(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월07일
(11) 등록번호 10-1239542
(24) 등록일자 2013년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7001531
(22) 출원일자(국제) 2005년06월24일
심사청구일자 2010년06월23일
(85) 번역문제출일자 2007년01월22일
(65) 공개번호 10-2007-0050913
(43) 공개일자 2007년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/022881
(87) 국제공개번호 WO 2006/002437
국제공개일자 2006년01월05일
(30) 우선권주장
60/582,966 2004년06월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20030182671 A1
전체 청구항 수 : 총 45 항

(73) 특허권자
바이오겐 아이덱 엠에이 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02142 캠브리지 캠브리지 센터 14
(72) 발명자
미 샤
미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 버논 로드 4
페핀스키 알 블레이크
미국 02474 매사추세츠주 알링턴 팰머스 로드 30
맥코이 존
미국 01867 매사추세츠주 리딩 하워드 스트리트 56
(74) 대리인
특허법인코리아나

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **탈수초화를 수반하는 병의 치료**

(57) 요 약

본 발명은 다발성 경화증을 포함하여, 탈수초화 및 수초발육부전을 수반하는 질환, 장애 또는 손상을 Sp35 길항제를 투여하여 치료하는 방법을 제공한다.

(30) 우선권주장
60/617,297 2004년10월07일 미국(US)
60/628,435 2004년11월15일 미국(US)
60/680,475 2005년05월13일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

희소돌기아교세포를 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제를 포함하는 조성물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 희소돌기아교세포의 분화 또는 생존의 촉진을 위한 생체외(*in vitro*) 방법:

(i) 가용성 Sp35 폴리펩티드;

(ii) Sp35 항체 또는 그의 항원-결합 단편;

(iii) Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 상기 Sp35 길항제 중 둘 이상의 조합.

청구항 2

뉴런 및 희소돌기아교세포의 혼합물을 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 뉴런의 희소돌기아교세포-매개 수초형성 촉진을 위한 생체외 방법:

(i) 가용성 Sp35 폴리펩티드;

(ii) Sp35 항체 또는 그의 항원-결합 단편;

(iii) Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 상기 Sp35 길항제 중 둘 이상의 조합.

청구항 3

하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제를 포함하는, 포유류에서 희소돌기아교세포의 분화 또는 생존의 촉진을 위한 약학 조성물:

(i) 가용성 Sp35 폴리펩티드;

(ii) Sp35 항체 또는 그의 항원-결합 단편;

(iii) Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 상기 Sp35 길항제 중 둘 이상의 조합.

청구항 4

하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제를 포함하는, 포유류에서 뉴런의 수초형성 촉진을 위한 약학 조성물:

(i) 가용성 Sp35 폴리펩티드;

(ii) Sp35 항체 또는 그의 항원-결합 단편;

(iii) Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 상기 Sp35 길항제 중 둘 이상의 조합.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 가용성 Sp35 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드가 서열 번호: 2 의 아미노산 잔기 34-532 를 포함하는 약학 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드가 서열 번호: 2 의 아미노산 417-493 을 포함하는 약학

조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드가 환형 펩티드인 약학 조성물.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드가 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드에 융합된 이종(heterologous) 폴리펩티드를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 이종 폴리펩티드가 항체 Ig 폴리펩티드, 혈청 알부민 폴리펩티드, 표적화 폴리펩티드, 리포터 폴리펩티드, 및 정제-용이화 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 이종 폴리펩티드가 항체 Ig 폴리펩티드인 약학 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 항체 Ig 폴리펩티드가 경첩(hinge) 및 Fc 폴리펩티드인 약학 조성물.

청구항 13

제 5 항에 있어서, 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드가 중합체에 콘쥬게이트되는 약학 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 중합체가 폴리알킬렌 글리콜 및 당 중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 중합체가 폴리알킬렌 글리콜인 약학 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 인 약학 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 가용성 Sp35 폴리펩티드가 1, 2, 3 또는 4 개의 중합체에 콘쥬게이트되는 약학 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 중합체의 총 분자량이 5,000 Da 내지 100,000 Da 인 약학 조성물.

청구항 19

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 Sp35 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 약학 조성물.

청구항 20

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물:

(i) 안티센스 폴리뉴클레오티드;

(ii) 리보자임;

(iii) 소형 간섭 RNA (siRNA); 및

(iv) 소형 헤어핀 RNA (shRNA).

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드가 Sp35 mRNA 의 코딩 부위에 상보적인 10 개 이상의 염기를 포함하는 안티센스 폴리뉴클레오티드인 약학 조성물.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드가 리보자임인 약학 조성물.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드가 siRNA 인 약학 조성물.

청구항 25

제 21 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드가 shRNA 인 약학 조성물.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 shRNA 가 뉴클레오티드 서열: TGATCGTCAT CCTGCTAGAC TTCAAGAGAG TCTAGCAGGA TGACGATCTT TTTTC (서열 번호: 40) 를 포함하는 약학 조성물.

청구항 27

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 다발성 경화증 (MS), 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교마이엘린붕괴 (CPM), 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ), 왈러 변성, 시각 신경염, 횡단척수염, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 척수 손상, 외상성 뇌손상, 방사선조사 후 손상, 화학요법의 신경학상 합병증, 발작, 급성 허혈성 시각신경병증, 비타민 E 결핍증, 분리 비타민 E 결핍 증후군, 바쎈-코른쯔바이그(Bassen Kornzweig) 증후군, 마르키아파바-비냐미 증후군, 이염색백질장애, 삼차신경통, 및 벨 마비 (Bell's palsy) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환, 장애, 또는 손상의 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 질환, 장애, 또는 손상이 다발성 경화증 (MS) 인 약학 조성물.

청구항 29

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 일시 주사 또는 만성 주입에 의한 투여를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 중추신경계 속으로 직접 투여되는 약학 조성물.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 MS 의 만성 병소 속으로 직접 투여되는 약학 조성물.

청구항 32

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, (a) 발현 조절 서열에 대한 조작가능한 연결을 통해 상기 Sp35 길항제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 상기 희소돌기아교세포를 핵산전달감염시키는 것, 및 (b) 상기 Sp35 길항제를 발현

시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 33

발현 조절 서열에 대한 조작가능한 연결을 통해서 Sp35 길항제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 Sp35 길항제가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 포유류에서 희소돌기아교세포의 분화 또는 생존의 촉진을 위한 약학 조성물:

(i) 가용성 Sp35 폴리펩티드;

(ii) Sp35 항체 또는 그의 항원-결합 단편;

(iii) Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 상기 Sp35 길항제 중 둘 이상의 조합.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 발현 벡터 내에 있는 약학 조성물.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상기 발현 벡터가 바이러스성 벡터인 약학 조성물.

청구항 36

제 33 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 Sp35 길항제를 발현시키는 배양 숙주 세포 내에 있는 약학 조성물.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 상기 배양 숙주 세포가 치료 대상 포유류로부터 유래된 것인 약학 조성물.

청구항 38

제 35 항에 있어서, 상기 바이러스성 벡터가 아데노바이러스성 벡터, 알파바이러스 벡터, 장내바이러스 벡터, 페스티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 파포바바이러스 벡터, 및 폭스바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 헤르페스바이러스 벡터가 단순 헤르페스바이러스 벡터 및 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 상기 폭스바이러스 벡터가 우두 바이러스 벡터인 약학 조성물.

청구항 41

제 34 항에 있어서, 상기 벡터가 국소 투여, 안내 투여, 비경구 투여, 포막내 투여, 경막하 투여 및 피하 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로로 투여되는 약학 조성물.

청구항 42

제 28 항에 있어서, 상기 다발성 경화증이 재발 완화성 다발성 경화증, 이차 진행성 다발성 경화증, 또는 일차 진행성 다발성 경화증인 약학 조성물.

청구항 43

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 조성물이 비경구 투여를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 상기 비경구 투여가 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내, 흉골내, 포막내, 간장내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 45

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 Sp35 길항제가 추가 치료제와 공동제형화 또는 공동투여되는 약학 조성물.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경생물학, 신경학 및 약리학에 관한 것이다. 더욱 특히, 다발성 경화증과 같은, 탈수초화 및 수초발육부전(dysmyelination) 질환을 Sp35 길항제를 투여하여 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 다발성 경화증 (MS), 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교 마이엘린붕괴 (CPM), 왈러 변성 및 일부 유전 질환 예컨대 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ) 을 포함하는 다수의 신경계 질환은 탈수초화 및 수초발육부전과 연관되어 있다. 이러한 질환들 중, MS 가 가장 널리 퍼져있고, 전세계 대략 2.5 백만 명에게 악영향을 미치고 있다.

[0003] MS 는 일반적으로 신경학적 병발의 재발-완화 패턴으로 시작하고, 이후에 신경학적 손상이 증가하는 만성 단계로 진행한다. MS 는 만성 병소에 집중된, 마이엘린, 희소돌기아교세포 및 축색의 파괴와 연관이 있다. MS 에서 관찰되는 탈수초화는 항상 영구적인 것은 아니며, 그 질환의 초기 단계에서는 수초재형성이 보고되어 있다. 뉴런의 수초재형성은 희소돌기아교세포를 필요로 한다.

[0004] MS 에 있어서는, 인터페론 베타와 같은 면역조절자 및 코르티코스테로이드의 사용을 포함하여, 다양한 질환-조절 치료법이 가능하다. 또한, MS 에서 수초형성 및 희소돌기아교세포의 중추적 역할로 인하여, 희소돌기아교세포 수를 증가시키거나 수초형성을 증강시키는 치유법을 개발하려는 노력이 있어 왔다. 예를 들어, [Cohen 등, U.S. 특허 No. 5,574,009]; [Chang 등, *N. Engl. J. Med.* *346*:165-73 (2002)] 를 참조한다. 그러나, MS 를 위한 추가적인 치유법을 고안해야 하는 절박한 요구는 여전하다.

발명의 상세한 설명

[0005] **발명의 간단한 개요**

[0006] 본 발명은 Sp35 (Sp35 는 문헌에서 LINGO-1 및 LRRN6 으로도 칭함) 가 희소돌기아교세포에서 발현되며, 희소돌기아교세포 분화, 생존 및 축색 수초형성을 음성적으로 조절한다는 발견을 기초로 한다. 나아가, Sp35 의 특정 길항제는 희소돌기아교세포의 생존, 증식 및 분화뿐만 아니라 뉴런의 수초형성을 촉진한다. 이러한 발견에 기초하여, 본 발명은 일반적으로 탈수초화 및 수초발육부전과 연관된 병 (예를 들어, 다발성 경화증) 을 Sp35 길항제를 투여하여 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0007] 특정 구현예에서, 본 발명은 Sp35 길항제의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 포유류에서 희소돌기아교세포의 증식, 분화 및 생존 촉진 방법을 포함한다.

[0008] 기타 구현예에서, 본 발명은 Sp35 길항제의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 포유류에서 뉴런의 수초형성 촉진 방법을 포함한다. 특정 구현예에서, 포유류는 탈수초화 및 수초발육부전을 수반하는 질환, 장애, 손상 또는 병으로 진단된다. 일부 구현예에서, 상기 질환, 장애, 손상 또는 병은 다발성 경화증 (MS), 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교 마이엘린붕괴 (CPM), 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ), 공세포백색질장애 (크라베 질환), 왈러 변성, 시각 신경염, 횡단척수염, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 척수 손상, 외상성 뇌손상, 방사선조사 후 손상, 화학요법의 신경학상 합병증, 발작, 급성 허혈성 시각신경병증, 비타민 E 결핍증, 분리 비타민 E 결핍 증후군, AR, 바쎈-코른쯔바이그(Bassen Kornzweig) 증후군, 마르키아파바-비냐미 증후군, 이염색백질장애, 삼차신경통, 및 벨 마비 (Bell's palsy) 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0009] 부가적으로, 본 발명은 (a) 재조합 Sp35 길항제를 발현시키는 배양 숙주 세포를 제공하고; (b) 상기 숙주 세포를 포유류 속에, 신경계 질환, 장애, 또는 손상 부위에 또는 그 근처에 도입시키는 것을 포함하는, 희소돌기아교세포 또는 마이엘린의 파괴를 수반하는, 포유류에서의 질환, 장애 또는 손상 치료 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 질환, 장애 또는 손상은 다발성 경화증 (MS), 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교 마이엘린붕괴 (CPM), 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ), 공세포백색질장애 (크라베 질환) 및 왈러 변성, 시각 신경염, 횡단척수염, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 척수 손상, 외상성 뇌손상, 방사선조사 후 손상, 화학요법의 신경학상 합병증, 발작, 급성 허혈성 시각신경병증, 비타민 E 결핍증, 분리 비타민 E 결핍 증후군, AR, 바쎈-코른쯔바이그 증후군, 마르키아파바-비냐미 증후군, 이염색백질장애, 삼차신경통, 및 벨 마비로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 배양 숙주 세포는 치료할 포유류로부터 유래된다.

[0010] 본 발명의 추가의 구현예는, Sp35 길항제가 포유류 내에서, 손상 부위에 또는 그 근처에 있는 뉴런에 의한 축색 확장의 저해를 감소시키기에 충분한 양으로, 뉴클레오티드 서열로부터 발현되도록, Sp35 길항제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를, 포유류에게, 그 질환, 장애 또는 손상의 부위에 또는 그 근처에 투여하는 것을 포함하는, 생체내 유전자 치유법에 의한, 희소돌기아교세포 또는 마이엘린의 파괴를 수반하는 질환, 장

애 또는 손상 치료 방법을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 벡터는 아데노바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, 장내바이러스 벡터, 페스티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 벡터, 파포바바이러스 벡터, 마마바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 및 단순 헤르페스바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스성 벡터이다. 일부 구현예에서, 상기 질환, 장애 또는 손상은 다발성 경화증 (MS), 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교 마이엘린붕괴 (CPM), 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ), 공세포백색질장애 (크라베 질환) 및 왈러 변성, 시각 신경염, 횡단척수염, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 척수 손상, 외상성 뇌손상, 방사선조사 후 손상, 화학요법의 신경학상 합병증, 발작, 급성 허혈성 시각신경병증, 비타민 E 결핍증, 분리 비타민 E 결핍 증후군, AR, 바쎈-코른쯔바이그 증후군, 마르키아파바-비냐미 증후군, 이염색백질장애, 삼차신경통, 및 벨 마비로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 벡터는 국소 투여, 안내 투여, 비경구 투여, 포막내 투여, 경막하 투여 및 피하 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로로 투여된다.

[0011] 상기 방법의 각종 구현예에서, Sp35 길항제는 희소돌기아교세포의 생존, 증식 및 분화뿐만 아니라 뉴런의 수초형성을 음성적으로 조절하는 Sp35 의 능력을 방해하는 임의의 분자일 수 있다. 특정 구현예에서, Sp35 길항제는 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 및 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, RNA 간섭) 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 특정 가용성 Sp35 폴리펩티드는, 막통과 도메인 및 세포질 도메인이 결손된 Sp35 폴리펩티드 단편, 변이체, 또는 그의 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 가용성 Sp35 폴리펩티드는 (i) Sp35 류신-풍부 반복 (LRR) 도메인, (ii) LRR 도메인에 대한 C-말단의 Sp35 염기성 영역, 및 (iii) Sp35 면역글로불린 (Ig) 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 Ig 도메인, Sp35 LRR 도메인, 막통과 도메인, 및 세포질 도메인이 결손된다. 일부 구현예에서, 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 LRR 도메인을 포함하고, Sp35 Ig 도메인, Sp35 염기성 영역, 막통과 도메인, 및 세포질 도메인이 결손된다. 일부 구현예에서, 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 아미노산 잔기 34-532 를 포함한다.

[0013] 일부 구현예에서, Sp35 길항제를 일시주사 또는 장기 주입으로 투여한다. 일부 구현예에서, 가용성 Sp35 폴리펩티드를 중추 신경계 속으로 직접 투여한다. 일부 구현예에서, 가용성 Sp35 폴리펩티드를 MS 의 만성 병소 속으로 직접 투여한다.

[0014] 일부 구현예에서, Sp35 길항제는 비(非)-Sp35 부분을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 비-Sp35 부분은 항체 Ig 부분, 혈청 알부민 부분, 표적화 부분, 리포터 부분, 및 정제-용이화 부분으로 이루어지는 군으루부터 선택된다. 일부 구현예에서, 항체 Ig 부분은 경첩 및 Fc 부분이다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 항체를 중합체에 콘쥬게이트시킨다. 일부 구현예에서, 중합체는 폴리알킬렌 글리콜, 당 중합체, 및 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 폴리알킬렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 항체를 1, 2, 3 또는 4 개의 중합체에 콘쥬게이트시킨다. 일부 구현예에서, 중합체의 전체 분자량은 5,000 Da 내지 100,000 Da 이다.

실 시 예

[0281] 실시예 1

[0282] Sp35 는 희소돌기아교세포 생물학에 관계된다.

[0283] 희소돌기아교세포는 여러 발달 단계를 통해서 A2B5 전구 세포 (A2B5 를 발현시킴) 로부터 성숙하여, 수초형성전 (premyelinating) 희소돌기아교세포 (O1 및 O4 를 발현시킴) 로 그리고 최종적으로 성숙한 수초형성 희소돌기아교세포 (O1, O4 및 MBP 를 발현시킴) 로 분화된다. 따라서, A2B5, O1, O4 및 MBP 표지자의 존재 또는 부존재를 모니터링함으로써, 주어진 세포의 발달 단계를 결정하고, 희소돌기아교세포 생물학에서 Sp35-Fc 의 역할을 평가하는 것이 가능하다. 희소돌기아교세포 생물학의 일반적인 검토를 위해서, 예를 들어, [Baumann and Pham-Dinh, Physiol. Rev. 81: 871-927 (2001)] 을 참조한다.

[0284] O4, MBP 및 CNPase 에 대한 단일클론 항체는 Sternberger Monoclonals; APC 에 대한 항체 (클론 CC-1; 참조번호 29) 는 Calbiochem 의 것이었다. 기타 항체는 βIII 튜불린 (Covance), Sp35 (Biogen Idec), Fyn (Santa

Cruz Biotechnology) 및 포스포-Fyn (Biosource) 에 대한 것이었다. A2B5 에 대한 단일클론 항체는 Chemicon 으로부터 입수가능하다.

[0285] Sp35 는 희소돌기아교세포에서 발현된다.

[0286] 정제 래트 P13 CG 뉴런, P2 희소돌기아교세포, 및 P4 별아교세포 배양물에서의 Sp35 의 발현을 역전사 (RT-PCT) 후의 중합효소 연쇄 반응으로 분석하였다. Ambion, Inc. 의 키트를 사용하여 제조자 안내서에 따라 래트 뇌 세포로부터 mRNA 를 추출하였다. 반-정량적 RT-PCR 을 정방향 프라이머 5' AGAGACATGCGATTGGTGA 3' (서열 번호: 38) 를 사용하여 수행하였고, 역방향 프라이머 5'AGAGATGTAGACGAGGTCATT 3' (서열 번호: 39) 는 뉴런에서 높은 발현을, 희소돌기아교세포에서 더 낮은 발현을 보였으며, 별아교세포에서는 발현되지 않았다 (도 5).

[0287] 성체 래트 시각신경으로부터 유래한 절편에서의 제자리(in situ) 하이브리드화에 의해 희소돌기아교세포에서 Sp35 의 발현을 확인하였다. 래트 시각신경 절편을 준비하고 [Mi 등, "Sp35 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex," Nat. Neurosci. 7: 221-28 (2004)] 에 기재되어 있는 바와 같이 처리하고, Sp35 코딩 서열의 처음 500 개의 뉴클레오티드를 사용하여 디곡시제닌-표지된 Sp35 안티센스 또는 센스로 탐침조사하였다. 티라미드 (Tyramide) 신호 증폭 키트 (Amersham Biosciences) 및 형광 항-디곡시제닌 콘쥬게이트된 항체 키트 (Perkin Elmer) 를 사용하여 제조자 안내서에 따라 절편을 염색하였다. 제자리 및 면역형광 합동 분석을 위해서, 절편을 먼저 디곡시제닌-표지된 RNA 및 이어서 항체, 예를 들어 CC1 항체 (Calbiochem; 성숙한 희소돌기아교세포 표지자) 또는 항-Sp35 항체로 탐침조사하였다. 안티센스 Sp35 탐침에 하이브리드화된 희소돌기아교세포 역시 CC1 (데이타는 나타내지 않음) 에 대한 항체로 공동-염색된 것이 관찰되었다. 센스 Sp35 탐침을 사용하는 특이적 표지는 관찰되지 않았다. 희소돌기아교세포에서의 Sp35 발현은 또한 P7 래트 피질의 측면 뇌실로부터의 조직 절편의 면역조직화학 연구로 확인하였다. CC1 항체로 표지된 피질 세포의 대다수 또한 항-Sp35 항체로 표지되었다. 신호를 없애는 Sp35-Fc 에 의한 항-Sp35 항체의 사전흡착에 의해서 상호작용의 특이성을 확인하였다 (실시예 2 참조).

[0288] Sp35 발현의 Sp35-특이적 RNAi 넉다운 (knockdown) 은 희소돌기아교세포 생장 및 분화를 촉진한다.

[0289] Sp35 가 희소돌기아교세포 생장 및 분화에 어떻게 기여하는지 조사하기 위해서 Sp35-특이적 RNAi 를 사용하여 희소돌기아교세포 전구체 세포에서의 Sp35 발현을 제거하였다. 50,000 A2B5 희소돌기아교세포 전구체 세포를 다음과 같이 제조한, Sp35-특이적 RNAi 서열 또는 대조군 RNAi 를 보유하는 렌티바이러스로 감염시켰다.

[0290] 소형-헤어핀 RNA (shRNA) 후보로 사용하기 위한 상동 영역을 찾는데 쥐(murine) 및 래트 Sp35 DNA 서열을 비교하였다. Sp35 RNAi 의 렌티바이러스 발현에 있어서, 올리고뉴클레오티드 LV1-035 및 LV1-036 을 어닐링하고, *Hpa*I 및 *Xho*I 절단 pLL3.7 에 결찰시켜 CH324 를 구축하였다. pLL3.7 벡터, 부가적인 방법론 및 바이러스 제조는 [Rubinson 등, Nat. Genet. 33, 401-06 (2003)] 에 기재되어 있는 바와 같았다. Sp35 RNAi 올리고뉴클레오티드는 MWG 에서 구입하였고, 다음의 서열을 가진다:

[0291] LV1-035 (센스 올리고)

[0292] 5′-TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCT AGCAGGATGACGATCTTTTTTC – 3’ (서열 번호: 40) 및

[0293] LV1-036 (안티센스 올리고)

[0294] 5′-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACT CTCTTGAAGTCTAGCAGGATGACGATCA – 3’ (서열 번호: 41).

[0295] 소문자로 나타낸 뉴클레오티드 변화를 제외하고 동일한 올리고뉴클레오티드 서열로써 대조군 RNAi 를 설계하였다:

[0296] 5′-TGATCcTCATcCttCTAtACTTCAAGAGAGTgTAGCAGGATGAcGATCT TTTTTCTCGA-3′ (서열 번호: 42) 및

[0297] 5′-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTaTAGaA GGATGACGATCA-3′ (서열 번호:

43).

[0298] 렌티바이러스 제조 전에, pLL3.7 로부터의 DNA 또는 pLL3.7 에서의 shRNA 후보를, 쥐 Sp35-HA 표지 플라스미드를 이용하여 5 대 1 의 비로 CHO 세포 내에 6-웰 형식으로 공-핵산전달감염시켰다. 핵산전달감염시킨 CHO 세포 용해물로부터 Sp35-HA 표지의 웨스턴 블랏 검출에 의해서뿐만 아니라 이중 웰로부터 제조한 전체 RNA 의 노던 블랏에 의해서 넉다운을 분석하였다. 블랏은 Sp35 cDNA 의 절편으로 탐침조사하였다. 핵산전달감염 48 시간 후 검정을 수행하였다. 예상한 바와 같이, 대조군-처리 세포에 비하여 CH324 RNAi-처리 CHO 세포에서 Sp35 mRNA 가 10 배 감소하였다. 데이타는 표시하지 않음. 녹색 형광 단백질 (GFP) 을 보유하는 RNAi 렌티바이러스는 [Rubinson 등] 에 기재한 바와 같이 생성하였다. 대조군 또는 Sp35 RNAi 로 처리한 배양물에서, 희소돌기아교세포의 대략 80% 가 GFP 양성이었다. 전체 세포 수는 RNAi 처리에 의해서 변경되지 않았다. 분화시 RNAi 의 효과를 정량화하기 위해서, GFP-발현 희소돌기아교세포만을 계수하였다.

[0299] 다음과 같이 변형하여 [Conn, Meth. Neurosci. 2:1-4 (Academic Press; 1990)] 에 기재되어 있는 바와 같이 암컷 Long Evans P2 래트로부터 풍부화된 희소돌기아교세포 집단을 생장시켰다. 간략히, 전뇌를 절개하고, 행크 완충염 용액 (HBSS; Invitrogen) 에 넣었다. 조직을 1-㎜ 단편이 되도록 자르고, 37 ℃ 에서 15 분 동안 0.01% 트립신 및 10 ㎍/㎖ DNase 에서 인큐베이션하였다. 해리된 세포를 폴리-L-리신-코팅된 T5 조직 배양 플라스크에 두고, 37 ℃ 에서 10 일 동안 20% 송아지 태아 혈청이 있는 DMEM 배지 (Invitrogen) 에서 생장시켰다. 플라스크를 밤새 200 rpm 으로 37 ℃ 에서 흔들어 희소돌기아교세포 전구체 ($A2B5^+$) 를 수합하여, 95% 순수 군이 되었다. 배양물을 1 주 동안 FGF/PDGF 가 있는 고-글루코오스 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) (10 ng/㎖; Peprotech) 에서 유지하였다. FGF/PDGF 를 제거하여 $A2B5^+$ 세포가 분화되어 3-7 일 후에 $O4^+$ 수초형성전 희소돌기아교세포가 되었고, 분화되어 7-10 일 후 $O4^+$ 및 MBP^+ 성숙 희소돌기아교세포가 되었다. 이러한 분화 상태는 형태 변화로부터 쉽게 명백해진다: $A2B5^+$ 세포는 모양이 양극성이고, $O4^+$ 수초형성전 희소돌기아교세포는 더 길고 더 분지형의 돌기를 가지며, MBP^+ 성숙 희소돌기아교세포는 돌기 사이에 마이엘린 시트 구조를 포함한다.

[0300] A2B5 희소돌기아교세포 전구체 세포를 CH324 RNAi 를 포함하는 렌티바이러스로 감염시켰다. 생성된 세포를 3 일 동안 배양시키고, O4-양성 (희소돌기아교세포 분화용 표지자) 희소돌기아교세포의 수를 계수하였다. 내생성 Sp35 발현이 Sp35 RNAi 렌티바이러스 감염으로 감소되었고, RT-PCR 로 확인하였다 (도 6A). Sp35 의 감소는 대조군 감염 세포에 비하여 더 고도로 분화된 성숙 희소돌기아교세포를 만들었으며, 이는 세포 돌기의 길이 증가 그리고 풍부한 마이엘린 시트 구조의 존재에 의해서 명백하였다 (데이타는 나타내지 않음). Sp35 RNAi 를 발현시킨 세포에는, 대조군 배양물에서보다 3 배만큼 많은 성숙 (O4-양성) 희소돌기아교세포가 있었다 (도 6B). 이들 데이타는 Sp35 가 희소돌기아교세포 분화를 음성으로 조절할 수 있음을 나타낸다.

[0301] 우성-음성 Sp35 는 희소돌기아교세포 생장 및 분화를 촉진시킨다.

[0302] Sp35 의 야생형 및 우성-음성 형태를 발현시키는 렌티바이러스성 벡터를 구축하였다. 마우스 전장 Sp35 (FL-Sp35, 서열 번호: 2 의 아미노산 잔기 34-614) 를 암호화하는 DNA 서열을 프라이머 5'-GAGGATCTCGACGCGGCCGCATGGAGACAGACACACTCCTG-3' (서열 번호: 44) 및 5'-GGGGCGGAATTGGATCCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAG-3' (서열 번호: 45) 를 사용하여 PCR 로 증폭시키고, HRST-IRESeGFP 렌티바이러스성 벡터의 *Not*I 및 *Bam*HI 부위에 삽입하였다. 유사하게, 우성 음성 Sp35 를 암호화하는 DNA 서열 (DN-Sp35, 서열 번호: 2 의 아미노산 잔기 34-581) 을 프라이머 5'- GAGGATCTCGACGCGGCCGCATGGAGACAGACACACTCCTG- 3' (서열 번호: 46) 및 5'- GATACGGATCCTCAGCCTTTGCCCCGGCTCCATAGAAACAGC-3' (서열 번호: 47) 을 사용하여 PCT 에 의해 증폭하였다. [Rubinson 등, "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference," Nat. Genet. 33: 401-06 (2003)] 에 기재되어 있는 바와 같이, FL-Sp35 및 DN-Sp35 플라스미드를 293 세포 속으로 핵산전달감염시켜서 렌티바이러스를 생성하였다. (실시예 4 에 기재한 바와 같이 제조한) 희소돌기아교세포를 세포 당 2 MOI 로 렌티바이러스로 감염시키고, FL-Sp35 및 DN-Sp35 의 발현을 웨스턴 블랏에 의해 확인하였다.

[0303] DN-Sp35 는 희소돌기아교세포 분화를 촉진시켜, 성숙 희소돌기아교세포의 수를 증가시켰다. 대조적으로, 전

장 Sp35 (FL-Sp35) 의 과다발현은 정반대의 효과를 가지며, 분화를 저해하였고, 이는 대조군에 비하여 성숙 희소돌기아교세포의 수가 감소한 것에 의해 명백하였다 (데이타는 나타내지 않음).

[0304] 실시예 2

[0305] Sp35-Fc 융합 단백질의 구축 및 정제

[0306] Sp35 의 생물학적 기능을 연구하기 위해서 인간 Sp35의 세포외 부분 (잔기 1-532) 을 인간 IgG1 의 경첩(hinge) 및 Fc 영역에 융합시켜 구축물을 만들었다. 클론 227.2 로부터 정방향 프라이머 5'-CAGCAGGTCGACGCGGCCGCATGCTGGCG GGGGGCGT – 3' (서열 번호: 48) 및 역방향 프라이머 5'-CAGCAGGTCGACCTCGCCCGGCTGGTTGGCCAACCAGCCGGGCGA GGTCGACCTCGAGG – 3' (서열 번호: 49) 를 사용하여 PCR 로 인간 Sp35 의 부분 코딩 서열을 수득하였다.

[0307] 평활-말단(blunt-end) PCR 산물을 PCR SCRIPT AMP 벡터 (Stratagene) 의 *Srf*I 부위로 서브클로닝시켜서 PCR SCRIPT AMT-Sp35 를 만들었다. *Sal*I 단편을 PCR SCRIPT AMP-Sp35 로부터 분리하고, PCRCAMP Ig 벡터 (Stratagene 벡터 PCR SCRIPT AMP 의 유도체) 로 서브클로닝시켰다. PCRCAMP Ig 백터에서, 경첩 및 Fc 감마 서열을 *Sal*I (5') → *Not*I (3') 단편으로서 서브클로닝시켰다. *Sal*I Sp35 단편을 PCRCAMP Ig 벡터의 *Sal*I 부위에 서브클로닝시켜서, 인-프레임 인간 Ig1 의 경첩 및 Fc 영역을 암호화하는 서열과 Sp35 신호 서열 및 세포외 도메인 (코돈 1-532) 을 융합시켰다. 정확한 분리물을 동정하였고, Sp35 Fc 단편을 포함하는 *Not*I 단편을 CHO 발현 벡터인 PV90 (Biogen Idec) 의 단일 *Not*I 클로닝 부위에 서브클로닝시켰다. 생성된 플라스미드를 DNA 서열분석으로 확인하고 GT123 으로 명명하였다.

[0308] CHO 숙주 세포 DG44 를 플라스미드 GT123 와의 전기천공법에 의해 Sp35-Fc 융합 단백질을 발현시키는 안정한 세포주를 생성하였다. 뉴클레오시드-비의존적 생장을 선별하기 위해, 핵산전달감염된 CHO 세포를 10% 투석 혈청 및 4 mM 글루타민의 존재 하에 알파-MEM 에서 배양하였다. 핵산전달감염 14 일 후, 세포에 새 배지를 공급하였다. Sp35-Fc 를 발현시키는 세포를 선별하기 위해서, CHO 세포를 파이코에리트린 (PE)-표지 염소 항-인간 IgG (Jackson Labs) 로 표지하고, FACS Mo-Flo (Cytomation) 에서 고속 유세포분석 분류하였다. 가장 높은 수준의 Sp35-Fc 를 발현시킨 세포를 선별하였다. 이러한 세포를 배양물에서 7 일 동안 증식시킨 후, 재표지하고 재분류하였다. 가장 높은 수준의 Sp35-Fc 를 발현시키는 세포를 96-웰 플레이트에서 개별 클론으로서 분리하였다. 이들 클론을 2 주 동안 생장시킨 후, 발현 수준을 체크하기 위한 FACS 분석 하루 전에 새 배지를 공급하였다. 가장 높은 수준의 Sp35-Fc 를 발현시킨 클론을 증식시키고, 냉동 세포 은행을 확립하였다. 세포주를 혈청이 없는 배지 BCM16 중의 현탁 배양액에서 생장하도록 적응시켰다. 세포주를 37 ℃ 에서 4-5 계대 동안 생장시킨 후, 50% 최대 세포 밀도까지 세포를 생장시키고, 생존 세포 밀도가 75% 로 떨어질 때까지 이를 10-15 일 동안 28 ℃ 에서 배양시켜, 이들 클론으로 생성한 Sp35-Fc 의 적정 농도를 정하였다. 이때, 배양 배지를 채취하고, 원심분리에 의해서 세포 및 파편을 제거하고, 탐침으로서 항-인간 Ig 항체 (Jackson Lab) 를 사용하여 웨스턴 블랏 분석에 의해서 배양 상청액을 Sp35-Fc 수준에 대해 적정시켰다.

[0309] Sp35-Fc 융합 단백질을 맑아진 배양 배지로부터 다음과 같이 정제하였다: 9 ㎖ 의 1M HEPES pH 7.5 를 900 ㎖ 의 조건화 배지에 첨가하였다. 배지를 3 ㎖ 의 단백질 A 세파로오스 (Amersham Bioscience) 에 4 ℃ 에서 3 시간 동안 배치식으로 로딩시켰다. 수지를 1.5 ㎝ (내경) 칼럼에 모으고, 3 ㎖ PBS 로 4 회, 800 mM NaCl 을 포함한 4 ㎖ PBS 로 2 회, 그리고 이어서 다시 3 ㎖ 의 PBS 로 세척하였다. Sp35-Fc 를 25 mM NaH_2PO_4 pH 2.8 및 100 mM NaCl 로 1.5 ㎖ 분획으로써 칼럼으로부터 용출시키고, 75 ㎕ 의 0.5 M NaH_2PO_4 pH 8.6 을 첨가하여 중화시켰다. 피크 단백질-포함 분획들을 280 ㎚ 에서의 흡광도로 확인하여 모으고, 1 ㎖ 단백질 A 칼럼에서 추가로 정제하였다. 로딩 전, NaCl 을 600 mM 까지 그리고 HEPES pH 7.5 를 50 mM 까지 첨가하였다. 칼럼을 600 ㎕ 의 10 mM HEPES ph 7.5 및 1 M NaCl 로 2 회, 그리고 이어서 1 ㎖ PBS 로 세척하였다. Sp35-Fc 를 25 mM NaH_2PO_4 pH 2.8 및 100 mM NaCl 로 칼럼으로부터 용출시켜 0.5 ㎖ 분획을 모으고, 25 ㎕ 의 0.5 M NaH_2PO_4 pH 8.6 을 첨가하여 중화시켰다. 피크 단백질-포함 분획들을 280 ㎚ 에서의 흡광도로 확인하고 모았다. 환원 SDS-PAGE 로, Sp35-Fc 단백질이 단일 밴드 (> 95% 순수) 로서 이동하였고, 겉보기 질량은 90 kDa 이었다. 비-환원 조건 하에, 단백질은 이량체로서 이동하였고, 근사 질량은 180 kDa 이었다. 정제한 Sp35-Fc 단백질을 분액 (aliquot) 화시키고 -70 ℃ 에서 저장하였다.

[0310] 실시예 3

[0311] 외생성 Sp35-Fc 는 희소돌기아교세포의 생존/증식/분화를 촉진한다.

[0312] 희소돌기아교세포에서 Sp35 mRNA 발현을 다음과 같이 다양한 발단 단계로 평가하였다. 희소돌기아교세포를 실시예 1 에 기재한 바와 같이 분화유도시키고, Ambion 키트를 사용하여 mRNA 를 분리하였다. 다음의 프라이머: 5′-CTTTCCCCTTCGACATCAAGAC – 3′ (정방향; 서열 번호: 50) 및 5′-CAGCAGCACCAGGCAGAA – 3′ (역방향; 서열 번호: 51); 및 FAM-표지 탐침 5′ – ATCGCCACCACCATGGGCTTCAT – 3′ (서열 번호: 52) 를 사용하여, Taqman® RT-PCR 키트 (Applied Biosystems) 를 사용하여, 제조자 안내에 따라서 Sp35 mRNA 발현의 정량화를 수행하였다. 데이타는 내부 대조군으로서 GAPDH 수준까지 표준화시켰다. 초기 전구 희소돌기아교세포 ($A2B5^+$) 및 수초형성전 희소돌기아교세포 ($O4^+$) 는 동등한 수준의 Sp35 mRNA 를 보였으나, 성숙 희소돌기아교세포 (MBP^+) 에서는 Sp35 mRNA 의 수준이 두 배를 초과하였다, 도 7.

[0313] 실시예 1 에 기재된 바와 같이 제조한 $A2B5^+$ 희소돌기아교세포를 3 일 동안 Sp35-Fc 또는 대조군-Fc 의 농도를 증가시키면서 처리하였다 (Sp35-Fc 는 실시예 2 에 기재한 바와 같이 제조하였음). 분화를 평가하기 위해서, $A2B5^+$ 세포를 4-웰 슬라이드 챔버에 10 ng/㎖ CNTF 및 15 nM 트리아이오도-L-티로닌으로 보충된 FGF/PDGF 가 없는 생장 배지 중에 두고, Sp35-Fc 또는 대조군-Fc 의 농도를 증가시키면서 즉시 처리하였다. 48 시간 (RNAi 에 있어서는 72 시간) 후, O4 에 대한 항체로 배양물을 염색하고, 총 $O4^+$ 및 성숙 $O4^+$ 희소돌기아교세포의 수를 정량화하였다. 샘플은 이중으로 분석하였다. Sp35-Fc 는 농도 의존적 방식으로 $A2B5^+$ 세포가 $O4^+$ 세포로 분화하는 것을 촉진시켰다, 도 8.

[0314] 성숙 희소돌기아교세포는 생체외에서 반감기가 약 48 내지 72 시간이고, 세포는 전형적으로는 72 시간 후에 세포사를 겪는다. 희소돌기아교세포 배양물을 Sp35-Fc (5 일 동안 10 ㎍/㎖) 로 처리하였을 때, 대조군-Fc 로 처리한 대조군에 비하여 세포 생육성 염색으로 판단한 바, 성숙 희소돌기아교세포에서의 생존율의 상당한 증가를 관찰하였다. MBP 발현을 성숙 희소돌기아교세포용 표지자로서 모니터링하였다. 대조군-Fc 처리 세포에 비하여, 항-MBP 항체를 사용한 웨스턴 블랏 및 세포 염색에 의해 Sp35-Fc 처리 세포에서 MBP 단백질 발현의 대략 3 배의 증가가 관찰되었다.

[0315] 실시예 4

[0316] Sp35 길항제는 RhoA 및 Fyn 을 조절한다.

[0317] 희소돌기아교세포 분화 조절에 연관된 신호전달 경로의 강력한 후보는 GTPase 의 Rho 패밀리이다. Rho GTPase 는 세포 형태를 조절하고, 희소돌기아교세포 분화를 위해서는 RhoA-GTP 양의 감소가 필요하다. [Liang, X 등, *J. Neurosci. 24*:7140-7149 (2004)] 를 참조한다. RhoA 경로를 통해서 Sp35 가 신호를 전달하는지 여부를 측정하기 위해서, Sp35-Fc 로 처리한 희소돌기아교세포의 세포 용해물 중 RhoAGTP 수준을 상응하는 대조군에서의 수준과 웨스턴 블랏에 의해서 비교하였다. Sp35-Fc 후에 RhoA-GTP 에 있어서 상당한 3 배의 감소를 보였고 (도 9A), 이는 Sp35 기능의 감쇠가 RhoAGTP 를 하향조절하여 희소돌기아교세포 분화를 유발할 수 있고, 연이어 MBP 발현을 증가시킴을 나타낸다. 희소돌기아교세포를 DN-Sp35 또는 Sp35 RNAi 로 처리한 경우에 RhoA GTP 양의 유사한 감소가 나타났다 (데이타는 나타내지 않음).

[0318] RhoA GTPase 의 활동은 Fyn 키나아제로 조절된다. [Liang, X 등, *J. Neurosci. 24*:7140-7149 (2004)] 를 참조한다. 증가된 Fyn 발현 및 인산화는 희소돌기아교세포 분화와 상호관련이 있다. 동일. 또한 [Osterhout, D.J. 등, *J. Cell Biol. 145*:1209-1218 (1999)] 를 참조한다. Sp35 길항제가 Fyn 기능에 영향을 주는지 시험하기 위해서, Fyn 발현 및 인산화를 웨스턴 블랏으로 직접 측정하였다. 실시예 1 에 기재한 바와 같이, DN-Sp35 처리하여 Fyn 단백질 및 Fyn 인산화가 2 배 증가하였다 (도 9B). 역으로, FL-Sp35 를 발현시키는 세포를 분석하였을 때, Fyn 발현 및 인산화는 2 배 감소하였다 (도 9B).

[0319] 실시예 5

[0320] Sp35-Fc 는 생체외에서 수초형성을 촉진한다.

[0321] 후근 신경절 (DRG) 뉴런 및 희소돌기아교세포의 공-배양액을 Sp35-Fc 로 처리하고, 면역조직화학 및 전자현미경으로 수초형성에 대하여 시험하여, 수초형성에서 Sp35 의 역할을 생체외에서 조사하였다. 이러한 연구를 위

하여, 우선 DRG 뉴런 및 희소돌기아교세포의 일차 배양액을 만드는 것이 필요하였다.

[0322] 암컷 Long Evans 래트 E4-E17 태아 후근 신경절을 [Plant 등, J. Neurosci. 22:6083-91 (2002)] 에 기재된 바와 같이 배양하였다. 절개한 DRG 를 1 × B27 100 ng/㎖ NGF (Invitrogen) 을 포함하는 NLA 배지 중에서 제 2-6 일 그리고 제 8-11 일 동안 플루오로데옥시우리딘의 존재 하에 2 주 동안 폴리-L-리신-코팅된 덮개 유리에 두었다 (100 ㎍/㎖).

[0323] $A2B5^+$ 희소돌기아교세포를 실시예 1 에 기재한 바와 같이 제조하고, 트립신처리하여 수득하였다.

[0324] 공배양 연구를 위해서, $A2B5^+$ 희소돌기아교세포를 10 ㎍/㎖ Sp35-Fc 의 존재 또는 부재 하에 DRG 뉴런 점적 배양물에 첨가하였다. 배양 배지 (B27 및 100 ng/㎖ NGF 로 보충한 신경기저 배지) 를 바꾸고, 새 Sp35-Fc 를 세포에 매 3 일마다 첨가하였다. 수초형성에서의 변화를 확인하기 위해서, 2 주 지난 배양물을 신경미세섬유용 면역조직화학적 염색 ("IHC") 에 의해서 항-βⅢ-튜불린 항체로 염색하여 축색을 확인하거나, 또는 항-MBP 항체로 염색하여 희소돌기아교세포를 확인하고, 4 주 지난 배양물을 SDS-PAGE 에 이어 웨스턴 블랏 분석하여 MBP 를 정량화하였다. 선별한 예에서, 덮개 유리 위에 직접 2.5% 글루터알데히드를 첨가하여 전자현미경 연구를 위해서 세포를 고정하였다. 단일 MBP^+ 희소돌기아교세포부터 유래된 수초 형성 절간 다발 (internode bundle) 의 수를 계수하여 2 주 지난 배양물에서의 수초 형성 축색을 정량화하였다. 샘플은 이중으로 분석하였다. 오차 막대는 개별 측정을 표시한다. 모든 연구에서 P 값은 일원 분산 분석을 사용하여 결정하였다.

[0325] 래트 일차 희소돌기아교세포 및 후근 신경절 (DRG) 뉴런의 배양물에서, 낮은 기저량의 수초 형성이 관찰되었다. 대조적으로, 2 주 동안 Sp35-Fc 로 처리하자 강건한 축색성 수초가 형성되었고, 이는 투여량-의존적 방식으로 Sp35-Fc 처리 배양물에서 발생한 MBP^+ 수초 형성 축색의 존재로써 명백하였다 (도 10A). 웨스턴 블랏 분석은, 마이엘린의 주요 단백질 성분인 MBP 의 발현이 Sp35-Fc-처리 배양물에서 증가하였음을 입증하였다 (도 10B). Sp35-Fc 의 존재 하 수초형성을 공초점 현미경으로 추가로 확인하였고, 이는 MBP 가 축색을 피막으로 덮었음을 입증하였다 (데이타는 나타내지 않음). Sp35-Fc 로 처리한 배양액에서, 전자현미경에 의해서 잘 형성된 다중 절간뿐만 아니라 랑비에 결절과 아주 닮은 구조가 관찰되었다 (도 10C). 대조군 배양물에서는 이따금씩 수초가 형성된 절편이 검출되었을 뿐, 랑비에 결절은 검출되지 않았다 (도 10D).

[0326] DN-Sp35 를 사용하여 축색성 수초형성에 대한 Sp35 길항제의 효과를 추가로 확인하였다. DN-Sp35 의 발현은 대조군과 비교시 수초형성 MBP^+ 세포의 전체 수를 5- 내지 10 배 증가시켰다 (도 10E). 대조적으로, FL-Sp35 의 과다발현은 대조군과 비교시 수초형성 MBP^+ 세포의 수를 2 배 감소시켰다 (도 10E). 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 배양액 내 MBP 를 정량화하였다. DN-Sp35 는 MBP 를 10 배 증가시킨 한편, FL-Sp35 는 MBP 를 2 배 감소시켰다 (도 10F). 배양물 내 FL-Sp35 및 DN-Sp35 단백질의 발현을 웨스턴 블랏에 의해 확인하였다 (도 10F). 이러한 연구는, 내생성 Sp35 가 수초형성을 저해하며, Sp35 의 길항작용은 그 저해를 역전시킬 수 있음을 추가로 나타낸다.

[0327] 실시예 6

[0328] Sp35 의 Ig 도메인 펩티드는 생체외에서 수초형성을 촉진시킨다.

[0329] 후근 신경절 (DRG) 뉴런 및 희소돌기아교세포의 공-배양물을 Sp35 Ig 펩티드로 처리하고, 실시예 5 에 기재한 바와 같이 수초형성에 대하여 시험하여, Sp35 의 Ig 도메인 부분을 포함하는 몇몇 펩티드를 생체외에서 조사하였다.

[0330] 공배양 연구를 위해서, $A2B5^+$ 희소돌기아교세포를 10 ㎍/㎖ Sp35-Ig-Fc (Fc 에 융합된 Sp35 아미노산 417-493) 의 존재 또는 부재 하에 DRG 뉴런 점적 배양물에 첨가하였다. 배양 배지 (B27 및 100 ng/㎖ NGF 로 보충된 신경기저 배지) 를 바꾸고, 새 Sp35-Ig-Fc 를 세포에 매 3 일마다 첨가하였다. 수초형성에서의 변화를 확인하기 위해서, 2 주 지난 배양물을 신경미세섬유용 면역조직화학적 염색 ("IHC") 에 의해서 항-βⅢ-튜불린 항체로 염색하여 축색을 확인하거나, 또는 항-MBP 항체로 염색하여 희소돌기아교세포를 확인하고, 4 주 지난 배양물을 SDS-PAGE 에 이어 웨스턴 블랏 분석하여 MBP 를 정량화하였다.

[0331] 웨스턴 블랏 분석은, 마이엘린의 주요 단백질 성분인 MBP 의 발현이 Sp35-Ig-Fc 처리 배양물에서 증가하였음을 입증하였다 (도 15). 돌연변이 Sp35-Ig-Fc 펩티드 또한 동일한 검정으로 시험하였다. 위치 456 의 아르

기닌 및 위치 458 의 히스티딘을 글루탐산 및 발린으로 각각 변이시켰을 때, 펩티드는 Sp35-Ig-Fc 펩티드와 비교시 수초형성을 촉진시키지 않았다 (도 15). 위치 456 의 아르기닌은 Sp35 의 Ig 도메인 중 "RKH 루프" (아르기닌-리신-히스티딘 아미노산 456-458) 의 일부이고, Sp35 길항제 폴리펩티드 결합에 있어서 중요하다고 사료된다. Sp35-Ig-Fc 의 존재 하에 MBP 단백질의 증가는 Sp35-Fc 분자의 존재 하에서의 MBP 단백질의 증가와 견줄만하다 (도 15).

[0332] Sp35 Ig 도메인 부분을 포함하는 환형 펩티드 또한 실시예 5 에 기재한 검정으로 이의 수초형성 촉진능을 시험하였다. Sp35 펩티드 LSPRKH (아미노산 454-458) (서열 번호: 61) 을, N-말단에 시스테인을 그리고 C-말단에 시스테인 잔기를 첨가하여 환형화하였다. 펩티드를 N-말단에서 아세틸 (Ac) 기로 그리고 그것의 C-말단에서 NH_2 잔기로 캡핑 (cap) 하였다. 추가로, LSPRKH (서열 번호: 61) 펩티드를 또한 N-말단에서 아미노산 연결기 GSGC 로 연결된 비오틴기 그리고 C-말단에서 시스테인 잔기-NH_2 와 합성하고 환형화시켰다. 웨스턴 블랏에서 나타낸 바와 같이, 처리 배양물에서, 생성된 환형 Sp35 펩티드, Ac-CLSPRKHC (서열 번호: 66), 및 비오틴-GSGCLSPRKHC (서열 번호: 63) 는 마이엘린의 주요 단백질 성분인 MBP 의 발현을 증가시켰다 (도 16). 다른 환형 펩티드를 대조군으로 사용하였다: 비오틴-GSGCLSPEKVC (서열 번호: 65), 비오틴-GSGCKHSPLRC (서열 번호: 64) 및 Ac-CLSPEKVC (서열 번호: 67). 대조군 펩티드는 모두, 처리된 공-배양물 중에서 MBP 의 증가를 보이지 않았다 (도 16).

[0333] 이러한 연구는, Sp35 의 Ig 도메인의 더 작은 펩티드가 Sp35 길항제로서 작용하여 Sp35 에 의한 수초형성 저해를 완화할 수 있음을 추가로 나타낸다.

[0334] 실시예 7

[0335] DN-Sp35 는 DRG 뉴런 및 희소돌기아교세포에서 작용하여 수초형성을 촉진한다.

[0336] 희소돌기아교세포와 비교하여 DRG 뉴런에서 Sp35 의 수초형성 과정에 대한 상대적인 기여를 다루는 실험을 수행하였다. DRG 뉴런, 희소돌기아교세포 및 공-배양물 (실시예 5 에 기재한 바와 같이 제조) 을 실시예 1 에 기재한 바와 같은 FL-Sp35 및 DN-Sp35 렌티바이러스성 벡터로 감염시키고, 2 주 후에 수초가 형성된 MBP^+ 세포에 대해 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 상기 두 세포 모두 DN-Sp35 를 발현시킬 때, 공-배양물 중 MBP 수준의 2 배 증가, 그리고 두 세포 모두가 FL-Sp35 를 발현시킬 때, 공-배양물 중 MBP 수준의 2 배 감소가 관찰되었다 (도 10G).

[0337] 한 가지 또는 양쪽 유형 모두의 세포에서 FL-Sp35 의 과다발현은, 대조군 (빈 벡터) 과 비교시 수초형성의 기저 수준을 상당히 감소시켰다. 반면, 한 가지 또는 양쪽 유형 모두의 세포에서 DN-Sp35 의 과다발현은, 대조군에 비하여 수초형성의 기저 수준을 2- 내지 3-배 증가시켰다 (도 10G). 외생적으로 첨가한 Sp35-Fc 는, 한 가지 또는 양쪽 유형 모두의 세포에서 FL-Sp35 의 과다발현에 의한 수초형성 저해를 역전시켰다. 또한, 외생성 Sp35-Fc 는 추가로, 어느 한 유형의 세포가 DN-Sp35 를 단독 과다발현시키는 경우 수초형성을 강화시켰고, 양쪽 유형의 세포 모두가 DN-Sp35 를 과다발현시키는 경우 약간 영향을 미쳤다. 이러한 연구는, 희소돌기아교세포 및 DRG 뉴런 모두에서 우성 음성 Sp35 단백질의 발현, 또는 Sp35-Fc 단백질로의 처리가 효과적인 수초형성에 기여함을 나타낸다.

[0338] 실시예 8

[0339] Sp35-넉아웃 마우스는 조기 개시 수초형성을 나타낸다.

[0340] [Schiemann 등 (Science 293: 2111-2114 (2001)] 에 기재되어 있는 바와 같이, Sp35 의 전체 단일 축색 코딩 서열을 표적으로 하는 GFP/Neo (녹색 형광 단백질/네오마이신) 대체 벡터로 Sp35-넉아웃 마우스를 만들었다. 마우스 게놈 129/SvJ DNA 를 람다 게놈 라이브러리로부터 분리하였다 (Stratagene #946313). 14.6-kb EcoRV 단편을 $pBSK^+$ 로 서브클로닝시킨 후, 개시 ATG 에서 eGFP Q40 리포터 유전자를 삽입하기 위하여 박테리아 내에서의 상동 재조합을 행하였다. 최종 구축물은 Sp35 의 단일-엑손 코딩 서열의 전체 1-1,841 뉴클레오티드를 결손하였다. D3 (129/Sv) 배아 줄기세포에서 Sp35 유전자자리를 표적화하는데 이 구축물을 사용하였다. EcoRI-절단 배아 줄기세포 DNA 의 서던 블랏에 의해서 정확히 표적화된 세포를 확인하였고, C57B1/6 포배에 주입하여 키메라 마우스를 만들었다. 키메라를 C57B1/6 마우스에 이종 교배시켜 이종접합체 전환군 마우스를 만들었다. 꼬리 DNA 의 3-프라이머 PCR 로 유전자형을 결정하였다. 정방향 프라이머 5′-CTATCCAAGCACTGCCTGCTC-3′ (서열 번호: 53), 및 두 가지 역방향 프라이머

5′-GAGTTCTAGCTCCTCCAGGTGTG-3′ (서열 번호: 54) 및 5′-GATGCCCTTCAGCTCGATGCG-3′ (서열 번호: 55) 는 35-회 반응 (20 s 동안 94 1C, 30 s 동안 65 1C, 30 s 동안 72 1C) 에서 각각 275-bp 야생형 및 356-bp 돌연변이 대립유전자 산물을 산출하였다. [Mi, S. 등, *Nat. Neurosci. 7*: 221-228 (2004)] 를 참조한다.

서던 블랏, RTPCR 및 노던 블랏 분석에 의해 Sp35 유전자 결손의 실증을 수행하였다. 야생형 마우스의 노던 블랏 및 RT-PCR 에서 뚜렷한 밴드가 검출되었지만, 넉아웃 마우스에서는 밴드가 전혀 없는 것으로 나타났다.

이종접합체의 서던 블랏은 야생형 및 변형 Sp35 대립유전자 모두를 나타내었다. Sp35 넉아웃 마우스는 행동, 운동 또는 생식력에서 명백한 신체적 비정상 또는 변형 없이 정상으로 보였다. 이종접합 F1 자손 한배새끼는 크기가 다양하였다.

[0341] Sp35 넉아웃 마우스로부터의 배양된 희소돌기아교세포를 분화의 변화가능성에 대하여 IHC 로 평가하였다. 야생형 한배새끼로부터의 배양에서보다 Sp35 넉아웃에서, 더욱 고도로 분화된 희소돌기아교세포 및 더 큰 비율의 성숙 희소돌기아교세포가 관찰되었다. 정상 마우스 발달에서 수초형성의 개시는 전형적으로는 생후 (P) 5 일에 일어나기 때문에, 다음으로는 전자현미경으로 야생형 및 넉아웃 마우스의 P1 척수에서 수초형성을 조사하였다. 생체외 배양과 일관되게, Sp35 넉아웃 마우스의 척수는, 그들의 야생형 한배새끼보다 더 수초가 형성된 축색 섬유를 포함하였다 (도 11). 넉아웃 마우스에서는 말초 신경계 좌골 신경에서 뚜렷한 변화가 검출되지 않았고, 이는 수초형성 효과가 CNS 에 한정됨을 시사한다.

[0342] 넉아웃 마우스의 공배양된 DRG 및 희소돌기아교세포는 더 많은 DRG 및 희소돌기아교세포 상호작용 및 수초형성을 보여주었다. Sp35 넉아웃 마우스의 공배양된 DRG 및 희소돌기아교세포는 더 많은 희소돌기아교세포 분화 및 수초형성을 보여주었다. 넉아웃 마우스의 척수 조직을 전자현미경으로 조사할 때, 신생 Sp35 넉아웃 마우스 (생후 1 일 (P1) 및 6 일 (P6)) 는, 그들의 야생형 한배새끼보다 더 많은 수초형성 섬유를 보여준다.

[0343] [Hogan B., Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press (1986), pp. 153-183] 의 방법에 따라서 야생형 Sp35 를 과다발현시키는 유전자삽입 마우스를 또한 만들었다. Sp35 를 과다발현시키는 유전자삽입 마우스를 전자현미경으로 조사할 때, 신생 마우스 (생후 8 일 (P8)) 는, 그들의 야생형 한배새끼보다 더 적은 수초형성 섬유를 보여주었다.

[0344] 실시예 9

[0345] Sp35-Fc 는 생체내에서 희소돌기아교세포 생존 및 수초형성을 촉진시킨다.

[0346] 성체 야생형 C57B1/6 수컷 마우스에게 6 주 동안 쿠프리존 (분쇄한 마우스 먹이와 함께 분쇄 0.2 중량%) 을 먹여서 뇌량 내에서 탈수초화를 유도하였다. 쿠프리존 공급 2, 2.5, 및 3 주째에, Sp35-Fc 를 정위적으로 (stereotactically) 탈수초화 뇌량 속에 주입하였다. Sp35-Fc 를 포함하지 않는 멸균 배지를 동일한 간격으로 대조군 마우스에 정위적으로 주입하였다. 쿠프리존 공급 6 주 후, 2, 4 및 6 주 동안 마우스들을 정상 사료 (분쇄한 마우스 먹이만) 로 되돌려, 다시 수초형성시켰다.

[0347] 쿠프리존-처리 마우스를 케타민 (80 ㎎/체중 ㎏) 및 자일라진 (10 ㎎/체중 ㎏) 으로 마취시키고, 정위 수술용으로 고안된 부동화 장치 (David Kopf Instruments) 내에 두었다. 두피를 개방하고, 멸균 화합물 (1 ㎖ 의 HBSS 중 1 μM) 을 야생형 수용체 마우스의 급성 탈수초화된 뇌량 속으로 한쪽으로만, 10 ㎖ Hamilton 시린지로 정수리점에 대하여 후방 0.7 ㎜ 그리고 측방 0.3 ㎜ 의 정위 좌표를 사용하여 1.7 ㎜ 깊이로 주입하였다 (Messier 등, Pharmacol. Biochem. Behav. 63(2): 313-18 (1999)). 추가로, 대조군 수용체 마우스에게 화합물을 포함하지 않는 HBSS 를 정위적으로 주입하였다. 두개골의 틈을 겔폼 (Gelfoam) 으로 채우고, 그 부분에 면봉으로 페니실린 및 스트렙토마이신 (Gibco) 을 바르고, 상처를 봉합하였다. 주입 후, 실험 중 매주 마우스를 죽이고, 그들의 뇌를 떼어내고 분자, 생화학 및 조직학 분석을 위해서 가공하였다.

[0348] Sp35-Fc 처리를 받은 동물은 항-MBP 단백질 항체 또는 룩솔 패스트 블루를 사용한 IHC 에 의해서, 증가된 숙성 희소돌기아교세포 생존 (CC1 항체 염색에 근거, 도 12) 및 축색 수초형성을 보여주었다.

[0349] 실시예 10

[0350] Sp35-형질전환 세포의 생체내 이식

[0351] 척수 손상에서 Sp35 의 생물학적 기능을 또한 조사하였다. 래트 척수의 손상된 중심점에 전달하기 위해서, Sp35 를 발현시키는 레트로바이러스 또는 레트로바이러스 대조군으로 피질 일차 배양 세포 (혼합 배양물) 를 감염시켰다. 2×10^6 개의 세포를 도입하고, 10 일째에 래트를 죽였다. 척수를 4% 파라포름알데히드에

밤새 고정시킨 후, 70% 에탄올에 이어 95% 에탄올에서 탈수시켰다. 조직 샘플을 파라핀에 깊이 넣었다. (10 마이크론 두께) 단면을 면역조직화학적 염색에 사용하였다. Sp35 를 투여한 손상된 래트에서 희소돌기아교세포 생존 및 축색 수초형성을 모니터링하였다. Sp35 를 발현시키는 세포를 투여한 동물에서 더 많은 희소돌기아교세포 및 축색 수초형성 그리고 더 적은 축색 후퇴가 보였다.

[0352] 이러한 실험용 Sp35 레트로바이러스 구축물을 다음과 같이 만들었다. *Xho*I 부위를 포함하는 프라이머 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG-3' (서열 번호: 56), 및 *Eco*RI 부위를 포함하는 5'CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAACTTG-3' (서열 번호: 57) 를 사용하여 Sp35 유전자를 PCR 증폭시켰다. PCR 산물을 *Xho*I 및 *Eco*RI 로 절단한 후, *Xho*I 및 *Eco*RI 로 미리 절단된 레트로바이러스 벡터 pMIG (IRES-GFP 를 포함) 에 결찰시켰다. 상기 새로운 벡터를 pMMC078 이라 칭하였다. pMMC078 의 모든 분리물은 비의도적 점 돌연변이를 포함하여서, pMMC078 의 두 가지 분리물을 함께 결찰시켰다. pMMC078.6 을 *Xho*I 및 *Acc*I 로 절단하고, pMMC078.7 을 *Xho*I 및 *Acc*I 로 절단하였다. 이들 두 단편을 함께 결찰시켜, 최종 수정 플라스미드 pMMC089 를 만들었다. 삽입물의 DNA 서열을 DNA 서열분석으로 확인하였다.

기재한 바와 같이 Sp35 레트로바이러스를 만들었다. 핵산전달감염 전날 293G 세포를 분할하였다. 8 ㎍ Sp35-레트로바이러스 DNA 를 사용하여 5×10^6 개의 세포를 리포펙타민 (Invitrogen) 으로 핵산전달감염시켰다. 핵산전달감염 이후 92 시간 후, 조건 배지를 채취하였다. 조건화 배지를 5000 g 로 10 분 동안 원심분리하고, 상청액을 Sp35 레트로바이러스 보존액으로 사용하였다. 이 보존액을 4 ℃ 에서 1 주 동안 또는 -80 ℃ 에서 6 개월 동안 저장하였다.

[0353] 실시예 11

[0354] Sp35-Fc 는 생체내에서 척수 손상 (SCI) 후 뉴런 및 희소돌기아교세포 생존을 촉진한다.

[0355] 성체 암컷 Long Evans 래트 (190-210 g; Charles River) 에서 척수 손상을 유도하였다. 후방 반절단 (dorsal hemisection) 을 T6/T7 에서 수행하여, 주 등쪽안쪽 및 부 등쪽측면 피질척수로 (CST) 성분을 완전히 차단하였다. 마이크로 메스를 사용하여 표면으로부터 1.8 ㎜ 깊이로 척수를 정위적으로 횡절개하였다. CST 횡절개 직후, T7 에서 거미막하공간 속으로 수막강내 카테터를 삽입하고, 피하공간에 삽입한 초회감작 미니-삼투 펌프 (Alzet 모델 2004, Alza Corp.) 에 연결하였다. 미니-삼투 펌프로 0.25 ㎕/h 의 25 μM Sp35-Fc 융합 단백질 또는 인간 IgG (5 ㎎/㎖) 또는 PBS (대조군으로서) 를 운반하였다. 수술 후의 조리는 수술 수 3 일간 매 8-12 시간마다 무통 (부프레노르핀/부프레넥스, Reckitt Benckiset Healthcare Ltd., 0.05 ㎎/㎏ 피하) 및 수술 후 7 일 동안 항생제 처리 (암피실린, Bristol Myers Squibb, 100 ㎎/㎏ 매일 2 회 피하) 를 포함하였다. 연구 기간 (4 주) 동안 또는 기능 회복까지 하루 2 회 수동으로 방광을 짜내었다. 연구 완료시, 래트를 마취하고 헤파린 처리한 식염수에 이어 4% 파라포름알데히드 (PFA) 로 경심 관류시켰다. 척수를 떼어내고, 파라핀에 깊이 넣고, 10 ㎛ 단면을 조직학적 분석을 위하여 절단하였다.

[0356] SCI 후 세포자멸사적 세포사를 정량화하기 위해서, SCI 3 일 또는 7 일 후에 동물들을 안락사시키고, 항-활성화-카스파제-3 항체 (Celll Signaling Technologies) 및 TUNEL 염색 (Promega) 을 이용하여 염색하였다. 단면을 또한 항-NeuN 항체 (Chemicon) 및 항-CC1 항체 (Calbiochem) 으로 염색하여 뉴런 및 희소돌기아교세포 각각을 확인하였다.

[0357] SCI 3 일 후, 횡절단 부위에 대하여 입 쪽 및 꼬리 쪽 모두에 광범위한 TUNEL 염색 및 뉴런 및 희소돌기아교세포 모두에 공분포된 활성화-카스파제-3 염색이 관찰되었다. 활성화-카스파제-3-양성 뉴런 및 희소돌기아교세포의 수는 SCI 3 일 후 대조군에서보다 Sp35-Fc-처리 동물에서 상당히 더 적었다. 나아가, SCI 4 주 후에, 항-βⅢ-튜불린 항체 (뉴런 생존) 및 항-O4 항체 (희소돌기아교세포 생존) 로의 염색을 기초로, 대조군에서보다 Sp35-Fc-처리 동물에서 병소 부위 주변의 척수 조직 내에, 더 많은 뉴런 및 희소돌기아교세포가 생존하였다.

[0358] 실시예 12

[0359] Sp35-Fc 는 생체외에서 카스파제-3 활성화 및 세포사를 감소시킨다.

[0360] PC12 세포 (Neuroscreen) 를, 5% 소 태아 혈청, 10% 말 혈청, 2 mM 글루타민, 100 U/㎖ 페니실린 및 200 ng/㎖ NGF 를 포함하는 100 ㎎/㎖ 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI-1640 배지에서 7 일 동안 분화시켰다. 실험을 위하여, 배양 배지를 Sp35-Fc, 음성 대조군으로서 인간 IgG (0.1-10 μM), 또는 양성 대조군으로서 zVAD (0.1 μM) 를 포함하는 NGF 가 없는 배양 배지로 대체하였다. NGF 회수 18 시간 후, 카스파제 3/7 Glo 키트

(Promega) 를 사용하여 제조자 안내서에 따라서, 활성화된 카스파제-3 을 정량화하였다. NGF 회수 42 시간 후, 세포사 검출 ELISA 키트 (Roche) 를 사용하여 제조자 안내서에 따라서, 세포자멸사적 세포사를 정량화하였다.

[0361] 0.1 μM Sp35-Fc 는, 배양 배지로부터 NGF 제거 18 시간 후에 영양 공급이 끊긴 분화된 PC12 세포에서 카스파제-3 활성화를 감소시킴을 관찰하였다. 카스파제-3 활성화에 대한 Sp35-Fc 의 효과는 투여량-의존적이었고, 더 높은 투여량 (1 또는 10 μM) 에서, 카스파제 저해제 zVAD (0.1 μM) 의 신경보호 투여량만큼 효과적이었다 (도 14). 세포사의 추가적 척도로서, TUNEL ELISA 법을 이용하여 세포자멸사를 정량화하였으며, Sp35-Fc 가 NGF 회수 42 시간 후에 측정된 세포사를 상당히 감소시킴을 발견하였다 (도 13).

[0362] 명쾌하게 이해하기 위해서 그림 및 예시를 사용하여 상기의 발명을 다소 상세하게 설명하였으나, 본 발명의 내용에 비추어보면, 첨부한 청구의 범위의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 거기에 약간의 변화 및 변형을 행할 수 있음이 당업자에게는 자명하다.

[0363] 본 명세서에서 언급하는 모든 간행물 및 특허 출원은, 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 낱낱이 참조로 반영되는 것으로 보이는 것과 같은 정도로 본원에 참조로 반영된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1 은 전장 인간 Sp35 cDNA 의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 1) 이다.

[0017] 도 2 는 전장 인간 Sp35 폴리펩티드의 아미노산 서열 (서열 번호: 2) 이다.

[0018] 도 3 은 전장 마우스 Sp35 폴리펩티드를 암호화하는 서열의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 3) 이다.

[0019] 도 4 는 전장 마우스 Sp35 폴리펩티드의 아미노산 서열 (서열 번호: 4) 이다.

[0020] 도 5 - Sp5 (LINGO-1) 는 희소돌기아교세포에서 발현된다. P13 CG 뉴런 (p13CGN), 희소돌기아교세포 및 별아교세포 배양물 중 LINGO-1 mRNA 발현의 RT-PCR 분석. 내부 대조군으로서 동일 샘플로부터 GAPDH 발현을 분석하였다.

[0021] 도 6A 및 6B - (A) RNAi-감염 희소돌기아교세포 및 비감염 대조군으로부터 Sp5 (LINGO-1) mRNA 발현의 RT-PCR 분석. β-액틴을 내부 표준으로서 사용하였다. (B) RNAi-처리 배양물 중 성숙 희소돌기아교세포의 정량화.

[0022] 도 7 - 다양한 발달 단계에서 희소돌기아교세포에서의 Sp35 (LINGO-1) mRNA 발현. 희소돌기아교세포를 유도시켜 분화시키고, Sp35 의 정량화를 RT-PCR 로 수행하였다. 데이타는 내부 대조군으로서 GAPDH 수준으로 표준화시켰다. 초기 전구 희소돌기아교세포 ($A2B5^+$) 및 수초형성전(pre-myelinating) 희소돌기아교세포 ($O4^+$) 는 동등한 수준의 Sp35 mRNA 를 나타내었지만, Sp35 mRNA 의 수준은 성숙 희소돌기아교세포 (MBP^+) 에서 2 배를 초과하였다.

[0023] 도 8 - 대조군-Fc 폴리펩티드 처리와 비교한 외생성 LINGO-1-Fc 처리 후 희소돌기아교세포의 용량-의존적 분화. 전체 O4+ 희소돌기아교세포의 백분율로서 성숙 희소돌기아교세포의 수 (마이엘린 시트의 존재로 확인) 를 계수하여 데이타를 정량화하였다. 각 샘플에 있어서, 대략 800 개의 세포가 계수되었다.

[0024] 도 9 - LINGO-1 (Sp5) 길항제는 RhoA 및 Fyn 을 조절한다. (A) 웨스턴 블랏으로 검출한, LINGO-1-Fc 로 처리한 희소돌기아교세포에서의 RhoA-GTP 양. (B) 웨스턴 블랏으로 검출한, FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 또는 대조군 플라스미드를 보유하는 렌티바이러스로 감염시킨 희소돌기아교세포에서의 Fyn 발현 및 인산화 (pFyn).

[0025] 도 10A - LINGO-1 길항제는 희소돌기아교세포에 의한 축색 수초형성을 촉진하다. 2 주 동안 LINGO-1-Fc (10 ㎍/㎖) 로 처리한 공배양물 내 수초형성의 정량적 분석. 각 샘플에 있어서, MBP^+ 에 대하여 염색된 10 개의 세포 필드 (field) 가 계수되었다.

[0026] 도 10B - MBP 단백질의 존재를 검출하기 위하여 항-MBP 항체를 사용하는 외생성 LINGO-1-Fc 및 대조군-Fc 폴리펩티드로 처리한 4-주 공배양물의 웨스턴 블랏.

[0027] 도 10C 및 10D - 4 주 동안 LINGO-1-Fc (C) 또는 대조군 Fc (D) 로 처리한 공배양물의 전자현미경 분석.

랑비에 결절 구조가 나타난다. 비율 막대, 1.5 ㎛.

[0028] 도 10E 및 10F - 2 주 동안 FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 및 대조군 렌티바이러스로 감염시킨 공배양물 내 수초형성. MBP^+ 세포를 면역형광법으로 계수하였다 (E). 적혈구응집소 표지에 대한 항체를 사용하여 MBP 및 LINGO-1 에 대하여 분석한, FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 및 대조군 렌티바이러스로 감염시킨 배양물으로부터의 웨스턴 블랏 (F).

[0029] 도 10G - 후근 신경절 세포 (DRG 감염) 단독 또는 희소돌기아교세포 (올리고 감염) 단독 또는 둘 모두 (양쪽 감염) 를 FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 및 대조군 렌티바이러스로 감염시킨 공배양물 내 수초형성.

[0030] 도 11A 및 11B - P1 마우스로부터 LINGO-1 넉아웃 및 야생형 척수에서 수초가 형성된 축색 섬유의 (A) 시각적 및 (B) 정량적 분석을 나타내는 전자현미경. 4 개의 척수를 분석하였다; 각 샘플에 있어서, 10 개의 필드로부터 수초 형성 축색 섬유를 계수하였다. 나타낸 데이타는 모든 측정치로부터의 평균 값이다.

[0031] 도 12 - 본원에서 기술하고 있는 바와 같이, 쿠프리존-처리 마우스에 Sp5-Fc (LINGO-1-Fc) 또는 대조군 폴리펩티드를 외과적으로 주입하였다. Sp35-Fc 처리를 받은 동물은 증가된 성숙 희소돌기아교세포 생존을 나타내었다 (CC1 항체 염색에 기초함).

[0032] 도 13 - Sp35-Fc (LINGO-1-Fc) 또는 대조군으로 처리된 NGF 회수 18 시간 후의 분화된 PC12 세포의 TUNEL 검정. Sp5-Fc 처리 세포는 보다 소수의 세포들이 세포자멸사하였다.

[0033] 도 14 - Sp35-Fc (LINGO-1), 카스파제 저해제 zVAD 또는 대조군 폴리펩티드로 처리한 배양 배지로부터 NGF 제거 18 시간 후 영양 공급을 끊은 분화된 PC12 세포에서의 세포자멸사. 대조군 폴리펩티드로 처리한 세포는 가장 많은 세포사를 나타내었다.

[0034] 도 15 - MBP 단백질의 존재를 검출하기 위해서 항-MBP 항체를 사용하여, 외생성 LINGO-1-Ig-Fc, 변이 LINGO-1-Ig-Fc (456 위치의 아르기닌을 히스티딘으로 바꿈), LINGO-1-Fc 및 대조군-Fc 폴리펩티드로 처리한 공배양물의 웨스턴 블랏.

[0035] 도 16 - MBP 단백질의 존재를 검출하기 위해서 항-MBP 항체를 사용하는, 실시예 6 에서 기재하는 바와 같은, 외생성 LINGO-1-Ig 환형 펩티드 및 변이 LINGO-1-Ig 환형 펩티드로 처리한 4 개의 공배양물의 웨스턴 블랏.

[0036] **발명의 상세한 설명**

[0037] 정의

[0038] 달리 정의하지 않는다면, 본원에 사용하는 모든 기술적 그리고 과학적 용어는, 본 발명이 속하는 업계의 당업자가 흔히 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 혼동이 있는 경우에는, 그 정의를 포함하는 본 출원이 제어한다. 달리 내용상 필요치 않다면, 단수형 용어는 복수형을 포함하고, 복수형 용어는 단수형을 포함한다.
본원에서 언급하는 모든 간행물, 특허 및 기타 참조문헌은, 어느 목적으로 보아도, 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 구체적이고도 개별적으로 참조로 반영되는 듯이, 그 전체가 참조로 반영된다.

[0039] 본원에 기재되어 있는 것들과 유사한 또는 동등한 방법 및 물질을 본 발명의 실행 또는 시험에 사용할 수 있지만, 적합한 방법 및 물질을 아래에 기재한다. 그러한 물질, 방법 및 예는 단지 예시만을 위한 것이며, 한정하기 위함은 아니다. 본 발명의 기타 특색 및 장점은 상세한 설명 및 청구의 범위로부터 명백해질 것이다.

[0040] 본 발명을 더욱 명확히 하기 위해서, 하기의 용어 및 정의를 제공한다.

[0041] "(단수형)" 독립체라는 용어는 그 독립체 하나 이상을 가리킨다; 예를 들어, "(단수형) 면역글로불린 분자" 는 하나 이상의 면역글로불린 분자를 나타내는 것으로 이해한다. 그와 같은 것으로서, "(단수형)", "하나 이상", 및 "적어도 하나" 라는 용어는 본원에서 상호호환하여 사용할 수 있다.

[0042] 본 명세서 및 청구의 범위를 통틀어, "포함한다 (복수형)" 라는 단어, 또는 "포함한다 (단수형)" 또는 "포함하는" 과 같은 변형형은, 임의의 언급된 완전물(integer) 또는 완전물 군을 포함함을 나타내지만, 임의의 기타 완전물 또는 와전물 군을 배제하지는 않는다.

[0043] 본원에서 사용할 때, "치료적 유효량" 은, 필요한 시간 동안 그리고 투여량으로, 원하는 치료적 결과를 얻기에 효과적인 양을 가리킨다. 치료적 결과는, 예를 들어, 증상의 경감, 생존 연장, 운동성 향상 등일 수 있다.
치료적 결과는 "치유" 일 필요는 없다.

[0044] 본원에서 사용할 때, "예방적 유효량" 은, 필요한 시간 동안 그리고 투여량으로, 원하는 예방적 결과를 얻기에 효과적인 양을 가리킨다. 전형적으로, 예방적 용량은 질환 이전에 또는 질환의 초기 단계에서 대상체에게 사용하기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이다.

[0045] 본원에서 사용할 때, "폴리뉴클레오티드" 는 비변역 5' 및 3' 서열, 코딩 서열, 뿐만 아니라 핵산 서열의 단편, 에피토프, 도메인, 및 변이체를 포함하는, 전장 cDNA 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드로 구성될 수 있고, 이것은 비변형 RNA 또는 DNA 또는 변형 RNA 또는 DNA 일 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥 또는, 더욱 전형적으로는, 이중-가닥 또는 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물일 수 있는 RNA 및 DNA 를 포함하는 하이브리드 분자로 구성될 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 와 DNA 모두를 포함하는 삼중-가닥 영역으로 구성될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 안정성 또는 다른 이유로 변형된 하나 이상의 변형 염기 또는 DNA 또는 RNA 골격을 포함할 수 있다. "변형" 염기는, 예를 들어, 트리틸화 염기 및 특이 염기 예컨대 이노신을 포함한다. 각종 변형이 DNA 및 RNA 에 행해질 수 있고; 그리하여, "폴리뉴클레오티드" 는 화학적, 효소적, 또는 대사적 변형 형태를 포함한다.

[0046] 본 발명에서, 폴리펩티드는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합, 즉, 펩티드 이소동배체에 의해서 서로 결합한 아미노산으로 구성될 수 있고, 20 개의 유전자-암호화 아미노산 이외의 아미노산 (예를 들어, 비-자연발생적 아미노산) 을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 번역후 과정과 같은 자연적 과정에 의해서, 또는 업계에 주지된 화학적 변형 기술에 의해서 변형될 수 있다. 그와 같은 변형은 기본서에 그리고 더욱 상세한 전공논문, 뿐만 아니라 방대한 연구 문헌에 잘 기재되어 있다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여, 폴리펩티드 내 어디에서나 발생할 수 있다. 주어진 폴리펩티드 내의 여러 부위에서 동일한 또는 다양한 정도로 동일 유형의 변형이 존재할 수 있음을 인식하게 될 것이다. 또한, 주어진 폴리펩티드는 많은 유형의 변형을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는, 예를 들어, 유비퀴틴화의 결과로써 분지될 수 있으며, 그것들은 분지되거나 분지되지 않은 환형일 수 있다. 환형, 분지형, 및 분지형 환형 폴리펩티드가 자연적 번역후 과정으로부터 생길 수 있고, 또는 합성법에 의해서 만들어질 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합, 헴 부분의 공유결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합, 포스포티딜이노시톨의 공유결합, 교차결합, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 교차결합의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 (anchor) 형성, 히드록실화, 아이오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, peg화, 단백질가수분해 과정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르지닐레이션과 같은 아미노산의 단백질로의 전이-RNA 매개 첨가, 및 유비퀴틴화를 포함한다 (예를 들어, [Proteins - Structure And Molecular Properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993)]; [Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983)]; [Seifter 등, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990)]; [Rattan 등, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)] 참조).

[0047] 본 발명의 Sp35 길항제를 칭할 때, "단편", "변이체", "유도체" 및 "유사체" 라는 용어는 Sp35 활성 저해능을 적어도 다소 보유하는 임의의 길항제 분자를 포함한다. 본원에서 설명하는 바와 같은 Sp35 길항제는, 그 Sp35 길항제가 여전히 그 기능을 하는 한, 제한 없이 단편, 변이체, 또는 유도체 분자를 포함할 수 있다. 본 발명의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 단백질가수분해 단편, 결손 단편 및 특히 동물에게 전달될 때 작용 부위에 더욱 손쉽게 도달하는 단편을 포함한다. 폴리펩티드 단편은 선형뿐만 아니라 삼차원 에피토프를 포함하여, 천연 폴리펩티드의 항원성 또는 면역원성 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 임의의 부분을 추가로 포함한다. 본 발명의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 앞서 기재한 바와 같은 단편을 포함하여, 변이체 Sp35 영역, 그리고 또한 아미노산 치환, 결손, 또는 삽입에 기인하여 아미노산 서열이 바뀐 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

대립 변이체와 같은 변이체는 자연적으로 발생할 수 있다. "대립 변이체" 는 유기체의 염색체상의 일정한 유전자 좌를 차지하는 유전자의 대안적 형태를 의미한다. *Gnens II*, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985). 비-자연발생적 변이체는 업계-공지의 돌연변이 유발 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 가용성 Sp35 폴리펩티드는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환, 결손 또는 첨가를 포함할 수 있다.

본 발명의 Sp35 길항제는 또한 유도체 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 천연 폴리펩티드에서는 발견되지 않는 부가적인 특색을 나타내도록 변경시킨 Sp35 영역을 포함할 수 있다. 예에는 융합 단백질 및 단백질 콘쥬게이트가 포함된다.

[0048] 본 발명에서, "폴리펩티드 단편" 은 Sp35 폴리펩티드의 짧은 아미노산 서열을 가리킨다. 단백질 단편은 "독립 구조" 이거나 또는 그 단편이 일부 영역을 형성하는 더 큰 폴리펩티드 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 단편의 대표적인 예에는, 예를 들어, 길이로 약 5 개의 아미노산, 약 10 개의 아미노산, 약 15 개의 아미노산, 약 20 개의 아미노산, 약 30 개의 아미노산, 약 40 개의 아미노산, 약 50 개의 아미노산, 약 60 개의 아미노산, 약 70 개의 아미노산, 약 80 개의 아미노산, 약 90 개의 아미노산, 및 약 100 개의 아미노산을 포함하는 단편이 포함된다.

[0049] *항체 또는 면역글로불린.* 한 가지 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제는 "항체" 또는 "면역글로불린" 분자, 또는 그의 면역특이적 단편, 예를 들어, 자연발생적 항체 또는 면역글로불린 분자 또는 항체 분자와 유사한 방식으로 항원에 결합하는 조작된 항체 분자 또는 단편이다. "항체" 및 "면역글로불린" 이라는 용어는 본원에서 상호호환하여 사용한다. 항체 또는 면역글로불린은 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함하며, 보통 최소한 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 척추동물계에서 기본 면역글로불린 구조는 비교적 잘 이해되어 있다. 예를 들어, [Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)] 참조.

[0050] 아래에서 더욱 상세하게 검토하겠지만, "면역글로불린" 이라는 용어는 생화학적으로 구별할 수 있는 다섯 가지 넓은 부류의 폴리펩티드를 포함한다. 다섯 가지 부류 모두는 분명히 본 발명의 범주 내에 속하며, 하기의 검토는 일반적으로 IgG 류의 면역글로불린 분자에 관한 것이다. IgG 와 관련하여, 표준 면역글로불린 분자는 분자량이 대략 23,000 돌턴인 두 개의 동일한 경쇄 폴리펩티드, 및 분자량이 53,000-70,000 인 두 개의 동일한 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 상기 네 개의 사슬은 전형적으로는 "Y" 구조 내에서 디설파이드 결합으로 결합되어 있으며, 여기서 경쇄는 "Y" 의 입구 부분에서 시작하여 가변 영역을 지나 계속해서 중쇄를 묶는다.

[0051] 경쇄 및 중쇄 모두는 구조적 그리고 기능적 상동 영역으로 나뉜다. "불변" 및 "가변" 이라는 용어는 기능상 사용된다. 이와 관련하여, 경쇄의 가변 도메인 (V_L) 및 중쇄의 가변 도메인 (V_H) 부분 모두는 항원 인식 및 특이성을 결정한다고 인식된다. 역으로, 경쇄의 불변 도메인 (C_L) 및 중쇄의 불변 도메인 (C_H1, C_H2 또는 C_H3) 은 중요한 생물학적 특성 예컨대 분비, 태반경유 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 부여한다. 관례상, 불변 영역 도메인의 넘버링은 그들이 항체의 항원 결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 더 멀어질수록 증가한다. N-말단 부분은 가변 부위이고, C-말단 부분은 불변 영역이고; C_H3 및 C_L 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 이룬다.

[0052] 경쇄는 카파 또는 람다 (κ, λ) 로 분류된다. 각각의 중쇄 부류는 카파 또는 람다 경쇄와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유결합되고, 두 중쇄의 "꼬리" 부분은, 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포 또는 유전자조작된 숙주 세포에 의해서 생성될 때 비-공유결합 또는 공유 디설파이드 결합으로 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 구조의 포크형 끝에 있는 N-말단으로부터 각 사슬의 바닥에 있는 C-말단까지 이어진다. 당업자는, 중쇄기 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론 (γ, μ, α, δ, ε) 과 그 중의 일부 하위부류 (예를 들어, γ1-γ4) 로 분류된다는 것을 인식할 것이다. 항체의 "부류" 를 각각 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE 로 결정하는 것이 이 사슬의 본질이다. 면역글로불린 하위부류 (동형) 예를 들어 IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 등은 잘 특징지어져 있고, 기능적 분화를 부여한다고 알려져 있다. 이들 부류 및 동형 각각의 변형형은 본 개시내용을 보면 당업자에게는 쉽게 식별가능하고, 따라서, 본 발명의 범주에 속한다.

[0053] 상기 나타낸 바와 같이, 가변 영역은 항체가 선택적으로 인식되고 항원에 있는 에피토프에 특이적으로 결합하도록 해 준다. 즉, 항체의 V_L 도메인 및 V_H 도메인이 조합되어 삼차원 항원 결합 부위를 결정하는 가변 영역을 형성한다. 이런 사차 항체 구조는 Y 의 각 팔의 끝에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 더욱 구체적으로는, 항원 결합 부위는 V_H 및 V_L 사슬 각각에 있는 세 개의 상보성 결정 영역 (CDR) 으로 정의된다. 몇몇 예, 예를 들어, 카멜리드 (camelid) 종으로부터 유래되거나 카멜리드 면역글로불린을 기초로 하여 조작한 특정 면역글로불린 분자에서, 완전 면역글로불린 분자는 경쇄 없이 중쇄로만 이루어질 수 있다. 예를 들어, [Hamers-Casterman 등, *Nature 363*:446-448 (1993)] 참조.

[0054] 자연발생적 항체에서, 각각의 항원 결합 도메인에 존재하는 6 개의 "상보성 결정 영역" 즉 "CDR" 은, 항체가 수성 환경에서 삼차원 구조를 취할 때, 특히 항원 결합 도메인을 형성하도록 배치되는 짧은 비-인접성 아미노산 서열이다. "기본틀" 영역이라고 칭하는, 항원 결합 도메인 내의 나머지 아미노산은 분자내 변이성이 덜하다. 기본틀 영역은 대개 β-시트 형태를 취하며, CDR 은 β-시트 구조를 연결시키고, 일부 경우에는 β

-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 기본틀 영역은 사슬-내 비-공유 상호작용에 의해서 정확한 정위로 CDR 을 배치하기 위해서 제공되는 뼈대를 형성한다. 배치된 CDR 에 의해서 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원에 있는 에피토프에 상보적인 표면을 한정한다. 이런 상보성 표면은 항체의 동종 에피토프에 대한 비-공유결합을 촉진시킨다. 당업자는 임의의 주어진 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 있어서 CDR 및 기본틀 영역 각각을 포함하는 아미노산을 손쉽게 확인할 수 있는데, 이는 그들이 정확하게 한정되었기 때문이다 (그 전체가 본원에 참조로 반영되는 "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E. 등, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 및 Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987) 참조).

[0055] 그러나, 카멜리드 종에서 V_HH 라고 칭하는 중쇄 가변 영역은 전체 CDR 을 형성한다. 카멜리드 V_HH 가변 영역과 통상의 항체로부터 유래된 것들 (V_H) 사이의 주요한 차이는 (a) V_H 의 경쇄 접촉 표면에서의 소수성 아미노산이 V_HH 에서의 해당 영역과 비교시 더 많은 것, (b) V_HH 에서의 CDR3 이 더 긴 것, 및 (c) V_HH 에서 CDR1 및 CDR3 사이의 디설파이드 결합이 빈번하게 발생한다는 것을 포함한다.

[0056] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 항체 분자의 중쇄 또는 경쇄 CDR 을 하나 이상 포함한다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터 둘 이상의 CDR 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터 세 개 이상의 CDR 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터 네 개 이상의 CDR 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터 다섯 개 이상의 CDR 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 하나 이상의 항체 분자로부터 여섯 개 이상의 CDR 을 포함한다. 대상 항원 결합 분자에 포함될 수 있는 하나 이상의 CDR 을 포함하는 예시적 항체 분자는 업계에 공지되어 있으며, 예시적 분자를 본원에 기재한다.

[0057] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항체 또는 그의 면역특이적 단편은 다중클론성, 단일클론성, 다중특이적, 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체, 단일 사슬 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')2, Fd, Fv, 단일-사슬 Fv (scFv), 단일-사슬 항체, 디설파이드-결합 Fv (sdFv), V_L 또는 V_H 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 및 항-이디오타입 (항-Id) 항체 (예를 들어, 본원에 나와 있는 결합 분자에 대한 항-Id 항체 포함) 를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. ScFv 분자는 업계에 공지되어 있고, 예를 들어, US 특허 5,892,019 에 기재되어 있다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 부류 (예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2) 또는 하위부류일 수 있다.

[0058] 단일-사슬 항체를 포함하는 항체 단편은 가변 영역(들)을 단독으로 또는 하기의 일부 또는 전체를 함께 포함할 수 있다: 경첩 영역, C_H1, C_H2, 및 C_H3 도메인. 본 발명에는 또한 가변 영역(들)과 경첩 영역, C_H1, C_H2, 및 C_H3 도메인의 임의의 조합을 또한 포함하는 항원-결합 단편이 포함된다. 본원에 나와 있는 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 항체 또는 그의 면역특이적 단편은 조류 및 포유류를 포함하는 임의의 동물 기원일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 인간, 쥐, 당나귀, 토끼, 염소, 기니 피그, 낙타, 라마, 말, 또는 닭 항체이다. 또다른 구현예에서, 가변 영역은 기원이 콘드릭토이드 (condricthoid) 일 수 있다 (예를 들어, 상어). 본원에서 사용할 때, "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대하여 유전자 도입시키고, 내생성 면역글로불린을 발현하지 않는 동물로부터 분리한 항체를 포함한다 (상기 및, 예를 들어, U.S. 특허 No. 5,939,598 (Kucherlapati 등) 에 기재되어 있음).

[0059] 본원에서 사용할 때, "중쇄 부분" 이라는 용어는 면역글로불린 중쇄로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 중쇄 부분을 포함하는 폴리펩티드는 하기 중 하나 이상을 포함한다: C_H1 도메인, 경첩 (예를 들어, 상부, 중간, 및/또는 하부 경첩 영역) 도메인, C_H2 도메인, C_H3 도메인, 또는 그의 변이체 또는 단편. 예를 들어, 본 발명에 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 C_H1 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; C_H1 도메인, 경첩 도메인의 적어도 일부, 및 C_H2 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; C_H1 도메인 및 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; C_H1 도메인, 경첩 도메인의 적어도 일부, 및 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬, 또는 C_H1 도메인, 경첩 도메인의 적어도 일부, C_H2 도메인, 및 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있다. 또다

른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 또한, 본 발명에 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 C_H2 도메인의 적어도 일부 (예를 들어, C_H2 도메인의 일부 또는 전부) 가 결손될 수 있다. 앞서 나타낸 바와 같이, 당업자는 이들 도메인 (예를 들어, 중쇄 부분) 이, 그들이 자연발생적 면역글로불린 분자와 아미노산 서열이 다르도록 변형될 수 있음을 이해할 것이다.

[0060] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 특정 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편에서, 다중체 (multimer)의 하나의 폴리펩티드 사슬의 중쇄 부분은 그 다중체의 제 2 폴리펩티드 사슬에 있는 것과 동일하다. 다르게는, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 중쇄 부분-함유 단량체는 동일하지 않다. 예를 들어, 각각의 단량체는, 예를 들어, 이중특이적 항체를 형성하는 상이한 표적 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0061] 본원에 나와 있는 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 결합 폴리펩티드의 중쇄 부분은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 중쇄 부분은 IgG_1 분자로부터 유래된 C_H1 도메인 및 IgG_3 분자로부터 유래된 경첩 영역을 포함할 수 있다. 또다른 예에서는, 중쇄 부분은 IgG_1 분자로부터 일부 유래되고, IgG_3 분자로부터 일부 유래된 경첩 영역을 포함할 수 있다. 또다른 예에서, 중쇄 부분은 IgG_1 분자로부터 일부 유래되고, IgG_4 분자로부터 일부 유래된 키메라 경첩을 포함할 수 있다.

[0062] 본원에서 사용할 때, "경쇄 부분" 이라는 용어는 면역글로불린 경쇄로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 경쇄 부분은 하나 이상의 V_L 또는 C_L 도메인을 포함한다.

[0063] 면역글로불린 (예를 들어, 면역글로불린 중쇄 부분 또는 경쇄 부분) 으로부터 유래된 폴리펩티드의 비-자연적인 변이체를 암호화하는 분리된 핵산 분자는, 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 또는 결손이 암호화된 단백질로 도입되도록, 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 첨가 또는 결손을 면역글로불린의 뉴클레오티드 서열로 도입시켜서 생성할 수 있다. 부위-특이적 돌연변이 및 PCR-매개 돌연변이와 같은 표준 기술로 돌연변이를 도입할 수 있다. 바람직하게, 보존적 아미노산 치환을 하나 이상의 비본질적 아미노산 잔기에 행할 수 있다.

[0064] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 항체 또는 그의 면역특이적 단편은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 대한 그들의 결합 친화력으로도 설명 또는 명시될 수 있다. 바람직한 결합 친화력은 해리 상수 즉 Kd 가 하기 미만인 것들을 포함한다:

[0065] 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, 또는 10^{-15} M.

[0066] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 항체 또는 면역특이적 단편은 본원에 기재되어 있는 바와 같이 Sp35 길항제로서 작용한다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항체는 길항제로서 기능하여, Sp35 폴리펩티드의 억제 활성을 차단 또는 저해할 수 있다.

[0067] 본원에서 사용할 때, "키메라 항체" 라는 용어는 면역반응성 영역 또는 부위가 제 1 종으로부터 수득 또는 유래되고, 불변 영역 (본 발명에 따르면 그대로이거나, 일부분이거나 또는 변형될 수 있음) 이 제 2 종으로부터 수득되는 임의의 항체를 의미할 것이다. 바람직한 구현예에서, 표적 결합 영역 또는 부위는 비-인간 기원 (예를 들어, 마우스 또는 영장류) 이고, 불변 영역은 인간 기원이다.

[0068] 본원에서 사용할 때, "조작 항체" 라는 용어는, 중쇄 및 경쇄 또는 둘 모두에서 가변 도메인을, 특이성이 알려진 항체의 하나 이상의 CDR 의 적어도 부분적인 치환에 의해서, 그리고, 필요하다면, 부분적 기본틀 영역 치환 및 서열 변경에 의해서 바꾼 항체를 가리킨다. CDR 은, 기본틀 영역이 유래되는 항체와 동일한 부류 또는 심지어는 하위부류의 항체로부터 유래될 수 있지만, CDR 은 다른 부류의 항체로부터, 바람직하게는 다른 종의 항체로부터 유래된 것도 고려된다. 특이성이 알려진 비-인간 항체로부터의 하나 이상의 "공여체" CDR 이 인간 중쇄 또는 경쇄 기본틀 영역으로 이식된 조작 항체를 본원에서는 "인간화 항체" 라고 칭한다. 한 가지 가변 도메인의 항원 결합능을 또다른 것으로 전이시키기 위해서, CDR 전부를 공여체 가변 영역의 완전 CDR 로 대체할 필요는 없을지도 모른다. 오히려, 표적 결합 부위의 활성을 유지하는데 필요한 잔기만 전이시킬 필요가 있을 것이다. 예를 들어, U.S. 특허 No. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, 및 6,180,370 에서 설명

하듯이, 기능상 조작 또는 인간화시킨 항체를 수득하는 것은 일상적인 실험의 수행에 의한 또는 시행착오 시험에 의한 당업자의 능력에 속할 것이다.

[0069] 본원에서 사용할 때, "결합된", "융합된" 또는 "융합" 이라는 용어는 상호호환적으로 사용된다. 이들 용어는 둘 이상의 요소 또는 성분이 화학적 콘쥬게이션 또는 재조합 수단을 포함하는 어떠한 수단에 의해서든지, 함께 결합되는 것을 가리킨다. "인-프레임 (in-frame) 융합" 은 둘 이상의 오픈 리딩 프레임 (ORF) 이 결합되어, 본래의 ORF 의 정확한 리딩 프레임을 유지하는 방식으로, 더 긴 연속 ORF 를 형성하는 것을 가리킨다. 따라서, 생성되는 재조합 융합 단백질은 본래의 ORF 로 암호화되는 폴리펩티드에 해당하는 둘 이상의 절편 (그 절편들은 성질상 보통은 그렇게 결합되지 않음) 을 포함하는 단일 단백질이다. 비록 인-프레임이 융합 절편을 통해 그와 같이 연속되게 만들어지지만, 그 절편들은 예를 들어 인-프레임 링커 서열에 의해서 물리적으로 또는 공간적으로 분리될 수 있다.

[0070] 폴리펩티드의 내용 중, "선형 서열" 또는 "서열" 은 아미노에서 카르복실 말단 방향으로의 폴리펩티드 내 아미노산의 순서인데, 여기서 서열 내에서 서로 이웃하는 잔기는 폴리펩티드의 일차 구조상 인접한다.

[0071] 본원에서 사용할 때, "발현" 이라는 용어는 유전자가 생화학물, 예를 들어, RNA 또는 폴리펩티드를 생성하는 과정을 가리킨다. 그 과정은 유전자 넉다운 뿐만 아니라 일시적 발현 및 안정적 발현 모두를 제한하지 않고 포함하는, 세포 내에서 유전자의 기능적 존재의 임의의 발현을 포함한다. 이는, 제한없이, 유전자의 전령 RNA (mRNA), 전이 RNA (tRNA), 소형 헤어핀 RNA (shRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA) 또는 임의의 기타 RNA 산물로의 전사 및 그와 같은 mRNA 의 폴리펩티드(들)로의 번역을 포함한다. 최종의 원하는 산물이 생화학물인 경우, 발현은 그 생화학물 및 임의의 전구체의 생성을 포함한다.

[0072] "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유류" 는 진단, 예후, 또는 치유를 원하는 임의의 대상체, 특히 포유류 대상체를 의미한다. 포유류 대상체는 인간, 가축, 농경용 가축, 동물원 동물, 스포츠용 동물, 애완동물 예컨대 개, 고양이, 기니 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 소, 젖소; 영장류 예컨대 유인원, 원숭이, 오랑우탄, 및 침팬지; 개과 예컨대 개 및 늑대; 고양이과 예컨대 고양이, 사자, 및 호랑이; 말과 (equid) 예컨대 말, 당나귀, 및 얼룩말; 식용 동물 예컨대 젖소, 돼지, 및 양; 유제류 예컨대 사슴 및 기린; 설치류 예컨대 마우스, 래트, 햄스터 및 기니 피그 등을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 특정 구현예에서, 포유류는 인간 대상체이다.

[0073] "RNA 간섭" 또는 "RNAi" 라는 용어는 siRNA 에 의한 유전자 발현의 침묵 또는 감소를 가리킨다. 그것은 침묵 유전자의 서열에 대하여 그의 이중 영역이 상동인 siRNA 에 의해 개시된, 동물 및 식물에서 서열-특이적, 전사후 유전자 침묵의 과정이다. 유전자는 유기체에 대하여 내생성 또는 외생성일 수 있고, 염색체 속에 통합되어 존재하거나 게놈에 통합되지 않은 핵산전달 감염 벡터 내에 존재한다. 유전자의 발현은 완전히 또는 부분적으로 저해된다. RNAi 는 또한 표적 RNA 의 기능을 저해한다고 여겨지며; 표적 RNA 의 기능은 완전 또는 부분적일 수 있다.

[0074] Sp35 (LINGO-1/LRRN6)

[0075] 본 발명은 Sp35 길항제가 희소돌기아교세포의 생존, 증식 및 분화를 촉진시켜서 그들의 개수를 증가시킨다는 사실을 기초로 한다. 또한, 본 발명자들은 Sp35 길항제가 뉴런의 수초형성을 촉진한다는 것을 발견하였다. 이론에 얽매이지 않고, Sp35 길항제에 의해 생기는 수초형성-촉진 활성은 희소돌기아교세포 증식에 대한 효과와는 별개로 본다.

[0076] 자연발생적 인간 Sp35 는 614 개의 아미노산 (도 1; 서열 번호: 2) 으로 이루어지는 글리코실화된 신경계-특이적 단백질이다. 인간 Sp35 폴리펩티드는 14 개의 류신-풍부 반복단위 (N- 및 C-말단 캡 포함) 로 이루어지는 LRR 도메인, Ig 도메인, 막통과 영역, 및 세포질 도메인을 포함한다 (도 2). 세포질 도메인은 정규의 티로신 인산화 부위를 포함한다. 또한, 자연발생적 Sp35 단백질은 신호 서열, LRRCT 와 Ig 도메인 사이의 짧은 염기성 영역, 및 Ig 도메인 및 세포질 도메인 사이의 막통과 영역을 포함한다 (도 2). 인간 Sp35 유전자는 대체 번역 개시 코돈을 포함하여서, 6 개의 추가적인 아미노산 (MQVSKR; 서열 번호: 5) 은 Sp35 신호 서열의 N-말단에 존재할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 표 1 은 Sp35 도메인 및 기타 영역을 도 1 의 서열을 기초로 하여, 아미노산 잔기 번호에 따라 나열한다.

표 1

도메인 또는 영역	개시 잔기	종결 잔기
신호 서열	1	33 또는 35
LRRNT	34 또는 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 또는 416
염기성	415 또는 417	424
Ig	419	493
연결 서열	494	551
막통과	552	576
세포질	577	614

[0077]

[0078] Sp35 의 조직 분포 및 발생적 발현이 인간 및 래트에서 연구되었다. Sp35 생물학은 실험 동물 (래트) 모델에서 연구되었다. 래트 Sp35 의 발현은 노던 블랏 및 면역조직화학적 염색에 의해서 측정된 바와 같이, 신경계 뉴런 및 뇌 희소돌기아교세포에 집중되어 있다. 래트 Sp35 mRNA 발현 수준은 출생 직후, 즉, 약 생후 1 일에 피크이며, 발달하면서 조절된다. 래트 척수 횡절단 손상 모델에서, Sp35 는 RT-PCR 로 측정한 바와 같이 손상 부위에서 상향 조절된다. 또한, Sp35 는 Nogo66 수용체 (Nogo 수용체) 와 상호작용하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 국제 특허 출원 No. PCT/US2004/00832 참조. 그러나, Nogo 수용체-1 은 희소돌기아교세포에서 발현되지 않고, 희소돌기아교세포 생물학에 대한 Sp35 의 임의의 영향은 Nogo-수용체-독립적 경로에 의해서 발생했음이 분명하다.

[0079] Sp35 의 길항제를 사용하는 치료 방법

[0080] 본 발명의 한 가지 구현예는 수초발육부전 또는 탈수초화와 연관된 질환, 장애 또는 손상, 예를 들어 다발성 경화증을 앓는 동물의, 그러한 질환을 치료하는 방법에 있어서, 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 및 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제의 유효량을 그 동물에게 투여하는 것을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 방법을 제공한다.

[0081] 부가적으로, 본 발명은 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 및 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는, 포유류에서 뉴런의 수초형성을 촉진시키는 방법에 관한 것이다.

[0082] 본 발명의 추가의 구현예는 희소돌기아교세포사 또는 분화 결손과 연관된 질환, 장애 또는 손상, 예를 들어, 다발성 경화증, 펠리체우스 메르츠바허 질환 또는 공세포백색질장애 (크라베 질환) 를 앓는 동물의 그와 같은 질환을 치료하는 방법에 있어서, 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 및 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제 유효량을 그 동물에 투여하는 것을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 방법을 제공한다.

[0083] 본 발명의 또다른 측면은 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 및 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sp35 길항제의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는, 포유류에서 희소돌기아교세포의 증식, 분화 및 생존을 촉진시키는 방법을 포함

한다.

[0084] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용할 Sp35 길항제, 예를 들어, 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 또는 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드는 희소돌기아교세포에 의한 뉴런의 수초형성을 음성적으로 조절하는 Sp35 의 능력을 정지, 감소, 저지, 또는 저해하는 치료제로서 제조 및 사용될 수 있다. 부가적으로, 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용할 Sp35 길항제는 희소돌기아교세포 분화, 증식 및 생존을 음성적으로 조절하는 Sp35 의 능력을 정지, 감소, 저지, 또는 저해하는 치료제로서 제조 및 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 추가의 구현예는 축색 확장의 저해를 감소시키고 수초형성을 촉진시키기에 충분한 양으로, 포유류에, 희소돌기아교세포 또는 마이엘린의 파괴와 관련된 질환, 장애 또는 손상 부위에 또는 그 근처에 투여하는 것을 포함하는 그 질환, 장애 또는 손상을 치료하기 위해서 희소돌기아교세포 증식 또는 생존을 유도하는 방법을 포함한다.

[0086] 본 발명의 방법에서, Sp35 길항제는 가용성 Sp35 폴리펩티드, Sp35 항체 또는 Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드의 환자에게로의 직접 투여를 통해 투여할 수 있다. 다르게는, Sp35 길항제는 특이적 Sp35 길항제를 생성하는 발현 벡터를 통해 투여할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, Sp35 길항제는 하기를 포함하는 치료 방법으로 투여된다: (1) Sp35 길항제를 발현시키는 핵산, 예를 들어, 벡터로, 이식가능한 숙주 세포를 형질전환 또는 핵산전달 감염시키는 것; 및 (2) 형질전환된 숙주 세포를 포유류 내의 질환, 장애 또는 손상 부위에 이식하는 것. 예를 들어, 형질전환된 숙주 세포는 MS 만성 병소 부위에 이식할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 이식가능한 숙주 세포를 포유류로부터 떼어내고, 임시로 배양시키고, Sp35 길항제를 암호화하는 분리 핵산으로 형질전환 또는 핵산전달 감염시키고, 그것을 떼어내었던 동일한 포유류로 다시 이식한다. 세포는 그것을 이식하는 동일한 부위에서 떼어낼 수 있지만, 그럴 필요는 없다. 때때로 생체외 유전자 치유법으로 알려진 그와 같은 구현예는 한정된 시간 동안 작용 부위에 집중되는 Sp35 길항제의 연속적인 공급을 제공할 수 있다.

[0087] 본 발명의 방법으로 치료 또는 개선될 수 있는 질환 또는 장애는 포유류 뉴런의 수초발육부전 또는 탈수초화와 관련된 질환, 장애 또는 손상을 포함한다. 구체적으로는, 뉴런을 둘러싸는 마이엘린이 없거나, 불충분하거나, 적당히 형성되지 않았거나 열화되고 있는 질환 및 장애. 그와 같은 질환은 다발성 경화증 (MS) 의 재발완화성, 이차 진행성 및 일차 진행성 형태를 포함하는 MS; 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교 마이엘린붕괴 (CPM), 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ), 공세포백색질장애 (크라베 질환), 왈러 변성, 시각 신경염 및 횡단척수염을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0088] 본 발명의 방법으로 치료 또는 개선시킬 수 있는 질환 또는 장애는 희소돌기아교세포사 또는 증식 또는 분화 결손과 관련된 질환, 장애 또는 손상을 포함한다. 그와 같은 질환은 다발성 경화증 (MS), 진행성 다초점백색질뇌증 (PML), 뇌척수염 (EPL), 중교 마이엘린붕괴 (CPM), 부신백색질형성장애증, 알렉산더 질환, 펠리체우스 메르츠바허 질환 (PMZ), 공세포백색질장애 (크라베 질환) 및 왈러 변성을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0089] 본 발명의 방법으로 치료 또는 개선시킬 수 있는 질환 또는 장애는 신경퇴행성 질환 또는 장애를 포함한다. 그와 같은 질환은 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0090] 본 발명의 방법으로 치료 또는 개선시킬 수 있는 추가의 질환, 장애 또는 손상의 예는 척수 손상, 만성 골수병증 또는 신경근병증, 외상성 뇌손상, 운동 뉴런 질환, 축색 전단, 타박상, 마비, 방사선조사 후 손상 또는 기타 화학요법의 신경학상 합병증, 발작, 큰 열공 (large lacunes), 대혈관 폐색, 피질하백색질허혈성변형 (leukoariaosis), 급성 허혈성 시각신경병증, 비타민 E 결핍증 (분리 결핍 증후군, AR, 바쎈-코른쯔바이그 증후군), B12, B6 (피리독신 - 펠라그라), 티아민, 엽산, 니코틴산 결핍, 마르키아파바-비냐미 증후군, 이염색백질장애, 삼차신경통, 벨 마비, 또는 축색 재생, 수초재형성 또는 희소돌기아교세포 생존 또는 분화/증식이 필요한 임의의 신경 손상을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0091] 가용성 Sp35 폴리펩티드류

[0092] 본 발명의 Sp35 길항제는 자연발생적 Sp35 의 생물학적 기능을 차단, 저해 또는 방해하는 폴리펩티드를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 가용성 Sp35 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 그의 유도체를 포함한다. 상기 표 1 은 Sp35 폴리펩티드의 다양한 도메인을 기재한다. 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 폴리펩티드의 세포내 및 막통과 도메인이 결손되어 있다. 예를 들어, 특정 가용성 Sp35 폴리

펩티드는 Sp35 의 막통과 도메인을 포함하는 아미노산 552-576 이 결손되어 있고/있거나 Sp35 의 세포내 도메인을 포함하는 아미노산 577-614 가 결손되어 있다. 부가적으로, 특정 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 폴리펩티드의 LRR 도메인, Ig 도메인, 염기성 영역 및/또는 전체 세포외 도메인 (서열 번호: 2 의 아미노산 34 내지 532 에 해당) 을 포함한다. 당업자가 인식하듯이, Sp35 의 전체 세포외 도메인은 세포외 도메인 폴리펩티드의 C-말단 또는 N-말단에 추가의 또는 더 적은 아미노산을 포함할 수 있다. 그러한 것으로서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 41 내지 525; 서열 번호: 2 의 40 내지 526; 서열 번호: 2 의 39 내지 527; 서열 번호: 2 의 38 내지 528; 서열 번호: 2 의 37 내지 529; 서열 번호: 2 의 36 내지 530; 서열 번호: 2 의 35 내지 531; 서열 번호: 2 의 34 내지 531; 서열 번호: 2 의 46 내지 520; 서열 번호: 2 의 45 내지 521; 서열 번호: 2 의 44 내지 522; 서열 번호: 2 의 43 내지 523; 및 서열 번호: 2 의 42 내지 524 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. Sp35 폴리펩티드 길항제는 표 1 에 기재한 바와 같은 도메인의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0093] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 1 내지 33; 서열 번호: 2 의 1 내지 35; 서열 번호: 2 의 34 내지 64; 서열 번호: 2 의 36 내지 64; 서열 번호: 2 의 66 내지 89; 서열 번호: 2 의 90 내지 113; 서열 번호: 2 의 114 내지 137; 서열 번호: 2 의 138 내지 161; 서열 번호: 2 의 162 내지 185; 서열 번호: 2 의 186 내지 209; 서열 번호: 2 의 210 내지 233; 서열 번호: 2 의 234 내지 257; 서열 번호: 2 의 258 내지 281; 서열 번호: 2 의 282 내지 305; 서열 번호: 2 의 306 내지 329; 서열 번호: 2 의 330 내지 353; 서열 번호: 2 의 363 내지 416; 서열 번호: 2 의 417 내지 424; 서열 번호: 2 의 419 내지 493; 및 서열 번호: 2 의 494 내지 551 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0094] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 1 내지 33; 서열 번호: 2 의 1 내지 35; 서열 번호: 2 의 1 내지 64; 서열 번호: 2 의 1 내지 89; 서열 번호: 2 의 1 내지 113; 서열 번호: 2 의 1 내지 137; 서열 번호: 2 의 1 내지 161; 서열 번호: 2 의 1 내지 185; 서열 번호: 2 의 1 내지 209; 서열 번호: 2 의 1 내지 233; 서열 번호: 2 의 1 내지 257; 서열 번호: 2 의 1 내지 281; 서열 번호: 2 의 1 내지 305; 서열 번호: 2 의 1 내지 329; 서열 번호: 2 의 1 내지 353; 서열 번호: 2 의 1 내지 416; 서열 번호: 2 의 1 내지 424; 서열 번호: 2 의 1 내지 493; 및 서열 번호: 2 의 1 내지 551; 서열 번호: 2 의 1 내지 531 및 서열 번호: 2 의 1 내지 532 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0095] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 더욱 또다른 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 34 내지 64; 서열 번호: 2 의 34 내지 89; 서열 번호: 2 의 34 내지 113; 서열 번호: 2 의 34 내지 137; 서열 번호: 2 의 34 내지 161; 서열 번호: 2 의 34 내지 185; 서열 번호: 2 의 34 내지 209; 서열 번호: 2 의 34 내지 233; 서열 번호: 2 의 34 내지 257; 서열 번호: 2 의 34 내지 281; 서열 번호: 2 의 34 내지 305; 서열 번호: 2 의 34 내지 329; 서열 번호: 2 의 34 내지 353; 서열 번호: 2 의 34 내지 416; 서열 번호: 2 의 34 내지 424; 서열 번호: 2 의 34 내지 493; 및 서열 번호: 2 의 34 내지 551 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0096] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 34 내지 530 서열 번호: 2 의 34 내지 531; 서열 번호: 2 의 34 내지 532; 서열 번호: 2 의 34 내지 533; 서열 번호: 2 의 34 내지 534; 서열 번호: 2 의 34 내지 535; 서열 번호: 2 의 34 내지 536; 서열 번호: 2 의 34 내지 537; 서열 번호: 2 의 34 내지 538; 서열 번호: 2 의 34 내지 539; 서열 번호: 2 의 30 내지 532; 서열 번호: 2 의 31 내지 532; 서열 번호: 2 의 32 내지 532; 서열 번호: 2 의 33 내지 532; 서열 번호: 2 의 34 내지 532; 서열 번호: 2 의 35 내지 532; 서열 번호: 2 의 36 내지 532; 서열 번호: 2 의 30 내지 531; 서열 번호: 2 의 31 내지 531; 서열 번호: 2 의 32 내지 531; 서열 번호: 2 의 33 내지 531; 서열 번호: 2 의 34 내지 531; 서열 번호: 2 의 35 내지 531; 및 서열 번호: 2 의 36 내지 531 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0097] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 더욱 또다른 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 36 내지 64; 서열 번

호: 2 의 36 내지 89; 서열 번호: 2 의 36 내지 113; 서열 번호: 2 의 36 내지 137; 서열 번호: 2 의 36 내지 161; 서열 번호: 2 의 36 내지 185; 서열 번호: 2 의 36 내지 209; 서열 번호: 2 의 36 내지 233; 서열 번호: 2 의 36 내지 257; 서열 번호: 2 의 36 내지 281; 서열 번호: 2 의 36 내지 305; 서열 번호: 2 의 36 내지 329; 서열 번호: 2 의 36 내지 353; 서열 번호: 2 의 36 내지 416; 서열 번호: 2 의 36 내지 424; 서열 번호: 2 의 36 내지 493; 및 서열 번호: 2 의 36 내지 551 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0098] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 서열 번호: 2 의 36 내지 530; 서열 번호: 2 의 36 내지 531; 서열 번호: 2 의 36 내지 532; 서열 번호: 2 의 36 내지 533; 서열 번호: 2 의 36 내지 534; 서열 번호: 2 의 36 내지 535; 서열 번호: 2 의 36 내지 536; 서열 번호: 2 의 36 내지 537; 서열 번호: 2 의 36 내지 538; 및 서열 번호: 2 의 36 내지 539 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0099] 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드, 이의 단편, 변이체 또는 유도체는 Sp35 의 Ig 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, 서열 번호: 2 의 417 내지 493; 서열 번호: 2 의 417 내지 494; 서열 번호: 2 의 417 내지 495; 서열 번호: 2 의 417 내지 496; 서열 번호: 2 의 417 내지 497; 서열 번호: 2 의 417 내지 498; 서열 번호: 2 의 417 내지 499; 서열 번호: 2 의 417 내지 500; 서열 번호: 2 의 417 내지 492; 서열 번호: 2 의 417 내지 491; 서열 번호: 2 의 412 내지 493; 서열 번호: 2 의 413 내지 493; 서열 번호: 2 의 414 내지 493; 서열 번호: 2 의 415 내지 493; 서열 번호: 2 의 416 내지 493; 서열 번호: 2 의 411 내지 493; 서열 번호: 2 의 410 내지 493; 서열 번호: 2 의 410 내지 494; 서열 번호: 2 의 411 내지 494; 서열 번호: 2 의 412 내지 494; 서열 번호: 2 의 413 내지 494; 서열 번호: 2 의 414 내지 494; 서열 번호: 2 의 415 내지 494; 서열 번호: 2 의 416 내지 494; 서열 번호: 2 의 417 내지 494; 및 서열 번호: 2 의 418 내지 494 의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체.

[0100] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 의 Ig 도메인의 펩티드를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함한다. 구체적으로는, 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 폴리펩티드: $ITX_1X_2X_3$ (서열 번호: 6), $ACX_1X_2X_3$ (서열 번호: 7), $VCX_1X_2X_3$ (서열 번호: 8), 및 $SPX_1X_2X_3$ (서열 번호: 9) [여기서, X_1 은 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, X_2 는 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, X_3 는 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴임]. 예를 들어, Sp35 Ig 도메인 길항제 펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 폴리펩티드를 포함한다: SPRKH (서열 번호: 10), SPRKK (서열 번호: 11), SPRKR (서열 번호: 12), SPKKH (서열 번호: 13), SPHKH (서열 번호: 14), SPRRH (서열 번호: 15), SPRHH (서열 번호: 16), SPRRR (서열 번호: 17), SPHHH (서열 번호: 18), SPKKK (서열 번호: 19), LSPRKH (서열 번호: 61), LSPRKK (서열 번호: 80), LSPRKR (서열 번호: 81), LSPKKH (서열 번호: 82), LSPHKH (서열 번호: 83), LSPRRH (서열 번호: 84), LSPRHH (서열 번호: 85), LSPRRR (서열 번호: 86), LSPHHH (서열 번호: 87), LSPKKK (서열 번호: 88), WLSPRKH (서열 번호: 89), WLSPRKK (서열 번호: 90), WLSPRKR (서열 번호: 91), WLSPKKH (서열 번호: 92), WLSPHKH (서열 번호: 93), WLSPRRH (서열 번호: 94), WLSPRHH (서열 번호: 95), WLSPRRR (서열 번호: 96), WLSPHHH (서열 번호: 97), WLSPKKK (서열 번호: 98). 이들 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 의 Ig 도메인 내에 염기성 "RKH 루프" (아르기닌-리신-히스티딘 아미노산 456-458) 를 포함한다. 이런 염기성 트리펩티드는 천연 Sp35 폴리펩티드에 결합하는 가용성 Sp35 길항제 폴리펩티드에 있어서 중요하다고 여겨진다. 염기성 트리펩티드를 포함하는 추가의 가용성 Sp35 펩티드는 ITPKRR (서열 번호: 20), ACHHK (서열 번호: 21) 및 VCHHK (서열 번호: 22) 이다.

[0101] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 의 Ig 도메인의 펩티드를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드, 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함한다. 구체적으로, 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 펩티드: X_4X_5RKH (서열 번호: 23), X_4X_5RRR (서열 번호: 24), X_4X_5KKK (서열 번호: 25), X_4X_5HHH (서열 번호: 26), X_4X_5RKK (서열 번호: 27), X_4X_5RKR (서열 번호: 28),

X_4X_5KKH (서열 번호: 29), X_4X_5HKH (서열 번호: 30), X_4X_5RRH (서열 번호: 31), 및 X_4X_5RHH (서열 번호: 32) [여기서, X_4 는 임의의 아미노산이고, X_5 는 임의의 아미노산임].

[0102] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 의 Ig 도메인의 펩티드를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드, 또는 그와 같은 폴리펩티드의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함한다. 구체적으로, 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 폴리펩티드: $ITX_6X_7X_8$ (서열 번호: 68), $ACX_6X_7X_8$ (서열 번호: 69), $VCX_6X_7X_8$ (서열 번호: 70) 및 $SPX_6X_7X_8$ (서열 번호: 71) [여기서, X_6 는 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, X_7 은 임의의 아미노산이고, X_8 은 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴임]. 예를 들어, Sp35 Ig 도메인 길항제 펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 폴리펩티드를 포함한다: SPRLH (서열 번호: 72).

[0103] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 의 Ig 도메인에 아미노산 452-458 을 포함하는 펩티드를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드, 또는 그의 유도체를 포함하고, 여기서 아미노산 452 는 트립토판 또는 페닐알라닌 잔기이다.

[0104] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 추가의 가용성 Sp35 폴리펩티드는 Sp35 의 염기성 도메인의 펩티드를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드를 포함한다. 구체적으로, 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 펩티드: RRARIRDRK (서열 번호: 33), KKVKVKEKR (서열 번호: 34), RRLRLRDRK (서열 번호: 35), RRGRGRDRK (서열 번호: 36) 및 RRIRARDRK (서열 번호: 37).

[0105] 본 발명을 실행하기 위한 각종 예시적 가용성 Sp35 폴리펩티드 및 이러한 분자들을 수득하기 위한 방법 및 물질은 아래에 기재하고/하거나, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 반영되는 국제 특허 출원 No. PCT/US2004/008323 에서 찾을 수 있다.

[0106] 본원에서 기술하고 있는 본 발명의 방법에 사용하기 위한 가용성 Sp35 폴리펩티드는 환형일 수 있다. 가용성 Sp35 폴리펩티드의 고리화는 선형 펩티드의 형태적 자유를 감소시키고, 더욱 구조적으로 억제된 분자를 만든다. 다수의 펩티드 고리화 방법이 업계에 알려져 있다. 예를 들어, 펩티드의 N-말단 및 C-말단 아미노산 잔기 사이의 아미드 결합 형성에 의한 "골격 대 골격" 고리화. "골격 대 골격" 고리화 방법은 두 ω-티오아미노산 잔기 (예를 들어 시스테인, 호모시스테인) 사이의 디설파이드 결합 형성을 포함한다. 본 발명의 특정 가용성 Sp35 펩티드는 펩티드의 N- 및 C- 말단을 변형시켜 환형 Sp35 폴리펩티드를 형성하는 것을 포함한다. 그와 같은 변형은 시스테인 잔기, 아세틸화된 시스테인 잔기, NH_2 가 있는 시스테인 잔기 및 비오틴을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 다른 펩티드 고리화 방법이, 그 전체가 본원에 참조로 반영되는 [Li & Roller. *Curr. Top. Med. Chem.* 3:325-341 (2002)] 에 기술되어 있다.

[0107] 본원에서 기술하고 있는 본 발명의 방법에 사용하기 위한 환형 Sp35 폴리펩티드는 $C_1LSPX_9X_{10}X_{11}C_2$ (서열 번호: 99) [여기서, X_9 는 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, X_{10} 은 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, X_{11} 은 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루타민, 또는 아스파라긴이고, C_1 은 임의로는 고리화 촉진 부분 (예를 들어, 아세틸기 또는 비오틴) 이 결합되어 있고, C_2 는 임의로는 고리화 촉진 부분 (예를 들어, NH_2 부분) 이 결합되어 있음] 를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0108] 본원에 기술되어 있는 가용성 Sp35 폴리펩티드는 치환, 삽입 또는 결손과 같은 다양한 변경을 가질 수 있다. 예를 들어, 치환은 하기의 치환을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다: 서열 번호: 2 의 Sp35 폴리펩티드의 6 위치에 있는 발린을 메티오닌으로; 서열 번호: 2 의 Sp35 폴리펩티드의 294 위치에 있는 세린을 글리신으로; 서열 번호: 2 의 Sp35 폴리펩티드의 348 위치에 있는 발린을 알라닌으로; Sp35 폴리펩티드의 419 위치에 있는 아르기닌을 히스티딘으로; 456 위치에 있는 아르기닌을 글루탐산으로; 그리고 서열 번호: 2 의 458 위치에 있는 히스티딘을 발린으로.

[0109] 본원에 기술되어 있는 서열 번호: 2 의 폴리펩티드에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 가용성 Sp35 폴리펩티드의 상응하는 단편 또한 포함된다.

[0110] 업계에 공지되어 있는 바와 같이, 두 폴리펩티드 사이의 "서열 동일성" 은 한 가지 폴리펩티드의 아미노산 서열과 제 2 폴리펩티드의 서열을 비교하여 결정한다. 본원에서 검토하는 바와 같이, 임의의 특정 폴리펩티드가 또다른 폴리펩티드에 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한지의 여부는 BESTFIT 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix 용 Version 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) 과 같은, 그러나 여기에 한정되지는 않는, 업계에 공지된 방법 및 컴퓨터 그로그램/소프트웨어를 사용하여 결정할 수 있다. BESTFIT 은 두 서열 사이의 최상의 상동 절편을 찾기 위해서, [Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)] 의 국부 상동 알고리즘을 사용한다. 특정 서열이 본 발명에 따른 기준 서열과 예를 들어 95% 동일한지 여부를 결정하는데 BESTFIT 또는 기타 임의의 서열 정렬 프로그램을 사용하는 경우, 변수는 물론 기준 폴리펩티드 서열의 전장에 걸쳐서 동일성 백분율을 계산하도록, 그리고 기준 서열의 아미노산 전체 개수의 5% 이하의 상동성 틈이 허용되도록 설정한다.

[0111] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 가용성 Sp35 폴리펩티드는 둘 이상의 가용성 Sp35 폴리펩티드의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0112] 항체 또는 그의 면역특이적 단편

[0113] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제는 또한 Sp35-특이적 항체 또는 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는데, 이것들은 Sp35 활성 길항제이다. 예를 들어, 희소돌기아교세포에서 발현될 때, Sp35 에 특정 Sp35 항체를 결합시키면, 희소돌기아교세포 생장 또는 분화의 저해가 차단되거나, 또는 CNS 뉴런의 탈수초화 또는 수초발육부전이 차단된다.

[0114] 본원에 기재한 방법에 사용하기 위한 특정 길항제 항체는 특이적으로 또는 선택적으로 특정 Sp35 폴리펩티드 단편 또는 도메인에 결합한다. 그와 같은 Sp35 폴리펩티드 단편은 서열 번호: 2 의 아미노산 34 내지 532; 34 내지 417, 34 내지 425, 34 내지 493, 66 내지 532, 66 내지 417 (LRR 도메인), 66 내지 426, 66 내지 493, 66 내지 532, 417 내지 532, 417 내지 425 (Sp35 염기성 영역), 417 내지 424 (Sp35 염기성 영역), 417 내지 493, 417 내지 532, 419 내지 493 (Sp35 Ig 영역), 또는 425 내지 532 를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 Sp35 폴리펩티드, 또는 서열 번호: 2 의 아미노산 34 내지 532; 34 내지 417, 34 내지 425, 34 내지 493, 66 내지 532, 66 내지 417, 66 내지 426, 66 내지 493, 66 내지 532, 417 내지 532, 417 내지 425 (Sp35 염기성 영역), 417 내지 493, 417 내지 532, 419 내지 493 (Sp35 Ig 영역), 또는 425 내지 532 에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 Sp35 변이체 폴리펩티드를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0115] 본 발명의 특정 Sp35 특이적 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체가 결합하는 추가의 Sp35 펩티드 단편은 Sp35 의 하나 이상의 류신-풍부-반복부위 (LRR) 를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 단편을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 그와 같은 단편은, 예를 들어, 서열 번호: 2 의 아미노산 66 내지 89, 66 내지 113, 66 내지 137, 90 내지 113, 114 내지 137, 138 내지 161, 162 내지 185, 186 내지 209, 210 내지 233, 234 내지 257, 258 내지 281, 282 내지 305, 306 내지 329, 또는 330 내지 353 를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 단편을 포함한다. 서열 번호: 2 의 아미노산 66 내지 89, 66 내지 113, 90 내지 113, 114 내지 137, 138 내지 161, 162 내지 185, 186 내지 209, 210 내지 233, 234 내지 257, 258 내지 281, 282 내지 305, 306 내지 329, 또는 330 내지 353 에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 변이체 Sp35 폴리펩티드의 상응하는 단편 또한 포함된다.

[0116] 본 발명의 특정 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체가 결합하는 추가의 Sp35 펩티드 단편은 Sp35 의 LRR 측면의 시스테인-풍부 영역 하나 이상을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 단편을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 그와 같은 단편은, 예를 들어, 서열 번호: 2 의 아미노산 34 내지 64 (N-말단 LRR 측면 영역 (LRRNT)) 를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 단편, 또는 서열 번호: 2 의 아미노산 363 내지 416 (C-말단 LRR 측면 영역 (LRRCT)) 을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 단편을 포함한다. 서열 번호: 2 의 아미노산 34 내지 64 및 363 내지 416 에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일한 변이체 Sp35 폴리펩티드의 상응하는 단편 또한 포함된다.

[0117] 다른 구현예에서, 본 발명은 Sp35 의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하며, 여기서 그 에피토프는 서열 번호: 2 의 적어도 약 4 내

지 5 개의 아미노산, 서열 번호: 2 의 적어도 7, 적어도 9, 또는 적어도 약 15 내지 약 30 개의 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 기술한 바와 같이 서열 번호: 2 의 주어진 에피토프의 아미노산은 인접성 또는 선형일 수 있지만, 그래야 할 필요는 없다. 특정 구현예에서, Sp35 의 하나 이상의 에피토프는 세포 표면에 발현될 때 Sp35 의 세포외 도메인으로 형성되는 또는 예를 들어, IgG Fc 영역에 융합되는 가용성 단편으로서, 비-선형 에피토프를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 따라서, 특정 구현예에서, Sp35 의 하나 이상의 에피토프는 서열 번호: 2 의 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 약 15 내지 약 30, 또는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100 개의 인접 또는 비-인접 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지며, 여기서 비-인접 아미노산은 단백질 접힘을 통해서 에피토프를 형성한다.

[0118] 다른 구현예에서, 본 발명은 Sp35 의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는데, 여기서 에피토프는 상기 기술한 바와 같이 서열 번호: 2 의 1 개 이외에, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 인접 또는 비-인접 아미노산을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지고, 단백질을 변형시키는 추가의 부분, 예를 들어, 탄수화물 부분을 포함할 수 있어서, 비변형형 단백질에 대해서보다 더 큰 친화력으로 변형형 표적 단백질에 Sp35 항체가 결합된다. 다르게는, Sp35 항체는 비변형형 표적 단백질에는 전혀 결합하지 않는다.

[0119] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 상기 기술한 Sp35 또는 단편 또는 변이체의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 즉, 연관되지 않은, 또는 랜덤 에피토프에 결합하는 것보다 더 손쉽게 그와 같은 에피토프에 결합하고; 상기 기술한 Sp35 또는 단편 또는 변이체의 하나 이상의 에피토프에 선택적으로 결합하고, 즉, 연관된, 유사한, 상동의 또는 동종 에피토프에 결합하는 것보다 더 손쉽게 그와 같은 에피토프에 결합하고; 상기 기술한 Sp35 또는 단편 또는 변이체의 특정 에피토프에 그 자체가 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 표준 항체의 결합을 경쟁적으로 저해하고; 또는 상기 기술한 Sp35 또는 단편 또는 변이체의 하나 이상의 에피토프에 약 5×10^{-2} M, 약 10^{-2} M, 약 5×10^{-3} M, 약 10^{-3} M, 약 5×10^{-4} M, 약 10^{-4} M, 약 5×10^{-5} M, 약 10^{-5} M, 약 5×10^{-6} M, 약 10^{-6} M, 약 5×10^{-7} M, 약 10^{-7} M, 약 5×10^{-8} M, 약 10^{-8} M, 약 5×10^{-9} M, 약 10^{-9} M, 약 5×10^{-10} M, 약 10^{-10} M, 약 5×10^{-11} M, 약 10^{-11} M, 약 5×10^{-12} M, 약 10^{-12} M, 약 5×10^{-13} M, 약 10^{-13} M, 약 5×10^{-14} M, 약 10^{-14} M, 약 5×10^{-15} M, 또는 약 10^{-15} M 미만의 해리 상수 K_D 를 특징으로 하는 친화력으로 결합한다. 특정 측면에서는, 상기 항체 또는 그의 단편은, 쥐과 Sp35 폴리펩티드 또는 그의 단편에 비하여, 인간 Sp35 폴리펩티드 또는 그의 단편에 우선적으로 결합한다.

[0120] 항체 결합 해리 상수의 내용에서 사용할 때, "약" 이라는 용어는 항체 친화력 측정에 이용하는 방법에 내재한 편차 정도를 허용한다. 예를 들어, 사용하는 기구의 정밀도, 측정하는 샘플의 수에 기초한 표준 오차, 및 반올림 오차에 따라, 예를 들어, "약 10^{-2} M" 이라는 용어는 0.05 M 내지 0.005 M 을 포함할 수 있다.

[0121] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 5×10^{-2} 초$^{-1}$, 10^{-2} 초$^{-1}$, 5×10^{-3} 초$^{-1}$ 또는 10^{-3} 초$^{-1}$ 이하의 오프 속도 (off rate) (k(off)) 로 Sp35 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합한다. 다르게는, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 5×10^{-4} 초$^{-1}$, 10^{-4} 초$^{-1}$, 5×10^{-5} 초$^{-1}$, 또는 10^{-5} 초$^{-1}$, 5×10^{-6} 초$^{-1}$, 10^{-6} 초$^{-1}$, 5×10^{-7} 초$^{-1}$ 또는 10^{-7} 초$^{-1}$ 이하의 오프 속도 (k(off)) 로 Sp35 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합한다.

[0122] 다른 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 10^{3} M^{-1} 초$^{-1}$, 5×10^{3} M^{-1} 초$^{-1}$, 10^{4} M^{-1} 초$^{-1}$ 또는 5×10^{4} M^{-1} 초$^{-1}$ 이상의 온 속도 (on rate) (k(on)) 로 Sp35 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합한다. 다르게는, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 10^{5} M^{-1} 초$^{-1}$, 5×10^{5} M^{-1} 초$^{-1}$, 10^{6} M^{-1} 초$^{-1}$, 또는 5×10^{6} M^{-1} 초$^{-1}$ 또는 10^{7} M^{-1} 초$^{-1}$ 이상의 온 속도 (k(on)) 로 Sp35 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합한다.

[0123] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제는 항체 분자, 또는 그의 면역특이적 단편이다. 구체적으로 명시하지 않는 한, 본원에서 사용할 때, 항체와 관련하여 "그의 단편" 은 면역특이적 단편,

즉, 항원-특이적 단편을 가리킨다. 한 가지 구현예에서, 본 발명의 항체는 이중특이적 결합 분자, 결합 폴리펩티드, 또는 항체, 예를 들어, 하나를 초과하는 에피토프, 예를 들어, 하나를 초과하는 항원 또는 동일한 항원 상의 하나를 초과하는 에피토프에 대해서 결합 특이성을 갖는 이중특이적 항체, 미니바디 (minibody), 도메인 결손 항체, 또는 융합 단백질이다. 한 가지 구현예에서, 이중특이적 항체는 Sp35 에서 하나 이상의 에피토프에 대하여 특이적인 하나 이상의 결합 도메인을 갖는다. 이중특이적 항체는 Sp35 의 에피토프에 대해서 특이적인 두 개의 표적 결합 도메인 및 제 2 표적에 대해서 특이적인 두 개의 표적 결합 도메인을 갖는 4가 항체일 수 있다. 따라서, 4가 이중특이적 항체는 각각의 특이성에 있어서 2가일 수 있다.

[0124] 본 발명의 특정 구현예에는, 면역원성이 대략 동일한 비변경 전항체 (whole antibody) 와 비교시, 이펙터 기능 감소, 비-공유적 이량체화능, 종양 부위에의 집중화 능력의 증가, 혈청 반감기 감소, 또는 혈청 반감기 증가와 같은 원하는 생화학적 특징을 제공하도록 하나 이상의 불변 영역 도메인의 적어도 일부분이 결손되거나 다르게는 변경된 Sp35 길항제 항체, 또는 그의 면역특이적 단편의 투여가 포함된다. 예를 들어, 본원에서 기술하는 치료 방법에 사용하기 위한 특정 항체는 면역글로불린 중쇄에 유사한 폴리펩티드 사슬을 포함하지만, 하나 이상의 중쇄 도메인의 적어도 일부분이 결손된 도메인 결손 항체이다. 예를 들어, 특정 항체에서는, 변형된 항체의 불변 영역의 한 가지 전체 도메인이 결손될 것이며, 예를 들어, C_H2 도메인의 전부 또는 일부가 결손될 것이다.

[0125] 본원에서 기술하는 치료법에 사용하기 위한 특정 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편에서, 업계에 공지된 기술을 사용하여 이펙터 기능을 감소시키도록 Fc 부분을 변이시킬 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 결손 또는 비활성화 (점돌연변이 또는 기타 수단을 통함) 는 혈중 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시켜서 종양 국소화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우에는, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 완화시켜서, 콘쥬게이트된 세포독소의 혈청 반감기 및 비특이적 결합을 감소시킬 수 있다. 불변 영역의 또 다른 변형을 사용하여 디설파이드 결합 또는 올리고당 부분을 변형시켜, 항원 특이성 또는 항체 유연성 증가에 기인한 국소화를 증가시킬 수 있다. 상기 변형으로 생긴 생리학적 프로파일, 생체이용성 및 기타 생화학적 효과, 예컨대 종양 국소화, 생분포 및 혈청 반감기는, 과도한 실험 없이, 주지된 면역학적 기술을 사용하여 쉽게 측정 및 정량화할 수 있다.

[0126] 업계에 공지되어 있는 기술을 사용하여, 전 (whole) 전구체 또는 부모 항체로부터, 본원에 나와 있는 진단 및 치료법에 사용하기 위한 항체 또는 그의 면역특이적 단편의 변형 형태를 만들 수 있다. 예시적 기술은 본원에서 더욱 상세하게 검토한다.

[0127] 특정 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편의 가변 및 불변 영역 모두 완전 인간 기원의 것이다. 완전 인간 항체는 업계에 알려져 있고 본원에 나와 있는 기술을 사용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 특이적 항원에 대한 완전 인간 항체는, 항원의 도전에 반응하지만 그의 내생성 유전자 좌는 무력해진 그와 같은 항체를 제조하도록 변형시킨 유전자도입 동물에 항원을 투여하여 제조할 수 있다. 그와 같은 항체를 만드는데 사용할 수 있는 예시적인 기술은 US 특허: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140 에 기재되어 있다. 업계에는 다른 기술들도 알려져 있다. 완전 인간 항체는 또한 본원의 다른 부분에서 더욱 상세하게 기재하고 있는 각종 제시 기술, 예를 들어, 파지 제시 또는 기타 바이러스 제시 시스템으로 생성할 수 있다.

[0128] 본원에 나와 있는 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편은 업계에 공지되어 있는 기술을 사용하여 만들거나 제작할 수 있다. 특정 구현예에서, 항체 분자 또는 그의 단편은 "재조합적으로 제조"되고, 즉, 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조된다. 항체 분자 또는 그의 단편을 만들기 위한 예시적인 기술은 본원의 다른 부분에서 더욱 상세하게 검토한다.

[0129] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편은, 예를 들어, 임의 유형의 분자를 항체에 공유결합시키는데, 그 공유결합이 항체가 그의 동종 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 막지 않도록 공유결합시켜 변형시킨 유도체를 포함한다. 예를 들어 비제한적으로 상기 항체 유도체는, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, peg화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도, 단백질가수분해성 절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질에 대한 결합 등에 의해서 변형된 항체를 포함한다. 임의의 수많은 화학적 변형이, 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하는 공지 기술에 의해 수행가능하나, 여기에 한정되지는 않는다. 추가로, 상기 유도체는 하나 이상의 비-전형적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0130] 바람직한 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단

편은 치료할 동물, 예를 들어, 인간에서 해로운 면역 반응을 이끌어내지 않을 것이다. 한 가지 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편은 업계에 공인된 기술을 사용하여 그들의 면역원성을 감소시키도록 변형된다. 예를 들어, 항체는 인간화, 영장류화, 면역성제거화될 수 있거나, 또는 키메라 항체를 만들 수 있다. 이들 유형의 항체는 부모 항체의 항원-결합성을 보유하거나 실질적으로 보유하지만, 인간에서 덜 면역성인 비-인간 항체, 전형적으로는 쥐과 또는 영장류 항체로부터 유래된다. 이는 (a) 전체 비-인간 가변 도메인을 인간 불변 영역에 이식시켜 키메라 항체를 생성하는 것; (b) 하나 이상의 비-인간 상보성 결정 영역 (CDR) 의 적어도 일부를 인간 기본틀 및 결정적인 기본틀 잔기를 보유하거나 보유하지 않은 불변 영역에 이식시키는 것; 또는 (c) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하지만, 표면 잔기를 치환시킴으로써 그것들을 인간-유사 절편으로 "은폐하는" 것을 포함하는 다양한 방법으로 달성할 수 있다. 그와 같은 방법은 [Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984)]; [Morrison 등, Adv. Immunol. 44:65-92 (1988)]; [Verhoeyen 등, Science 239:1534-1536 (1988)]; [Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991)]; [Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994)], 및 U.S. 특허 No. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, 및 6,190,370 에 나와 있고, 이들 모두는 그 전체가 본원에 참조로 반영된다.

[0131] 항체의 면연원성을 감소시키는데 또한 면역성제거를 사용할 수 있다. 본원에서 사용할 때, "면역성제거" 라는 용어는 T 세포 에피토프를 변형시키기 위한 항체의 변경을 포함한다 (예를 들어, WO9852976A1, WO0034317A2 참조). 예를 들어, 출발 항체의 V_H 및 V_L 서열을 분석하고, 서열 내 상보성-결정 영역 (CDR) 및 기타 중요한 잔기와 연관하여 에피토프의 위치를 보여주는 각각의 V 영역으로부터 인간 T 세포 에피토프를 "매핑 (map)"한다. T 세포 에피토프 지도로부터 개별 T 세포 에피토프를 분석하여 최종 항체의 활성을 변경할 위험이 적은 대안 아미노산 치환을 확인한다. 아미노산 치환 조합을 포함하는 일정 범위의 대안 V_H 및 V_L 서열을 설계하고, 이어서 이들 서열을 본원에 나와 있는 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 일정 범위의 결합 폴리펩티드, 예를 들어, Sp35 길항제 항체 또는 그의 면역특이적 단편에 통합시킨 후, 기능을 시험한다. 전형적으로는, 12 및 24 개의 변이체 항체를 생성하고 시험한다. 이어서, 변형 V 및 인간 C 영역을 포함하는 완전 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현 벡터로 클로닝시키고, 그에 따른 플라스미드를 전항체를 생성하기 위해서 세포주에 도입시킨다. 이어서, 적당한 생화학적 그리고 생물학적 검정으로 항체를 비교하고, 최적의 변이체를 확인한다.

[0132] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 단편은 업계에 공지된 임의의 적합한 방법으로 생성할 수 있다. 다중클론성 항체는 업계에 주지된 다양한 절차로 생성할 수 있다. 예를 들어, Sp35 면역특이적 단편을 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는 다양한 숙주 동물에 투여하여 항원에 특이적인 다중클론성 항체를 포함하는 혈청 생성을 유도할 수 있다. 다양한 보조약을 사용하여, 숙주 종에 따라, 면역 반응을 증가시킬 수 있고, 이것은 프로인트 (Freund's) (완전 및 불완전), 미네랄 겔 예컨대 수산화알루미늄, 표면 활성 성분 예컨대 리소레시틴, 플루론산 폴리올, 다중음이온, 펩티드, 오일 에멀션, 열쇠구멍 삿갓조개 헤모시아닌, 디니트로페놀, 및 잠재적으로 유용한 인간 보조약 예컨대 BCG (칼메트-구에린 (Calmette-Guerin) 균) 및 좌창한균 (Corynebacterium parvum) 을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 그와 같은 보조약은 또한 업계에 주지되어 있다.

[0133] 하이브리도마, 재조합, 및 파지 제시 기술, 또는 그들의 조합의 사용을 포함하여 업계에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 단일클론 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 업계에 공지되어 있고, 예를 들어, [Harlow 등, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)]; [Hammerling 등, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)] 에서 교시한 것들을 포함하는 하이브리도마 기술을 사용하여 단일클론 항체를 제조할 수 있다 (상기 참조문헌은 그 전체가 참조로 반영됨).

본원에서 사용할 때 "단일클론 항체" 는 하이브리도마 기술을 통해서 제조된 항체에 한정되지 않는다. "단일클론 항체" 라는 용어는 임의의 진핵생물성, 원핵생물성, 또는 파지 클론을 포함하여 단일 클론으로부터 유래된 항체를 가리키며, 그것이 제조되는 방법이 아니다. 따라서, "단일클론 항체" 라는 용어는 하이브리도마 기술을 통해서 제조된 항체에 한정되지 않는다. 단일클론 항체는 하이브리도마 및 재조합 및 파지 제시 기술의 사용을 포함하여 업계에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

[0134] 업계에 공인된 프로토콜을 사용하여, 한 가지 예로, 관련 항원 (예를 들어, 정제 Sp35 항원 또는 그와 같은 항원을 포함하는 세포 또는 세포성 추출물) 및 보조약을 다중 피하 또는 복막내 주입하여 포유류에서 항체를 키운다. 이런 면역조치는 전형적으로 활성화 비장림프구 또는 림프구로부터의 항원-반응성 항체의 생성을 포함하는 면역 반응을 이끌어 낸다. 생성된 항체를 동물 혈청으로부터 수확하여 다중클론성 제제를 얻을 수 있지만, 종종 비장, 림프절 또는 말초 혈액으로부터 개별 림프구를 분리하여, 단일클론 항체 (MAb) 의 균질 제제

를 얻는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 림프구를 비장으로부터 수득한다.

[0135] 이러한 주지된 방법 (Kohler 등, Nature 256:495 (1975)) 으로, 항원을 주입한 포유류로부터의 비교적 수명이 짧거나 필멸의 림프구를 불멸 종양 세포주 (예를 들어, 골수종 세포주) 와 융합시켜서, 불멸이며 B 세포의 유전적으로 코딩된 항체를 생성할 수 있는 하이브리드 세포 즉 "하이브리도마" 를 생성한다. 생성되는 하이브리드를, 단일 항체 형성용 특이적 유전자를 포함하는 각각의 개별 계통으로 선택, 희석, 및 재생장시켜, 단일 유전자 계통으로 분리시킨다. 그들은 원하는 항원에 대항하는 균질한 항체를 생성하며, 그들의 순수한 유전자 혈통과 관련하여, "단일클론성" 이라 칭한다.

[0136] 그렇게 제조한 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 비융합 모체 골수종 세포의 생장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적합한 배양 배지 내에서 접종 및 생장시킨다. 당업자는 하이브리도마의 형성, 선택 및 생장용 시약, 세포주 및 배지가 다수의 공급원으로부터 시판되며, 표준화된 프로토콜이 잘 확립되어 있음을 인식할 것이다. 일반적으로, 하이브리도마 세포가 생장하는 배양 배지를 원하는 항원에 대항하는 단일클론 항체 생성에 대해서 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해서 생성된 단일클론 항체의 결합 특이성을 면역침전, 방사면역측정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA) 과 같은 생체외 검정으로 측정한다. 하이브리도마 세포가, 원하는 특이성, 친화력 및/또는 활성의 항체를 생성한다고 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차로 서브클로닝시키고, 표준 방법 (Goding, Monoclonal Antibodies; Principles and Practice, Academic Press, pp 59-103 (1986)) 으로 생장시킨다. 서브클론에 의해서 분비된 단일클론 항체를, 예를 들어, 단백질-A, 하이드록실라파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 정제 절차로 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리할 수 있음을 추가로 인식할 것이다.

[0137] 특이적 에피토프를 인식하는 항체 단편을 공지의 기술로 생성할 수 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')2 단편을, 파파인 (Fab 단편 제조를 위함) 또는 펩신 (F(ab')2 단편 제조를 위함) 과 같은 효소를 사용하여, 면역글로불린 분자의 단백질가수분해적 절단에 의해 제조할 수 있다. F(ab')2 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 C_H1 도메인을 포함한다.

[0138] 당업자는 또한 DNA 암호화 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 항원 결합 부위) 이 또한 항체 파지 라이브러리로부터 유래될 수 있음을 인식할 것이다. 특히, 그와 같은 파지를 이용하여, 레파토리 또는 조합 항체 라이브러리 (예를 들어, 인간 또는 쥐과) 로부터 발현되는 항원-결합 도메인을 제시할 수 있다. 관심 있는 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지를, 예를 들어, 고형 표면 또는 비드에 결합 또는 포획된 항원 또는 표지 항원을 사용하여, 항원으로 선택 또는 확인할 수 있다. 이러한 방법에 사용하는 파지는 전형적으로는 파지 유전자 Ⅲ 또는 유전자 Ⅷ 단백질에 재조합적으로 융합되는 Fab, Fv 또는 디설파이드 안정화 Fv 항체 도메인으로 파지로부터 발현되는 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 필라멘트형 파지이다. 예시적 방법은, 예를 들어, EP 368 684 B1; U.S. 특허 5,969,108, [Hoogenboom, H.R. and Chames, Immunol. Today 27:371 (2000)]; [Nagy 등 Nat. Med. 8:801 (2002)]; [Huie 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682 (2001)]; [Lui 등, J. Mol. Biol. 315:1063 (2002)] 에 나와 있고, 이들 각각은 본원에 참조로 반영된다. 여러 간행물 (예를 들어, Marks 등, Bio/Technology 10:779-783 (1992)) 은 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서, 사슬 셔플링, 뿐만 아니라 복합 감염 및 생체내 재조합에 의한 고친화력 인간 항체의 생성을 기술한다. 또다른 구현예에서, 리보솜 제시를 사용하여 제시 플랫폼으로서 박테리오파지를 대체할 수 있다 (예를 들어, [Hanes 등, Nat. Biotechnol. 18:1287 (2000)]; [Wilson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750 (2001)]; 또는 [Irving 등, J. Immunol. Methods 248:31 (2001)] 참조). 더욱 또다른 구현예에서, 항체에 대하여 세포 표면 라이브러리를 선별할 수 있다 ([Boder 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701 (2000)]; [Daugherty 등, J. Immunol. Methods 243:211 (2000)]). 그와 같은 절차는 단일클론 항체의 분리 및 수반되는 클로닝에 있어서 전통적인 하이브리도마 기술에 대한 대안을 제공한다.

[0139] 파지 제시 방법에서, 기능적 항체 도메인이, 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 보유하는 파지 입자의 표면에 제시된다. 특히, V_H 및 V_L 영역을 암호화하는 DNA 서열을 동물 cDNA 라이브러리 (예를 들어, 인간 또는 쥐과 임파성 조직 cDNA 라이브러리) 또는 합성 cDNA 라이브러리로부터 증폭시킨다. 특정 구현예에서, V_H 및 V_L 영역을 암호화하는 DNA 를 scFv 링커로 PCR 에 의해서 함께 연결시키고, 파지미드 벡터로 클로닝시킨다 (예를 들어, pCANTAB 6 또는 pComb 3 HSS). 벡터를 대장균에서 전기천공시키고, 대장균을 헬퍼 파지로 감염시킨다. 이러한 방법에 사용한 파지는 전형적으로는 fd 및 M13 을 포함하는 필라멘트형 파지이고, V_H 및 V_L 영역은 보통 파지 유전자 Ⅲ 또는 유전자 Ⅷ 에 재조합적으로 융합된다. 관심 있는 항원 (즉, Sp35 폴리펩

티드 또는 그의 단편) 에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지를, 예를 들어, 고형 표면 또는 비드에 결합 또는 포획된 항원 또는 표지 항원을 사용하여, 항원으로 선택 또는 확인할 수 있다.

[0140] 항체를 만드는데 사용할 수 있는 파지 제시법의 추가의 예는 [Brinkman 등, J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995)]; [Ames 등, J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995)]; [Kettleborough 등, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994)]; [Persic 등, Gene 187:9-18 (1997)]; [Burton 등, Advances in Immunology 57:191-280 (1994)]; PCT 출원 No. PCT/GB91/01134; PCT 공개 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 U.S. 특허 No. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108 (이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 반영됨) 에 나와 있는 것들을 포함한다.

[0141] 상기 참조문헌에 기재되어 있는 바와 같이, 파지 선택 후, 그 파지로부터 항체 코딩 영역을 분리하고, 인간 항체, 또는 임의의 기타 원하는 항원 결합 단편을 포함하는 전항체를 생성하는데 사용하고, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 박테리아를 포함하는 임의의 원하는 숙주에서 발현시킬 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')2 단편을 재조합적으로 생성하기 위한 기술은 또한 PCT 공개 WO 92/22324; [Mullinax 등, BioTechniques 12(6):864-869 (1992)]; 및 [Sawai 등, AJRI 34:26-34 (1995)]; 및 [Better 등, Science 240:1041-1043 (1988)] (상기 참조문헌은 그 전체가 참조로 반영됨) 에 나와 있는 것들과 같이 업계에 공지된 방법을 사용하여 이용할 수 있다.

[0142] 단일-사슬 Fv 및 항체를 생성하는데 사용할 수 있는 기술의 예는 U.S. 특허 No. 4,946,778 및 5,258,498; [Huston 등, Methods in Enzymology 203:46-88 (1991)]; [Shu 등, PNAS 90:7995-7999 (1993)]; 및 [Skerra 등, Science 240:1038-1040 (1988)] 에 기재되어 있는 것들을 포함한다. 인간에서 항체의 생체내 사용 및 생체외 검출 검정을 포함하는 몇몇 용도에 있어서, 키메라, 인간화, 또는 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 키메라 항체는 항체의 여러 부분이 여러 동물 종으로부터 유래된 분자, 예컨대 쥐과 단일클론 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체이다. 키메라 항체 제조 방법은 업계에 알려져 있다. 예를 들어, [Morrison, Science 229:1202 (1985)]; [Oi 등, BioTechniques 4:214 (1986)]; [Gillies 등, J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989)]; U.S. 특허 No. 5,807,715; 4,816,567; 및 4,816397] 을 참조하며, 이것들은 그 전체가 본원에 참조로 반영된다. 인간화 항체는 비-인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 기본틀 영역을 갖는 원하는 항원에 결합하는 비-인간 종 항체로부터의 항체 분자이다. 종종, 인간 기본틀 영역에서의 기본틀 잔기를 CDR 공여체 항체로부터의 해당 잔기로 치환시킴으로써, 항원 결합이 변경, 바람직하게는 향상될 것이다. 이들 기본틀 치환은 업계에 주지된 방법에 의해서, 예를 들어, 특정 위치의 유다른 기본틀 잔기를 확인하기 위한 항원 결합 및 서열 비교에서 중요한 기본틀 잔기를 확인하기 위해서 CDR 및 기본틀 잔기의 상호작용을 모델링함으로써 확인할 수 있다. (예를 들어, Queen 등, U.S. 특허 No. 5,585,089; [Riechmann 등, Nature 332:323 (1988)] 을 참조하며, 이것들은 그 전체가 본원에 참조로 반영된다.) 항체는 예를 들어, CDR-이식 (EP 239,400; PCT 공개 WO 91/09967; U.S. 특허 No. 5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 덧댐 (veneering) 또는 재포장 (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; [Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)]; [Studnicka 등, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)]; [Roguska. 등, PNAS 91:969-973 (1994)]), 및 사슬 셔플링 (U.S. 특허 No. 5,565,332) 을 포함하는, 업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 인간화시킬 수 있다.

[0143] 인간 환자의 치료적 처리에 있어서는 완전 인간 항체가 특히 바람직하다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하여 앞서 기재한 파지 제시 방법을 포함하는 업계에 공지된 다양한 방법으로 만들 수 있다. 또한, U.S. 특허 No. 4,444,887 및 4,716,111; 및 PCT 공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741 을 참조하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 반영된다.

[0144] 인간 항체는 또한 기능적 내생성 면역글로불린을 발현시킬 수는 없지만, 인간 면역글로불린 유전자를 발현시킬 수 있는 유전자도입 마우스를 사용하여 생성할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체는 마우스 배아 줄기 세포에 무작위로 또는 상동 재조합에 의해서 도입될 수 있다. 다르게는, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자 이외에 인간 가변 영역, 불변 영역, 및 다양성 영역을 마우스 배아 줄기 세포에 도입시킬 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는, 상동 재조합에 의해서 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 동시에 또는 별도로 비-기능적이 될 수 있다. 특히, JH 영역의 동종접합 결손은 내생성 항체 생성을 저지한다. 변형된 배아 줄기 세포를 배반포가 되도록 확장 및 미세주입하여 키메라 마우스를 생성한

다. 이어서, 인간 항체를 발현시키는 동종접합 자손을 생성하도록 키메라 마우스를 키운다. 유전자도입 마우스를 선택된 항원, 예를 들어, 원하는 표적 폴리펩티드 일부 또는 전부로 정상 방식으로 면역시킨다. 종래의 하이브리도마 기술을 사용하여 상기의 면역시킨 유전자도입 마우스로부터, 항원에 대항하도록 유도된 단일클론 항체를 수득할 수 있다. 유전자도입 마우스가 품고 있는 인간 면역글로불린 도입유전자는 B-세포 분화 도중 재배열되고, 이어서 종류 전환 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 그와 같은 기술을 사용하여, 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생성하는 것이 가능하다. 인간 항체를 생성하기 위한 이런 기술을 총람하기 위해서, [Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)] 를 참조한다. 인간 항체 및 인간 단일클론 항체를 생성하기 위한 이런 기술 및 그와 같은 항체를 생성하기 위한 프로토콜의 상세한 검토를 위해서, 예를 들어, PCT 공개 WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; U.S. 특허 No. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 및 5,939,598 을 참조하며, 이것들은 그 전체가 본원에 참조로 반영된다. 또한, Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 및 GenPharm (San Jose, Calif.) 과 같은 회사를 이용하여, 앞서 기재한 것과 유사한 기술을 사용하여, 선택된 항원에 대항하도록 유도된 인간 항체를 얻을 수 있다.

[0145] "유도 선택 (guided selection)" 이라고 칭하는 기술을 사용하여, 선택된 에피토프를 인식하는 완전 인간 항체를 생성할 수 있다. 이런 접근법에서, 선택된 비-인간 단일클론 항체, 예를 들어, 마우스 항체를 사용하여, 동일한 에피토프를 인식하는 완전 인간 항체의 선택을 유도한다 (Jespers 등, Bio/Technology 12:899-903 (1988)). 또한, U.S. 특허 No. 5,565,332 를 참조한다.

[0146] 또다른 구현예에서, 종래의 절차를 사용하여, 원하는 단일클론 항체를 암호화하는 DNA 를 손쉽게 분리 및 서열화할 수 있다 (예를 들어, 쥐과 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 탐침을 사용). 분리 및 서브클로닝된 하이브리도마 세포는 그와 같은 DNA 의 바람직한 공급원으로서의 역할을 한다. 일단 분리되면, DNA 를 발현 벡터 속에 넣을 수 있고, 이어서 이것을 다르게는 면역글로불린을 생성하지 않는 대장균 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 원핵생물성 또는 진핵생물성 숙주 세포 속으로 핵산전달감염시킨다. 더욱 특히, 분리 DNA (본원에 기재하는 바와 같이 합성일 수 있음) 를 사용하여, 본원에 참조로 반영되며, 1995 년 1 월 25 일에 출원된, Newman 등의 U.S. 특허 No. 5,658,570 에 기재되어 있는 바와 같이 항체 제조용 불변 및 가변 영역 서열을 클로닝할 수 있다. 본질적으로, 이것은 선택한 세포로부터의 RNA 추출, cDNA 로의 전환, 및 Ig 특이적 프라이머를 사용하는 PCR 에 의한 증폭을 수반한다. 이를 위한 적합한 프라이머는 또한 U.S. 특허 No. 5,658,570 에 기재되어 있다. 아래에서 더욱 상세하게 검토하겠지만, 원하는 항체를 발현시키는 형질전환 세포를 비교적 대량으로 생장시켜서 면역글로불린을 임상적 및 상업적으로 공급할 수 있다.

[0147] 특정 구현예에서, 업계에 주지된 방법에 의해서, 예를 들어, 서열 과변이 영역을 결정하기 위한 다른 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 공지 아미노산 서열과의 비교에 의해서, 중 및/또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 검사하여 상보성 결정 영역 (CDR) 의 서열을 확인할 수 있다. 통상의 재조합 DNA 기술을 사용하여, 하나 이상의 CDR 을 기본틀 영역 내로, 예를 들어, 인간 기본틀 영역으로 삽입하여, 비-인간 항체를 인간화시킬 수 있다.

기본틀 영역은 자연발생적 또는 공통 기본틀 영역, 바람직하게는 인간 기본틀 영역일 수 있다 (예를 들어, 인간 기본틀 영역 목록에 있어서 [Chothia 등, J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998)] 참조). 바람직하게는, 기본틀 영역 및 CDR 의 조합으로 생기는 폴리뉴클레오티드가, 원하는 폴리펩티드, 예를 들어, Sp35 의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 암호화한다. 바람직하게는, 기본틀 영역 내에서 하나 이상의 아미노산을 치환할 수 있고, 바람직하게는, 그 아미노산 치환은 항체의 그것의 항원에 대한 결합을 향상시킨다.

추가로, 그와 같은 방법을 사용하여, 사슬내 디설파이드 결합에 관여하는 하나 이상의 가변 영역 시스테인 잔기의 아미노산을 치환 또는 결손시켜서, 하나 이상의 사슬내 디설파이드 결합이 결손된 항체 분자를 생성할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 기타 변경도 본 발명에 포함되며, 업계의 기술에 속한다.

[0148] 또한, 생물학적 활성이 적당한 인간 항체 분자로부터의 유전자와 함께 항원 특이성이 적당한 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 접합시켜서 "키메라 항체" 를 생성하기 위해서 개발된 기술 ([Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984)]; [Neuberger 등, Nature 312:604-608 (1984)]; [Takeda 등, Nature 314:452-454 (1985)]) 을 사용할 수 있다. 본원에서 사용할 때, 키메라 항체는 여러 부분이 여러 동물 종으로부터 유래된 분자, 예컨대 쥐과 단일클론 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 것들, 예를 들어, 인간화 항체이다.

[0149] 다르게는, 단일 사슬 항체의 생성에 대하여 기재한 기술 (U.S. 특허 No. 4,694,778; [Bird, Science 242:423-442 (1988)]; [Huston 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)]; 및 [Ward 등, Nature 334:544-

554 (1989)]) 을 채택하여 단일 사슬 항체를 생성할 수 있다. 단일 사슬 항체는, 아미노산 결합을 통해서 Fv 영역의 중쇄 및 경쇄 단편을 연결시켜 단일 사슬 항체가 되게 함으로써 형성된다. 대장균에서의 기능적 Fv 단편의 구축 기술을 또한 사용할 수 있다 (Skerra 등, Science 242:1038-1041 (1988)).

[0150] Sp35 길항제 항체는 또한 인간 항체 또는 내생성 면역글로불린을 생성할 수 없는 유전자도입 동물 (예를 들어, 마우스) 에서 생성한 실질적 인간 항체일 수 있다 (예를 들어, U.S. 특허 No. 6,075,181, 5,939,598, 5,591,669 및 5,589,369 를 참조하며, 이들 각각은 참조로 본원에 반영됨). 예를 들어, 키메라 및 배자계열 (germ line) 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역의 동종접합 결손은 내생성 항체 생성을 완전히 저해한다고 기재되어 있다. 인간 면역글로불린 유전자 배열의 이와 같은 배자계열 돌연변이 마우스로의 전이는 항원 도전시 인간 항체를 생성할 것이다. SCID 마우스를 사용하여 인간 항체를 생성하는 또다른 바람직한 수단이, 본원에 참조로 반영되는 U.S. 특허 No. 5,811,524 에 나와 있다. 이들 인간 항체와 결합된 유전자적 물질을 또한 본원에 기재한 바와 같이 분리 및 조작할 수 있음이 인식될 것이다.

[0151] 재조합 항체를 생성하는 매우 효율적인 더욱 또다른 수단이 [Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992)] 에 나와 있다. 특히, 이 기술은 원숭이 가변 도메인 및 인간 불변 서열을 포함하는 영장류화 항체를 생성한다. 이 참조문헌은 그 전체가 본원에 참조로 반영된다. 게다가, 이 기술은 또한 공중에 속한 U.S. 특허 No. 5,658,570, 5,693,780 및 5,756,096 에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 반영된다.

[0152] 또다른 구현예에서, 분리된 가변 영역 및 미세조작에 의해서 림프구를 선택할 수 있다. 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포를, 면역시킨 포유류로부터 분리하고, 생체외에서 약 7 일 동안 배양시킬 수 있다. 상기 배양물을 선별 기준을 충족시키는 특이적 IgG 에 대하여 선별할 수 있다. 양성 웰로부터 세포를 분리할 수 있다. 개별 Ig-생성 B 세포는, FACS 에 의해서 또는 보체-매개 용혈판 검정으로 그들을 동정하여 분리할 수 있다. Ig-생성 B 세포를 튜브 속으로 미세조작시킬 수 있고, 예를 들어, RT-PCR 을 사용하여 V_H 및 V_L 유전자를 증폭시킬 수 있다. V_H 및 V_L 유전자는 항체 발현 벡터로 클로닝될 수 있고, 발현을 위해서 세포 (예를 들어, 진핵생물성 또는 원핵생물성 세포) 속으로 핵산전달감염시킬 수 있다.

[0153] 다르게는, 당업자에게 주지된 기술을 사용하여 항체-생성 세포주를 선택 및 배양할 수 있다. 그와 같은 기술은 다양한 실험실용 매뉴얼 및 일차 문헌에 기재되어 있다. 이와 관련하여, 아래에 기재하는 바와 같이 본 발명에 사용하기에 적합한 기술이 [Current Protocols in Immunology, Coligan 등, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)] (부록 포함) 에 기재되어 있고, 이것은 그 전체가 참조로 본원에 반영된다.

[0154] 본원에 나와 있는 치료법에 사용하기 위한 항체는 항체 합성에 있어서 업계에 공지된 임의의 방법에 의해서, 특히, 화학적 합성에 의해서, 또는 바람직하게는 본원에 기재되어 있는 재조합 발현 기술에 의해서 생성될 수 있다.

[0155] 항원 결합 DNA 서열의 모든 대립유전자, 변이체 및 돌연변이가 본 발명의 범주에 더 포함됨이 추가로 인식될 것이다.

[0156] 주지된 바와 같이, RNA 는 구아니디늄 이소티오시아네이트 추출 및 침전에 이은 원심분리 또는 크로마토그래피와 같은 표준 기술에 의해서, 본래의 하이브리도마 세포로부터 또는 기타 형질전환 세포로부터 분리할 수 있다. 원하는 경우, 올리고 dT 셀룰로오스에서의 크로마토그래피와 같은 표준 기술에 의해서 전체 RNA 로부터 mRNA 를 분리할 수 있다. 적합한 기술은 업계에 잘 알려져 있다.

[0157] 한 가지 구현예에서, 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA 는, 주지의 방법에 따라 역전사효소 및 DNA 중합효소를 사용하여, 동시에 또는 별도로 만들 수 있다. 공통 불변 영역 프라이머로 또는 공표된 중쇄 및 경쇄 DNA 및 아미노산 서열에 기초한 더욱 특정한 프라이머로 PCR 을 개시할 수 있다. 상기 검토한 바와 같이, PCR 은 또한 항체 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 클론을 분리하는데 사용할 수 있다. 이런 경우, 공통 프라이머 또는 더 큰 상동 탐침, 예컨대 마우스 불변 영역 탐침으로 라이브러리를 선별할 수 있다.

[0158] DNA, 전형적으로 플라스미드 DNA 는 업계에 공지된 기술을 사용하여 세포로부터 분리하고, 예를 들어, 재조합 DNA 기술과 관련된 상기 참조문헌에 상세하게 나타나 있는 주지의 표준 기술에 따라서, 제한 매핑 및 서열화할 수 있다. 물론, DNA 는 분리 과정 또는 후속하는 분석 도중 임의의 지점에서 본 발명에 따른 합성일 수 있다.

[0159] 항체, 또는 그의 단편, 유도체 또는 유사체, 예를 들어, Sp35 길항제인 항체의 중쇄 또는 경쇄의 재조합형 발현

은 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 구축을 요한다. 일단 본 발명의 항체 분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 (바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 포함하는) 그의 일부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 수득하면, 항체 분자 생성용 벡터를 업계에 주지된 기술을 사용하여 재조합 DNA 기술로 생성할 수 있다. 이와 같이, 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 항체를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 당업자에게 주지된 방법을 사용하여 항체 코딩 서열 및 적당한 전사 및 번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어, 생체외 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 본 발명은, 따라서, 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는, 본 발명의 항체 분자, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 그와 같은 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고 (예를 들어, PCT 공개 WO 86/05807; PCT 공개 WO 89/01036; 및 U.S. 특허 No. 5,122,464 참조), 항체의 가변 도메인을 전체 중쇄 또는 경쇄 발현을 위한 그와 같은 벡터로 클로닝시킬 수 있다.

[0160] 발현 벡터를 종래의 기술로 숙주 세포에 전이시킨 후, 핵산전달감염 세포를 종래의 기술로 배양시켜서, 본원에 기재되어 있는 방법에 사용하기 위한 항체를 생성한다. 따라서, 본 발명은 이종 프로모터에 작동적으로 연결된, 본 발명의 항체, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 이중-사슬 항체의 발현에 대한 바람직한 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 모두를 암호화하는 벡터를 아래에 상술하는 바와 같이, 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위한 숙주 세포에서 공동발현시킬 수 있다.

[0161] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여, 본원에 기재하는 방법에 사용하기 위한 항체 분자를 발현시킬 수 있다. 그와 같은 숙주-발현 시스템은, 관심 있는 코딩 서열을 생성하고 이어서 정제할 수 있는 매개체를 나타낼 뿐만 아니라, 적당한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환 또는 핵산전달감염된 경우, 본 발명의 항체 분자를 그 자리에서 발현시킬 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은 미생물, 예컨대, 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아 (예를 들어, 대장균, 고초균); 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모 (예를 들어, 사카로미세스 (Saccharomyces), 피치아 (Pichia)); 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 바큘로바이러스) 로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 로 감염되거나, 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드) 로 형질전환된 식물 세포 시스템; 포유류 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 금속티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 레이트 프로모터; 우두바이러스 7.5K 프로모터) 를 포함하는 재조합 발현 구축물을 품은 포유류 세포 시스템 (예를 들어, COS, CHO, BLK, 293, 3T3 세포) 을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 바람직하게는, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위한, 대장균과 같은 박테리아 세포, 더욱 바람직하게는, 진핵생물성 세포를 재조합 항체 분자의 발현에 사용한다. 예를 들어, 포유류 세포 예컨대 중국 햄스터 난소 세포 (CHO) 는, 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 주요한 조기 발현 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께 효과적인 항체용 발현 시스템이다 ([Foecking 등, Gene 45:101 (1986)]; [Cockett 등, Bio/Technology 8:2 (1990)]).

[0162] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는, 발현시키려는 항체 분자에 의도되는 용도에 따라서 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자의 약학 조성물을 생성하기 위해서, 그와 같은 단백질을 대량으로 생성할 경우, 손쉽게 정제되는 높은 수준의 융합 단백질 산물의 발현에 관여하는 벡터가 바람직할 수 있다. 그와 같은 벡터는, 항체 코딩 서열을 lacZ 코딩 영역과 함께 인-프레임 벡터로 개별적으로 결찰시켜서, 융합 단백질을 생성할 수 있는 대장균 발현 벡터 pUR278 (Ruther 등, EMBO J. 2:1791 (1983)); pIN 벡터 ([Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985)]; [Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503- 5509 (1989)]); 등을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 또한, pGEX 벡터를 사용하여 글루타티온 S-전이효소 (GST) 로 융합 단백질로서 이종 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. 일반적으로, 그와 같은 융합 단백질은 가용성이며, 용해된 세포로부터, 기질 글루타티온-아가로오스 비즈에 대한 결합 및 흡착에 이어 유리 글루타티온의 존재 하에서의 용출에 의해서 손쉽게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 산물을 GST 부분으로부터 방출시키기 위해서 트롬빈 또는 인자 Xa 단백질분해효소 절단 부위를 포함하도록 고안된다.

[0163] 곤충 시스템에서, 오토그라파 칼리포니카 (Autographa californica) 핵 다각체형 바이러스 (AcNPV) 가 전형적으로 외래 유전자를 발현시키는 벡터로서 사용된다. 상기 바이러스는 거염벌레 (Spodoptera frugiperda) 세포 내에서 생장한다. 상기 항체 코딩 서열을 개별적으로 바이러스의 비-필수 영역 (예를 들어, 폴리헤드린 유전자) 로 클로닝시키고, AcNPV 프로모터 (예를 들어 폴리헤드린 프로모터) 의 제어 하에 둘 수 있다.

[0164] 포유류 숙주 세포에서, 다수의 바이러스계 발현 시스템을 이용할 수 있다. 아데노바이러스를 발현 벡터로서 사용하는 경우, 관심 있는 항체 코딩 서열을 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예를 들어, 레이트 프로모터 및 3원 선도 서열에 결찰시킬 수 있다. 이어서, 이런 키메라 유전자를 생체외 또는 생체내 재조합에 의해서 아데노바이러스 게놈에 삽입할 수 있다. 바이러스성 게놈의 비-필수 영역 (예를 들어, 영역 E1 또는 E3) 에의 삽입은 감염된 숙주에서 생존가능하며 항체 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 만들 것이다. (예를 들어, [Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)] 참조). 삽입된 항체 코딩 서열의 유효 번역에는 특이적 개시 신호 또한 필요하다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 게다가, 상기 개시 코돈은 전체 삽입물을 확실히 번역하기 위해서 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 일치해야 한다. 이들 외생성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 기원이 천연 및 합성으로 다양할 수 있다. 발현 효능은 적당한 전사 증강 요소, 전사 종결자 등을 포함시킴으로써 강화시킬 수 있다 ([Bittner 등, Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)] 참조).

[0165] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조정하고, 유전자 산물을 원하는 특정 방식으로 변형 및 처리하는 숙주 세포 계통을 선택할 수 있다. 그와 같은 단백질 산물의 변형 (예를 들어, 글리코실화) 및 처리 (예를 들어, 절단) 는 단백질의 기능에 있어서 중요할 수 있다. 여러 숙주 세포는 단백질 및 유전자 산물의 번역후 처리 및 변형에 있어서 특징적이고 특이적인 메카니즘을 갖는다. 발현되는 외래 단백질을 확실히 올바로 변형 및 처리하기 위해서 적당한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이를 위하여, 유전자 산물의 일차 전사, 글리코실화, 및 인산화의 적절한 처리를 위한 세포성 수단을 보유하는 진핵생물성 숙주 세포를 사용할 수 있다. 그와 같은 포유류 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, 그리고 특히, 예를 들어, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D 와 같은 유방암 세포주 및, 예를 들어, CRL7030 및 Hs578Bst 와 같은 정상 포유류 선 세포주를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0166] 재조합 단백질의 장기간의 고수율적 생성을 위해서는, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 항체 분자를 안정하게 발현시키는 세포주를 조작할 수 있다. 복제의 바이러스성 기원을 포함하는 발현 벡터를 사용하는 것보다는, 숙주 세포를 적당한 발현 제어 요소 (예를 들어, 프로모터, 증강인자, 서열, 전사 종결자, 아데닐중합체형성 부위 등) 및 선택성 표지자로 조절된 DNA 로 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA 의 도입에 이어, 조작한 세포를 영양강화 배지에서 1-2 일 동안 생장시킨 후, 선택 배지로 바꾼다. 재조합 플라스미드 내 선택성 표지자는 선택에 대한 저항성을 부여하며, 세포가 플라스미드를 그들의 염색체 속으로 안정하게 통합 및 생장시키고, 차례로 세포주로 클로닝 및 확장될 수 있는 부위를 형성하도록 해 준다. 유리하게는 이 방법을 사용하여 항체 분자를 안정하게 발현시키는 세포주를 조작할 수 있다.

[0167] 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제 (Wigler 등, Cell 11:223 (1977)), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실전이효소 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), 및 아데닌 포스포리보실전이효소 (Lowy 등, Cell 22:817 1980) 유전자를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는 다수의 선택 시스템을 사용할 수 있고, 각각 tk-, hgprt- 또는 aprt-세포에 이용할 수 있다. 또한, 하기 유전자에 있어서 선택의 근거로서 항대사물질 저항성을 사용할 수 있다: 메토트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 dhfr (Wigler 등, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); 미코페놀산에 대한 저항성을 부여하는 gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); 아미노글리코시드 G-418 에 대한 저항성을 부여하는 neo (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); 및 Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993);, TIB TECH 11(5):155-215 (May, 1993)); 및 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 hygro (Santerre 등, Gene 30:147 (1984)). 사용할 수 있는 재조합 DNA 기술 업계에 흔히 알려져 있는 방법이 [Ausubel 등 (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)]; [Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]; 및 [Chapters 12 and 13, Dracopoli 등. (eds), Current Prolocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)]; [Colberre-Garapin 등, J. Mol. Biol. 150:1 (1981)] (이들은 그 전체가 본원에 참조로 반영됨) 에 기재되어 있다.

[0168] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해서 증가시킬 수 있다 (검토를 위해서, [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, Vol. 3. (1987)] 을 참조함). 항체를 발현시키는 벡터 시스템내의 표지자가 증폭가능한 경우, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 저해자 수준이 증가하면 표지자 유전자의 복제수를 증가시킬 것이다. 증폭되는 영역이 항체 유전자와 연관되기 때문에, 항체 생성 또한 증가시킬 것이다

(Crouse 등, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

[0169] 숙주 세포는 본 발명의 두 발현 벡터인, 중쇄 유래 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 암호화하는 제 2 벡터로 공동-핵산전달감염시킬 수 있다. 상기 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 동등하게 발현시킬 수 있는 동일한 선택성 표지자를 포함할 수 있다. 다르게는, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두를 암호화하는 단일 벡터를 사용할 수 있다. 그와 같은 상황에서, 과도한 독성 유리 중쇄를 피하기 위해서, 유리하게는 중쇄 앞에 경쇄를 놓는다 (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). 중쇄 및 경쇄용 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 를 포함할 수 있다.

[0170] 일단 본 발명의 항체 분자를 재조합적으로 발현시키면, 그것을 면역글로불린 분자 정제에 있어서 업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피 (예를 들어, 이온교환, 친화력, 특히 단백질 A 후 특이적 항원에 대한 친화력, 및 사이징 (sizing) 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 분리 용해도에 의해서 또는 단백질 정제용 임의의 기타 표준 기술에 의해서 정제할 수 있다. 다르게는, 본 발명의 항체 친화력을 증가시키는 바람직한 방법이 US 2002 0123057 A1 에 나와 있다.

[0171] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 결합 분자 또는 항원 결합 분자는 하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전적으로 결손된 합성 불변 영역 ("도메인-결손 항체") 을 포함한다. 특정 구현예에서, 양립가능한 변형 항체는 전체 C_H2 도메인이 제거된 도메인 결손 구축물 또는 변이체 (ΔC_H2 구축물) 를 포함할 것이다. 기타 구현예에 있어서, 짧은 연결 펩티드를 결손 도메인에 대해서 치환하여 가변 영역의 유연성 및 이동 자유성을 제공한다. 당업자는 항체의 대사율에 대한 C_H2 도메인의 조절성에 기인하여 그와 같은 구축물이 특히 바람직함을 인식할 것이다.

[0172] 특정 구현예에서, 본원에 나와 있는 방법에 사용하기 위한 변형 항체는 미니바디이다. 미니바디는 업계에서 기술하는 방법으로 만들 수 있다 (예를 들어, US 특허 5,837,821 또는 WO 94/09817A1 참조).

[0173] 또다른 구현예에서, 본원에 나와 있는 방법에 사용하기 위한 변형 항체는 업계에 알려져 있는 C_H2 도메인 결손 항체이다. 도메인 결손 구축물은 IgG_1 인간 불변 도메인을 암호화하는 벡터 (예를 들어, Biogen IDEC Incorporated 로부터의 것) 를 사용하여 유도할 수 있다 (예를 들어, WO 02/060955A2 및 WO02/096948A2 참조). 이런 예시적 벡터를 조작하여 C_H2 도메인을 삭제하고, 도메인 결손 IgG_1 불변 영역을 발현시키는 합성 벡터를 얻었다.

[0174] 한 가지 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 항체 또는 그의 단편은, 단량체성 소단위 사이의 회합을 허용하는 한, 소수의 또는 심지어는 단일의 아미노산의 결손 또는 치환을 갖는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 예를 들어, C_H2 도메인의 선택 영역에서 단일 아미노산의 돌연변이는 실질적으로 Fc 결합을 감소시켜서 종양 국소화를 증가시키기에 충분할 수 있다. 유사하게는, 조정할 이펙터 기능 (예를 들어 보체 결합) 을 조절하는 하나 이상의 불변 영역 도메인의 상기 부분을 간단히 삭제하는 것이 바람직할 수 있다. 불변 영역의 그와 같은 부분적 결손은 항체의 선택된 특징 (혈청 반감기) 을 향상시키면서, 그대로인 대상 불변 영역 도메인과 관련된 기타의 바람직한 기능은 남겨둔다. 게다가, 상기에 언급한 바와 같이, 개시한 항체의 불변 영역은 생성된 구축물의 프로파일을 증강시키는 하나 이상의 아미노산의 치환 또는 돌연변이를 통한 합성일 수 있다. 이와 관련하여, 변형 항체의 구조 및 면역성 프로파일을 실질적으로 유지하면서, 보존된 결합 부위 (예를 들어 Fc 결합) 에 의해서 제공되는 활성을 붕괴시킬 수 있다. 또 다른 구현예는, 이펙터 기능과 같은 바람직한 특징을 증강시키거나 더 많은 세포독소 또는 탄수화물 결합을 제공하기 위해서, 불변 영역에 대한 하나 이상의 아미노산의 첨가를 포함한다. 그와 같은 구현예에서, 선택된 불변 영역 도메인으로부터 유래된 특이적 서열을 삽입 또는 복제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0175] 본 발명은 또한 Sp35 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편인, 본원에 기재되어 있는 항체 분자 (예를 들어, V_H 영역 및/또는 V_L 영역) 의 변이체 (유도체 포함) 를 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 항체의 사용을 제공한다. 당업자에게 공지된 표준 기술을 사용하여,결합 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 내에 돌연변이를 도입할 수 있고, 이것은 특정위치 돌연변이 및 PCR-매개 돌연변이를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않으며, 이들은 아미노산을 치환한다. 바람직하게는, 변이체 (유도체 포함) 는 기준 V_H 영역, V_HCDR1, V_HCDR2, V_HCDR3, V_L 영역, V_LCDR1, V_LCDR2, 또는 V_LCDR3 에 관하여 50 개 미만의 아미노산 치환, 40 개 미만의 아미노산 치환, 30 개 미만의 아미노산 치환, 25 개 미만의 아미노산 치환, 20 개 미만의 아미노산 치환, 15 개 미만의 아미노산 치환, 10 개 미만의 아미노산 치환, 5 개 미만

의 아미노산 치환, 4 개 미만의 아미노산 치환, 3 개 미만의 아미노산 치환, 또는 2 개 미만의 아미노산 치환을 암호화한다. "보존적 아미노산 치환" 은 아미노산 잔기가 유사 전하의 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 유사 전하의 측쇄를 갖는 아미노산 잔기류는 업계에 정의되어 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비전하 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘) 을 포함한다. 다르게는, 예컨대 포화 돌연변이에 의해서 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라서 무작위로 돌연변이를 도입할 수 있고, 생성된 돌연변이체는 생물학적 활성에 대하여 선별하여 활성을 보유하는 돌연변이체를 확인할 수 있다.

[0176] 예를 들어, 항체 분자의 CDR 영역에만 또는 기본틀 영역에만 돌연변이를 도입하는 것이 가능하다. 도입한 돌연변이는 침묵 또는 중립 미스센스 돌연변이일 수 있고, 즉, 항체의 항원 결합능에 대한 효과가 없거나 거의 없다. 이들 유형의 돌연변이는 코돈 사용을 최적화시키거나 하이브리도마의 항체 생성을 향상시키는데 유용할 수 있다. 다르게는, 비-중립 미스센스 돌연변이는 항체의 항원 결합능을 변경할 수 있다. 대부분의 침묵 및 중립 미스센스 돌연변이의 위치는 기본틀 영역 내이기 쉬운 반면, 대부분의 비-중립 미스센스 돌연변이의 위치는 CDR 내이기 쉽지만, 이것이 절대적인 필수사항은 아니다. 당업자는 항원 결합 활성에서의 변경 없음 또는 결합 활성에서의 변경 (예를 들어, 항원 결합 활성에서의 향상 또는 항체 특이성에서의 변화) 과 같은 원하는 성질의 돌연변이체 분자를 설계 및 시험할 수 있을 것이다. 돌연변이에 따라서, 암호화된 단백질은 일상적으로 발현될 수 있고, 암호화된 단백질의 기능적 및/또는 생물학적 활성을 본원에 기재되어 있는 기술을 사용하여 또는 업계에 공지된 기술을 통상적으로 변형시켜서 측정할 수 있다.

[0177] 융합 단백질 및 콘쥬게이트된 폴리펩티드 및 항체

[0178] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 폴리펩티드 및 항체를 추가로 이종 폴리펩티드에 N- 또는 C-말단에 재조합적으로 융합시키거나 폴리펩티드 또는 기타 조성물에 화학적으로 콘쥬게이트 (공유 및 비-공유 콘쥬게이션 포함) 시킬 수 있다. 예를 들어, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체를 검출 검정시 표지 및 이펙터 분자 예컨대 이종 폴리펩티드, 약물, 방사선핵종, 또는 독소로서 유용한 분자에 재조합적으로 융합 또는 콘쥬게이트시킬 수 있다. 예를 들어, PCT 공개 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. 특허 No. 5,314,995; 및 EP 396,387 을 참조한다.

[0179] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 폴리펩티드 및 항체는, 즉, 임의 유형의 분자의 공유결합에 의해서, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체가 Sp35 의 생물학적 기능의 저해를 저지하지 않도록 변형한 유도체를 포함한다. 예를 들어, 한정하려는 것은 아니고, 본 발명의 Sp35 길항제 폴리펩티드 및 항체는, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, peg화, 포스필화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도, 단백질 가수분해성 절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질에 대한 결합 등에 의해서 변형될 수 있다. 수많은 화학적 변형 중 어떠한 것도 특정 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는 공지 기술에 의해서 수행할 수 있다. 추가로, 상기 유도체는 하나 이상의 비-전형적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0180] 본원에 나와 있는 치료 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 폴리펩티드 및 항체는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합, 즉 펩티드 동배체에 의해서 서로 연결된 아미노산으로 구성될 수 있고, 20 개의 유전자-암호화 아미노산 이외의 아미노산을 포함할 수 있다. Sp35 길항제 폴리펩티드 및 항체는 번역후 과정과 같은 자연적 과정에 의해서, 또는 업계에 주지된 화학적 변형 기술에 의해서 변형될 수 있다. 그와 같은 변형은 기본서에 그리고 더욱 상세한 전공논문, 뿐만 아니라 방대한 연구 문헌에 잘 기재되어 있다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체 내 어디에서나 또는 탄수화물과 같은 부분에서 발생할 수 있다. 주어진 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체 내의 여러 부위에서 동일한 또는 다양한 정도로 동일 유형의 변형이 존재할 수 있음을 인식하게 될 것이다. 또한, 주어진 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체는 많은 유형의 변형을 포함할 수 있다. Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체는, 예를 들어, 유비퀴틴화의 결과로서 분지될 수 있고, 그것들은 분지되거나 분지되지 않은 환형일 수 있다. 환형, 분지형, 및 분지형 환형 Sp35 길항제 폴리펩티드 및 항체가 자연적 번역후 과정으로부터 생길 수 있고, 또는 합성법에 의해서 만들어질 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합, 헴 부분의 공유결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합, 포스포티딜이노시톨의 공유결합, 교차결합, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 교차결합의

형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 아이오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, peg화, 단백질가수분해 과정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르지닐레이션과 같은 아미노산의 단백질로의 전이-RNA 매개 첨가, 및 유비퀴틴화를 포함한다 (예를 들어, [Proteins - Structure And Molecular Properties, T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993)]; [Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983)]; [Seifter 등, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990)]; [Rattan 등, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)] 참조).

[0181] 본 발명은 또한 Sp35 기능을 저해하는 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체 융합물을 포함하거나, 그것으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어지는 융합 단백질을 제공한다. 바람직하게는, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체가 융합되는 이종 폴리펩티드는 기능에 있어서 유용하고, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체 표적화에 유용하다. 본 발명의 특정 구현예에서, 가용성 Sp35 길항제 폴리펩티드, 예를 들어, LRR 도메인, Ig 도메인, 또는 전체 세포외 도메인 (서열 번호: 2 의 아미노산 34 내지 532 에 해당) 을 포함하는 Sp35 폴리펩티드를 이종 폴리펩티드 부분에 융합시켜서 Sp35 길항제 융합 폴리펩티드를 형성한다. Sp35 길항제 융합 단백질 및 항체를 사용하여 다양한 목적, 예를 들어, 혈청 반감기 증가, 생체이용성 향상, 특이적 기관 또는 조직형에 대한 생체내 표적화, 재조합 발현 효능의 향상, 숙주 세포 분비 향상, 정제 용이성, 및 더 높은 결합력을 이룰 수 있다. 달성할 목적(들)에 따라, 이종 부분은 비활성 또는 생물학적으로 활성일 수 있다. 또한, 그것은 생체외 또는 생체내에서 절단가능하도록 또는 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 안정하게 융합되도록 선택될 수 있다. 이들 기타 목적을 이루기 위한 이종 부분은 업계에 공지되어 있다.

[0182] Sp35 길항제 융합 폴리펩티드 또는 항체의 발현에 대한 대안으로서, 선택된 이종 부분을 미리형성하고 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 화학적으로 콘쥬게이트시킬 수 있다. 대부분의 경우, 선택된 이종 부분은 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 융합되던 또는 콘쥬게이트되던, 유사하게 기능할 것이다. 따라서, 하기의 이종 아미노산 서열의 검토에서, 달리 지적하지 않는다면, 이종 서열은 융합 단백질 형태로 또는 화학적 콘쥬게이트로서 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 연결될 수 있다.

[0183] 약리학적으로 활성인 폴리펩티드 예컨대 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체는 종종 급속한 생체내 제거를 보이기 때문에, 체내에서 치료적으로 효과적인 농도를 달성하기 위해서 많은 투여량을 요한다. 또한, 약 60 kDa 미만의 폴리펩티드는 잠재적으로 사구체여과를 겪으며, 이는 때때로 신독성에 이르게 된다. Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체와 같은 비교적 작은 폴리펩티드의 융합 또는 콘쥬게이션을 이용하여 그와 같은 신독성의 위험성을 감소시키거나 피할 수 있다. 치료적 폴리펩티드의 생체내 안정성, 즉, 혈청 반감기를 증가시키기 위한, 다양한 이종 아미노산 서열, 즉, 폴리펩티드 부분 또는 "담체" 가 공지되어 있다.

[0184] 본질적으로 전장 인간 혈청 알부민 (HSA), 또는 HSA 단편은, 그것의 긴 반감기, 넓은 생체내 분포, 및 효소적 또는 면역학적 기능의 결핍에 기인하여, 흔히 이종 부분으로 사용한다. [Yeh 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1904-08 (1992)] 및 [Syed 등, Blood 89-3243-52 (1997)] 에서 교시한 것들과 같은 방법 및 물질의 적용을 통해서, HSA 를 사용하여, 예를 들어, 10-배 내지 100-배 더 높은, 상당히 증가된 생체내 안정성을 보이면서, Sp35 부분을 이용하여 약리학적 활성을 나타내는 Sp35 길항제 융합 폴리펩티드 또는 항체 또는 폴리펩티드/항체 콘쥬게이트를 형성할 수 있다. HSA 의 C-말단을 가용성 Sp35 부분의 N-말단에 융합시킬 수 있다. HSA 는 자연적으로 분비되는 단백질이기 때문에, 융합 단백질이 진핵생물성, 예를 들어, 포유류 발현 시스템에서 생성되는 경우, HSA 신호 서열을 이용하여, 가용성 Sp35 융합 단백질을 세포 배양 배지로 분비시킬 수 있다.

[0185] 신호 서열은 세포질 그물 막을 가로지르는 단백질 수송을 개시하는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다. 면역성퓨진 (immunofusin) 구축에 유용한 신호 서열은 항체 경쇄 신호 서열, 예를 들어, 항체 14.18 (Gillies 등, J. Immunol. Meth. 125:191-202 (1989)), 항체 중쇄 신호 서열, 예를 들어, MOPC141 항체 중쇄 신호 서열 (Sakano 등, Nature 286:5774 (1980)) 을 포함한다. 다르게는, 기타 신호 서열을 사용할 수 있다. 예를 들어, [Watson, Nucl. Acids Res. 12:5145 (1984)] 를 참조한다. 신호 펩티드는 보통 신호 펩티다제에 의해서 세포질 그물의 관내강에서 절단된다. 이것은 Fc 영역 및 가용성 Sp35 부분을 포함하는 면역성퓨진 단백질을 분비시킨다.

[0186] 일부 구현예에서, DNA 서열은 분비 카세트 및 가용성 Sp35 부분 사이의 단백질가수분해성 절단 부위를 암호화할 수 있다. 그와 같은 절단 부위는, 예를 들어, 암호화된 융합 단백질의 단백질가수분해성 절단을 제공하여, 표적 단백질로부터 Fc 도메인을 분리시킬 수 있다. 유용한 단백질가수분해성 절단 부위는 트립신, 플라스민, 트롬빈, 인자 Xa, 또는 엔테로키나아제 K 와 같은 단백질가수분해성 효소로 인식되는 아미노산 서열

을 포함한다.

[0187] 분비 카세트는 복제성 발현 벡터 속으로 통합시킬 수 있다. 유용한 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드 등을 포함한다. 예시적 발현 벡터는 pdC 이고, 여기서는 면역성퓨진 DNA 의 전사가 인간 사이토메갈로바이러스의 증강인자 및 프로모터의 조절 하에 놓인다. 예를 들어, [Lo 등, Biochim. Biophys. Acta 1088:712 (1991)]; 및 [Lo 등, Protein Engineering 11:495-500 (1998)] 을 참조한다. 적당한 숙주 세포를 가용성 Sp35 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 로 형질전환 또는 핵산전달감염시키고, 가용성 Sp35 폴리펩티드의 발현 및 분비에 사용할 수 있다. 전형적으로 사용되는 숙주 세포는 불멸성 하이브리도마 세포, 골수종 세포, 293 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, Hela 세포, 및 COS 세포를 포함한다.

[0188] 한 가지 구현예에서, 가용성 Sp35 폴리펩티드를 경첩 및 Fc 영역, 즉, Ig 중쇄 불변 영역의 C-말단 부분에 융합시킨다. Sp35-Fc 융합의 잠재적 장점은 용해도, 생체내 안정성, 및 다가, 예를 들어, 이량체화를 포함한다. 사용하는 Fc 영역은 IgA, IgD, 또는 IgG Fc 영역 (경첩-C_H2-C_H3) 일 수 있다. 다르게는, IgE 또는 IgM Fc 영역 (경첩-C_H2-C_H3-C_H4) 일 수 있다. IgG Fc 영역, 예를 들어, IgG_1 Fc 영역 또는 IgG_4 Fc 영역을 일반적으로 사용한다. 한 가지 구현예에서, IgG Fc 를 화학적으로 정의하는 파파인 절단 부위 바로 상류의 경첩 영역에서 시작하는 서열 (즉, 잔기 216, Kabat 시스템에 따라 중쇄 불변 영역의 제 1 잔기를 114 로 함), 또는 기타 면역글로불린의 유사 부위를 융합에 사용한다. 융합시키는 정확한 부위는 결정적이지 않으며; 특정 부위는 주지되어 있고 분자의 생물학적 활성, 분비, 또는 결합 특징을 최적화시키도록 선택할 수 있다. Fc 융합물을 암호화하는 DNA 를 구축 및 발현시키기 위한 물질 및 방법은 업계에 공지되어 있고, 과도한 실험 없이, 가용성 Sp35 융합물을 수득하는데 적용할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예는 Capon 등, U.S. 특허 No. 5,428,130 및 5,565,335 에 기재되어 있는 것들과 같은 Sp35 융합 단백질을 이용한다.

[0189] 완전 비손상 야생형 Fc 영역은 본 발명의 방법에 사용하는 Fc 융합 단백질에는 보통 필요하지 않고 바람직하지 못한 이펙터 기능을 나타낸다. 따라서, 특정 결합 부위는 전형적으로, 분비 카세트의 구축 동안 Fc 영역으로부터 삭제된다. 예를 들어, 경쇄와의 공동발현은 불필요하기 때문에, 중쇄 결합 단백질용 결합 부위, Bip (Hendershot 등, Immunol. Today 8:111-14 (1987)) 를, 이 부위가 면역성퓨진의 효율적인 분비를 방해하지 않도록, IgE 의 Fc 영역의 C_H2 도메인으로부터 삭제한다. 막통과 도메인 서열, 예컨대 IgM 에 존재하는 것들 또한 일반적으로 삭제된다.

[0190] IgG_1 Fc 영역이 가장 흔히 사용된다. 다르게는, 면역글로불린 감마 (감마-2, 감마-3 및 감마-4) 의 기타 하위부류의 Fc 영역을 분비 카세트에 사용할 수 있다. 면역글로불린 감마-1 의 IgG_1 Fc 영역은 일반적으로 분비 카세트에서 사용되며, 경첩 영역, C_H2 영역, 및 C_H3 영역의 일부 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 감마-1 의 Fc 영역은 C_H2-결손-Fc 이며, 이것은 경첩 영역 및 C_H3 영역 부분을 포함하지만, C_H2 영역은 포함하지 않는다. C_H2-결손-Fc 는 [Gillies 등, Hum. Antibod. Hvbridomas 1:47 (1990)] 에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, IgA, IgD, IgE, 또는 IgM 중 하나의 Fc 영역을 사용한다.

[0191] Sp35-Fc 융합 단백질은 여러 가지 다른 구조로 구축할 수 있다. 한 가지 구조에서, 가용성 Sp35 부분의 C-말단을 Fc 경첩 부분의 N-말단에 직접 융합시킨다. 약간 다른 구조에서는, 짧은 폴리펩티드, 예를 들어, 2-10 개의 아미노산을, 가용성 Sp35 부분의 N-말단 및 Fc 부분의 C-말단 사이의 융합물에 통합시킨다. 그와 같은 링커는 형태적 유연성을 제공하며, 이것은 일부 경우에 있어서 생물학적 활성을 향상시킬 수 있다. 경첩 영역의 충분한 부분이 Fc 부분에 포함되며, Sp35-Fc 융합물은 이량체화하여 2가 분자를 형성할 것이다. 단량체성 Fc 융합물의 상동 모집단은 단일특이적, 2가 이량체를 수득할 것이다. 각각 특이성이 다른 두 단량체성 Fc 융합물의 혼합물은 이중특이적, 2가 이량체를 수득할 것이다.

[0192] 상응하는 아미노-반응성 기 및 티올-반응성 기를 포함하는 다수의 교차-링커 중 임의의 것을 사용하여 Sp35 길항제 폴리펩티드를 혈청 알부민에 연결시킬 수 있다. 적합한 링커의 예는 티올-반응성 말레이미드를 삽입하는 아민 반응성 교차-링커, 예를 들어, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, 및 GMBS 를 포함한다. 기타 적합한 링커는 티올-반응성 할로아세테이트기를 삽입한다 (예를 들어, SBAP, SIA, SIAB). 설프히드릴기와의 반응을 위한 보호 또는 비-보호 티올을 제공하여 환원성 결합을 생성하는 링커는 SPDP, SMPT, SATA, 및 SATP 를 포함한다. 그와 같은 시약은 시판된다 (예를 들어, Pierce Chemicals).

[0193] 콘쥬게이션은 혈청 알부민에 티올 부분 또는 가용성 Sp35 폴리펩티드의 N-말단을 수반할 필요가 없다. 예를 들어, 가용성 Sp35-알부민 융합물은, 가용성 Sp35 부분을 혈청 알부민 유전자에 N-말단, C-말단, 또는 둘 다에

융합시키는 유전자조작 기술을 사용하여 수득할 수 있다.

[0194] 가용성 Sp35 폴리펩티드를 이종 펩티드에 융합시켜 가용성 Sp35 부분의 정제 또는 동정을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 히스티딘 표지를 가용성 Sp35 폴리펩티드에 융합시켜서, 시판되는 크로마토그래피 수단을 사용하여 정제를 용이화시킬 수 있다.

[0195] 본 발명의 일부 구현예에서, 가용성 Sp35 융합 구축물을 사용하여 박테리아에서 가용성 Sp35 부분의 제조를 증강시킨다. 그와 같은 구축물에서, 보통 높은 수준으로 발현되고/되거나 분비된 박테리아성 단백질을 가용성 Sp35 폴리펩티드의 N-말단 융합 파트너로서 이용한다. 예를 들어, [Smith 등, Gene 67:31 (1988)]; [Hopp 등, Biotechnology 6:1204 (1988)]; [La Vallie 등, Biotechnology 11:187 (1993)] 을 참조한다.

[0196] 적합한 융합 파트너의 아미노 및 카르복시 말단에서 가용성 Sp35 부분을 융합시켜, 가용성 Sp35 폴리펩티드의 2가 또는 4가 형태를 수득할 수 있다. 예를 들어, 가용성 Sp35 부분을 Ig 부분의 아미노 및 카르복시 말단에 융합시켜서 두 가용성 Sp35 부분을 포함하는 2가 단량체성 폴리펩티드를 생성할 수 있다. Ig 부분을 이용하여, 이러한 두 단량체를 이량체화시킬 때, 가용성 Sp35 단백질의 4가 형태가 수득된다. 그와 같은 다가 형태를 사용하여 표적에 대한 결합 친화력을 증가시킬 수 있다. 가용성 Sp35 부분을 일렬로 놓아서 콘카타머 (concatamer) 를 형성함으로써 가용성 Sp35 의 다가 형태를 또한 수득할 수 있으며, 이것을 단독으로 이용하거나 Ig 또는 HSA 와 같은 융합 파트너에 융합시킬 수 있다.

[0197] (폴리펩티드 이외의) 콘쥬게이트된 중합체

[0198] 본 발명의 일부 구현예는, 하나 이상의 중합체가 Sp35 폴리펩티드 또는 항체에 콘쥬게이트 (공유결합) 된 가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 Sp35 항체를 포함한다. 그와 같은 콘쥬게이션에 적합한 중합체의 예는 (상기 검토한) 폴리펩티드, 당 중합체 및 폴리알킬렌 글리콜 사슬을 포함한다. 전형적으로, 그러나 반드시 그런 것은 아니고, 하기 중 하나 이상을 향상시키기 위해서, 가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 Sp35 항체에 중합체를 콘쥬게이트시킨다: 용해도, 안정성, 또는 생체이용성.

[0199] Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 콘쥬게이션시키는데 일반적으로 사용하는 중합체 부류는 폴리알킬렌 글리콜이다. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 이 가장 빈번하게 사용된다. PEG 부분, 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 PEG 중합체를 각각의 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 콘쥬게이트시켜서, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체 단독에 비하여, 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. PEG 부분은 비-항원성이며, 본질적으로는 생물학적으로 비활성이다. 본 발명의 실행에 사용하는 PEG 부분은 분지형 또는 비분지형일 수 있다.

[0200] Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 결합되는 PEG 부분의 수 및 개별 PEG 사슬의 분자량은 바뀔 수 있다. 일반적으로, 중합체 분자량이 클수록, 더 적은 중합체 사슬이 폴리펩티드에 결합된다. 보통, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 결합되는 전체 중합체 질량은 20 kDa 내지 40 kDa 이다. 따라서, 하나의 중합체 사슬이 결합된 경우, 그 사슬의 분자량은 일반적으로 20-40 kDa 이다. 두 사슬이 결합된 경우, 각 사슬의 분자량은 일반적으로 10-20 kDa 이다. 세 사슬이 결합된 경우, 분자량은 일반적으로 7-14 kDa 이다.

[0201] 중합체, 예를 들어, PEG 는 폴리펩티드에 있는 임의의 적합한 노출된 반응성 기를 통해서 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 결합될 수 있다. 노출된 반응성 기(들)는, 예를 들어, 내부 리신 잔기의 N-말단 아미노기 또는 엡실론 아미노기, 또는 둘 다일 수 있다. 활성화된 중합체는 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 있는 임의의 유리 아미노기에서 반응하고 공유결합될 수 있다. (만약 있다면) Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체의 유리 카르복실기, 적합하게는 활성화된 카르보닐기, 히드록실, 구아니딜, 이미다졸, 산화 탄수화물 부분 및 메르캅토기를 또한 중합체 결합용 반응성 기로서 사용할 수 있다.

[0202] 콘쥬게이션 반응에서, 폴리펩티드 농도에 따라서, 폴리펩티드 몰 당 약 1.0 내지 약 10 몰의 활성화된 중합체를 전형적으로 이용한다. 보통, 선택되는 비는 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체의 원하는 약리학적 활성을 손상시킬 수 있는 부반응 (종종 비-특이적) 을 최소화시키면서 반응을 최대화시키는 것 사이의 균형을 나타낸다. 바람직하게는, Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체의 적어도 50% 의 생물학적 활성 (예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 업계에 공지된 임의의 검정에서 입증된 바와 같음) 이 보유되며, 가장 바람직하게는 거의 100% 가 보유된다.

[0203] 통상의 화학을 사용하여 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체에 중합체를 콘쥬게이트시킬 수 있다. 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜 부분을 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체의 리신 엡실론 아미노기에 커플링시킬 수 있다. N-히드록실숙신이미드 (NHS) 활성 에스테르 예컨대 PEG 숙신이미딜 숙시네이트 (SS-PEG) 및 숙신이미딜 프로피오네이트 (SPA-PEG) 를 사용하여 리신 측쇄에 대한 결합을 수행할 수 있다. 적합한 폴리알킬렌 글

리콜 부분은, 예를 들어, 카르복시메틸-NHS 및 노르류신-NHS, SC 를 포함한다. 이들 시약은 시판된다. 추가의 아민-반응성 PEG 링커를 숙신이미딜 부분에 대체할 수 있다. 이들은, 예를 들어, 이소티오시아네이트, 니트로페닐카르보네이트 (PNP), 에폭시드, 벤조트리아졸 카르보네이트, SC-PEG, 트레실레이트, 알데히드, 에폭시드, 카르보닐이미다졸 및 PNP 카르보네이트를 포함한다. 보통 반응 선택성 및 정도를 최대화시키도록 조건을 최적화시킨다. 그와 같은 반응 조건의 최적화는 업계의 통상의 기술 내에 속한다.

[0204] PEG화는 업계에 공지된 임의의 PEG화 반응으로 수행할 수 있다. 예를 들어, [Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992)], 및 유럽 특허 출원 EP 0 154 316 및 EP 0 401 384 를 참조한다. PEG화는 반응성 폴리에틸렌 글리콜 분자 (또는 유사 반응성 수용성 중합체) 와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 사용하여 수행할 수 있다.

[0205] 아실화에 의한 PEG화는 일반적으로 폴리에틸렌 글리콜의 활성 에스테르 유도체를 반응시키는 것을 포함한다. 임의의 반응성 PEG 분자를 PEG화에 이용할 수 있다. N-히드록시숙신이미드 (NHS) 에 에스테르화된 PEG 가 빈번하게 사용되는 활성화된 PEG 에스테르이다. 본원에서 사용할 때, "아실화" 는 치료적 단백질 및 수용성 중합체 예컨대 PEG 사이의 하기 유형의 결합을 제한 없이 포함한다: 아미드, 카르바메이트, 우레탄 등. 예를 들어, [Bioconjugate Chem. 5:133-140, 1994] 를 참조한다. 반응 변수는 일반적으로 가용성 Sp35 폴리펩티드를 손상 또는 비활성화시킬 온도, 용매, 및 pH 조건을 피하도록 선택된다.

[0206] 일반적으로, 상기 연결 결합은 아미드이고, 전형적으로 생성되는 산물의 95% 이상은 1-, 2- 또는 3-PEG화된다. 그러나, PEG화도가 더 큰 일부 종을, 사용하는 특정 반응 조건에 좌우되는 양으로 형성할 수 있다. 임의로, 예를 들어, 투석, 염석, 초여과, 이온교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 소수성 교환 크로마토그래피, 및 전기영동을 포함하는 종래의 정제 방법에 의해서 혼합물, 특히 미반응 종으로부터 정제 PEG화 종을 분리한다.

[0207] 알킬화에 의한 PEG화는 일반적으로 환원제의 존재 하에 PEG 의 말단 알데히드 유도체를 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체와 반응시키는 것을 포함한다. 또한, 실질적으로는 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체의 N-말단 아미노기에서만 PEG화, 즉, 1-PEG화 단백질에 유리하도록 반응 조건을 조작할 수 있다. 1-PEG화 또는 다중-PEG화의 경우, PEG 기는 전형적으로는 $-C_H2-NH-$ 기를 통해서 단백질에 결합된다. 특히 $-C_H2-$ 기와 관련하여, 이런 유형의 결합은 "알킬" 연결로 알려져 있다.

[0208] N-말단 표적화 1-PEG화 산물을 생성하기 위한 환원성 알킬화를 통한 유도체화는 유도체화에 이용가능한 여러 유형의 일차 아미노기 (N-말단에 대한 리신) 의 차등 반응성을 이용한다. 단백질의 N-말단 아미노기에서와 리신 잔기의 엡실론-아미노기 사이의 pKa 차를 이용할 수 있는 pH 에서 반응을 수행한다. 그와 같은 선택적 유도체화에 의해서, 알데히드와 같은 반응성 기를 포함하는 수용성 중합체의 단백질에 대한 결합을 조절하고: 중합체와의 콘쥬게이션은 단백질의 N-말단에서 우세하게 발생하며, 기타 반응성 기, 예컨대 리신 측쇄 아미노기에서는 어떠한 상당한 변형도 일어나지 않는다.

[0209] 아실화 및 알킬화 접근법 모두에 사용하는 중합체 분자는 수용성 중합체 중에서 선택한다. 선택되는 중합체는 전형적으로 단일 반응성 기, 예컨대 아실화에 있어서는 활성 에스테르 또는 알킬화에 있어서는 알데히드를 갖도록 변형시켜서, 본 방법에서 제공하는 바와 같이 중합도를 조절할 수 있다. 예시적 반응성 PEG 알데히드는 수 안정적인 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 또는 그의 단일 C1-C10 알콕시 또는 아릴옥시 유도체이다 (예를 들어, Harris 등, U.S. 특허 No. 5,252,714 참조). 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 아실화 반응에 있어서, 선택되는 중합체(들)는 전형적으로는 단일 반응성 에스테르기를 갖는다. 환원성 알킬화에 있어서, 선택되는 중합체(들)는 전형적으로는 단일 반응성 알데히드기를 갖는다. 일반적으로, 수용성 중합체는 자연발생적 글리코실 잔기로부터 선택되지는 않을 것인데, 이들은 보통 포유류 재조합체 발현 시스템으로 더욱 편리하게 만들어지기 때문이다.

[0210] PEG화 가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 항체 제조 방법은 일반적으로 (a) Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체를 폴리에틸렌 글리콜 (예컨대 PEG 의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체) 을, 상기 분자가 하나 이상의 PEG 기에 결합되는 조건 하에 반응시키는 단계, 및 (b) 반응 산물(들)을 수득하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 아실화 반응에 있어서 최적의 반응 조건은 공지의 변수 및 원하는 결과를 기준으로 건별로 결정될 것이다. 예를 들어, PEG 대 단백질의 비가 클수록, 일반적으로 다중-PEG화 산물의 백분율이 더 커진다.

[0211] 실질적으로 단일-중합체/가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 Sp35 항체의 상동 모집단을 생성하는 환원성 알킬화는 일반적으로 하기의 단계를 포함한다: (a) 가용성 Sp35 단백질 또는 폴리펩티드를, 폴리펩티드 또는 항체의 N-말단

아미노기의 선택적 변형에 적합한 pH 에서 환원성 알킬화 조건 하에 반응성 PEG 분자와 반응시키는 단계; 및 (b) 반응 산물(들)을 수득하는 단계.

[0212] 실질적으로 단일-중합체/가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 Sp35 항체의 상동 모집단에 대하여, 환원성 알킬화 반응 조건은 수용성 중합체 부분을 폴리펩티드 또는 항체의 N-말단에 선택적으로 결합시키는 조건이다. 그와 같은 반응 조건은 일반적으로 리신 측쇄 아미노기 및 N-말단 아미노기 사이의 pKa 차에 대비한다. 본 발명의 목적상, 상기 pH 는 일반적으로 3-9, 전형적으로는 3-6 의 범위이다.

[0213] 가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 항체는 표지, 예를 들어, 단백질 가수분해에 의해서 이후에 방출될 수 있는 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 리신 부분은 리신 및 N-말단 모두와 반응한 후 His 표지를 방출시킬 트라우트 (Traut's) 시약 (Pierce) 과 같은 저분자량 링커로 변형시킨 His-표지를 우선 반응시켜서 선택적으로 변형시킬 수 있다. 이때, 상기 폴리펩티드는 말레이미드기, 비닐설폰기, 할로아세이트기, 또는 유리 또는 보호 SH 와 같은 티올-반응성 헤드기를 포함하는 PEG 로 선택적으로 변형시킬 수 있는 유리 SH 기를 포함할 것이다.

[0214] 트라우트 시약은 PEG 결합을 위한 특이적 부위를 설정할 임의의 링커로 대체할 수 있다. 예를 들어, 트라우트 시약은 SPDP, SMPT, SATA, 또는 SATP (Pierce) 로 대체할 수 있다. 유사하게는 단백질을, 말레이미드 (예를 들어 SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, 또는 GMBS), 할로아세테이트기 (SBAP, SIA, SLAB), 또는 비닐설폰기를 삽입하는 아민-반응성 링커와 반응시키고, 생성된 산물을 유리 SH 를 포함하는 PEG 와 반응시킬 수 있다.

[0215] 일부 구현예에서, 폴리알킬렌 글리콜 부분을 Sp35 길항제 폴리펩티드 또는 항체의 시스테인기와 커플링시킨다. 예를 들어, 말레이미드기, 비닐설폰기, 할로아세테이트기, 또는 티올기를 사용하여 커플링시킬 수 있다.

[0216] 임의로는, 가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 항체를 불안정 결합을 통해서 폴리에틸렌-글리콜 부분에 콘쥬게이트시킨다. 불안정 결합은, 예를 들어, 생화학적 가수분해, 단백질 가수분해, 또는 설프히드릴 절단으로 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 결합은 생체내 (생리학적) 조건 하에서 절단될 수 있다.

[0217] 상기 반응은, 반응성 기가 N-말단에서의 알파 아미노기에 있는 경우, 일반적으로 약 pH 5-8, 예를 들어, pH 5, 6, 7, 또는 8 에서 생물학적 활성 물질을 비활성 중합체와 반응시키는데 사용되는 임의의 적합한 방법으로 행할 수 있다. 일반적으로 상기 방법은 활성화된 중합체를 제조한 다음, 단백질을 그 활성화된 중합체와 반응시켜서 제형에 적합한 가용성 단백질을 생성하는 것을 포함한다.

[0218] Sp35 폴리뉴클레오티드 길항제

[0219] 특정 구현예는 Sp35 를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 핵산 분자를 포함하는 Sp35 폴리뉴클레오티드 길항제 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 탈수초화 또는 수초발육부전 장애의 치료 방법을 포함한다. Sp35 폴리뉴클레오티드 길항제는 Sp35 의 발현을 방지한다 (넉다운). Sp35 폴리뉴클레오티드 길항제는 안티센스 분자, 리보자임, siRNA, shRNA 및 RNAi 를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 전형적으로는, 그와 같은 결합 분자를 별도로 동물에게 투여하지만 (예를 들어, [O'Connor, J. Neurochem. 56:560 (1991)] 참조), 그와 같은 결합 분자는 또한 숙주 세포에 의해서 흡수되고 생체내에서 발현되는 폴리뉴클레오티드로부터 생체내에서 발현될 수 있다. 또한 [Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)] 을 참조한다.

[0220] RNAi 는 표적화된 mRNA 의 발현을 방해하는 RNA 의 발현을 가리킨다. 특히, RNAi 는 siRNA (짧은 간섭 RNA) 를 통해서 특이적 mRNA (예를 들어 Sp35) 와의 상호작용을 통해서 표적화된 유전자를 침묵시킨다. 이어서, dsRNA 복합체가 세포에 의한 분해에 있어서 표적화된다. 추가의 RNAi 분자는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA); 또는 짧은 간섭 헤어핀을 포함한다. shRNA 분자는 루프로 연결된 표적 유전자로부터의 센스 및 안티센스 서열을 포함한다. shRNA 는 핵에서 세포질로 수송되고, mRNA 를 따라 분해된다. Pol Ⅲ 또는 U6 프로모터를 사용하여 RNAi 용 RNA 를 발현시킬 수 있다.

[0221] RNAi 는 그들의 "표적" mRNA 에 대하여 서열-특이적 상동성을 갖는 이중 가닥 RNA (dsRNA) 분자에 의해서 매개된다 (Caplen 등, Proc Natl Acad Sci USA 98:9742-9747, 2001). 드로소필라 (Drosophila) 세포가 없는 용해물에서의 생화학적 연구는, RNA-의존성 유전자 침묵의 매개자가 21-25 뉴클레오티드 "소간섭" RNA 듀플렉스 (siRNA) 임을 나타낸다. 따라서, siRNA 분자는 본 발명의 방법에 유리하게 사용된다. siRNA 는 DICER 로 알려진 RNase 에 의한 dsRNA 의 처리로부터 유도된다 (Bernstein 등, Nature 409:363-366, 2001). siRNA 듀플렉스 산물이 RISC (RNA Induced Silencing Complex: RNA 유도 침묵 복합체) 라 칭하는 다중-단백질 siRNA 복합체 속으로 보충되는 것으로 보인다. 어떤 특정 이론으로도 한정되지 않기를 바라면서, RISC 가

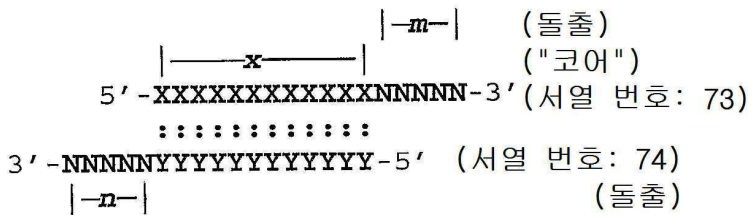
표적 mRNA 로 유도되고, 여기서 siRNA 듀플렉스가 서열-특이적으로 상호작용하여 촉매적 방식으로 절단을 매개한다고 여겨진다 (Bernstein 등, Nature 409:363-366, 2001; Boutla 등, Curr Biol 11:1776-1780, 2001).

[0222] RNAi 는 비-제한적 예로서 뉴런을 포함하는 (Krichevsky 등, Proc Natl Acad Sci USA 99:11926-11929, 2002), 포유류 세포에서 유전자 기능을 분석하고 필수 유전자를 동정하는데 사용해 왔다 ([Elbashir 등, Methods 26:199-213, 2002]; [Harborth 등, J Cell Sci 114:4557-4565, 2001]). RNAi 는 또한 치료 양식, 예컨대, 제한 없이 폴리오바이러스 (Gitlin 등, Nature 418:379-380, 2002) 및 HIV (Capodici 등, J Immunol 169:5196-5201, 2002) 를 포함하는 바이러스의 감염, 복제 및/또는 생장의 저해 또는 차단, 및 종양유전자 발현의 감소 (예를 들어, bcr-abl 유전자; Scherr 등, Blood Sep 26 epub ahead of print, 2002) 에 대해서 평가되고 있다.

RNAi 는 포유류 (마우스) 및 양서류 (Xenopus) 배에서 (각각, [Calegari 등, Proc Natl Acad Sci USA 99:14236-14240, 2002]; 및 [Zhou, 등, Nucleic Acids Res 30:1664-1669, 2002]), 그리고 신생 마우스에서 (Lewis 등, Nat Genet 32:107-108, 2002) 의 유전자 발현을 조절하고, 성체 유전자도입 마우스에서 도입유전자 발현을 감소 (McCaffrey 등, Nature 418:38-39, 2002) 시키는데 사용해 왔다. 세포 배양물 및 생체내에서 siRNA 의 효능 및 특이성을 측정하는 방법이 기재되어 있다 (예를 들어, [Bertrand 등, Biochem Biophys Res Commun 296:1000-1004, 2002]; [Lassus 등, Sci STKE 2002(147):PL13, 2002]; 및 [Leirdal 등, Biochem Biophys Res Commun 295:744-748, 2002] 참조).

[0223] 제한 없이 siRNA 를 포함하는 RNAi 를 매개하는 분자는 화학적 합성 (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), dsRNA 의 가수분해 (Yang 등, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), T7 RNA 중합효소를 이용한 생체외 전사 ([Donzeet 등, Nucleic Acids Res 30:e46, 2002]; [Yu 등, Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002]), 및 대장균 RNase III 와 같은 뉴클레아제를 사용하는 이중-가닥 RNA 의 가수분해 (Yang 등, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002) 에 의해서 제조할 수 있다.

[0224] siRNA 분자는 또한 두 올리고뉴클레오티드를 서로 어닐링시켜서 형성할 수 있고, 전형적으로는 하기의 일반적인 구조를 가지며, 이것은 이중-가닥 및 단일-가닥 부분을 포함한다:



[0225]

[0226] 여기서 N, X 및 Y 는 뉴클레오티드이고; X 는 Y 에 수소결합하고; ":" 는 두 염기 사이의 수소 결합을 나타내고; x 는 1 내지 약 100 사이의 값을 갖는 자연수이고; m 및 n 은, 독립적으로, 0 내지 약 100 사이의 값을 갖는 정수이다. 일부 구현예에서, N, X 및 Y 는 독립적으로 A, G, C 및 T 또는 U 이다. 특히, 합성 siRNA (즉, 두 올리고뉴클레오티드의 어닐링 산물) 의 경우, 비-자연발생적 염기 및 뉴클레오티드가 존재할 수 있다. 이중-가닥 중심부는 "코어" 라고 칭하고, 측정 단위로서 염기쌍 (bp) 을 갖고; 단일-가닥 부분은 돌출부이고, 측정 단위로서 뉴클레오티드 (nt) 를 갖는다. 나타낸 돌출부는 3' 돌출부이지만, 5' 돌출부를 갖는 분자 또한 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 돌출부가 없는 siRNA 분자 (즉, $m = 0$ 및 $n = 0$), 및 코어의 한쪽에는 돌출부가 있지만, 나머지에는 없는 것들 (즉, $m = 0$ 및 $n \geq 1$, 또는 그 반대) 이 본 발명의 범주에 속한다.

[0227] 당초에는, RNAi 기술은 포유류 시스템에 손쉽게 적용가능한 것으로 보이지 않았다. 이는, 포유류에서는, dsRNA 가 dsRNA-활성화 단백질 키나아제 (PKR) 를 활성화시켜서 세포자멸사성 캐스케이드 및 세포사를 야기하기 때문이다 (Der 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3279-3283, 1997). 또한, dsRNA 가 포유류 세포에서 인터페론 캐스케이드를 활성화시키고, 이것은 또한 세포 생리를 변경시킬 수 있다는 것은 알려진 지 오래되었다 (Colby 등, Annu. Rev. Microbiol. 25:333, 1971; Kleinschmidt 등, Annu. Rev. Biochem. 41:517, 1972; Lampson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55L782, 1967; Lomniczi 등, J. Gen. Virol. 8:55, 1970; 및 Younger 등, J. Bacteriol 92:862, 1966). 그러나, PKR 및 인터페론 캐스케이드의 dsRNA-매개 활성화는 약 30 개의 염기쌍보다 더 긴 dsRNA 를 요한다. 반대로, 길이가 30 개의 염기쌍 미만인 dsRNA 가 포유류 세포내에서 RNAi 를 야기한다는 것이 입증되었다 (Caplen 등, Proc. Natl Acad. Sci. USA 98:9742-9747, 2001). 따라서, 실질적으로 더 긴 dsRNA 가 없는 짧은 RNA 를 제조함으로써, 더 긴 dsRNA 분자와 관련된 바람직하지 못한 비-특이적 효과를 피할 수 있다고 예상된다.

[0228] siRNA 에 관한 참조문헌: Bernstein 등, Nature 409:363-366, 2001; Boutla 등, Curr Biol 11:1776-1780, 2001; Cullen, Nat Immunol. 3:597-599, 2002; Caplen 등, Proc Natl Acad Sci USA 98:9742-9747, 2001; Hamilton 등, Science 286:950-952, 1999; Nagase 등, DNA Res. 6:63-70, 1999; Napoli 등, Plant Cell 2:279-289, 1990; Nicholson 등, Mamm. Genome 13:67-73, 2002; Parrish 등, Mol Cell 6:1077-1087, 2000; Romano 등, Mol Microbiol 6:3343-3353, 1992; Tabara 등, Cell 99:123-132, 1999; 및 Tuschl, Chembiochem. 2:239-245, 2001.

[0229] Paddison 등 (Genes & Dev. 16:948-958, 2002) 은 RNAi 를 이루기 위한 수단으로서 헤어핀으로 접힌 작은 RNA 분자를 사용하였다. 따라서, 그와 같은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 분자 또한 본 발명의 방법에 유리하게 사용한다. 기능적 shRNA 의 줄기 및 루프의 길이는 바뀐다: 줄기 길이는 약 25 내지 약 30 nt 사이의 범위일 수 있고, 루프 크기는 4 내지 약 25 nt 사이의 범위일 수 있으며, 침묵 활성에 영향을 주지 않는다. 어떠한 특정 이론에 의해서도 제한받지 않기를 바라며, 이들 shRNA 는 DICER RNase 의 shRNA 산물과 비슷하며, 어떠한 경우에도, 특정 유전자의 발현을 저해하는 동일한 능력을 갖는다고 본다.

[0230] 본 발명의 일부 구현예에서, shRNA 는 실시예 1 에서 기재하는 바와 같이 렌티바이러스 벡터 (pLL3.7) 로부터 발현된다.

[0231] 안티센스 DNA 또는 RNA 를 통해서, 또는 삼중-나선 형체를 통해서 유전자 발현을 조절하는데 안티센스 기술을 사용할 수 있다. 안티센스 기술은 예를 들어 [Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991)]; [Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)] 에서 검토된다. 삼중 나선 형체는, 예를 들어, [Lee 등, Nucleic Acids Research 6:3073 (1979)]; Cooney 등, Science 241:456 (1988)]; 및 [Dervan 등, Science 251:1300 (1991)] 에서 검토된다. 상기 방법은 상보적 DNA 또는 RNA 에 대한 폴리뉴클레오티드의 결합에 기초한다.

[0232] 예를 들어, Sp35 를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 5' 코딩 부분을 사용하여 길이가 약 10 내지 40 개의 염기쌍인 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드를 설계할 수 있다. DNA 올리고뉴클레오티드는 전사에 관여하는 유전자의 영역에 상보적이도록 설계되어, 표적 단백질의 전사 및 생성을 막는다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 mRNA 와 하이브리드화되고, mRNA 분자의 표적 폴리펩티드로의 번역을 차단한다.

[0233] 한 가지 구현예에서, Sp35 유전자에 대하여 특이적인 안티센스 핵산이 외생성 서열로부터의 전사에 의해서 세포내에 생성된다. 예를 들어, 벡터 또는 그의 일부가 전사되어 안티센스 핵산 (RNA) 을 생성한다. 그와 같은 벡터는 에피솜으로 남거나, 전사되어서 원하는 안티센스 RNA 를 생성할 수 있는 한, 염색체 속으로 통합될 수 있다. 그와 같은 벡터는 그 업계에서 표준인 재조합 DNA 기술 방법으로 구축할 수 있다. 벡터는 척추동물 세포에서 복제 및 발현에 사용하는, 플라스미드, 바이러스, 또는 업계에 공지된 기타의 것일 수 있다.
안티센스 분자의 발현은, 척추동물, 바람직하게는 인간 세포, 예컨대 본원의 다른 부분에서 기재한 것들에서 작용하는, 업계에 공지된 임의의 프로모터에 의해서일 수 있다.

[0234] 안티센스 분자의 절대적 상보성은 바람직하기는 하지만 필요로 하지는 않는다. Sp35 를 암호화하는 RNA 의 적어도 일부에 대해서 상보적인 서열은, RNA 와 하이브리드화되어 안정한 듀플렉스를 형성할 수 있도록 충분한 상보성을 갖는 서열을 의미하며; 또는 트리플렉스 형성을 검정할 수도 있다. 하이브리드 능력은 상보성 정도 및 안티센스 핵산의 길이 모두에 좌우될 것이다. 일반적으로, 핵산을 더 많이 하이브리드시킬수록, 그것이 포함할 수 있으며, 더욱이 안정한 듀플렉스 (또는 경우에 따라 트리플렉스일 수 있음) 를 형성하는 염기 불일치가 더 많아진다. 당업자는 하이브리드화된 복합체의 용융점을 측정하기 위한 표준 절차를 사용하여 용인할만한 불일치 정도를 확인할 수 있다.

[0235] 전령 RNA 의 5' 말단에 대해서 상보적인 올리고뉴클레오티드, 예를 들어, AUG 개시 코돈을 포함하며 거기까지의 5' 미번역 서열은 번역 개시시에 가장 효율적으로 작동해야 한다. 그러나, mRNA 의 3' 미번역 서열에 대해서 상보적인 서열은 또한 mRNA 의 번역 저해에도 효과적인 것으로 보인다. 일반적으로, [Wagner, R., Nature 372:333-335 (1994)] 를 참조한다. 따라서, 5'- 또는 3'- 비번역 비-코딩 영역에 대해서 상보적인 올리고뉴클레오티드를 Sp35 의 번역을 저해하기 위한 안티센스 접근법에 사용할 수 있었다. mRNA 의 5' 미번역 영역에 대해서 상보적인 올리고뉴클레오티드는 AUG 개시 코돈의 보체를 포함해야 한다. mRNA 코딩 영역에 대해서 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드는 덜 효율적인 번역 저해자이지만, 본 발명에 따라 사용할 수 있었다. 안티센스 핵산은 길이가 적어도 6 개의 뉴클레오티드여야 하며, 바람직하게는 길이가 6 내지 약 50 개의 뉴클레오티드 범위인 올리고뉴클레오티드이다. 특정 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 10 개의 뉴클레오티드, 적어도 17 개의 뉴클레오티드, 적어도 25 개의 뉴클레오티드 또는 적어도 50 개의 뉴클레오티

드이다.

[0236] 본원에 나와 있는 치료법을 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥의 DNA 또는 RNA 또는 키메라 혼합물 또는 그의 유도체 또는 변형형일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 염기 부분, 당 부분, 또는 인산염 골격에서 변형되어, 예를 들어, 분자의 안정성, 하이브리드화 등을 향상시킬 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 펩티드와 같은 기타 첨부기 (예를 들어, 생체내 숙주 세포 수용체 표적화를 위한 것), 또는 세포막을 가로지르는 수송 용이화제 (예를 들어, Letsinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556 (1989); Lemaitre 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652 (1987)); 1988 년 12 월 15 일에 공개된 PCT 공개 No. WO88/09810 참조) 또는 혈액뇌장벽 (예를 들어, 1988 년 4 월 25 일에 공개된 PCT 공개 No. WO89/10134 참조), 하이브리드화-촉발된 절단제 (예를 들어, Krol 등, BioTechniques 6:958-976 (1988) 참조) 또는 중격제 (예를 들어, Zon, Pharm. Res. 5:539-549(1988) 참조) 를 포함할 수 있다. 이를 위해서, 올리고뉴클레오티드를 또다른 분자, 예를 들어, 펩티드, 하이브리드화 촉발된 교차-연결제, 수송제, 하이브리드화-촉발된 절단제 등에 콘쥬게이트시킬 수 있다.

[0237] 본원에 나와 있는 치료법에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N-6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N-6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실큐에오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N-6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N2-카르복시프로필)우라실, (acp3)w, 및 2,6-이아미노퓨린을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형 염기 부분을 포함할 수 있다.

[0238] 본원에 나와 있는 치료법에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일룰로스, 및 헥소스를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형 당 부분을 포함할 수 있다.

[0239] 더욱 또다른 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료법에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아미도티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포르디아미데이트, 메틸포스포네이트, 알킬 포스포트리에스테르, 및 포름아세탈 또는 그의 유도체를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형 포스페이트 골격을 포함한다.

[0240] 더욱 또다른 구현예에서, 본원에 나와 있는 치료법에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 α-아노머 올리고뉴클레오티드이다. α-아노머 올리고뉴클레오티드는, 통상의 상황과는 반대로, 상보성 RNA 와, 가닥들이 서로 평행하게 가는 특이적 이중-가닥 하이브리드를 형성한다 (Gautier 등, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641(1987)). 상기 올리고뉴클레오티드는 2'-0-메틸리보뉴클레오티드 (Inoue 등, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148(1987)), 또는 키메라 RNA-DNA 유사체 (Inoue 등, FEBS Lett. 215:327-330(1987)) 이다.

[0241] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 업계에 공지된 표준 방법에 의해서, 예를 들어, 자동화 DNA 합성기 (예컨대 Biosearch, Applied Biosystems 에서 시판하는 것 등) 를 사용하여 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 [Stein 등, Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)] 의 방법으로 합성할 수 있고, 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오티드는 구경이 조절된 유리 중합체 지지체 (Sarin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451(1988)) 등을 사용하여 제조할 수 있다.

[0242] 본원에 나와 있는 치료법에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드 조성물은 촉매적 RNA, 또는 리보자임을 추가로 포함한다 (예를 들어, 1990 년 10 월 4 일에 공개된 PCT 국제 공개 WO 90/11364; Sarver 등, Science 247:1222-1225 (1990) 참조). 망치머리형 리보자임의 사용이 바람직하다. 망치머리형 리보자임은 표적 mRNA 와 상보적 염기쌍을 형성하는 측면 영역으로 나타내는 위치에서 mRNA 를 절단시킨다. 표적 mRNA 가 하기의 두 염기 서열을 갖는다는 것이 유일한 요구사항이다: 5'-UG-3'. 망치머리형 리보자임의 구축 및 생성은 업계에 주지되어 있으며, [Haseloff and Gerlach, Nature 334:585-591 (1988)] 에 더 완전하게 기재되어 있다. 바람직하게는, 절단 인식 부위가 표적 mRNA 의 5' 말단 근처에 위치하도록; 즉, 비-기능적 mRNA 전사의 효능을 증가시키고 세포내 누적을 최소화시키도록 리보자임을 조작한다.

[0243] 안티센스 접근법에서와 같이, 본원에 나와 있는 진단 및 치료법에 사용하기 위한 리보자임은 변형 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 향상된 안정성, 표적화 등을 위함) 로 구성될 수 있고, 생체내에서 Sp35 를 발현시키는 세포로 전달될 수 있다. 리보자임을 암호화하는 DNA 구축물은 안티센스 암호화 DNA 의 도입에 있어서 상기 기재한 바와 동일한 방식으로 세포에 도입시킬 수 있다. 바람직한 전달 방법은, 예를 들어, pol Ⅲ 또는 pol Ⅱ 프로모터와 같은 강한 구성 프로모터의 제어 하에, 리보자임을 "암호화"하는 DNA 구축물의 사용을 포함하여서, 핵산전달감염 세포가 내생성 Sp35 메세지를 파괴하고 번역을 저해하기 위해서 충분한 양의 리보자임을 생성할 것이다. 안티센스 분자와 달리 리보자임은 촉매적이기 때문에, 효능을 위해서는 낮은 세포내 농도를 요한다.

[0244] 벡터

[0245] Sp35 길항제를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 또한 본 발명의 방법에 사용하기 위한 길항제를 제조하는데 사용할 수 있다. 그와 같은 핵산을 작동적으로 연결시키는 발현 조절 서열 및 벡터의 선택은 원하는 기능성, 예를 들어, 단백질 발현, 및 형질전환시킬 숙주 세포에 좌우된다.

[0246] 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현을 조절하는데 유용한 발현 조절 요소는 업계에 알려져 있다. 예로는 유도 프로모터, 구성 프로모터, 분비 신호, 및 기타 조절성 요소가 포함되지만, 여기에 한정되지는 않는다. 유도 프로모터를 사용하는 경우, 그것은, 예를 들어, 숙주 세포 매개체에서 영양 상태의 변화 또는 온도의 변화에 의해서 조절될 수 있다.

[0247] 벡터는 원핵생물성 레플리콘, 즉, 박테리아성 숙주 세포에서 염색체-외 재조합 DNA 분자의 자발적 복제 및 유지에 관한 능력을 갖는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 그와 같은 레플리콘은 업계에 주지되어 있다. 또한, 원핵생물성 레플리콘을 포함하는 벡터는 또한, 그의 발현이 내약물성과 같은 탐지가능한 표지를 부여하는 유전자를 포함할 수 있다. 박테리아성 내약물성 유전자의 예는 암피실린 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 것들이다.

[0248] 원핵생물성 레플리콘을 포함하는 벡터는 또한 박테리아성 숙주 세포 내 코딩 유전자 서열의 발현을 지시하기 위한 원핵생물성 또는 박테리오파지 프로모터를 포함할 수 있다. 박테리아성 숙주와 양립가능한 프로모터 서열은 전형적으로는 발현시킬 DNA 절편의 삽입이 편리한 제한 부위를 포함하는 플라스미드 벡터에 제공된다. 그와 같은 플라스미드 벡터의 예는 pUC8, pUC9, pBR322 및 pBR329 (BioRad), pPL 및 pKK223 (Pharmacia) 이다. 임의의 적합한 원핵생물성 숙주를 사용하여 본 발명의 방법에 사용하는 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 분자를 발현시킬 수 있다.

[0249] 본 발명의 목적상, 다수의 발현 벡터 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 한 부류의 벡터는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 우두바이러스, 바큘로바이러스, 레트로바이러스 (RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래한 DNA 요소를 이용한다. 다른 것에는 내부 리보솜 결합 부위가 있는 다중시스트론 시스템의 사용이 포함된다. 추가로, 핵산전달감염된 숙주 세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 표지자를 도입시킴으로써 DNA 를 그들의 염색체로 통합시킨 세포를 선택할 수 있다. 상기 표지자는 영양요구성 숙주에 대한 자가영양, 살생물제 내성 (예를 들어, 항생제) 또는 중금속 예컨대 구리에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선별가능한 표지 유전자는 발현시킬 DNA 서열에 직접 연결시키거나, 공형질전환에 의해서 동일한 세포로 도입시킬 수 있다. 네오마이신 인전이효소 (neo) 유전자가 선별가능한 표지 유전자의 한 예이다 (Southern 등, J. Mol. Anal. Genet. 1:327-341 (1982)). mRNA 의 최적의 합성을 위해서는 추가의 요소 또한 필요할 수 있다. 이들 요소는 신호 서열, 스플라이스 신호, 뿐만 아니라 전사 프로모터, 증강인자, 및 종결 신호를 포함할 수 있다.

[0250] 한 가지 구현예에서, NEOSPLA (U.S. 특허 6,159,730) 라고 칭하는 Biogen IDEC, Inc. 의 특허 발현 벡터를 사용할 수 있다. 이 벡터는 사이토메갈로바이러스 프로모터/증강인자, 마우스 베타 글로빈 주 프로모터, SV40 복제 기원, 소 성장 호르몬 아데닐중합체형성 서열, 네오마이신 인전이효소 엑손 1 및 엑손 2, 이수소엽산 환원효소 유전자 및 선도 서열을 포함한다. 이 벡터는 CHO 세포 내에 핵산전달감염시킨 후, G418 포함 배지 중 선택하고 메토트렉세이트 증폭시 매우 높은 수준의 발현을 낸다고 밝혀졌다. 물론, 진핵생물성 세포에서 발현을 이끌어 낼 수 있는 임의의 발현 벡터를 본 발명에 사용할 수 있다. 적합한 벡터의 예는 플라스미드 pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, 및 pZeoSV2 (Invitrogen, San Diego, CA 에서 구입가능), 및 플라스미드 pCI (Promega, Madison, WI 에서 구입가능) 를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 추가의 진핵생물성 세포 발현 벡터는 업계에 알려져 있고 시판된다. 전형적으로는, 그와 같은 벡터는 원하는 DNA 절편의 삽입이 편리한 제한 부위를 포함한다.

예시 벡터는 pSVL 및 pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pml2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), 레트로바이러스성 발현 벡터 pMIG 및 pLL3.7, 아데노바이러스 셔틀 벡터 pDC315, 및 AAV 벡터를 포함한다. 기타 예시 벡터 시스템은 예를 들어, U.S. 특허 6,413,777 에 나와 있다.

[0251] 일반적으로, 적합하게 높은 수준의 길항제를 발현하는 다수의 형질전환 세포의 선별은, 예를 들어, 로보트를 이용한 시스템으로 수행할 수 있는 일상적인 실험이다.

[0252] 포유류 숙주 세포 발현에 빈번하게 사용되는 조절 서열은 포유류 세포에서 높은 수준의 단백질 발현에 관여하는 바이러스성 요소, 예컨대 레트로바이러스 LTR 로부터 유도된 프로모터 및 증강인자, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 로부터 유도된 프로모터 및 증강인자 (예컨대 CMV 프로모터/증강인자), Simian 바이러스 40 (SV40) 으로부터 유도된 프로모터 및 증강인자 (예컨대 SV40 프로모터/증강인자), 아데노바이러스로부터 유도된 프로모터 및 증강인자 (예를 들어, 아데노바이러스 주 레이트 프로모터 (AdmlP)), 폴리오마 및 강한 포유류 프로모터 예컨대 천연 면역글로불린 및 액틴 프로모터를 포함한다. 바이러스성 조절 요소, 및 그의 서열에 관한 추가의 설명은, 예를 들어, Stinski, U.S. 특허 No. 5,168,062; Bell, U.S. 특허 No. 4,510,245; 및 Schaffner, U.S. 특허 No. 4,968,615 를 참조한다.

[0253] 재조합 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어, 복제 기원) 및 선별가능한 표지 유전자를 수반할 수 있다. 선별가능한 표지 유전자는 벡터를 도입시키는 숙주 세포의 선별을 용이하게 해 준다 (예를 들어, Axel, U.S. 특허 No. 4,399,216; 4,634,665 및 5,179,017 참조). 예를 들어, 선별가능한 표지 유전자는 전형적으로, 그 벡터를 도입시키는 숙주 세포에, G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여한다. 빈번하게 사용되는 선별가능한 표지 유전자는 2수소엽산 환원효소 (DHFR) 유전자 (메토트렉세이트 선택/증폭시킨 dhfr- 숙주 세포에 사용) 및 neo 유전자 (G418 선택에 사용) 를 포함한다.

[0254] Sp35 길항제를 암호화하는 벡터를 적합한 숙주 세포의 형질전환에 사용할 수 있다. 임의의 적합한 방법으로 형질전환할 수 있다. 외생성 DNA 를 포유류 세포에 도입시키는 방법은 업계에 주지되어 있고, 덱스트란-매개 핵산전달감염, 인간칼슘 침전, 폴리브렌-매개 핵산전달감염, 원형질체 융합, 전기천공, 폴리뉴클레오티드(들)의 리포솜 중 포획, 및 DNA 의 핵 속으로의 직접 미세주입을 포함한다. 또한, 핵산 분자를 바이러스성 벡터에 의해서 포유류 세포 속으로 도입시킬 수 있다.

[0255] 숙주 세포의 형질전환은 이용하는 벡터 및 숙주 세포에 적합한 통상의 방법으로 수행할 수 있다. 원핵생물성 숙주 세포의 형질전환에 있어서, 전기천공 및 염 처리법을 이용할 수 있다 (Cohen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-14 (1972)). 척추동물 세포의 형질전환에 있어서, 전기천공, 양이온성 지질 또는 염 처리법을 이용할 수 있다. 예를 들어, Graham 등, Virology 52:456-467 (1973); Wigler 등, Proc. Natl. Acad. Sci USA 76:1373-76 (1979) 를 참조한다.

[0256] 단백질 발현에 사용하는 숙주 세포주는 가장 바람직하게는 포유류 기원이고; 당업자에게는 거기에 발현시킬 원하는 유전자 산물에 가장 잘 맞는 특정 숙주 세포주를 선택적으로 결정할 능력이 있다고 믿는다. 예시적 숙주 세포주는 NSO, SP2 세포, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포, 원숭이 신장 세포 (COS), 인간 간세포 암종 세포 (예를 들어, Hep G2), A549 세포 DG44 및 DUXB11 (중국 햄스터 난소 세포주, DHFR -), HELA (인간 경부 암종), CVI (원숭이 신장 세포주), COS (SV40 T 항원이 있는 CVI 유도체), R1610 (중국 햄스터 섬유아세포), BALBC/3T3 (마우스 섬유아세포), HAK (햄스터 신장 세포주), SP2/0 (마우스 골수종), P3x63-Ag3.653 (마우스 골수종), BFA-1c1BPT (소 내피 세포), RAJI (인간 림프구) 및 293 (인간 신장) 을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 숙주 세포주는 전형적으로는 상업상의 서비스인 미국 미생물 보존센터 (American Tissue Culture Collection) 로부터 또는 공개 문헌으로부터 이용가능하다.

[0257] 제조 세포주로부터 폴리펩티드의 발현은 공지의 기술을 사용하여 증강시킬 수 있다. 예를 들어, 글루타민 합성효소 (GS) 시스템은 특정 조건 하에서의 발현을 증강시키는데 흔히 사용된다. 예를 들어, 유럽 특허 No. 0 216 846, 0 256 055, 및 0 323 997 및 유럽 특허 출원 No. 89303964.4 를 참조한다.

[0258] 숙주 세포

[0259] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 Sp35 길항제 발현용 숙주 세포는 원핵생물성 또는 진핵생물성일 수 있다. 예시적 진핵생물성 숙주 세포는 효모 및 포유류 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 (ATCC 수탁번호 CCL61), NIH 스위스 마우스 배아 세포 NIH-3T3 (ATCC 수탁번호 CRL1658), 및 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK) 를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 기타 유용한 진핵생물성 숙주 세포는 곤충 세포 및 식물 세포를 포

함한다. 예시적 원핵생물성 숙주 세포는 대장균 및 스트렙토마이스 (Streptomyces) 이다.

[0260] 유전자 치유법

[0261] Sp35 길항제는 포유류, 예를 들어, 인간 환자에서, 희소돌기아교세포의 생존, 증식 및 분화의 촉진 또는 뉴런의 수초형성의 촉진이 치료적으로 이로울 수 있는 신경계 질환, 장애 또는 손상의 치료에 대한 유전자-치유 접근법을 사용하여 생체내에서 생성될 수 있다. 이는 적합한 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 적합한 Sp35 길항제-암호화 핵산의 투여와 관계있다. 일반적으로, 이들 서열은 바이러스성 벡터 속으로 통합된다. 그와 같은 유전자 치유법에 적합한 바이러스성 벡터는 아데노바이러스성 벡터, 알파바이러스 벡터, 장내바이러스 벡터, 페스티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 바큘로바이러스성 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 엡스타인 바 바이러스성 벡터, 파포바바이러스성 벡터, 마마바이러스, 우두바이러스성 벡터, 아데노-연관 바이러스성 벡터 및 단순 헤르페스 바이러스성 벡터를 포함한다. 바이러스성 벡터는 복제-불능 바이러스성 벡터일 수 있다. E1 유전자 또는 E3 유전자가 결손된 아데노바이러스성 벡터가 전형적으로 사용된다. 아데노바이러스성 벡터를 사용하는 경우, 상기 벡터는 보통 선별가능한 표지 유전자를 갖지 않는다.

[0262] 약학 조성물

[0263] 본 발명의 방법에 사용하는 Sp35 길항제는 인간을 포함하는 포유류에 투여하기 위한 약학 조성물로 제형화할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하는 약학 조성물은 예를 들어, 이온교환제, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충 물질 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스계 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양털 지방을 포함하는 약학적 허용성 담체를 포함한다.

[0264] 본 발명의 방법에 사용하는 조성물은 임의의 적합한 방법으로, 예를 들어, 비경구로, 뇌실내로, 경구로, 흡입 스프레이에 의해서, 국소적으로, 직장으로, 비강으로, 구강으로, 질로 또는 이식한 저장소 (reservoir) 를 통해서 투여할 수 있다. 본원에서 사용할 때 "비경구" 라는 용어는, 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내, 흉골내, 포막내, 간장내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 미리 설명한 바와 같이, 본 발명의 방법에 사용하는 Sp35 길항제는 신경계에서 작용하여 희소돌기아교세포의 생존, 증식 및 분화 및 뉴런의 수초형성을 촉진시킨다. 따라서, 본 발명의 방법에서, Sp35 길항제는, 그들이 혈액뇌장벽을 가로지르는 방식으로 투여된다. 이러한 가로지름은 Sp35 길항제 분자 자체의 고유한 물리화학적 성질로부터, 약학 제형물 중 기타 성분으로부터, 또는 혈액뇌장벽을 돌파하기 위한 바늘, 캐뉼라 또는 외과적 기구와 같은 기계적 장치의 사용으로부터 생길 수 있다. Sp35 길항제가 혈액뇌장벽을 본래 가로지르지 못하는 분자인 경우, 예를 들어, 적합한 투여 경로인 상기의 가로지름을 용이하게 해 주는 부분에 대한 융합은, 예를 들어, MS 의 만성 병소로 직접, 예를 들어, 포막내 또는 두개내이다. Sp35 길항제가 혈액뇌장벽을 본래 가로지르는 분자인 경우, 투여 경로는 아래에 기재하는 다양한 경로 중 하나 이상에 의해서일 수 있다.

[0265] 본 발명의 방법에 사용하는 조성물의 멸균 주사제 형태는 수성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이들 현탁액은 적합한 분산 또는 습윤화제 및 현탁제를 사용하여 업계에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 비독성의 비경구적 허용성 희석제 또는 용매 중 멸균 주사제 용액 또는 현탁액, 예를 들어, 1,3-부탄디올 중 현탁액일 수 있다. 이용할 수 있는 허용성 운반체 및 용매에는 물, 링거액 및 염화나트륨 등장액이 있다. 또한, 멸균 고정유가 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 이용된다. 이를 위하여, 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 포함하는 임의의 자극성이 적은 고정유를 이용할 수 있다. 지방산, 예컨대 올레산 및 그의 글리세리드 유도체가, 특히 그들의 폴리옥시에틸렌화 형태에서는, 올리브 오일 또는 피마자 오일과 같이 타고난 약학적 허용성 오일이기 때문에, 주사제의 제조에 유용하다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 또한 장쇄 알코올 희석제 또는 분산제, 예컨대 카르복시메틸 셀룰로오스 또는 에멀션 및 현탁액을 포함하는 약학적 허용성 형태의 제형에 흔히 사용하는 유사 분산제를 포함할 수 있다. 약학적 허용성 고체, 액체, 또는 기타 투약 형태의 제조에 흔히 사용되는, 기타 흔히 사용되는 계면활성제, 예컨대 Tweens, Spans 및 기타 유화제 또는 생체이용성 증강제를 또한 제형 목적상 사용할 수 있다.

[0266] 비경구 제형은 단일의 덩어리 용량, 주입 또는 부하 덩어리 용량에 이은 유지 용량일 수 있다. 이들 조성물은 특정의 고정된 또는 가변적 간격으로, 예를 들어, 하루 1 회, 또는 "필요할 때" 를 기준으로 투여할 수 있다.

[0267] 본 발명의 방법에 사용하는 특정 약학 조성물은, 예를 들어, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액을 포함하는 허용성 투약 형태로 경구로 투여될 수 있다. 특정 약학 조성물은 또한 비강 에어로졸 또는 흡입에 의해서 투여될 수 있다. 그와 같은 조성물은 벤질 알코올 또는 기타 적합한 보존제, 생체이용성을 증강시키기 위한 흡수 촉진제, 및/또는 기타 종래의 가용화 또는 분산제를 이용하여, 식염수 중 용액으로 제조할 수 있다.

[0268] 단일 투약 형태를 제조하기 위해서 담체 물질과 조합될 수 있는 Sp35 길항제의 양은 치료할 숙주, 사용하는 길항제의 유형 및 특정 투여 양식에 따라 바뀔 것이다. 상기 조성물은 단일 용량, 다중 용량 또는 설정한 시간에 걸쳐서 주입으로 투여될 수 있다. 투약 요법은 또한 최적의 원하는 반응 (예를 들어, 치료 또는 예방 반응) 을 얻도록 조정할 수 있다.

[0269] 본 발명의 방법은 Sp35 길항제의 "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량" 을 사용한다. 그와 같은 치료적 또는 예방적 유효량은 질환 상태, 연령, 성별, 및 개체의 중량과 같은 요인에 따라 바뀔 수 있다. 치료적 또는 예방적 유효량은 또한 치료적으로 이로운 효과가 임의의 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 것이다.

[0270] 임의의 특정 환자에 있어서의 특정 투여량 및 치료 요법은 사용하는 특정 Sp35 길항제, 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 및 식이요법, 및 투여 시간, 배설률, 약물 조합, 및 치료할 특정 질환의 심각성을 포함하는 다수의 요인에 좌우될 것이다. 간병인이 그와 같은 요인을 판단하는 것은 본 업계의 통상의 기술에 속한다. 상기 양은 또한 치료할 개별 환자, 투여 경로, 제형의 유형, 사용하는 화합물의 특징, 질환의 심각성, 및 원하는 효과에 좌우될 것이다. 사용하는 양은 업계에 주지된 약리학적 및 약동학적 원리에 의해서 결정할 수 있다.

[0271] 본 발명의 방법에서, Sp35 길항제는 일반적으로 신경계에 직접, 뇌실내로, 또는 포막내로, 예를 들어, MS 의 만성 병소 속으로 투여된다. 본 발명의 방법에 따라 투여하기 위한 조성물은, 1 일 0.001 - 10 mg/체중 kg 의 Sp35 길항제 폴리펩티드 투여량을 투여하도록 제형화할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 투여량은 1 일 0.01 - 1.0 mg/체중 kg 이다. 일부 구현예에서, 투여량은 1 일 0.001 - 0.5 mg/체중 kg 이다.

[0272] Sp35 길항제 항체로 치료하는데 있어서, 투여량은, 예를 들어, 약 0.0001 내지 100 mg/숙주 체중 kg, 더욱 통상적으로는 0.01 내지 5 mg/숙주 체중 kg (예를 들어, 0.02 mg/숙주 체중 kg, 0.25 mg/숙주 체중 kg, 0.5 mg/숙주 체중 kg, 0.75 mg/숙주 체중 kg, 1 mg/숙주 체중 kg, 2 mg/숙주 체중 kg 등) 의 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 1 mg/체중 kg 또는 10 mg/체중 kg 일 수 있고, 또는 1-10 mg/kg 의 범위에 속하고, 바람직하게는 적어도 1 mg/kg 이다. 상기 범위의 중간 용량 또한 본 발명의 범주에 속한다. 대상체에 그와 같은 용량을 매일, 격일로, 매주 또는 경험상의 분석에 의해서 결정된 임의의 기타 계획에 따라 투여할 수 있다. 예시적 치료는 장기간, 예를 들어, 적어도 6 개월에 걸친 다중 투여량으로의 투여를 수반한다. 추가의 예시적 치료 요법은 매 2 주마다 1 회 또는 1 달 1 회 또는 매 3 내지 6 개월마다 1 회의 투여를 수반한다. 예시적 투약 계획은 매일 1-10 mg/kg 또는 15 mg/kg, 격일로 30 mg/kg 또는 매주 60 mg/kg 을 포함한다. 일부 방법에서, 결합 특이성이 다른 둘 이상의 단일클론 항체를 동시에 투여하며, 이 경우, 투여하는 각 항체의 투여량은 지시한 범위에 속한다.

[0273] 특정 구현예에서, Sp35 길항제 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 핵산 분자로 대상체를 치료할 수 있다. 핵산 용량은 환자 당 약 10 ng 내지 1 g, 100 ng 내지 100 mg, 1 ㎍ 내지 10 mg, 또는 30 - 300 ㎍ DNA 범위이다. 감염성 바이러스 벡터 용량은 1회 분량 당 10-100, 또는 그 이상의 비리온 (virion) 으로 가변적이다.

[0274] 보충 활성 화합물을 또한 본 발명의 방법에 사용하는 조성물에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 가용성 Sp35 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 하나 이상의 치료제와 공동제형화 및/또는 공동투여할 수 있다.

[0275] 본 발명은 방출-조절 시스템의 피하 주입 또는 수용액의 일시 주사를 포함하는, 선택된 표적 조직에 Sp35 길항제를 전달하는 임의의 적합한 전달 방법을 포함한다. 방출-조절 임플란트를 사용하면, 반복 주사의 필요성이 감소된다.

[0276] 본 발명의 방법에 사용하는 Sp35 길항제는 뇌 속에 직접 주입할 수 있다. 화합물의 직접 뇌 주입을 위한 각종 임플란트가 알려져 있고, 신경학적 장애를 앓는 인간 환자에게 치료 화합물을 전달하는데 효과적이다. 이들은 펌프, 정위적으로 이식한 일시적 세포간 카테터, 영구적 두개내 카테터 임플란트, 및 수술로 이식한 생분해성 임플란트를 사용하는, 뇌 속으로의 장기적 주입을 포함한다. 예를 들어, Gill 등, 상기 문헌; Scharfen 등, "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas," Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24(4):583-591 (1992); Gaspar 등, "Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas," Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 43(5):977-982 (1999); chapter 66, pages 577-580,

Bellezza 등, "Stereotactic Interstitial Brachytherapy," in Gildenberg 등, Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery, McGraw-Hill (1998); 및 Brem 등, "The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial," J. Neuro-Oncology 26:111-23 (1995) 를 참조한다.

[0277] 상기 조성물은 또한 적합한 화합물 전달 또는 지지 시스템으로서 기능하는 생체융화성 담체 물질에 분산된 Sp35 길항제를 포함할 수 있다. 서방성 담체의 적합한 예는 좌제 또는 캡슐과 같은 성형품 형태의 반투성 중합체 매트릭스를 포함한다. 이식가능한 또는 마이크로캡슐의 서방성 매트릭스는 폴리락티드 (U.S. 특허 No. 3,773,319; EP 58,481), L-글루탐산 및 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman 등, Biopolymers 22:547-56 (1985)); 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 에틸렌 비닐 아세테이트 (Langer 등, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)) 또는 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988) 을 포함한다.

[0278] 본 발명의 일부 구현예에서, Sp35 길항제를 뇌의 적당한 영역에 직접 주입하여 환자에게 투여한다. 예를 들어, Gill 등, "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease," Nature Med. 9: 589-95 (2003) 을 참조한다. 대안적인 기술도 가능하고, 본 발명의 Sp35 길항제를 투여하는데 적용할 수 있다. 예를 들어, 카테터 또는 임플란트의 정위적 위치선정은 Riechert-Mundinger 기구 및 ZD (Zamorano-Dujovny) 다목적 국소화 기구를 사용하여 수행할 수 있다. 명암대비가 강화된 전산화 X선 단층촬영 (CT) 스캔, 옴니파큐 (omnipaque) 120 ㎖ 주입, 350 ㎎ 아이오드/㎖, 2 ㎜ 슬라이스 두께는 삼차원 다면 처리 계획을 가능케 해 준다 (STP, Fischer, Freiburg, Germany). 이 장치는 자기 공명 영상화 연구에 기초하여, 뚜렷한 표적 확인을 위해서 CT 및 MRI 표적 정보를 합치도록 해 준다.

[0279] GE CT 스캐너 (General Electric Company, Milwaukee, WI) 로 사용하기 위해서 변형시킨 Leksell 정위 시스템 (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) 뿐만 아니라 Brown-Roberts-Wells (BRW) 정위 시스템 (Radionics, Burlington, MA) 을 이 목적에 사용할 수 있다. 따라서, 이식한 날 아침에, BRW 정위 프레임의 환형 기본 고리를 환자의 두개골에 부착시킬 수 있다. 기본 플레이트에 덮은 흑연 막대 위치확인 프레임으로 (표적 조직) 영역을 통해서 3 ㎜ 간격으로 일련의 CT 조각을 얻을 수 있었다. VAX 11/780 컴퓨터 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) 에서 전산화 처리 계획 프로그램을 실행하여 흑연 막대 영상의 CT 좌표를 사용하여 CT 공간과 BRW 공간 사이를 매핑시킬 수 있다.

[0280] 본원에 기재되어 있는 바와 같은 탈수초화 또는 수초발육부전 장애의 치료 방법은 전형적으로, 인간에게 사용하기 전에, 원하는 치료적 또는 예방적 활성에 대하여, 생체외에서 그리고 이어서 허용성 동물 모델에서 생체내에서 시험한다. 유전자도입 동물을 포함하여 적합한 동물 모델은 당업자가 알 것이다. 예를 들어, Sp35 길항제의 분화 및 생존 효과를 입증하기 위한 생체외 검정을 본원에 기재한다. 축색의 수초형성에 대한 Sp35 길항제의 효과를 실시예에 기재하는 바와 같이 생체외에서 시험할 수 있다. 마지막으로, Sp35 길항제를 발현하는 유전자도입 마우스를 만들거나 본원에 기재되어 있는 바와 같은 모델의 마우스 또는 래트에 Sp35 길항제를 투여하여 생체내 시험을 수행할 수 있다.

도면

도면1a

GGAGAGACATGCGATTGGTGACCGAGCCGAGCGGACCGAAGGCGCGCCCGA
GATGCAGGTGAGCAAGAGGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGGAGCATGCCCAG
CCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGC
TGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCCAGGA
CCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAGGGCATC
CCCACCGAGACGCGCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCA
ACCAGGACGAGTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA
GAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCCGGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTC
CGGACGCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCT
TCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGT
TATCCTACTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGG
TTGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGCCTCAAC
AGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCG
AGGCGCTGTCCCACCTGCACGGCCTCATCGTCCTGAGGCTCCGGCACCTCAA
CATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCT
TGGAGATCTCCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAACTGCCTCTAC
GGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCC
CTACCTGGCCGTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCCTCAACCTCTCCTACA
ACCCCATCAGCACCATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCA
GGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTC
CGCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCA
CACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCT
GGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTCGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCC
GCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCCACGTGCGCCACGCCCGAGTT
TGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCCAACTACT
TCACCTGCCGCCGCGCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCCAGCAGGTGTTTGT
GGACGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTGTGCCGGGCCGATGGCGACCCGCCG
CCCGCCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCA
ATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCA
GGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAA
CGACTCCATGCCCGCCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCGACTGGCCCC
ATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGCGAGGGAGA
GGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCCCTTCGACATCAAGACCCTCA
TCATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTTCCTGGGCGTCGTCCTCTTCTGCC
TGGTGCTGCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAACAT
CGAGATCGAGTATGTGCCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGAC
GCGCCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGAGGCCGGGGCGGGGGGCAG
GGACCCCCGGGCGGCCGGGCAGGGGAAGGGGCCTGGCCGCCACCTGCTCACT
CTCCAGTCCTTCCCACCTCCTCCCTACCCTTCTACACACGTTCTCTTTCTCCCT
CCCGCCTCCGTCCCCTGCTGCCCCCCGCCAGCCCTCACCACCTGCCCTCCTTC
TACCAGGACCTCAGAAGCCCAGACCTGGGGACCCCACCTACACAGGGGCATT
GACAGACTGGAGTTGAAAGCCGACGAACCGACACGCGGCAGAGTCAATAAT
TCAATAAAAAAGTTACGAACTTTCTCTGTAACTTGGGTTTCAATAATTATGGA
TTTTTATGAAAACTTGAAATAATAAAAAGAGAAAAAAACTATTTCCTATAGC
TAGTCGGAATGCAAACTTTTGACGTCCTGATTGCTCCAGGGCCCTCTTCCAAC
TCAGTTTCTTGTTTTTCTCTTCNTCCTNCTCCTCTTCTTCCTCCTTTCTCTTCTCT
TCCCCCAGTGGGGAGGGATCACTCAGGAAAACAGGAAAGGAGGTTCCAGCC
CCACCCACCTGCCCACCCCGCCCCAGGCACCATCAGGAGCAGGCTAGGGGGC
AGGCCTGGGCCCAGCTCCGGGCTGGCTTTTTGCAGGGCGCAGGTGGAGGGGAC

도면1b

AGGTCTGCCGATGGGGGTGGGAGCCTGTCTGCTGGGCTGCCAGGCGGCACC
ACTGCAAGGGGTGGGAGCCTGGCTCGGGTGTGGCTGAGACTCTGGACAGAGG
CTGGGGTCCTCCTGGGGGACAGCACAGTCAGTGGAGAGAGCCAGGGGCTGG
AGGTGGGGCCCACCCCAGCCTCTGGTCCCAGCTCTGCTGCTCACTTGCTGTGT
GGCCCTCAAGCAGGTCCACTGGCCTCTCTGGGCCTCAGTCTCCACATCTGTAC
AAATGGGAACATTACCCCCTGCCCTGCCTACCTNANAGGGCTGTTNTGAGGN
ATNGATGAGATGATGTATGT

도면2

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLVLGSVL
SGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFVA
VPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF
PHLEELELNENIVSAVEPGAFNNLFNLRTL
GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKI
VILLDYMFQDLYNLKSLEVGDNDLVYISHR
AFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTEALSHLH
GLIVLRLRHLNINAIRDYSFKRLYRLKVLEI
SHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSITHCNLT
AVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSM
LHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNY
LRVLNVSGNQLTTLEESVFHSVGNLETLIL
DSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFNRQQPT
CATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRRA
RIRDRKAQQVFVDEGHTVQFVCRADGDPP
PAILWLSPRKHLVSAKSNGRLTVFPDGTLE
VRYAQVQDNGTYLCIAANAGGNDSMPAHL
HVRSYSPDWPHQPNKTFAFISNQPGEGEA
NSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVV
LFCLVLLFLWSRGKGNTKHNIEIEYVPRKS
DAGISSADAPRKFNMKMI

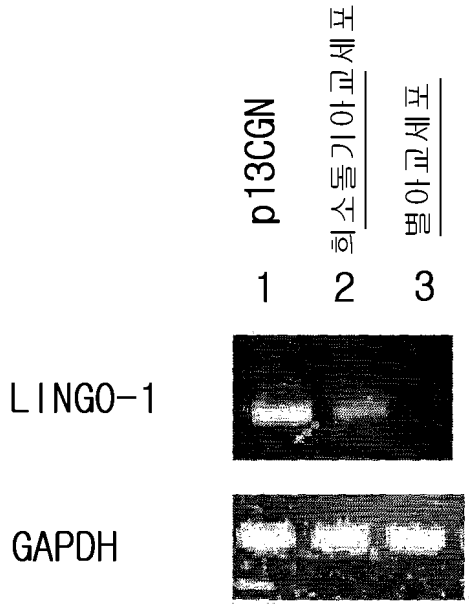
도면3

ATGCTGGCAGGGGGTATGAGAAGCATGCCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCA
GCCCATCCTCCTGCTGGTACTGGGCTCAGTGCTGTCAGGCTCTGCTACAGGCTG
CCCGCCCCGCTGCGAGTGCTCAGCGCAGGACCGAGCCGTGCTCTGCCACCGCA
AACGCTTTGTGGCGGTGCCCGAGGGCATCCCCACCGAGACTCGCCTGCTGGAC
CTGGGCAAAAACCGCATCAAGACACTCAACCAGGACGAGTTTGCCAGCTTCCC
ACACCTGGAGGAGCTAGAACTCAATGAAAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCA
GGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTGAGGACTCTGGGGCTGCGCAGCAACCG
CCTGAAGCTTATCCCGCTGGGCGTCTTCACCGGCCTCAGCAACTTGACCAAGCT
GGACATCAGTGAGAACAAGATCGTCATCCTGCTAGACTACATGTTCCAAGACC
TATACAACCTCAAGTCGCTGGAGGTCGGCGACAACGACCTCGTCTACATCTCC
CATCGAGCCTTCAGCGGCCTCAACAGCCTGGAACAGCTGACGCTGGAGAAATG
CAATCTGACCTCCATCCCCACGGAGGCGCTCTCCCACCTGCACGGCCTCATCGT
CCTGCGGCTACGACATCTCAACATCAATGCCATCAGGGACTACTCCTTCAAGA
GGCTGTACCGACTTAAGGTCTTAGAGATCTCCCACTGGCCCTACCTGGACACCA
TGACCCCCAACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACATCCCTATCCATCACGCACT
GCAACCTGACAGCCGTGCCCTATCTGGCAGTGCGTCACCTGGTCTATCTCCGTT
TCCTCAACCTTTCCTACAACCCAATCGGTACAATCGAGGGCTCCATGCTGCATG
AGCTGCTGCGGTTGCAGGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTG
GAGCCCTATGCCTTTCGTGGGCTCAACTACCTGCGTGTGCTCAATGTCTCTGGC
AACCAGCTGACCACCCTGGAGGAGTCAGCCTTCCATTCGGTGGGCAACCTGGA
GACGCTCATCCTGGACTCCAACCCACTGGCCTGTGACTGCCGGCTGCTGTGGGT
GTTCCGGCGCCGCTGGCGGCTCAACTTCAACAGGCAGCAGCCCACCTGCGCCA
CACCTGAGTTCGTCCAGGGCAAAGAGTTCAAGGACTTTCCGGATGTACTCCTA
CCCAACTACTTCACCTGCCGCCGGGCCCACATCCGGGACCGCAAGGCACAGCA
GGTGTTTGTAGATGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTATGCCGGGCAGATGGCG
ACCCTCCACCAGCTATCCTTTGGCTCTCACCCCGCAAGCACTTGGTCTCGGCCA
AGAGCAATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTAC
GCCCAGGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCAGCCAATGCTGGCGG
CAACGACTCCATGCCCGCCCACTTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCTGACTGGCC
CCATCAACCCAACAAGACCTTCGCCTTCATCTCCAACCAGCCAGGCGAGGGAG
AGGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCCCTTCGACATCAAGACGCTC
ATTATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCCTTCCTGGGCGTTGTCCTATTCTGCC
TGGTGCTGCTGTTTCTATGGAGCCGGGGCAAAGGCAACACAAAGCACAACATC
GAAATTGAGTATGTGCCCCGGAAATCGGACGCAGGCATCAGCTCAGCTGATGC
ACCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGA

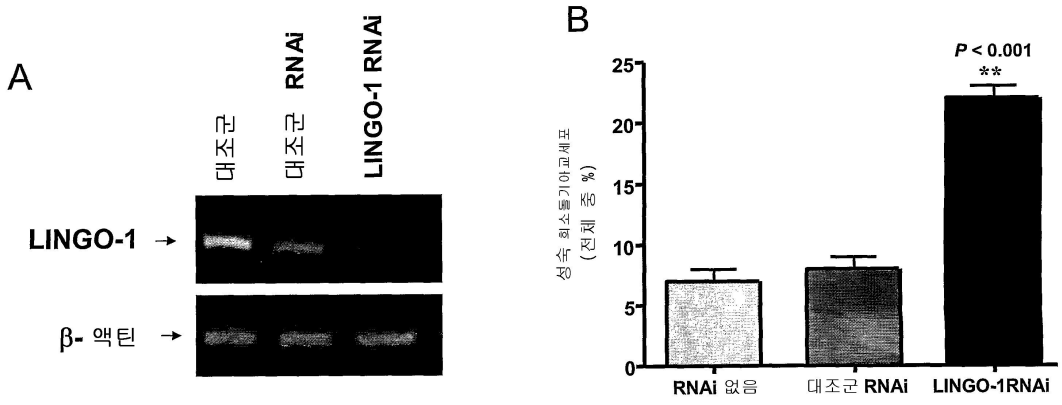
도면4

M L A G G M R S M P S P L L A C W Q P I L L L V L
G S V L S G S A T G C P P R C E C S A Q D R A V L
C H R K R F V A V P E G I P T E T R L L D L G K N
R I K T L N Q D E F A S F P H L E E L E L N E N I
V S A V E P G A F N N L F N L R T L G L R S N R L
K L I P L G V F T G L S N L T K L D I S E N K I V
I L L D Y M F Q D L Y N L K S L E V G D N D L V Y
I S H R A F S G L N S L E Q L T L E K C N L T S I
P T E A L S H L H G L I V L R L R H L N I N A I R
D Y S F K R L Y R L K V L E I S H W P Y L D T M T
P N C L Y G L N L T S L S I T H C N L T A V P Y L
A V R H L V Y L R F L N L S Y N P I G T I E G S M
L H E L L R L Q E I Q L V G G Q L A V V E P Y A F
R G L N Y L R V L N V S G N Q L T T L E E S A F H
S V G N L E T L I L D S N P L A C D C R L L W V F
R R R W R L N F N R Q Q P T C A T P E F V Q G K E
F K D F P D V L L P N Y F T C R R A H I R D R K A
Q Q V F V D E G H T V Q F V C R A D G D P P P A I
L W L S P R K H L V S A K S N G R L T V F P D G T
L E V R Y A Q V Q D N G T Y L C I A A N A G G N D
S M P A H L H V R S Y S P D W P H Q P N K T F A F
I S N Q P G E G E A N S T R A T V P F P F D I K T
L I I A T T M G F I S F L G V V L F C L V L L F L
W S R G K G N T K H N I E I E Y V P R K S D A G I
S S A D A P R K F N M K M I

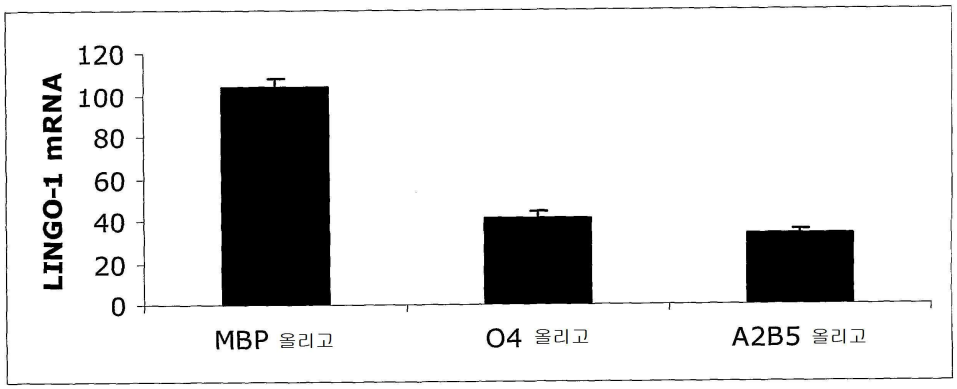
도면5



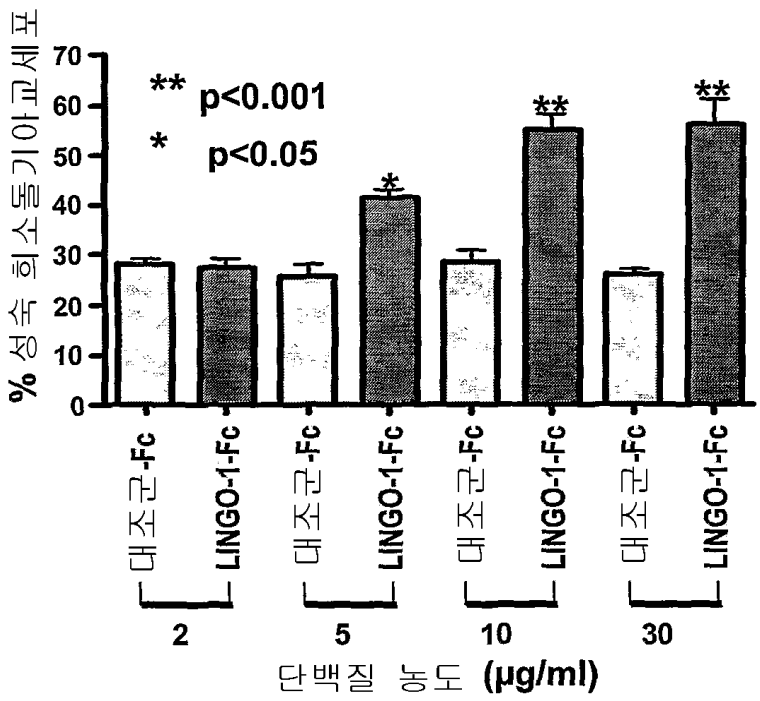
도면6


A
대조군
대조군 RNAi
LINGO-1 RNAi
LINGO-1
β- 액틴
B
P < 0.001
**
성숙 희소돌기아교세포 (전체 중 %)
25
20
15
10
5
0
RNAi 없음
대조군 RNAi
LINGO-1RNAi

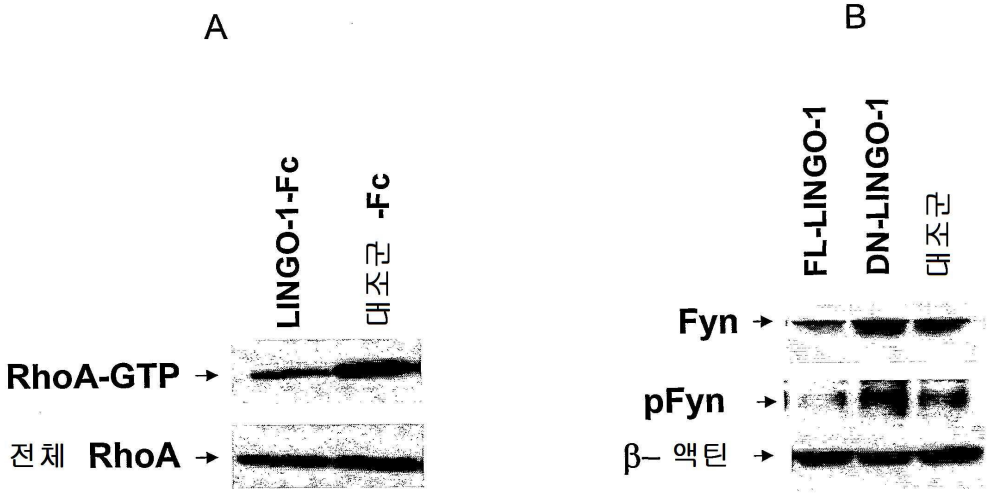
도면7


LINGO-1 mRNA
120
100
80
60
40
20
0
MBP 올리고
O4 올리고
A2B5 올리고

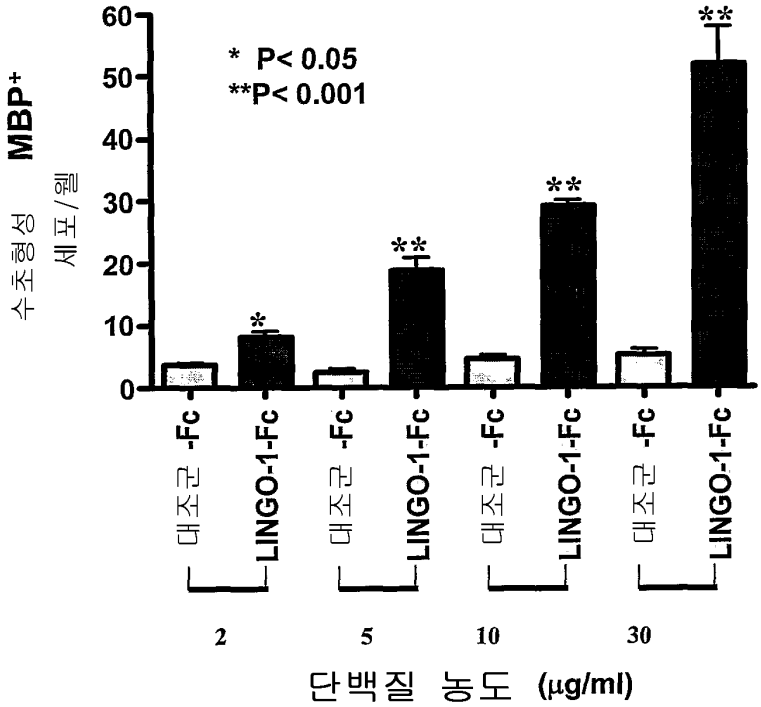
도면8


% 성숙 희소돌기아교세포
70
60
50
40
30
20
10
0
** p<0.001
* p<0.05
대조군-Fc
LINGO-1-Fc
2
5
10
30
단백질 농도 (μg/ml)

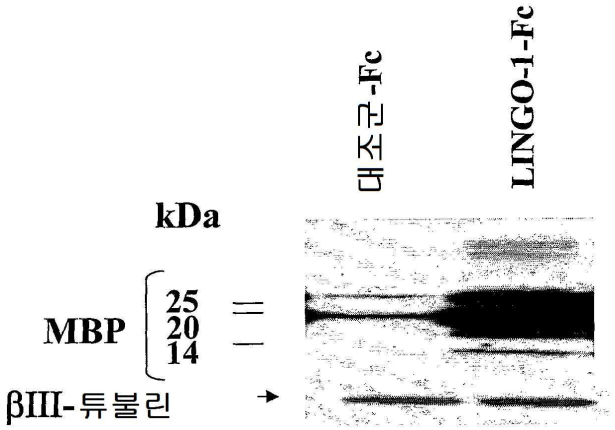
도면9


A
LINGO-1-Fc
대조군 -Fc
RhoA-GTP
전체 RhoA
B
FL-LINGO-1
DN-LINGO-1
대조군
Fyn
pFyn
β– 액틴

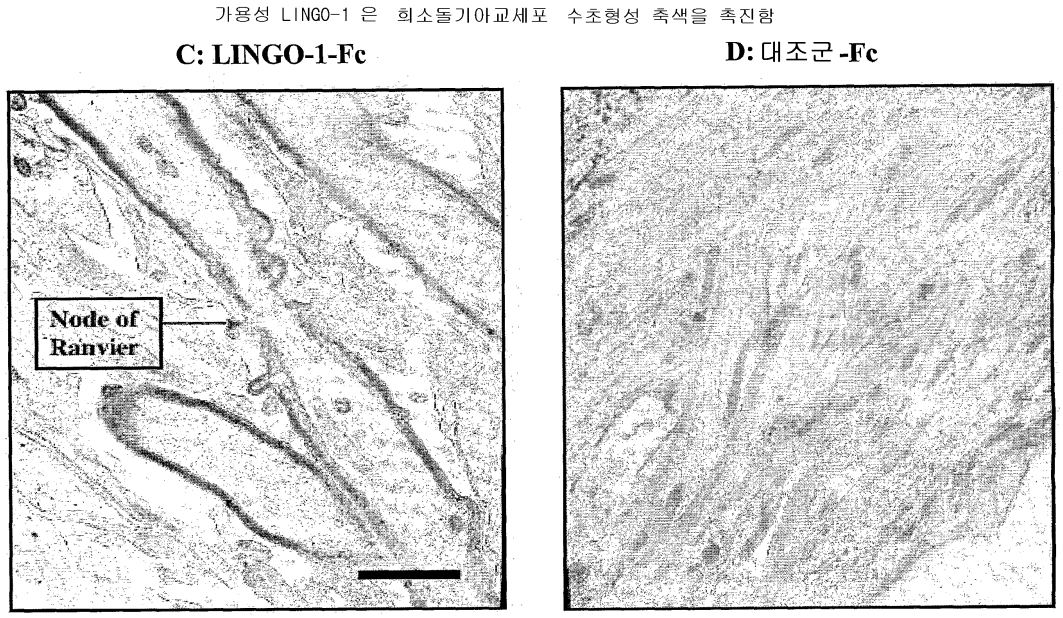
도면10A


수초형성 MBP+ 세포/웰
60
50
40
30
20
10
0
* P< 0.05
**P< 0.001
*
**
**
**
대조군 -Fc
LINGO-1-Fc
대조군 -Fc
LINGO-1-Fc
대조군 -Fc
LINGO-1-Fc
대조군 -Fc
LINGO-1-Fc
2
5
10
30
단백질 농도 (μg/ml)

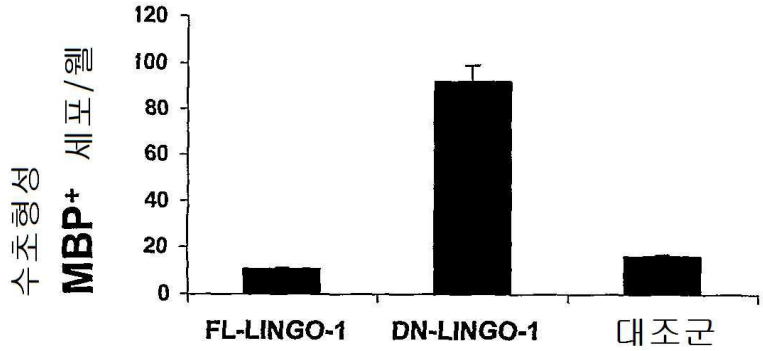
도면10B


대조군 -Fc
LINGO-1-Fc
kDa
MBP
25
20
14
βIII-튜불린

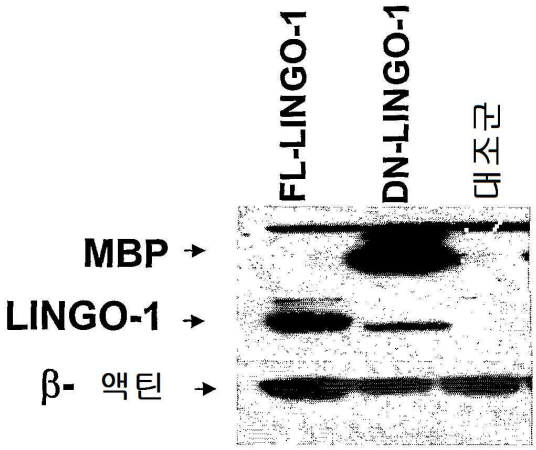
도면10C10D



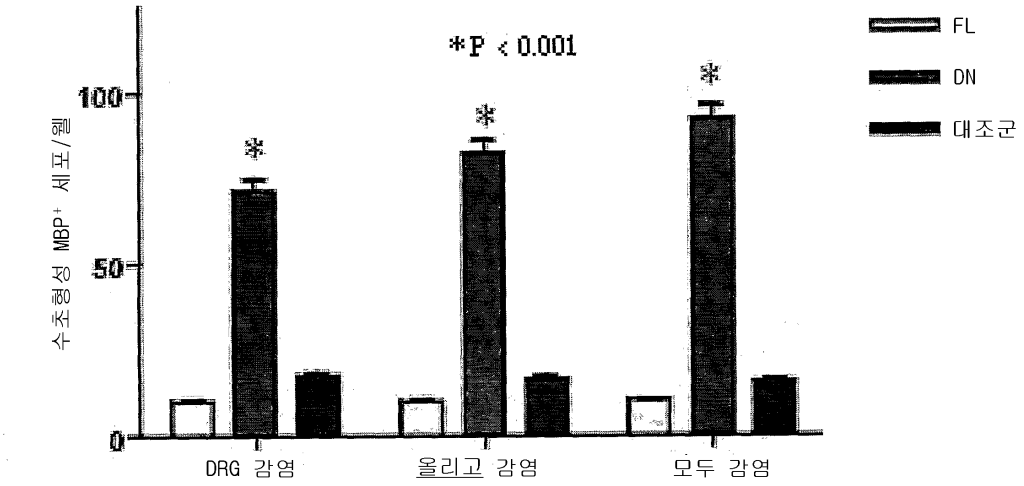
도면10E



도면10F

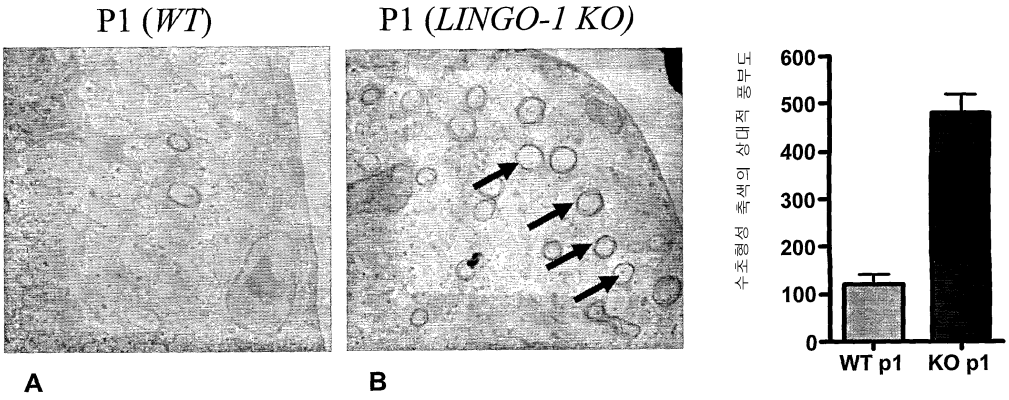


도면10G

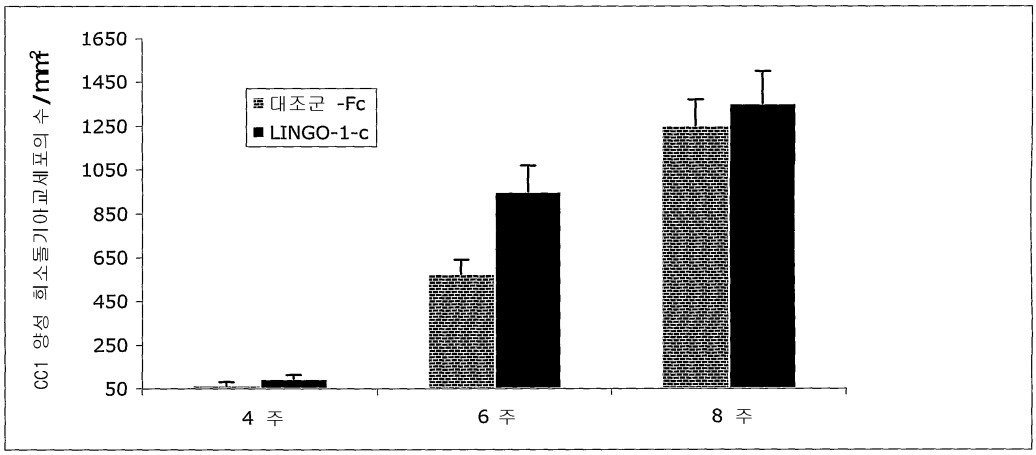


도면11

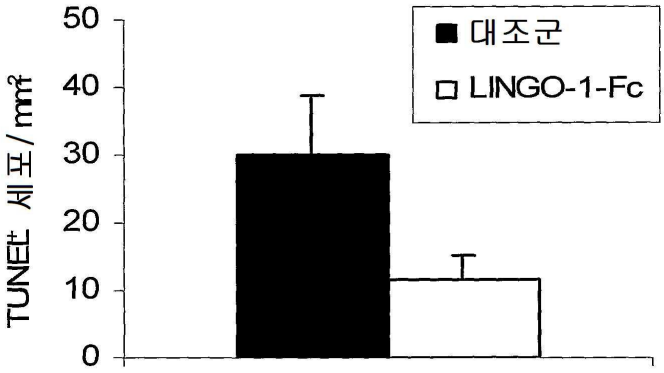
LINGO-1 녹아웃 마우스는 척수 초수초형성을 보임



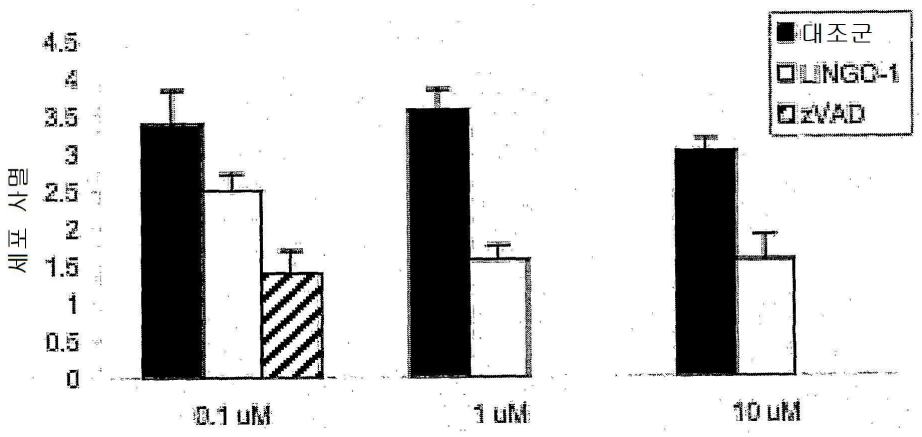
도면12



도면13

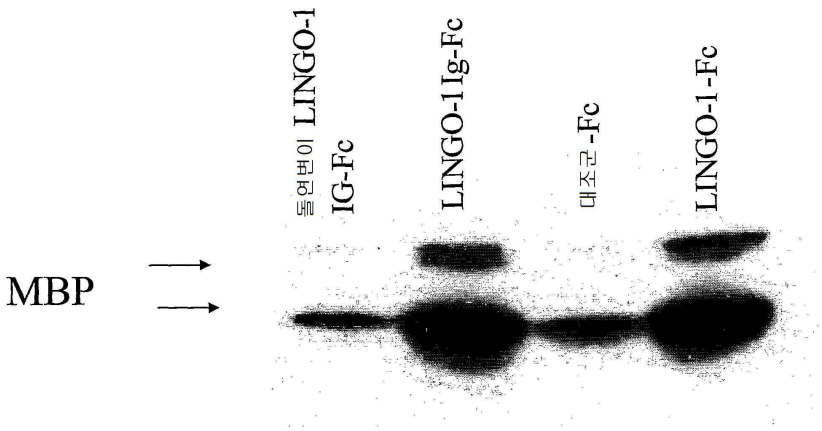


도면14



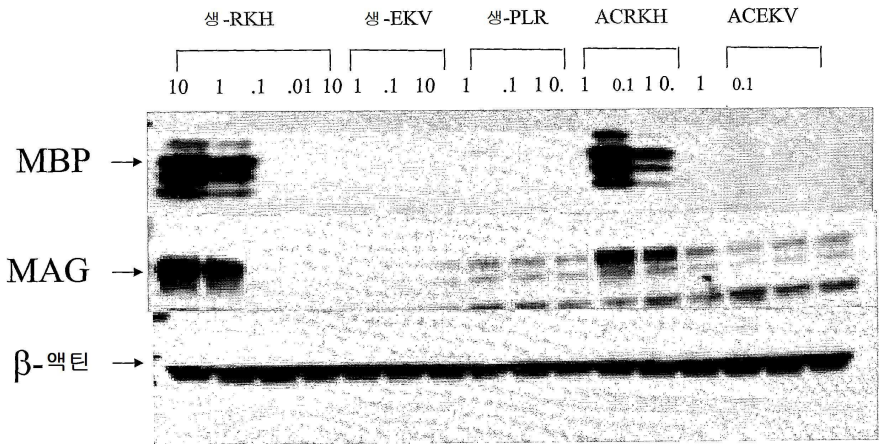
도면15

LINGO-1 Ig 도메인은 공동배양시 수초형성을 촉진함



도면16

LINGO-1 펩티드 RKH 는 공동배양시 수초형성을 촉진함



서 열 목 록

<110> Mi, Sha
Pepinsky, R. Blake
McCoy, John
<120> Treatment of Conditions Involving Demyelination

<130> 2159.0460004

<140> 11/165,576
<141> 2005-06-24

<150> 60/680,475
<151> 2005-05-13

<150> 60/628,435
<151> 2004-11-15

<150> 60/617,297
<151> 2004-10-07

<150> 60/582,966
<151> 2004-06-24

<160> 99

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 1845
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgctggcgg ggggcgtgag gagcatgccc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc 60

ctcctgctgg tgctgggctc agtgctgtca ggctcggcca cgggctgccc gccccgctgc 120

gagtgctccg cccaggaccg cgctgtgctg tgccaccgca agcgctttgt ggcagtcccc 180

gagggcatcc ccaccgagac gcgcctgctg gacctaggca agaaccgcat caaaacgctc 240

aaccaggacg agttcgccag cttcccgcac ctggaggagc tggagctcaa cgagaacatc 300

gtgagcgccg tggagcccgg cgccttcaac aacctcttca acctccggac gctgggtctc 360

cgcagcaacc gcctgaagct catcccgcta ggcgtcttca ctggcctcag caacctgacc 420

aagctggaca tcagcgagaa caagattgtt atcctgctgg actacatgtt tcaggacctg 480

tacaacctca agtcactgga ggttggcgac aatgacctcg tctacatctc tcaccgcgcc 540

ttcagcggcc tcaacagcct ggagcagctg acgctggaga aatgcaacct gacctccatc 600

cccaccgagg cgctgtccca cctgcacggc ctcatcgtcc tgaggctccg gcacctcaac 660

atcaatgcca tccgggacta ctccttcaag aggctctacc gactcaaggt cttggagatc 720

tcccactggc cctacttgga caccatgaca cccaactgcc tctacggcct caacctgacg 780

tccctgtcca tcacacactg caatctgacc gctgtgccct acctggccgt ccgccaccta 840

gtctatctcc gcttcctcaa cctctcctac aaccccatca gcaccattga gggctccatg 900

ttgcatgagc tgctccggct gcaggagatc cagctggtgg gcgggcagct ggccgtggtg 960

gagccctatg ccttccgcgg cctcaactac ctgcgcgtgc tcaatgtctc tggcaaccag 1020

ctgaccacac tggaggaatc agtcttccac tcggtgggca acctggagac actcatcctg 1080

gactccaacc cgctggcctg cgactgtcgg ctcctgtggg tgttccggcg ccgctggcgg 1140

ctcaacttca accggcagca gcccacgtgc gccacgcccg agtttgtcca gggcaaggag 1200

ttcaaggact tccctgatgt gctactgccc aactacttca cctgccgccg cgcccgcatc 1260

cgggaccgca aggcccagca ggtgtttgtg gacgagggcc acacggtgca gtttgtgtgc 1320

cgggccgatg gcgacccgcc gcccgccatc ctctggctct caccccgaaa gcacctggtc 1380

tcagccaaga gcaatgggcg gctcacagtc ttccctgatg gcacgctgga ggtgcgctac 1440

gcccaggtac aggacaacgg cacgtacctg tgcatcgcgg ccaacgcggg cggcaacgac 1500

tccatgcccg cccacctgca tgtgcgcagc tactcgcccg actggcccca tcagcccaac 1560

aagaccttcg ctttcatctc caaccagccg ggcgagggag aggccaacag cacccgcgcc 1620

actgtgcctt tccccttcga catcaagacc ctcatcatcg ccaccaccat gggcttcatc 1680

tctttcctgg gcgtcgtcct cttctgcctg gtgctgctgt ttctctggag ccggggcaag 1740

ggcaacacaa agcacaacat cgagatcgag tatgtgcccc gaaagtcgga cgcaggcatc 1800

agctccgccg acgcgccccg caagttcaac atgaagatga tatga 1845

<210> 2
<211> 614
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
1 5 10 15

Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
35 40 45

Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
50 55 60

Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
65 70 75 80

Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
85 90 95

Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu
420 425 430

Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro
435 440 445

Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser
450 455 460

Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr
465 470 475 480

```
Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala
                485                 490                 495

Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser
            500                 505                 510

Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn
        515                 520                 525

Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe
    530                 535                 540

Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile
545                 550                 555                 560

Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
                565                 570                 575

Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
            580                 585                 590

Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
        595                 600                 605

Phe Asn Met Lys Met Ile
    610
```

<210> 3
<211> 1845
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 3

```
atgctggcag ggggtatgag aagcatgccc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc        60

ctcctgctgg tactgggctc agtgctgtca ggctctgcta caggctgccc gccccgctgc       120

gagtgctcag cgcaggaccg agccgtgctc tgccaccgca aacgctttgt ggcggtgccc       180

gagggcatcc ccaccgagac tcgcctgctg gacctgggca aaaaccgcat caagacactc       240

aaccaggacg agtttgccag cttcccacac ctggaggagc tagaactcaa tgaaaacatc       300
```

gtgagcgccg tggagccagg cgccttcaac aacctcttca acctgaggac tctggggctg 360

cgcagcaacc gcctgaagct tatcccgctg ggcgtcttca ccggcctcag caacttgacc 420

aagctggaca tcagtgagaa caagatcgtc atcctgctag actacatgtt ccaagaccta 480

tacaacctca agtcgctgga ggtcggcgac aacgacctcg tctacatctc ccatcgagcc 540

ttcagcggcc tcaacagcct ggaacagctg acgctggaga aatgcaatct gacctccatc 600

cccacggagg cgctctccca cctgcacggc ctcatcgtcc tgcggctacg acatctcaac 660

atcaatgcca tcagggacta ctccttcaag aggctgtacc gacttaaggt cttagagatc 720

tcccactggc cctacctgga caccatgacc cccaactgcc tctacggcct caacctgaca 780

tccctatcca tcacgcactg caacctgaca gccgtgccct atctggcagt gcgtcacctg 840

gtctatctcc gtttcctcaa cctttcctac aacccaatcg gtacaatcga gggctccatg 900

ctgcatgagc tgctgcggtt gcaggagatc cagctggtgg gcgggcagct ggccgtggtg 960

gagccctatg cctttcgtgg gctcaactac ctgcgtgtgc tcaatgtctc tggcaaccag 1020

ctgaccaccc tggaggagtc agccttccat tcggtgggca acctggagac gctcatcctg 1080

gactccaacc cactggcctg tgactgccgg ctgctgtggg tgttccggcg ccgctggcgg 1140

ctcaacttca acaggcagca gcccacctgc gccacacctg agttcgtcca gggcaaagag 1200

ttcaaggact ttccggatgt actcctaccc aactacttca cctgccgccg ggcccacatc 1260

cgggaccgca aggcacagca ggtgtttgta gatgagggcc acacggtgca gtttgtatgc 1320

cgggcagatg gcgaccctcc accagctatc ctttggctct caccccgcaa gcacttggtc 1380

tcggccaaga gcaatgggcg gctcacagtc ttccctgatg gcacgctgga ggtgcgctac 1440

gcccaggtac aggacaacgg cacgtacctg tgcatcgcag ccaatgctgg cggcaacgac 1500

tccatgcccg cccacttgca tgtgcgcagc tactcgcctg actggcccca tcaacccaac 1560

aagaccttcg ccttcatctc caaccagcca ggcgagggag aggccaacag cacccgcgcc 1620

actgtgcctt tccccttcga catcaagacg ctcattatcg ccaccaccat gggcttcatc 1680

tccttcctgg gcgttgtcct attctgcctg gtgctgctgt ttctatggag ccggggcaaa 1740

ggcaacacaa agcacaacat cgaaattgag tatgtgcccc ggaaatcgga cgcaggcatc 1800

agctcagctg atgcaccccg caagttcaac atgaagatga tatga 1845

<210> 4
<211> 614
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 4

Met Leu Ala Gly Gly Met Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
1 5 10 15

Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
35 40 45

Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
50 55 60

Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
65 70 75 80

Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
85 90 95

Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu
100 105 110

Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile

```
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala His Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu
            420                 425                 430

Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro
        435                 440                 445

Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser
    450                 455                 460

Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr
465                 470                 475                 480

Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala
                485                 490                 495

Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser
            500                 505                 510

Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn
        515                 520                 525

Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe
    530                 535                 540

Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile
545                 550                 555                 560

Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
                565                 570                 575

Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
            580                 585                 590
```

Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
595 600 605

Phe Asn Met Lys Met Ile
610

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Gln Val Ser Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)..(5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 6
Ile Thr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)..(5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 7
Ala Cys Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)..(5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 8
Val Cys Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)..(5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 9
Ser Pro Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 11
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Ser Pro Arg Lys Lys
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Ser Pro Arg Lys Arg
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Ser Pro Lys Lys His
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Ser Pro His Lys His
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Ser Pro Arg Arg His
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Ser Pro Arg His His
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Ser Pro Arg Arg Arg
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ser Pro His His His
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Ser Pro Lys Lys Lys
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Ile Thr Pro Lys Arg Arg
1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Ala Cys His His Lys
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Val Cys His His Lys
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 23
Xaa Xaa Arg Lys His
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 24
Xaa Xaa Arg Arg Arg
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 25
Xaa Xaa Lys Lys Lys
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26
Xaa Xaa His His His
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27
Xaa Xaa Arg Lys Lys
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28
Xaa Xaa Arg Lys Arg
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29
Xaa Xaa Lys Lys His
1 5

<210> 30
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 30
Xaa Xaa His Lys His
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 31
Xaa Xaa Arg Arg His
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 32
Xaa Xaa Arg His His
1 5

<210> 33

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys

1 5

<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rat RT-PCR Forward Primer

<400> 38
agagacatgc gattggtga 19

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Rat RT-PCR Reverse Primer

<400> 39
agagatgtag acgaggtcat t 21

<210> 40
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LV1-035 (sense oligo)

<400> 40
tgatcgtcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttttc 55

<210> 41
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LV1-036 (antisense oligo)

<400> 41
tcgagaaaaa agatcgtcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca 59

<210> 42
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LV1-035 Control

<400> 42
tgatcctcat ccttctatac ttcaagagag tgtagcagga tgacgatctt ttttctcga 59

<210> 43
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LV1-036 Control

<400> 43
tcgagaaaaa agatcgtcat cctgctagac tctcttgaag tatagaagga tgacgatca 59

<210> 44
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FL-Sp35 Primer

<400> 44

gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41

<210> 45
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FL-Sp35 Primer

<400> 45
ggggcggaat tggatcctca cagatcctct tctgagatga g 41

<210> 46
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DN-Sp35 Primer

<400> 46
gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41

<210> 47
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DN-Sp35 Primer

<400> 47
gatacggatc ctcagccttt gccccggctc catagaaaca gc 42

<210> 48
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Human Sp35 Forward Primer

<400> 48
cagcaggtcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt 37

<210> 49
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Human Sp35 Reverse Primer

<400> 49
cagcaggtcg acctcgcccg gctggttggc caaccagccg ggcgaggtcg acctcgagg 59

<210> 50
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sp35 Forward Primer

<400> 50
ctttcccctt cgacatcaag ac 22

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sp35 Reverse Primer

<400> 51

cagcagcacc aggcagaa 18

<210> 52
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FAM Labeled Probe

<400> 52
atcgccacca ccatgggctt cat 23

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse Forward Primer

<400> 53
ctatccaagc actgcctgct c 21

<210> 54
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse Reverse Primer

<400> 54
gagttctagc tcctccaggt gtg 23

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse Reverse Primer

<400> 55
gatgcccttc agctcgatgc g 21

<210> 56
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sp35 Primer

<400> 56
gattactcga gatgctggcg gggggcgtga gg 32

<210> 57
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sp35 Primer

<400> 57
cgcgggaatt ctcatatcat cttcatgttg aacttg 36

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His
1 5 10

<210> 59

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Ile His
1 5 10

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Gly Ser Gly Cys Ile Pro Gln Ser
1 5

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Leu Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Leu Ser Pro Glu Lys Val
1 5

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)

<223> Position 1 is Biotinylated-Gly

<400> 63
Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys
1 5 10

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is Biotinylated-Gly

<400> 64
Gly Ser Gly Cys Lys His Ser Pro Leu Arg Cys
1 5 10

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is Biotinylated-Gly

<400> 65
Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys
1 5 10

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE

<222> (1)
<223> Position 1 is Acetylated-Cys

<400> 66
Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys
1 5

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Position 1 is Acetylated-Cys

<400> 67
Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys
1 5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> Xaa is any Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 68
Ile Thr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> Xaa is any Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 69
Ala Cys Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<220>
<221> SITE

<222> (4)
<223> Xaa is any Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 70
Val Cys Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> Xaa is any Amino Acid

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Xaa is any Basic Amino Acid

<400> 71
Ser Pro Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Ser Pro Arg Leu His
1 5

<210> 73
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> General Structure for an Oligonucleotide used in Preparation of an siRNA Molecule

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(200)
<223> n is a, c, g, t or u

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(200)
<223> nucleotide may be missing

<400> 73
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 200

<210> 74
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> General Structure for an Oligonucleotide used in Preparation of

an siRNA Molecule

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(200)
<223> n is a, c, g, t or u

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(200)
<223> nucleotide may be missing

<400> 74
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 200

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Gly Ser Gly Cys Lys His Ser Pro Leu Arg Cys
1 5 10

<210> 77

<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys
1 5 10

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys
1 5

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80
Leu Ser Pro Arg Lys Lys
1 5

<210> 81
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81
Leu Ser Pro Arg Lys Arg

1 5

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82
Leu Ser Pro Lys Lys His
1 5

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Leu Ser Pro His Lys His
1 5

<210> 84
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
Leu Ser Pro Arg Arg His
1 5

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85
Leu Ser Pro Arg His His
1 5

<210> 86
<211> 6
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86
Leu Ser Pro Arg Arg Arg
1 5

<210> 87
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Leu Ser Pro His His His
1 5

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Leu Ser Pro Lys Lys Lys
1 5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Trp Leu Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Trp Leu Ser Pro Arg Lys Lys
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91
Trp Leu Ser Pro Arg Lys Arg
1 5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Trp Leu Ser Pro Lys Lys His
1 5

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93
Trp Leu Ser Pro His Lys His
1 5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94
Trp Leu Ser Pro Arg Arg His
1 5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95
Trp Leu Ser Pro Arg His His
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96
Trp Leu Ser Pro Arg Arg Arg
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97
Trp Leu Ser Pro His His His
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98
Trp Leu Ser Pro Lys Lys Lys
1 5

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (5)..(7)
<223> Xaa is either lysine, arginine, histidine, glutamine, or asparagine

<400> 99
Cys Leu Ser Pro Xaa Xaa Xaa Cys
1 5