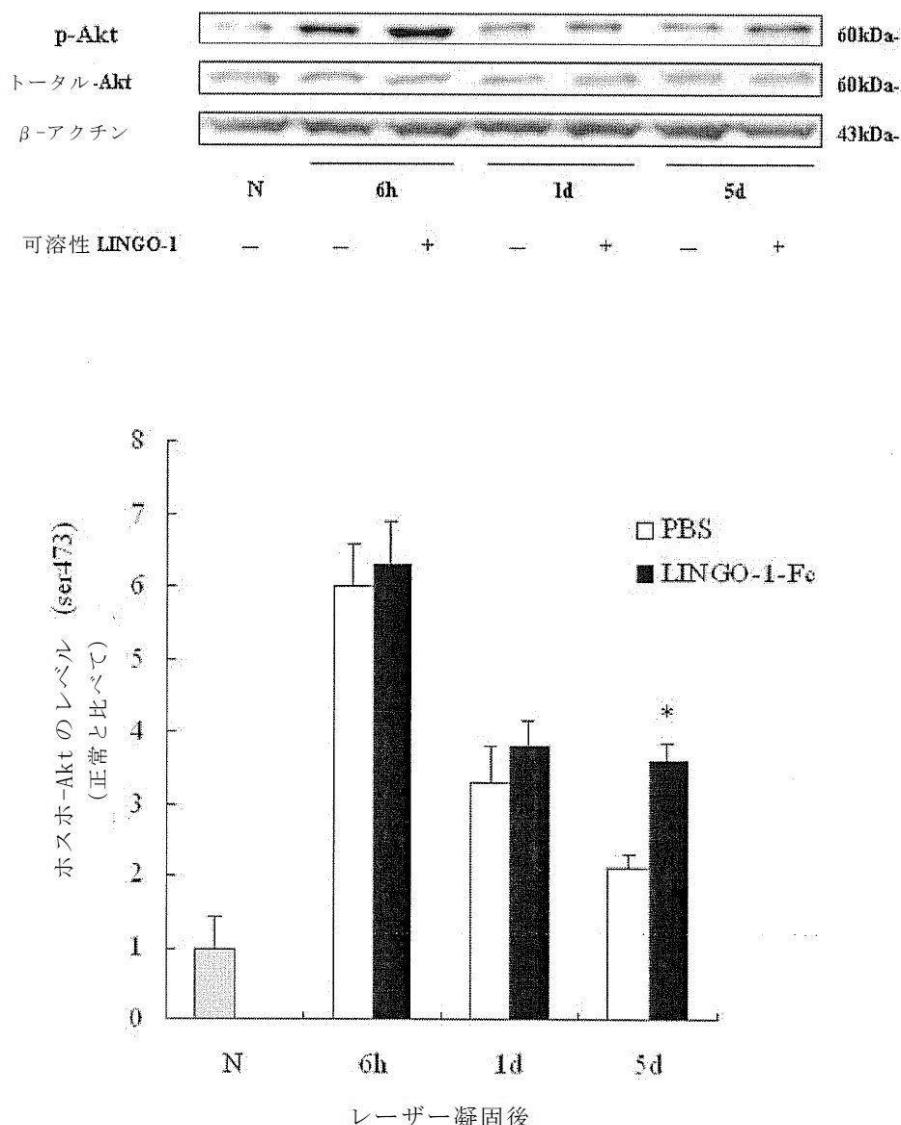


図 15

【図 16】

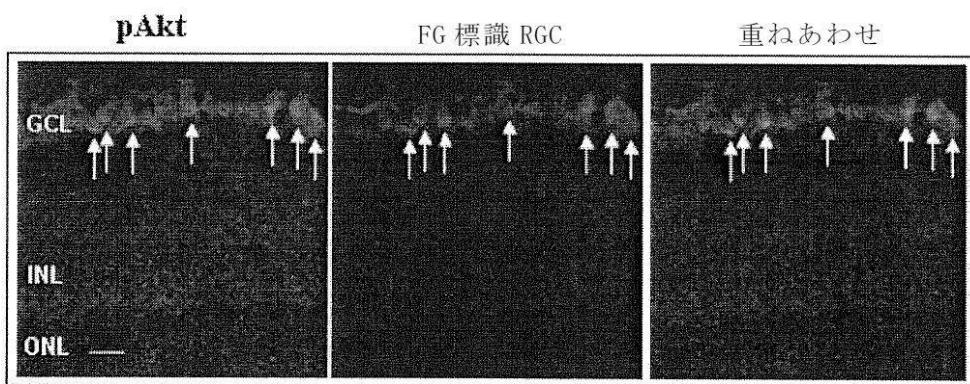
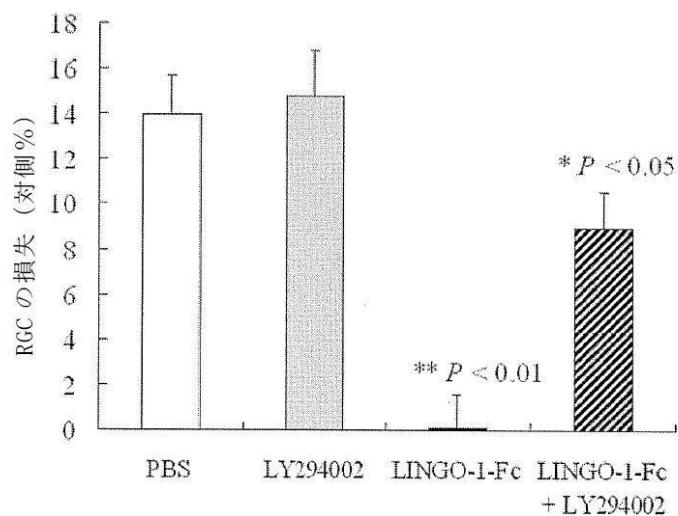


図 16

【図17】

A



B

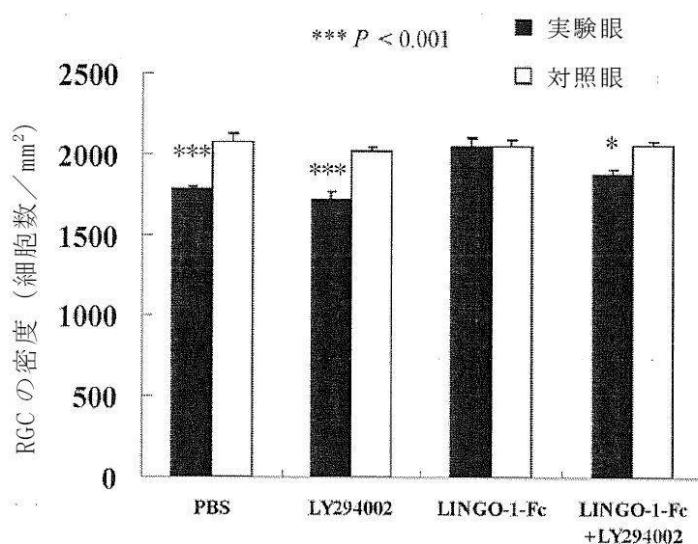


図 17

【図18】

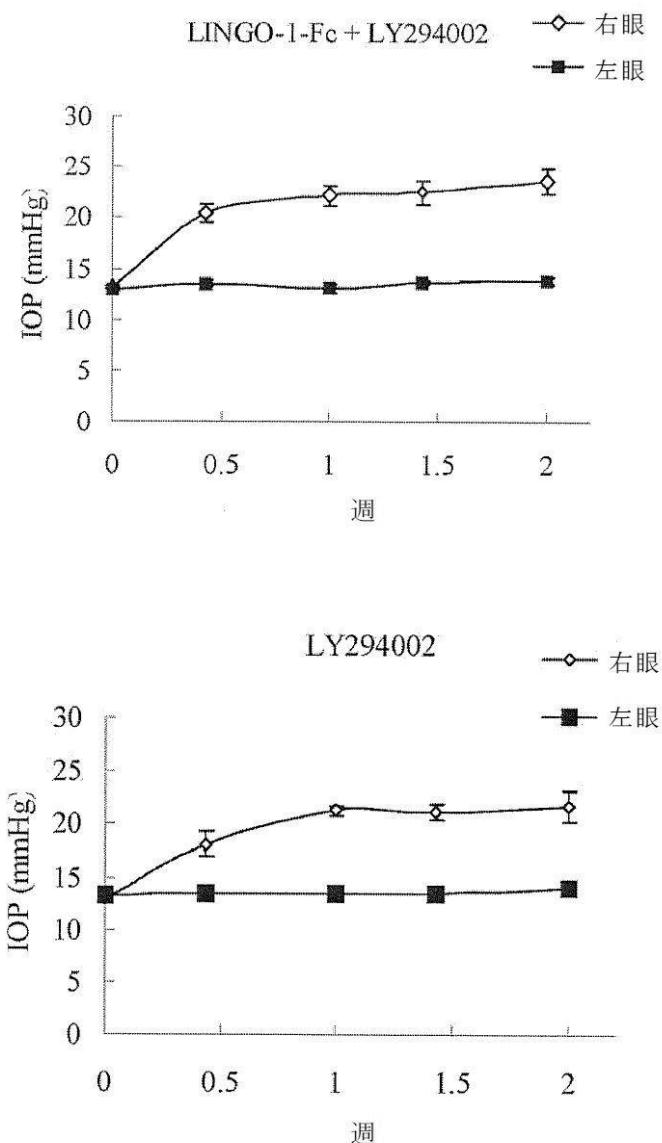


図18

【図 19】

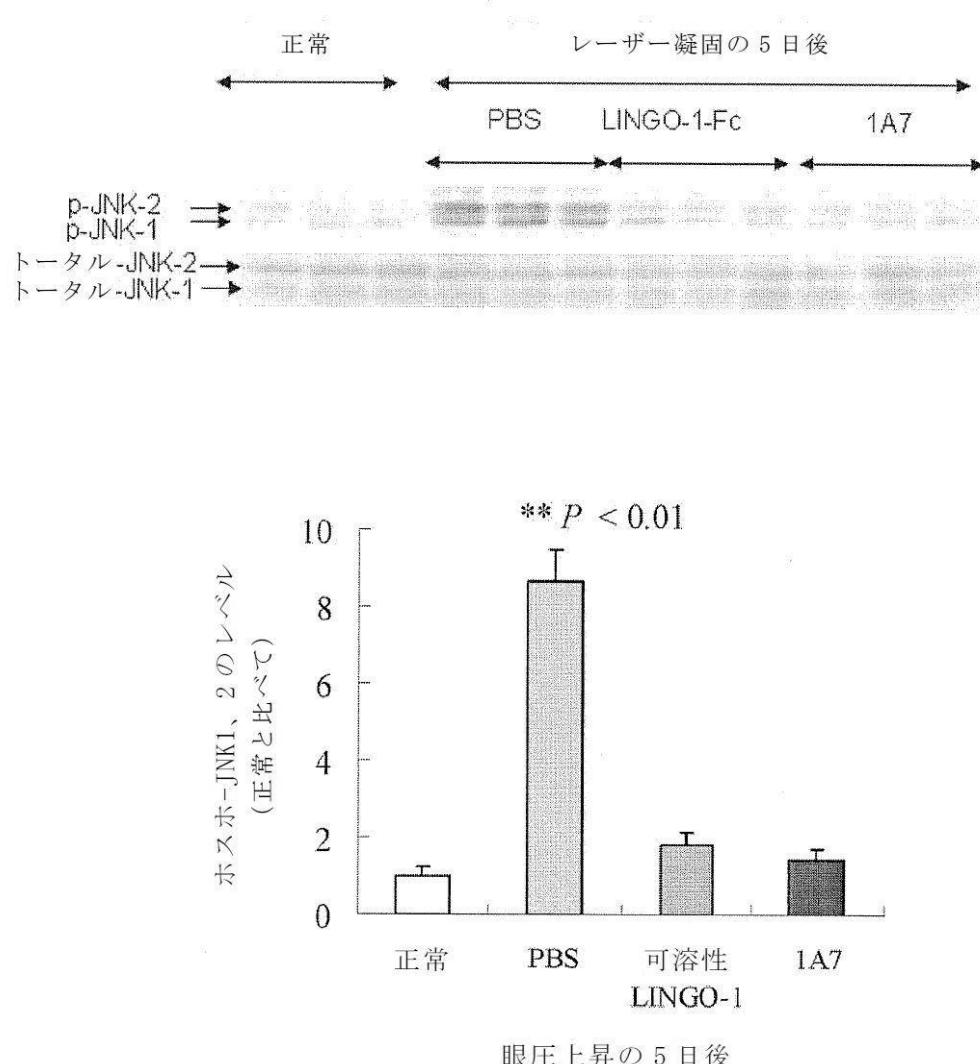


図 19

【図20】

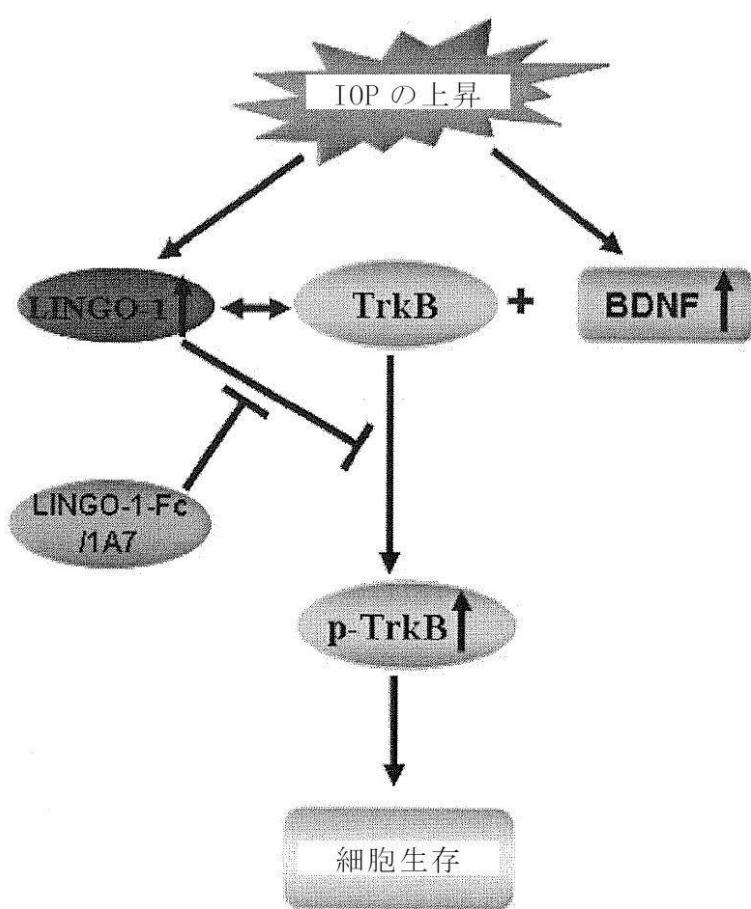


図 20

【図 21】

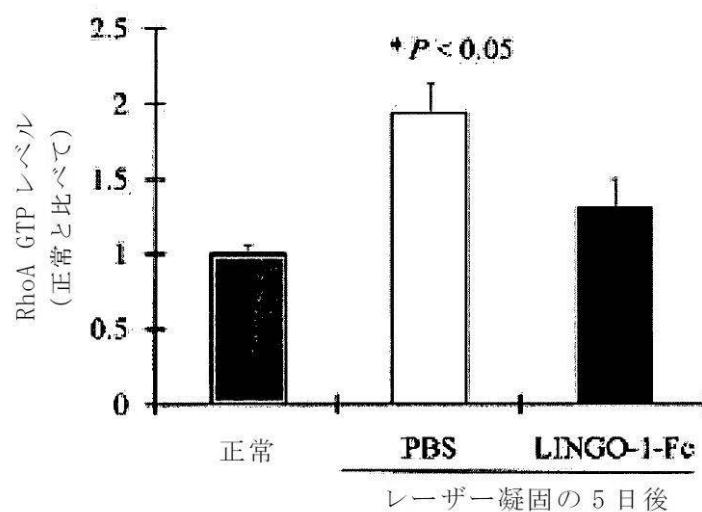
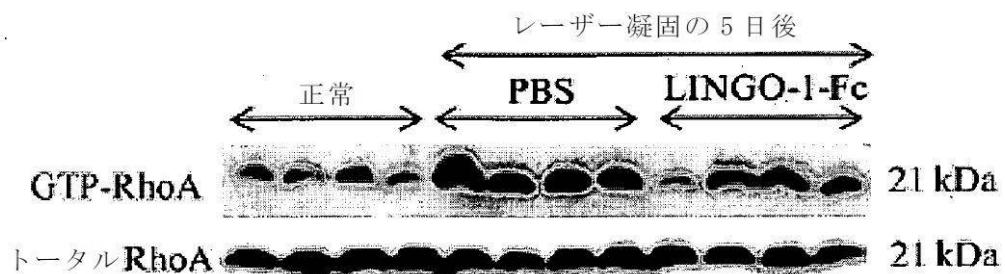


図 21

【配列表】

0005674469000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
		C 0 7 K	14/47	
		C 0 7 K	16/18	

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

審査官 渡邊 優子

(56)参考文献 欧州特許出願公開第0 0 9 5 8 8 3 1 ( E P , A 1 )  
国際公開第1 0 / 0 0 5 5 7 0 ( WO , A 1 )  
Invest Ophthalmol Vis Sci., Vol.46 Suppl.1 p.E-157 (2005)  
Invest Ophthalmol Vis Sci., Vol.44 No.10 p.4357-65 (2003)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
A 6 1 K 3 8 / 0 0  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
A 6 1 K 3 1 / 7 1 3  
C 1 2 N 1 5 / 0 0  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )