(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5653622号
(P5653622)

(45)発行日　平成27年1月14日(2015.1.14)　(24)登録日　平成26年11月28日(2014.11.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	

請求項の数 26　(全 40 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-538504 (P2009-538504)
(86)(22)出願日　平成19年11月21日 (2007.11.21)
(65)公表番号　特表2010-509939 (P2010-509939A)
(43)公表日　平成22年4月2日 (2010.4.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/085349
(87)国際公開番号　WO2008/064292
(87)国際公開日　平成20年5月29日 (2008.5.29)
審査請求日　平成22年11月15日 (2010.11.15)
(31)優先権主張番号　60/860,256
(32)優先日　平成18年11月21日 (2006.11.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　PTA-8383
微生物の受託番号　ATCC　PTA-8384

前置審査

(73)特許権者　391008788
アボット・ラボラトリーズ
ＡＢＢＯＴＴ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ
アメリカ合衆国　イリノイ州　アボット　パーク　アボット　パーク　ロード　１００
(73)特許権者　513144626
アッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー・ウント・コー・カー・ゲー
ドイツ国、６５２０５・ビースバーデン、マツクス－プランク－リング・２・アー
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｎｏｇｏ－６６受容体（ＮＧＲ）に対する中和モノクローナル抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ｎｏｇｏ－６６受容体（ＮｇＲ）の少なくとも１個のエピトープと特異的に相互作用する単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

（ａ）配列番号３の配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ領域）を含む配列、及び
配列番号４の配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ領域）を含む配列；又は

（ｂ）配列番号５の配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ領域）を含む配列、及び
配列番号６の配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ領域）を含む配列

を含む、抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又はその抗原結合フラグメントがＮｏｇｏ－６６のヒトＮｇＲへの結合を阻害し、前記抗体又はその抗原結合フラグメントがミエリン関連糖タンパク質（ＭＡＧ）のヒトＮｇＲへの結合を阻害しない、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項２】

モノクローナル中和抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項３】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントがＮｏｇｏ－６６を中和することができる、請求項２に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項４】

Ｎｏｇｏ－６６受容体がヒト、カニクイザル又はラットのものである、請求項２に記載

の抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項５】
Ｎｏｇｏ－６６受容体ポリペプチドが、配列番号１又は配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する、請求項２に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項６】
Ｎｏｇｏ－６６受容体が、配列番号８又は配列番号９に記載の核酸配列を有する核酸によりコードされている、請求項２に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項７】
ヒトＮｇＲに結合し、抗体がグリコシル化されている、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項８】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、マウス抗体又はキメラ抗体である、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項９】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント及びＦｖフラグメントからなる群から選択される抗原結合フラグメントである、請求項１に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【請求項１０】
Ｎｏｇｏ－６６受容体の少なくとも１個のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体であって、ハイブリドーマ細胞株ＡＴＣＣ　ＮＯ．ＰＴＡ－８３８３により分泌されるモノクローナル抗体。
【請求項１１】
Ｎｏｇｏ－６６受容体の少なくとも１個のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体がハイブリドーマ細胞株ＡＴＣＣ　ＮＯ．ＰＴＡ－８３８４により分泌されるモノクローナル抗体。
【請求項１２】
結合がＮｏｇｏ－６６受容体の不活性化をもたらす、請求項１０に記載のモノクローナル抗体。
【請求項１３】
結合がＮｏｇｏ－６６受容体の不活性化をもたらす、請求項１１に記載のモノクローナル抗体。
【請求項１４】
請求項１に記載のモノクローナル中和抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸。
【請求項１５】
請求項１４に記載の単離された核酸を含むｐｃＤＮＡ、ｐＴＴ、ｐＴＴ３、ｐＥＦＢＯＳ、ｐＢＶ、ｐＪＶ及びｐＢＪから構成される群から選択される、ベクター。
【請求項１６】
原生動物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞から構成される群から選択される、請求項１５に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。
【請求項１７】
動物細胞がＨＥＫ２９３、ＣＨＯ及びＣＯＳを含む群から選択される哺乳動物細胞である、請求項１６に記載の宿主細胞。
【請求項１８】
真核細胞である、請求項１５に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。
【請求項１９】
ヒト及び／又はラットＮｇＲに結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを生産し得る条件下で、請求項１６に記載の宿主細胞を培地中で培養する段階を含む、ヒト及び／又はラットＮｇＲに結合する請求項１に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントの生産方法。

【請求項２０】
請求項１、２及び５のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントと医薬的に許容可能なキャリヤーとを含有する医薬組成物。
【請求項２１】
Ｎｏｇｏ－６６受容体に結合するＮｏｇｏ－６６を低減させることが必要な対象に投与して対象においてＮｏｇｏ－６６受容体に結合するＮｏｇｏ－６６を低減させるための、請求項１、２及び５のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。
【請求項２２】
Ｎｏｇｏ－６６により誘導される神経突起伸長阻害を回復させることが必要な対象に投与して対象においてＮｏｇｏ－６６により誘導される神経突起伸長阻害を回復させるための、請求項1、２及び５のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。
【請求項２３】
単独投与又は他の治療剤と併用投与してＮｇＲ活性に関連する障害の対象を治療するための、請求項１、２及び５のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。
【請求項２４】
障害が、筋委縮性側索硬化症、腕神経叢損傷、外傷性脳損傷を含む脳損傷、脳性麻痺、フリードライヒ運動失調症、ギラン・バレー症候群、白質ジストロフィー、多発性硬化症、ポリオ後遺症、二分脊椎、脊髄損傷、脊髄性筋萎縮症、脊髄腫瘍、脳卒中及び横断性脊髄炎からなる群から選択される神経疾患を含む、請求項２３に記載の医薬組成物。
【請求項２５】
障害が、認知症、老人性認知症、軽度認知障害、アルツハイマー関連認知症、ハンチントン舞踏病、遅発性ジスキネジア、運動亢進症、躁病、梅毒性パーキンソン病、スチール・リチャードソン症候群、ダウン症候群、重症筋無力症、神経外傷、血管アミロイドーシス、アミロイドーシスを伴う脳出血Ｉ、脳炎症、フリードライヒ運動失調症、急性錯乱、筋委縮性側索硬化症、緑内障及びアルツハイマー病からなる群から選択される神経疾患を含む、請求項２３に記載の医薬組成物。
【請求項２６】
請求項１、２及び５に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、ＮｇＲ活性が有害である障害に罹患した対象においてヒトＮｇＲ活性を低下させるための医薬組成物であって、対象におけるヒトＮｇＲ活性が低下するように、単独投与又は他の治療剤と併用して対象に投与される医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願はＮｏｇｏ－６６受容体結合性蛋白質、特にＮｏｇｏ－６６受容体と結合し、Ｎｏｇｏ－６６受容体の機能を中和することが可能なモノクローナル抗体について記載する。従って、これらの抗体は限定されないが、哺乳動物脳損傷、脊髄損傷、脳卒中、神経変性疾患及び統合失調症等の数種の状態の治療に有用であると思われる。
【背景技術】
【０００２】
哺乳動物中枢神経系（ＣＮＳ）内の損傷後の軸索再生は殆どの場合に不可能であり、転帰はＣＮＳ内の神経線維の固有の再成長能と、損傷部位の微細環境に局在しており、損傷した線維区域の再成長、従って再生を積極的に妨害するＣＮＳ内の阻害因子とのバランスに依存する。
【０００３】
希突起膠細胞により産生されるＣＮＳミエリンがインビトロ及びインビボで成長円錐崩壊を引き起こし、その結果、軸索伸長の直接阻害を生じることにより損傷の初期段階にお

ける軸索成長に最も関係の深い非許容因子であることは定説である（研究報告については、Ｌｅｅら，２００３参照）。ＣＮＳミエリンの主要阻害因子として希突起膠細胞ミエリン糖蛋白（ＯＭｇｐ）、ミエリン関連糖蛋白（ＭＡＧ）及びＮｏｇｏ－Ａがつい最近同定された（Ｄｏｍｅｎｉｃｏｎｉら，２００２；研究報告：Ｗｏｏｌｆ　＆　Ｂｌｏｅｃｈｉｎｇｅｒ，２００２；ＭｃＧｅｅ　＆　Ｓｔｒｉｔｔｍａｔｔｅｒ，２００３；Ｌｅｅら，２００３）。最後に挙げた蛋白質は主要阻害機能を発揮するドメインＮｏｇｏ－６６を含む（ＧｒａｎｄＰｒｅら，２０００）。興味深いことに、全３種の阻害蛋白質はＣＮＳで高い発現レベルを示し、同一のニューロングリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）部分により固定された受容体であるＮｏｇｏ－６６受容体ないしＮｇＲと相互作用する（Ｆｏｕｒｎｉｅｒら，２００１）。Ｎｏｇｏ－６６受容体ＮｇＲは４７３アミノ酸グリコシルホスファチジルイノシトール結合蛋白質である。この蛋白質はＮ末端シグナル配列とそれに続く８個のロイシンリッチリピートドメイン、（一緒になって所謂細胞外ドメインを形成する）ロイシンリッチリピートＣ末端ドメイン及びＧＰＩ固定ドメインから構成される。ＧＰＩアンカーを介して、ＮｇＲは外部ニューロン原形質膜と結合している。

【０００４】

ＮｇＲ自体は３個のＣＮＳ集積ＧＰＩ固定蛋白質（ＮｇＲ、ＮｇＲ２及びＮｇＲ３と言う。）のファミリーに属しており、ファミリーの配列一致度は約４０％であるが、全体の構造編成は非常によく似ている（Ｂａｒｔｏｎら，２００３；Ｌａｕｒｅｎら，２００３；Ｐｉｇｎｏｔｔら，２００３）。ＮｇＲは複数のミエリン関連阻害分子と相互作用することが知られている唯一のメンバーであるが、ＭＡＧもＮｇＲ２と相互作用することが最近報告されている（Ｖｅｎｋａｔｅｓｈら，２００５）。ＮｇＲホモログの機能は現時点では不明である。ＮｇＲ自体は齧歯類又はニワトリで初期発生中には発現されないが、成体動物では高い発現レベルを示し、ＮｇＲは脊髄を含むＣＮＳ領域の全部ではないとしても大半で発現される（Ｈｕｎｔら，２００２ａ，ｂ）。ニワトリ（Ｆｏｕｒｎｉｅｒら，２００１）、ラット（Ｈｕｎｔら，２００２ａ）及びマウス（Ｗａｎｇら，２００２ｂ）ではｍＲＮＡと蛋白質レベルの両者で脊髄発現が報告されている。成体ＣＮＳ組織内において、ＮｇＲ蛋白質はその軸索突起を含む全成熟ニューロンで発現される。リガンドがＮｇＲと結合すると、細胞内シグナル伝達カスケードが開始し、その結果、軸索伸長阻害と成長円錐崩壊が生じる。ＮｇＲは膜貫通ドメインを含まないので、シグナル伝達にはＮｇＲ／リガンド相互作用シグナルを細胞に導入する共受容体が必要である。ＮｇＲシグナル伝達の初期段階は共受容体ｐ７５又はＴＲＯＹとのその相互作用である（Ｗｏｎｇら，２００２；Ｓｈａｏら，２００５；Ｐａｒｋら，２００５）。Ｌｉｎｇｏ－１と呼ばれる第２の共受容体も同定されている。ＮｇＲとＰ７５又はＴＲＯＹとＬｉｎｇｏ－１の三元複合体のみが機能的シグナル伝達複合体を構成する（Ｍｉら，２００４；Ｐａｒｋら，２００５）。このシグナル伝達の結果はアクチン細胞骨格の再構成である。ニューロンにおいて、このアクチン細胞骨格変化は軸索伸長の阻害と成長円錐崩壊の誘導をもたらす。

【０００５】

インビトロにおいて、ＮｇＲ（－／－）マウスに由来する後根神経節細胞はＮｏｇｏ６６結合能が低下し、成長円錐崩壊アッセイにおいてＮｏｇｏ６６、Ｆｃ－ＭＡＧ、ＯＭｇｐ又はミエリンの阻害作用に対して低応答性である（Ｋｉｍら，２００４）。ＮｇＲ（－／－）マウスは部分的又は完全な脊髄損傷後に赤核脊髄路と縫線核脊髄路を含む脳幹路の再生増加を示した。脊髄の完全な実験的離断後でも、ＮｇＲ（－／－）マウスはオープンフィールド試験で機能回復の増加を示した。脊髄の半側切断及び完全離断後に、ＮｇＲ（－／－）マウスの回復はホモ接合（＋／＋）及びヘテロ接合同腹子よりも有意に良好であった（Ｋｉｍら，２００４）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｌｅｅら，２００３

【非特許文献２】Ｄｏｍｅｎｉｃｏｎｉら，２００２
【非特許文献３】Ｗｏｏｌｆ　＆　Ｂｌｏｅｃｈｉｎｇｅｒ，２００２
【非特許文献４】ＭｃＧｅｅ　＆　Ｓｔｒｉｔｔｍａｔｔｅｒ，２００３
【非特許文献５】ＧｒａｎｄＰｒｅら，２０００
【非特許文献６】Ｆｏｕｒｎｉｅｒら，２００１
【非特許文献７】Ｂａｒｔｏｎら，２００３
【非特許文献８】Ｌａｕｒｅｎら，２００３
【非特許文献９】Ｐｉｇｎｏｔら，２００３
【非特許文献１０】Ｖｅｎｋａｔｅｓｈら，２００５
【非特許文献１１】Ｈｕｎｔら，２００２ａ，ｂ
【非特許文献１２】Ｗａｎｇら，２００２ｂ
【非特許文献１３】Ｗｏｎｇら，２００２
【非特許文献１４】Ｓｈａｏら，２００５
【非特許文献１５】Ｐａｒｋら，２００５
【非特許文献１６】Ｍｉら，２００４
【非特許文献１７】Ｋｉｍら，２００４

【発明の概要】

【０００７】

本願はＮｏｇｏ－６６結合について選択的に競合し、ＮｇＲ活性が有害であり得る障害を改善すると予想される抗ＮｇＲ中和モノクローナル抗体の作製について記載する。本発明の中和モノクローナル抗体は例えば、特に急性脊髄損傷、脳損傷又は神経変性疾患（例えばハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病又は多発性硬化症）後の損傷したＣＮＳにおいてニューロン再生を促進すると予想される。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】図１ａ及びｂは抗体ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１とヒト及びラットＮｇＲとの結合を示す。

【図２】ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６とＮｇＲ－Ｆｃとの結合のｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１による競合。

【図３】ＨＥＫ２９３ｆ細胞で発現させたヒト及びラットＮｇＲとＮｏｇｏ６６との結合のｍＡＢ５０及びｍＡＢ５１による競合。

【図４】ｍＡＢ５０及びｍＡＢ５１とＮＴｅｒａ２細胞との結合。

【図５】ＮＴｅｒａ２細胞凝集物からの神経突起伸長の定量。

【図６】ｈＮｇＲの欠失変異体。

【図７】ＭＡＧ－ＦｃのＮｇＲ－Ｆｃへの結合の競合。

【図８】許容条件下及び阻害条件下におけるラット後根神経節ニューロン及びＮｏｇｏ６６により誘導される神経突起伸長阻害のｍＡｂ５０による中和。

【図９】ラットＤＲＧ細胞におけるＮｏｇｏ６６により誘導される神経突起伸長阻害のｍＡＢ５０及びｍＡｂ５１による中和。

【０００９】

配列表

配列番号１：ヒトＮｇＲ蛋白質
配列番号８：ヒトＮｇＲヌクレオチド
配列番号２：ラットＮｇＲ蛋白質
配列番号９：ラットＮｇＲヌクレオチド
配列番号３：抗体クローン５０ＶＨ
配列番号４：抗体クローン５０ＶＬ
配列番号５：抗体クローン５１ＶＨ
配列番号６：抗体クローン５１ＶＬ
配列番号７：ＡＰ－Ｎｏｇｏ－６６蛋白質

配列番号１０：ＡＰ－Ｎｏｇｏ－６６ヌクレオチド。

【００１０】

詳細な説明

本願はＮｏｇｏ受容体（ＮｇＲ）と相互作用する単離結合性蛋白質、特にヒト及びラットＮｇＲと結合してこれを中和する中和モノクローナル抗体に関する。これらの抗体はＮｇＲとの結合についてＮｏｇｏ－６６と競合することができる。本願の他の側面としては、このような結合性蛋白質の作製方法、前記蛋白質を使用した医薬組成物、及び前記蛋白質の使用方法が挙げられる。

【００１１】

抗体

本願の主要な態様はＮｏｇｏ－６６受容体（ＮｇＲ）の少なくとも１個のエピトープと特異的に結合する単離された蛋白質又はポリペプチドを含む。「単離された蛋白質」又は「単離されたポリペプチド」なる用語はその起源又は誘導源によりその天然状態でこれに付随する天然結合成分と結合していない蛋白質又はポリペプチド、同一種に由来する他の蛋白質を実質的に含まない蛋白質又はポリペプチド、別の種に由来する細胞により発現される蛋白質又はポリペプチド、あるいは自然界に存在しない蛋白質又はポリペプチドである。従って、化学的に合成されるポリペプチド又はその天然起源である細胞とは異なる細胞系で合成されるポリペプチドはその天然結合成分から「単離」されることになる。当分野で周知の蛋白質精製技術を使用して、単離により蛋白質から天然結合成分を実質的に除去することもできる。本明細書で使用する「ポリペプチド」なる用語はアミノ酸の任意ポリマー鎖を意味する。「ペプチド」及び「蛋白質」なる用語はポリペプチドなる用語と交換可能に使用し、同様にアミノ酸のポリマー鎖を意味する。「ポリペプチド」なる用語は天然又は人工蛋白質、蛋白質フラグメント及び蛋白質配列のポリペプチドアナログを包含する。ポリペプチドはモノマーでもポリマーでもよい。

【００１２】

Ｎｏｇｏ－６６受容体（ＮｇＲ）の少なくとも１個のエピトープと特異的に結合する単離蛋白質又はポリペプチドはリガンドと前記ＮｇＲの結合を阻害することができる。Ｎｏｇｏ－６６受容体ＮｇＲは４７３アミノ酸グリコシルホスファチジルイノシトール結合蛋白質である。この蛋白質はＮ末端シグナル配列とそれに続く８個のロイシンリッチリピートドメイン、（一緒になって所謂細胞外ドメインを形成する）ロイシンリッチリピートＣ末端ドメイン及びＧＰＩ固定ドメインから構成される。ＧＰＩアンカーを介して、ＮｇＲは外部ニューロン原形質膜と結合している。本発明の好ましい蛋白質はヒトＮｇＲの少なくとも１個のエピトープと結合するモノクローナル中和抗体又はその抗原結合フラグメントである。Ｎｏｇｏ６６は軸索伸長阻害を誘導すると共に成長円錐崩壊を促進するＣＮＳミエリンの数種の主要阻害因子の１つである。

【００１３】

本明細書で使用する「抗体」なる用語はジスルフィド結合により相互に結合された２本の重（Ｈ）鎖と２本の軽（Ｌ）鎖の４本のポリペプチド鎖から構成される免疫グロブリン分子を意味する。抗体はある分子と特異的に反応することにより分子を抗体と結合することができる場合に、この分子と「結合することが可能」であると言う。「エピトープ」なる用語は抗体と結合することが可能であり、更にこの抗体により認識することができる任意分子の部分を意味する。エピトープないし「抗原決定基」は通常、アミノ酸や糖側鎖等の化学的に活性な表面分子群から構成され、特定の三次元構造特性と特定の電荷特性をもつ。

【００１４】

本明細書で使用する抗体の「抗原結合フラグメント」（又は単に「抗原フラグメント」）なる用語は受容体と特異的に結合し、これを夫々活性化又は調節する能力を保持する抗体の１個以上の部分を意味する。抗体の抗原結合機能は全長抗体のフラグメントにより実現可能であることが分かっている。抗体の「抗原結合部分」なる用語に含まれる結合フラグメントの例としては、（ｉ）ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインから構成される１価

フラグメントであるＦａｂフラグメント；（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド橋により結合された２個のＦａｂフラグメントからなる２価フラグメントであるＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント；（ｉｉｉ）ＶＨドメインとＣＨ１ドメインから構成されるＦｄフラグメント；（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬドメインとＶＨドメインから構成されるＦｖフラグメント；（ｖ）ＶＨドメインから構成されるｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄら，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６）；並びに（ｖｉ）単離ＣＤＲが挙げられる。更に、Ｆｖフラグメントの２個のドメインＶＬ及びＶＨは別々の遺伝子によりコードされるが、ＶＬ領域とＶＨ領域が対合して１本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）抗体と呼ばれる１価分子を形成する単一蛋白質としての作製を可能にする合成リンカーにより組換え法を使用して結合することができる。（例えばＢｉｒｄら，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６；Ｈｕｓｔｏｎら，（１９８８）Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３参照。）このようなｓｃＦｖ抗体も抗体の抗原結合部分なる用語に含むものとする。ダイアボディ等の他の形態の１本鎖抗体もこの用語に含む。ダイアボディはＶＨ及びＶＬドメインが１本のポリペプチド鎖で発現される２価の二重特異性抗体であるが、非常に短いリンカーを使用するため、同一鎖の２領域間で対合することができず、これらの領域は別の鎖の相補性領域と対合し、同一受容体上又は２個の受容体分子に２個の抗原結合部位を形成する。（例えばＨｏｌｌｉｇｅｒら，（１９９３）Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８；Ｐｏｌｊａｋら，（１９９４）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２：１１２１－１１２３参照）。

【００１５】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」とは異なる抗体の混合物を含む「ポリクローナル」抗体調製物と異なり、共通重鎖及び共通軽鎖アミノ酸配列を有する抗体分子の調製物を意味するものとする。モノクローナル抗体はファージ、細菌、酵母又はリボソームディスプレイ等の数種の新規技術や、ハイブリドーマ由来抗体（例えばケーラーとミルスタインの標準ハイブリドーマ法（（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７）等のハイブリドーマ技術により作製したハイブリドーマにより分泌される抗体）等の旧来の方法により作製することができる。本発明の抗体は哺乳動物細胞株で作製したＮｇＲ蛋白質を使用して標準免疫／ハイブリドーマ技術により作製した。

【００１６】

本明細書で使用する「中和モノクローナル抗体」とは特定抗原と結合すると、前記抗原に対するリガンドの結合を競合及び阻害することが可能な抗体分子調製物を意味するものとする。本願の特定ケースにおいて、本発明の中和抗体はＮｇＲとの結合についてＮｏｇｏ６６と競合し、Ｎｏｇｏ６６とＮｇＲの結合に起因するＮｏｇｏ６６生物活性又は機能を妨害することができる。

【００１７】

好ましくは、本願のモノクローナル中和抗体はヒト抗体である。「ヒト抗体」なる用語はヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に対応又は由来する可変領域と定常領域を有する抗体を意味する（例えばＫａｂａｔら，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２，１９９１参照）。本願のヒト抗体はヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基（例えばランダムもしくは部位特異的変異誘発によりインビトロ又は体細胞変異によりインビボで導入される変異）を例えばＣＤＲ、特にＣＤＲ３に含んでいてよい。本明細書で使用する「ＣＤＲ」なる用語は抗体可変配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖及び軽鎖可変領域の各々に３個のＣＤＲがあり、可変領域の各々についてＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３と呼ぶ。各種態様において、抗体は組換え抗体又はモノクローナル抗体である。本願の最も好ましい中和抗体を本明細書ではｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１（夫々ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＰＴＡ－８３

８３及びＰＴＡ－８３８４）と呼ぶ。ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１抗体と機能的抗体フラグメント、ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１関連抗体と機能的抗体フラグメント、並びにｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１に等価の特性（例えばＮｇＲに対する高い結合親和性と低い解離反応速度と高い中和能）を有する他の抗体と機能的抗体フラグメントを本発明に含むものとする。

【００１８】

免疫原性ＮｇＲポリペプチドに対する本願の抗ＮｇＲ抗体又はそのフラグメントの結合親和性と解離速度は当分野で公知のいずれかの方法により測定することができる。例えば、結合親和性は競合ＥＬＩＳＡ、ｃＲＩＡ、ＢＩＡｃｏｒｅ又はＫｉｎＥｘＡ技術により測定することができる。解離速度もＢＩＡｃｏｒｅ又はＫｉｎＥｘＡ技術により測定することができる。結合親和性と解離速度は例えばＢＩＡｃｏｒｅを使用して表面プラズモン共鳴法により測定される。

【００１９】

本願の好ましい抗体の１例は配列番号３の配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ領域）と配列番号４の配列を含む軽鎖可変領域（Ｌ領域）を含む配列（ｍＡＢ５０抗体）に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列一致度を有する。別の好ましい態様は配列番号５の配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ領域）と配列番号６の配列を含む軽鎖可変領域（Ｌ領域）を含む配列（ｍＡＢ５１抗体）に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列一致度を有する。

【００２０】

好ましくは、ｍＡｂ５０抗体とｍＡｂ５１抗体は1×10^{-9}Ｍ未満のEC_{50}でヒトＮｇＲと結合し、より好ましくは、前記抗体は1×10^{-10}Ｍ未満のEC_{50}でＮｇＲと結合し、最も好ましくは、前記抗体は4×10^{-11}Ｍ未満のEC_{50}でＮｇＲと結合する。

【００２１】

抗ＮｇＲ抗体ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１はプロＮｇＲ、成熟ＮｇＲ及び短縮型ＮｇＲ等の各種形態のヒトＮｇＲと結合するものとする。抗体ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１はＮｇＲ２やＮｇＲ３等の他のＮｇＲホモログ、又は他のＬＲＲ含有蛋白質と特異的に結合しない。他方、抗体ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１は他の種、特に齧歯類に由来するＮｇＲ、より具体的にはラットＮｇＲに対して交差反応性を示す。ＭＡｂ５２～６２は更にマウスＮｇＲに対しても交差反応性である。例えば、抗体はラットに由来するＮｇＲと結合する（ラットＮｇＲに対する両者抗体のIC_{50}は約3×10^{-11}Ｍである）。

【００２２】

本願の（ＮｇＲ）と相互作用する単離結合性蛋白質は抗体又はその抗原結合部分が１個以上の糖鎖残基を含むグリコシル化結合性蛋白質でもよい。初期インビボ蛋白質産生後に翻訳後修飾と呼ばれるプロセシングを受ける場合がある。特に、糖鎖（グリコシル）残基が酵素により付加される場合があり、このプロセスをグリコシル化と言う。その結果として得られた蛋白質は共有結合オリゴ糖側鎖をもち、グリコシル化蛋白質又は糖蛋白質と呼ばれる。蛋白質グリコシル化は該当蛋白質のアミノ酸配列と、蛋白質が発現される宿主細胞に依存する。生物によって産生されるグリコシル化酵素（例えばグリコシルトランスフェラーゼやグリコシダーゼ）は異なり、利用可能な基質（ヌクレオチド糖）も異なる。このような因子により、蛋白質グリコシル化パターンとグリコシル残基の組成は特定蛋白質が発現される宿主系により異なる。本発明で有用なグリコシル残基としては限定されないが、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、ｎ－アセチルグルコサミン及びシアル酸が挙げられる。グリコシル化結合性蛋白質はグリコシル化パターンがヒトであるようなグリコシル残基を含むことが好ましい。

【００２３】

本願の抗体はＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ又はＩｇＤ定常領域等の重鎖定常領域を含む。更に、抗体はκ軽鎖定常領域又はλ軽鎖定常領域のいずれかの軽鎖定常領域を含むことができる。抗体はκ軽鎖定常領域を含むことが好ましい。あるいは、抗体部分は例えばＦａｂフラグメント又は１本鎖Ｆｖフラグメントと

することができる。抗体エフェクター機能を改変するためにＦｃ部分のアミノ酸残基を置換することは当分野で公知である（Ｗｉｎｔｅｒら，米国特許第５，６４８，２６０号；５，６２４，８２１号明細書）。抗体のＦｃ部分は数種の重要なエフェクター機能（例えばサイトカイン誘導、ＡＤＣＣ、貪食作用、補体依存性細胞傷害作用（ＣＤＣ）並びに抗体及び抗原－抗体複合体の半減期／クリアランス率）を媒介する。これらのエフェクター機能は治療目的に応じて治療用抗体に望ましい場合もあるが、不要又は有害な場合もある。所定のヒトＩｇＧアイソタイプ、特にＩｇＧ１及びＩｇＧ３は夫々ＦｃγＲｓ及び補体Ｃ１ｑとの結合を介してＡＤＣＣとＣＤＣを媒介する。胎児性Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）は抗体の循環半減期を決定する必須成分である。更に別の態様では、抗体のエフェクター機能を改変するように、抗体の定常領域（例えば抗体のＦｃ領域）の少なくとも１個のアミノ酸を置換する。

【００２４】

組換え蛋白質の作製

免疫及びＥＬＩＳＡアッセイと、（「実施例」のセクションに記載する）神経突起伸長アッセイのために、可溶性ヒト及びラットＮｇＲを作製した。アルカリホスファターゼタグと融合したリガンドＮｏｇｏ６６（ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６）も作製し、神経突起伸長アッセイの阻害因子及び（同様に「実施例」のセクションに記載する）ＥＬＩＳＡ試験とＦＡＣＳ試験におけるリガンドとして利用した。

【００２５】

ヒト及びラットＮｇＲ

ヒトＮｇＲ蛋白質はアクセション番号ＡＡＧ５３６１２に基づくものとした。（アミノ酸２７～４５０の）蛋白質ＤＮＡをｐＳｅｃベクター（Ａｍｂｉｏｎ）にクローニングし、ＣＨＯ－Ｋ１細胞で安定に発現させることにより蛋白質を作製した。発現させた受容体は配列番号１（ヒトＮｇＲ蛋白質）及び配列番号８（ヒトＮｇＲヌクレオチド）に従い、Ｃ末端にＭｙｃと６×Ｈｉｓタグを結合した全長蛋白質の４２４アミノ酸（アミノ酸２７～４５０）から構成された。セルファクトリー当たり５０００ｍｌのＵｌｔｒａＣＨＯ無血清培地（Ｃａｍｂｒｅｘ　Ｂｉｏ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を加えた４０チャンバーセルファクトリー８個でヒトｓｅｃＮｇＲ　２７－４５０　ａａ＿Ｄ６＿ＣＨＯ－Ｋ１細胞をコンフルエントまで培養した（約５日間）。その後、上清４０リットルを遠心し、Ｈｅｍｏｆｌｏｗ　Ｆカラム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃａｒｅ）で５００ｍｌまで濃縮した。濃縮液を－８０℃で凍結させた。蛋白質精製のために、濃縮蛋白質上清に２０ｍＭ　NaH_2PO_4；１４０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．４）５００ｍｌを加えて１０００ｍｌとし、再び３００ｍｌまで濃縮した。濃縮工程をもう一度繰返し、最後に２０ｍＭ　NaH_2PO_4；１４０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．４）３００ｍｌを濃縮液に加えた。２０ｍＭ　NaH_2PO_4；３００ｍＭ　ＮａＣｌ；ｐＨ８．０で平衡化しておいたＮｉ－ＮＴＡ－Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ　Ｆａ．（Ｑｉａｇｅｎ　ｃａｔａｌｏｇ　＃３０４３０）５０ｍｌを濃縮液６００ｍｌに加え、６℃で１時間撹拌し、６℃で沈降させ、上清を捨て、Ｎｉ－ＮＴＡビーズをカラムに充填した。カラムを室温にて２０ｍＭ　NaH_2PO_4；３００ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）１０ＣＶで洗浄した後、２０ｍＭ　NaH_2PO_4；３００ｍＭ　ＮａＣｌ；１０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）５～１０ＣＶで洗浄した。カラムを２０ｍＭ　NaH_2PO_4；３００ｍＭ　ＮａＣｌ；１００ｍＭイミダゾール；ｐＨ８．０で溶出させ、ＵＶ－２８０ｎｍ活性ピークを採取した。次に溶出液を６℃にて一晩２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ７．０）５Ｌで透析し、透析液を室温でＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（カラムサイズ１．６ｃｍ×３ｃｍ；容量６ｍｌ；Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｃａｔａｌｏｇ　＃１７－０５１０－０１）にロードした。緩衝液Ａは５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ；ｐＨ７．０とした。緩衝液Ｂは５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ；１Ｍ　ＮａＣｌ；ｐＨ７．０とし、流速２ｍｌ／分とした。勾配は０％Ｂ保持５ＣＶ；０－５０％Ｂ１２ＣＶ；５０－１００％Ｂ２ＣＶ；１００％Ｂ保持５ＣＶとした。フラクションサイズは２．５ｍｌとした。その後、フラクションをＳＤＳ－ＰＡＧで分析し、ＳＤＳ－ｐａｇｅ上のサイズと純度（高グリコシル化ＮｇＲ－Ｈｉｓ

でＮｇＲ－Ｈｉｓ最高純度；低グリコシル化ＮｇＲ－Ｈｉｓで最高ＮｇＲ－Ｈｉｓ純度）によりフラクションプールした。プールしたフラクションを１２～１４ｋＤａ透析チューブで６℃にて２０ｍＭ　NaH_2PO_4；１４０ｍＭ　ＮａＣｌ；ｐＨ７．４で１回透析し、フラクションを０．２μｍ滅菌フィルターで濾過し、その後の使用に備えて６℃で保存した。長期間保存用として、受容体フラクションを分取し、－８０℃で保存した。

【００２６】

ラットＮｇＲ　ＤＮＡ（アクセション番号ＡＡＭ４６７７２）をｐｃＤＮＡ３．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングし、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞で一過性発現システムにより発現及び生産させた。蛋白質は配列番号２（ラットＮｇＲ蛋白質）及び配列番号９（ラットＮｇＲヌクレオチド）に従い、６×Ｈｉｓタグと結合したアミノ酸２７～４５０を含んでいた。ラット蛋白質の生産はＨＥＫ２９３Ｆ細胞で４８～７２時間標準一過性発現により実施した。細胞上清を回収し、蛋白質の精製はヒト蛋白質について上述したと同様の工程に従った。所定の実験では、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから入手した蛋白質を使用した。これらの蛋白質は、ヒト組換えＮｇＲ／Ｆｃキメラ，カタログ番号１２０８－ＮＧ及び組換えマウスＮｏｇｏ受容体／Ｆｃキメラ，カタログ番号１４４０－ＮＧであった。

【００２７】

ＮｇＲの細胞表面発現

細胞表面で発現されるＮｇＲには、アミノ酸１～４７３の完全オープンリーディングフレームを含む全長受容体配列（夫々ラットＡＡＭ４６７７２及びヒトＡＡＧ５３６１２）をｐｃＤＮＡ４にクローニングした。プラスミドを標準手順に従ってＣＨＯ－Ｋ１又はＨＥＫ２９３細胞に形質移入した。要約すると、細胞をペトリ皿でＭＥＭ培地に播種し、Ｆｕｇｅｎｅ　６（Ｒｏｃｈｅ）を製造業者の指示に従って形質移入した。１５０μｇ／ｍｌゼオシンを使用して２～３週間選択を実施し、蛋白質発現をＦＡＣＳにより確認した（下記実施例４参照）。

【００２８】

ＨＥＫ２９３Ｆ細胞で一過性発現させるために、製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｆｒｅｅ　Ｓｔｙｌｅ　Ｓｙｓｔｅｍ）の指示に従って細胞を懸濁培養し、４８～７２時間後に回収し、ＦＡＣＳ試験に使用した（下記実施例のセクション参照）。

【００２９】

ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６の生産

ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６（配列番号７及び配列番号１０）を標準条件下で生産した。要約すると、Ｎｏｇｏ６６をｐＡＰＴａｇ５ベクターにクローニングし、ＨＥＫ２９３細胞に構築物を形質移入し、ＲＰＭＩ　Ｇｌｕｔａｍａｘ＋１０％ＦＣＳ，１５０μｇ／ｍｌゼオシンで選択した。蛋白質生産のために、セルファクトリー当たり１２００ｍｌのＲＰＭＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）＋１０％ＦＣＳを加えた１０チャンバーセルファクトリー６個でＨＥＫ２９３細胞をコンフルエントまで培養した（約３日間）。その後、上清を捨て、Ｐｒｏ２９３ａ－ＣＤＭ（Ｃａｍｂｒｅｘ　Ｂｉｏ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）１２００ｍｌを各セルファクトリーに充填した。細胞を更に３日間培養した。その後、上清７２００ｍｌを遠心し、Ｈｅｍｏｆｌｏｗ　Ｆカラム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃａｒｅ）で３５０ｍｌまで濃縮した。１ｍＭ　ＰｅｆａｂｌｏｃＳＣ（ＲＯＣＨＥ）の添加後、濃縮液を分取し、－８０℃で凍結させた。

【００３０】

抗体及び抗体産生細胞株の作製

本願の抗体は適切な宿主（例えばヒト、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ等の脊椎動物、爬虫類、魚類、両生類、並びに鳥類、爬虫類及び魚類の卵）に免疫により作製することができる。このような抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。本願の抗体を作製するためには、本発明の免疫原性ＮｇＲポリペプチド又はそのフラグメントにより宿主を免疫する。「免疫」なる用語は本明細書では抗原を免疫レパートリーに提示するプロセスを意味し、レパートリーは遺伝子改変されていない天然生物に存在するか又は人工ヒト免疫レパートリーを示すように改変されたものを含むトラン

スジェニック生物に存在するかを問わない。同様に、「免疫原製剤」とはアジュバント又は抗原の免疫原性を強化する他の添加剤を加えた抗原製剤である。

【００３１】

動物の免疫は当分野で公知のいずれかの方法により実施することができる。例えばＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，１９９０参照。マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ及びウマ等の非ヒト動物の免疫方法は当分野で周知である。例えばＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ及び米国特許第５，９９４，６１９号明細書参照。好ましい１態様では、ＮｇＲ抗原をアジュバントと共に投与し、免疫応答を刺激する。このようなアジュバントとしては完全もしくは不完全フロイントアジュバント、ＲＩＢＩ（ムラミルジペプチド）又はＩＳＣＯＭ（免疫刺激複合体）が挙げられる。このようなアジュバントはポリペプチドを局所沈着物中に分離することにより迅速な分散から保護することもできるし、マクロファージや免疫系の他の成分に対して化学走化性の因子を分泌するように宿主を刺激する物質を添加してもよい。ポリペプチドを投与している場合には、免疫スケジュールは数週間にわたってポリペプチドを２回以上投与することが好ましい。

【００３２】

無傷又は破壊した細胞の細胞膜に伴われたＮｇＲにより動物宿主を免疫することが考えられ、本願の抗体は本発明の免疫原性ＮｇＲポリペプチドと結合することにより同定される。

【００３３】

動物宿主をＮｇＲ抗原により免疫後、動物から抗体及び／又は抗体産生細胞を得ることができる。動物から採血する又は動物を屠殺することにより動物から抗ＮｇＲ抗体含有血清が得られる。血清は動物から採取したまま使用してもよいし、血清から免疫グロブリンフラクションを採取してもよいし、血清から抗ＮｇＲ抗体を精製してもよい。こうして得られた血清又は免疫グロブリンはポリクローナルであるため、一連の異種特性をもつ。

【００３４】

抗体産生細胞株

本願は更に免疫動物から作製可能な抗体産生不死化ハイブリドーマについて記載する。好ましくは、免疫動物はヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する非ヒト動物であり、脾臓Ｂ細胞を非ヒト動物と同一種に由来する骨髄腫と融合させる。

【００３５】

免疫後、動物を屠殺し、脾臓Ｂ細胞を当分野で周知のように不死化骨髄腫細胞と融合させる。例えばＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，前出参照。骨髄腫細胞は免疫グロブリンポリペプチドを分泌しないことが好ましい（非分泌型細胞株）。融合及び抗体選択後、ＮｇＲもしくはその一部又はＮｇＲを発現する細胞を使用してハイブリドーマをスクリーニングする。好ましくは、初期スクリーニングは酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）又は放射免疫測定法（ＲＩＡ）、好ましくはＥＬＩＳＡを使用して実施される（実施例のセクションにＥＬＩＳＡスクリーニングの１例を記載する）。

【００３６】

抗ＮｇＲ抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングし、以下に詳述するように、活発なハイブリドーマ増殖、高い抗体産生能及び望ましい抗体特性等の望ましい特性について更にスクリーニングする。ハイブリドーマを培養し、同系動物、免疫系を欠損する動物（例えばヌードマウス）でインビボ増殖させる、あるいは細胞培養でインビトロ増殖させる。ハイブリドーマの選択、クローニング及び増殖方法は当業者に周知である。好ましい１態様において、ハイブリドーマは上記のようにマウスハイブリドーマである。別の好ましい態様において、ハイブリドーマは非ヒト非マウス種（例えばラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ又はウマ）で作製される。別の態様において、ハイブリドーマは抗ＮｇＲ抗体を発現するヒト細胞にヒト非分泌型骨髄腫が融合されたヒトハイブリドーマである。

【００３７】
本願は、米国特許第５，６２７，０５２号明細書、国際公開第９２／０２５５１号パンフレット及びＢａｂｃｏｃｋ，Ｊ．Ｓ．ら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：７８４３－７８４８に記載されているような選択リンパ球抗体法（ＳＬＡＭ）と当分野で呼ばれる手順を使用して単一単離リンパ球から作製される組換え抗体についても記載する。この方法では、リンカー（例えばビオチン）を使用して抗原ＮｇＲ又はそのフラグメントをヒツジ赤血球と結合させ、これを使用してＮｇＲに対する特異性をもつ抗体を分泌する単一細胞を同定する抗原特異的溶血プラークアッセイを使用することにより、該当抗体を分泌する単一細胞（例えば任意免疫動物に由来するリンパ球）をスクリーニングする。該当抗体分泌細胞の同定後、重鎖及び軽鎖可変領域ｃＤＮＡを逆転写酵素－ＰＣＲにより細胞から得た後、ＣＯＳ又はＣＨＯ細胞等の哺乳動物宿主細胞で適切な免疫グロブリン定常領域（例えばヒト定常領域）のコンテキストにおいてこれらの可変領域を発現させることができる。インビボ選択したリンパ球に由来する増幅免疫グロブリン配列を形質移入した宿主細胞をその後、例えば形質移入した細胞のパニングにより更にインビトロ分析及び選択し、ＮｇＲに対する抗体を発現する細胞を単離することができる。

【００３８】
インビトロ作製した抗体
本願に記載する抗体を作製するためには、抗体ライブラリーをスクリーニングして所望の結合特異性をもつ抗体を同定するインビトロ法を使用することもできる。組換え抗体ライブラリーのこのようなスクリーニング方法は当分野で周知である。

【００３９】
組換え抗体ライブラリーはＮｇＲ又はＮｇＲの一部により免疫された対象に由来することができる。あるいは、組換え抗体ライブラリーはナイーブ対象、即ちＮｇＲにより免疫されていない対象に由来することができる（例えばヒトＮｇＲにより免疫されていないヒト対象に由来するヒト抗体ライブラリー）。本願の抗体はヒトＮｇＲを含むペプチド（例えばｈＮｇＲの一部に対応するペプチド）で組換え抗体ライブラリーをスクリーニングし、ＮｇＲを認識する抗体を選択することにより選択される。このようなスクリーニングと選択を実施するための方法は前段落に挙げた文献に記載されているように、当分野で周知である。ｈＮｇＲに対する特定結合親和性をもつ本願の抗体（例えば特定k_{off}速度定数でヒトＮｇＲから解離するもの）を選択するためには、当分野で公知の表面プラズモン共鳴法を使用して所望のk_{off}速度定数をもつ抗体を選択することができる。ｈＮｇＲに対して特定中和活性をもつ本願の抗体（例えば特定IC_{50}をもつもの）を選択するためには、ｈＮｇＲ活性の阻害を評価する方法として当分野で公知の標準方法を使用することができる。

【００４０】
抗体の特性
本願のｍＡＢ５０及びｍＡＢ５１又はその抗原結合部分はヒトＮｇＲと結合し、表面プラズモン共鳴法により測定した場合に約０．１s^{-1}以下、好ましくは$1\times10^{-2}s^{-1}$以下、より好ましくは$1\times10^{-3}s^{-1}$以下、更に好ましくは$1\times10^{-4}s^{-1}$以下、最も好ましくは$1\times10^{-5}s^{-1}$以下のk_{off}速度定数でヒトＮｇＲから解離する。本明細書で使用する「表面プラズモン共鳴」なる用語は例えばＢＩＡｃｏｒｅシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ　ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ及びＰｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を使用してバイオセンサーマトリックス内の蛋白濃度の変化の検出によりリアルタイム生体特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を意味する。更に詳細な記載については、Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．ら（１９９３）Ａｎｎ．Ｂｉｏｌ．Ｃｌｉｎ．５１：１９－２６；Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．ら（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１１：６２０－６２７；Ｊｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂ．ら（１９９５）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．８：１２５－１３１；及びＪｏｈｎｎｓｏｎ，Ｂ．ら（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８：２６８－２７７参照。

【００４１】
【表１】

表 1.個々の Biacore 反応速度パラメーター(抗原:hNgR-Fc キメラ)

捕獲抗体	アイソタイプ	会合速度(M-1s-1)	解離速度(s-1)	Kd(M)
mAb50	IgG2a,k	3.51×10^{5}	4.97×10^{-5}	1.41×10^{-13}
mAb51	IgG2a,k	5.44×10^{5}	5.88×10^{-5}	1.08×10^{-13}

【００４２】
本明細書で使用する「K_{on}」なる用語は当分野で公知の通り、抗体と抗原が抗体／抗原複合体を形成するための会合速度定数を意味するものとする。
【００４３】
本明細書で使用する「K_{off}」なる用語は当分野で公知の通り、抗体／抗原複合体から抗体が解離する解離速度定数を意味する。本明細書で使用する「K_d」なる用語は当分野で公知の通り、特定抗体－抗原相互作用の解離定数を意味するものとする。
【００４４】
あるいは、本願のｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１又はその抗原結合部分は約１×１０^{-6}Ｍ以下、好ましくは１×１０^{-7}Ｍ以下、好ましくは１×１０^{-8}Ｍ以下、より好ましくは１×１０^{-9}Ｍ以下、より好ましくは１×１０^{-10}Ｍ以下、最も好ましくは１×１０^{-11}Ｍ以下のＩＣ$_{50}$でヒトＮｇＲを阻害することができる。本明細書で使用するＩＣ$_{50}$なる用語はリガンドＮｏｇｏ６６とＮｇＲの結合について競合する抗体の濃度を意味するものとする。
【００４５】
融合抗体及びイムノアドヘジン
本願は別のポリペプチドに連結した本願の抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体の全部又は一部を含む作製可能な融合抗体又はイムノアドヘジンについても記載する。ある態様において、抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体の可変領域のみをポリペプチドに連結する。他の態様において、本願の抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体のＶＨドメインを第１のポリペプチドに連結し、ＶＨドメインとＶＬドメインを相互作用させて抗体結合部位を形成するように第１のポリペプチドと会合する第２のポリペプチドに抗体のＶＬドメインを連結する。他の態様において、ＶＨドメインとＶＬドメインを相互作用させるリンカーによりＶＨドメインをＶＬドメインから分離する（下記１本鎖抗体の項参照）。その後、ＶＨ－リンカー－ＶＬ抗体を該当ポリペプチドに連結する。融合抗体はＮｏｇｏ受容体－１リガンドを発現する細胞又は組織にポリペプチドを誘導するのに有用である。該当ポリペプチドは毒素等の治療剤でもよいし、可視化可能な酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ）等の診断剤でもよい。更に、２個（以上）の１本鎖抗体を相互に連結した融合抗体を作製することもできる。これは、１本のポリペプチド鎖上に２価又は多価抗体を作製したい場合や、二重特異性抗体を作製したい場合に有用である。
【００４６】
１態様は本願の抗体又は抗体部分を誘導体化した又は別の機能的分子（例えば別のペプチド又は蛋白質）と連結した標識結合性蛋白質を提供する。例えば、核酸、別の抗体（例えば二重特異性抗体又はダイアボディ）、検出可能な物質、細胞傷害性物質、薬剤、及び／又は抗体もしくは抗体部分と別の分子（例えばストレプトアビジンコア領域やポリヒスチジンタグ）との結合を媒介することができる蛋白質もしくはペプチド等の１個以上の他の分子部分と本願の抗体又は抗体部分を（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有的結合又は他の方法により）機能的に連結することにより、本願の標識結合性蛋白質を誘導することができる。
【００４７】
本願の抗体又は抗体部分を誘導体化することができる有用な検出可能な物質としては蛍

光化合物が挙げられる。検出可能な蛍光物質の例としてはフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリン等が挙げられる。アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等の検出可能な酵素で抗体を誘導体化することもできる。検出可能な酵素で抗体を誘導体化する場合には、検出可能な反応生成物を生成するために酵素により使用される他の試薬を加えることにより抗体を検出する。例えば、検出可能な物質として西洋ワサビペルオキシダーゼを使用する場合には、過酸化水素とジアミノベンジジンを加えると、検出可能な着色反応生成物が得られる。抗体を核酸、ビオチンで誘導体化し、アビジン又はストレプトアビジン結合の間接測定により検出することもできる。

【００４８】

本願の別の態様は結晶化結合性蛋白質を提供する。本明細書で使用する「結晶化」なる用語は結晶形態で存在する抗体又はその抗原結合部分を意味する。結晶は物質の固体状態の１形態であり、非晶質固体状態や液体結晶状態等の他の形態から区別される。結晶は原子、イオン、分子（例えば抗体等の蛋白質）、又は分子集合（例えば抗原／抗体複合体）の規則的な反復三次元配列から構成される。これらの三次元配列は当分野で周知の特定の数学的関係に従って配置されている。結晶中で反復している基本単位ないし構成単位を非対称単位と言う。所定の明確な結晶対称性に一致する配置で非対称単位が反復することにより、結晶の「単位格子」を構成する。単位格子が全３方向に規則的平行移動により反復することにより、結晶を構成する。Ｇｉｅｇｅ，Ｒ．ａｎｄ Ｄｕｃｒｕｉｘ，Ａ．Ｂａｒｒｅｔｔ，Ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，第２版，ｐｐ．２０１－１６，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，（１９９９）参照。

【００４９】

好ましくは、本願は本明細書に開示するような全長抗ＮｇＲ抗体及びそのフラグメントの結晶と、このような結晶を含有する製剤及び組成物について記載する。１態様において、結晶化結合性蛋白質は結合性蛋白質の可溶性部分よりも長いインビボ半減期をもつ。別の態様において、結合性蛋白質は結晶化後に生物活性を保持する。

【００５０】

本発明の結晶化結合性蛋白質は当分野で公知の方法に従って作製することができる。

【００５１】

１本鎖抗体

本願は本発明の免疫原性ＮｇＲと結合する１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）を含む。ｓｃＦｖを作製するためには、ＶＨ配列とＶＬ配列を連続した１本鎖蛋白質として発現させ、ＶＬ領域とＶＨ領域を可撓性リンカーにより結合できるように、可撓性リンカーをコードするＤＮＡ、例えばアミノ酸配列（Ｇ１Ｙ４－Ｓｅｒ）をコードするＤＮＡにＶＨとＶをコードするＤＮＡを機能的に連結する（例えばＢｉｒｄら，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６；Ｈｕｓｔｏｎら，（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら，３０ Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２－５５４参照）。１本鎖抗体はただ１個のＶＨとＶＬを使用する場合には１価とすることができ、２個のＶＨとＶＬを使用する場合には２価とすることができ、３個以上のＶＨとＶＬを使用する場合には多価とすることができる。

【００５２】

キメラ抗体

本願は更に一方の特異性が本願の免疫原性Ｎｏｇｏ受容体－１ポリペプチドに対するものである二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。例えば、第１の結合ドメインを介して本発明の免疫原性ＮｇＲポリペプチドと特異的に結合し、第２の結合ドメインを介して第２の分子と結合するキメラ抗体を作製することができる。「キメラ抗体」な

る用語はある種に由来する重鎖及び軽鎖可変領域配列と、別の種に由来する定常領域配列を含む抗体（例えばヒト定常領域に連結したマウス重鎖及び軽鎖可変領域をもつ抗体）を意味する。キメラ抗体は組換え分子生物学技術により作製することもできるし、相互に物理的に結合させてもよい。更に、２個以上のＶＨとＶＬを含み、本発明の免疫原性ポリペプチドと、ミエリンによる成長円錐崩壊と神経突起伸長及び発芽の阻害を低減する働きがあるとされる別の分子とに特異的に結合する１本鎖抗体を作製することもできる。このような二重特異性抗体は、例えばＦａｎｇｅｒら，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ４：７２－８１（１９９４）及びＷｒｉｇｈｔ ａｎｄ Ｈａｒｒｉｓ，２０（前出）等の周知技術を使用して作製することができる。所定態様では、キメラ抗体は本発明の抗体に由来する可変領域の１個以上を使用して作製される。別の態様では、キメラ抗体は前記抗体に由来する１個以上のＣＤＲ領域を使用して作製される。「ヒト化抗体」なる用語は非ヒト種（例えばマウス）に由来する重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨ及び／又はＶＬ配列の少なくとも一部をより「ヒト様」即ちヒト生殖細胞系列可変配列に類似するように改変した抗体を意味する。ヒト化抗体の１例はヒトＣＤＲ配列を非ヒトＶＨ及びＶＬ配列に導入して対応する非ヒトＣＤＲ配列を置換したＣＤＲグラフト抗体である。

【００５３】

ヒト化抗体

ヒト化抗体は所望抗原と結合する非ヒト種に由来する抗体分子であり、非ヒト種に由来する１個以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）とヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域をもつ。ヒトＩｇ配列は当分野で公知である。当分野で公知の通り、このようなインポート配列を使用して免疫原性を低下させたり、結合性、親和性、会合速度、解離速度、アビディティ、特異性、半減期又は他の適切な特性のいずれかを低下させ、増加させ又は改変することができる。

【００５４】

抗原結合を改変する、好ましくは改善するためには、ヒトフレームワーク領域のフレームワーク残基をＣＤＲドナー抗体に由来する対応する残基で置換すればよい。これらのフレームワーク置換は当分野で周知の方法により同定され、例えば抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するにはＣＤＲ残基とフレームワーク残基の相互作用のモデル化を使用し、特定位置の異常なフレームワーク残基を同定するには配列比較を使用する。（例えばＱｕｅｅｎら，米国特許第５，５８５，０８９号明細書；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３（１９８８）参照）。三次元免疫グロブリンモデルは広く入手可能であり、当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元配座構造を図解表示するコンピュータープログラムも入手可能である。これらの表示を検討すると、候補免疫グロブリン配列の機能に残基が果たすと予想される役割を分析することができ、即ち候補免疫グロブリンがその抗原と結合する能力に影響を与える残基を分析することができる。こうして、ターゲット抗原に対する親和性の増加等の所望抗体特性が得られるようにコンセンサス配列とインポート配列からＦＲ残基を選択し、組み合わせることができる。一般に、ＣＤＲ残基は抗原結合の改変に直接的且つ最も実質的に関与している。当分野で公知の各種技術を使用して抗体をヒト化することができ、限定されないが、Ｃａｒｔｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：４２８５（１９９２）；Ｐｒｅｓｔａら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２６２３（１９９３），Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａら，ＰＮＡＳ ９１：９６９－９７３（１９９４）に記載されている技術が挙げられる。

【００５５】

誘導体化及び標識抗体

本願の抗体又は抗原結合フラグメントは誘導体化又は別の機能的分子（例えば別のペプチド又は蛋白質）と連結することができる。一般に、抗体又は抗原結合フラグメントは本発明の抗原性ペプチドとの結合が誘導体化又は標識により悪影響を受けないように誘導体

化される。例えば、別の抗体（例えば二重特異性抗体又はダイアボディ）、検出可能な物質、細胞傷害性物質、薬剤及び／又は抗体もしくは抗体部分と別の分子（例えばストレプトアビジンコア領域又はポリヒスチジンタグ）との結合を媒介することができる蛋白質もしくはペプチド等の１個以上の他の分子部分と本願の抗体又は抗体部分を（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有的結合又は他の方法により）機能的に連結することができる。更に、抗体又はその抗原結合部分は、抗体又は抗体部分と１種以上の他の蛋白質又はペプチドとの共有又は非共有的結合により形成される大きな免疫接着分子の一部でもよい。このような免疫接着分子の例としてはストレプトアビジンコア領域を使用して四量体ｓｃＦｖ分子を作製する場合（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖら（１９９５）Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ６：９３－１０１）や、システイン残基、マーカーペプチド及びＣ末端ポリヒスチジンタグを使用して２価ビオチン化ｓｃＦｖ分子を作製する場合（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖら（１９９４）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ３１：１０４７－１０５８）が挙げられる。Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント等の抗体部分は夫々全長抗体のパパイン又はペプシン消化等の慣用技術を使用して全長抗体から作製することができる。更に、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は標準組換えＤＮＡ技術を使用して得ることができる。

【００５６】

誘導体化抗体は（同一型又は例えば二重特異性抗体を作製するためには異なる型の）２個以上の抗体を架橋することにより作製することができる。適切な架橋剤としては適切なスペーサーにより分離された２個の別個の反応基をもつヘテロ２官能性のもの（例えばｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）又はホモ２官能性のもの（例えばスベリン酸ジスクシンイミジル）が挙げられる。このようなリンカーはＰｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌから入手可能である。

【００５７】

誘導体化抗体は標識抗体でもよい。例えば、本発明の抗体又は抗体部分を誘導体化することができる検出剤はフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリン、ランタニド蛍光体等の蛍光化合物である。西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等の検出に有用な酵素で抗体を標識してもよい。検出可能な酵素で標識する態様では、検出可能な反応生成物を生成するために酵素により使用される他の試薬を加えることにより抗体を検出する。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼを過酸化水素及びジアミノベンジジンと併用する。抗体をビオチンで標識し、アビジン又はストレプトアビジン結合の間接測定により検出することもできる。二次レポーターにより認識される所定ポリペプチドエピトープ（例えばロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）で抗体を標識してもよい。抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体又はその抗原フラグメントを放射性標識アミノ酸で標識してもよい。放射性ラベルは診断目的と治療目的の両者に使用することができる。放射性標識抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体は例えば対象におけるＮｏｇｏ受容体－１濃度を測定するために診断用として使用することができる。更に、放射性標識抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体は脊髄損傷を治療するために治療用として使用することもできる。

【００５８】

ポリペプチド用ラベルの例としては限定されないが、放射性同位体ないし放射性核種である^{15}Ｎ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ、^{153}Ｓｍが挙げられる。ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、メチルもしくはエチル基又は糖鎖基等の化学基で抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体又はその抗原フラグメントを誘導体化してもよい。これらの基は抗体の生物学的特性を改善するため、例えば血清半減期を延長するため又は組織結合を増加するために有用であると思われる。更に、ポリペプチド用ラベルとしては核酸も挙げられ、例えばＰＣＲによる検出用又は遺伝子発現強化用のＤＮＡや、ＮｇＲを保持する細胞又は組織における遺伝子発現を抑制するための

ｓｉＲＮＡも挙げられる。

【００５９】

抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体のクラス及びサブクラスは当分野で公知の方法のいずれかにより決定することができる。一般に、抗体のクラス及びサブクラスは特定クラス及びサブクラスの抗体に特異的な抗体を使用して決定することができる。このような抗体は市販されている。クラス及びサブクラスはＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット及び他の技術により決定することができる。あるいは、クラス及びサブクラスは抗体の重鎖及び／又は軽鎖の定常領域の全部又は一部を配列決定し、そのアミノ酸配列を種々のクラス及びサブクラスの免疫グロブリンの既知アミノ酸配列と比較し、抗体のクラス及びサブクラスを決定することにより決定することができる。

【００６０】

抗ＮｇＲ抗体によるＮｇＲ活性の阻害

本願の抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体又はその抗原結合フラグメントはリガンドとＮｇＲの結合を阻害する。このような阻害のIC_{50}は当分野で公知のいずれかの方法、例えばＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ又は機能的拮抗により測定することができる。IC_{50}は０．０１～１００ｎＭとすることができる。好ましくは、IC_{50}は１～１０ｎＭである。より好ましくは、本発明の抗Ｎｏｇｏ受容体－１抗体又はその抗原結合フラグメントのIC_{50}は０．１ｎＭ～１ｎＭである。最も好ましくは、IC_{50}は０．１ｎＭ未満である。

【００６１】

二重可変領域抗体

本明細書で使用する二重可変領（ＤＶＤ）結合性抗体とは２個以上の抗原結合部位を含む結合性蛋白質であり、４価又は多価結合性抗体である。「多価結合性抗体」なる用語は本明細書では２個以上の抗原結合部位を含む結合性蛋白質の意味で使用する。多価結合性抗体は３個以上の抗原結合部位をもつように構築することが好ましく、一般に天然抗体以外のものである。「多重特異性結合性抗体」なる用語は２個以上の関連又は無関連ターゲットと結合することが可能な結合性蛋白質を意味する。このようなＤＶＤは単一特異性、即ち１種類の抗原としか結合できないものでもよいし、多重特異性、即ち２種類以上の抗原と結合できるものでもよい。２個の重鎖ＤＶＤポリペプチドと２個の軽鎖ＤＶＤポリペプチドを含むＤＶＤ結合性抗体をＤＶＤ　Ｉｇと言う。ＤＶＤ　Ｉｇの各半分は重鎖ＤＶＤポリペプチドと軽鎖ＤＶＤポリペプチドと２個の抗原結合部位を含む。各結合部位は重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含み、抗原結合部位１個当たり合計６個のＣＤＲが抗原結合に関与している。ＤＶＤ結合性蛋白質とＤＶＤ結合性蛋白質の作製方法は米国特許出願第１１／５０７，０５０号に開示されている。本発明はＮｇＲと結合することが可能な結合性蛋白質を含むＤＶＤ結合性蛋白質を含むものとする。好ましくは、ＤＶＤ結合性蛋白質はＮｇＲと第２のターゲットとに結合することが可能である。第２のターゲットは反発性ガイダンス分子（ＲＧＭ）、Ｎｏｇｏ－Ａ、ＭＡＧ、ＯＭｇｐ、ＣＳＰＧから構成される群から選択される。ＣＳＰＧとしては、アグリカン、ブレビカン、バーシカン、ニューロカン、ホスファカン又はＴｅ３８から選択することができる。従って、これらの例はミエリン由来阻害剤と、ＮｇＲの公知ニューロン共受容体を含む。

【００６２】

二重特異性抗体

本願は「二重特異性抗体」技術についても記載する。二重特異性抗体はアゴニスト、アンタゴニスト又は両者の各種組み合わせとして機能することができる。本明細書で使用する「アゴニスト」なる用語は該当分子と接触した場合に、アゴニストの不在下で観察される活性又は機能の強さに比較して分子の所定活性又は機能の強さを増加するモジュレーターを意味する。本明細書で使用する「アンタゴニスト」又は「阻害剤」なる用語は該当分子と接触した場合に、アンタゴニストの不在下で観察される活性又は機能の強さに比較して分子の所定活性又は機能の強さを低下させるモジュレーターを意味する。特定該当アンタゴニストとしては、Ｎｏｇｏ－６６の生物活性を阻害又は調節するものが挙げられる。Ｎｏｇｏ－６６のアンタゴニスト及び阻害剤としては限定されないが、Ｎｏｇｏ－６６受

容体（ＮｇＲ）と相互作用する任意分子、好ましくはモノクローナル抗体が挙げられる。

【００６３】

なお、ＮｇＲとの相互作用の結果、受容体又は他のリガンド／細胞膜成分の結合と中和を生じる場合があり、複数の疾患に対する付加的又は相乗的作用に有用であると思われる。

【００６４】

本願はＮｇＲとｐ７５、ＮｇＲとＴＲＯＹ、ＮｇＲとＬＩＮＧＯ－１等のＮｇＲ抗体とＮｇＲ共受容体の組み合わせについても記載する。本願はＮｇＲとそのリガンド及びＮｇＲとミエリン由来阻害因子に交差反応する抗体も含む。これらの抗体としては、ＮｇＲと反発性ガイダンス分子（ＲＧＭ）、ＮＧＲとＮｏｇｏ－Ａ、ＮＧＲとＭＡＧ、ＮｇＲとＯＭｐｇ、ＮｇＲとＣＳＰＧに交差反応する抗体が挙げられる。ＣＳＰＧとしては、アグリカン、ブレビカン、バーシカン、ニューロカン、ホスファカン又はＴｅ３８から選択することができる。従って、これらの例はミエリン由来阻害剤と、ＮｇＲの公知ニューロン共受容体を含む。

【００６５】

本願はＮｇＲと成長因子受容体の二重特異性抗体についても記載し、このような成長因子としては限定されないが、神経成長因子（ＮＧＦ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、ミオスタチン（ＧＤＦ－８）、増殖分化因子－９（ＧＤＦ９）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ又はＦＧＦ２）、グリア細胞由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）が挙げられる。

【００６６】

抗体の使用

本願の中和抗体又はその部分はヒトＮｇＲと結合することができるので、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）又は組織免疫組織化学等の慣用イムノアッセイを使用して（例えば血清や血漿等の生体サンプル中で）ヒトＮｇＲを検出するために使用することができる。本願は、生体サンプル中のヒトＮｇＲの検出方法として、生体サンプルを本発明の抗体又は抗体部分と接触させる段階と、及び、ヒトＮｇＲと結合した抗体（又は抗体部分）又は未結合抗体（又は抗体部分）を検出することにより、生体サンプル中のヒトＮｇＲを検出する段階とを含む方法を提供する。抗体は結合抗体又は未結合抗体の検出を容易にするために検出可能な物質で直接又は間接的に標識する。適切な検出可能な物質としては各種酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料及び放射性材料が挙げられる。適切な酵素の例としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としてはストレプトアビジン／ビオチンとアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光材料の例としてはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリスリンが挙げられ；発光材料の１例としてはルミノールが挙げられ；適切な放射性材料の例としては^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ、^{153}Ｓｍが挙げられる。

【００６７】

本願の抗体及び抗体部分はヒトＮｇＲ活性をインビトロ及びインビボの両者で中和できることが好ましい。従って、本発明のこのような抗体及び抗体部分はＮｏｇｏ－６６とＮｇＲの結合又はそれに起因する活性を阻害するために使用することができる。

【００６８】

別の態様において、本願は対象、有利にはＮｇＲに起因する活性が有害である疾患又は障害に罹患した対象におけるＮｏｇｏ－６６活性又はＮｇＲ活性を低下させる方法を提供する。本願はこのような疾患又は障害に罹患した対象におけるＮｇＲ活性を低下させる方

法として、対象のＮｇＲ活性を低下させるように本願の抗体又は抗体部分を対象に投与する段階を含む方法を提供する。好ましくは、ＮｇＲはヒトＮｇＲであり、対象はヒト対象である。あるいは、対象は本発明の抗体が結合することが可能なＮｇＲを発現する哺乳動物でもよい。更に、対象はＮｇＲを導入した哺乳動物でもよい。本願の抗体は治療目的でヒト対象に投与することができる。更に、本願の抗体は獣医学的目的のため又はヒト疾患の動物モデルとして抗体が結合することが可能なＮｇＲを発現する非ヒト哺乳動物に投与することもできる。後者に関して、このような動物モデルは本発明の抗体の治療効果の評価（例えば投与量及び投与時間の試験）に有用であると思われる。

【００６９】

本明細書で使用する「ＮｇＲ活性が有害である障害」なる用語はこの障害に罹患した対象におけるＮｇＲ又はそれに起因する活性の存在が障害の病理生理の原因である又は障害の増悪に寄与する因子であることが分かっている又はその疑いのある疾病及び他の障害を包含するものとする。従って、ＮｇＲ活性が有害である障害はＮｇＲ活性の低下が障害の症状及び／又は進行を緩和すると予想される障害である。本発明の抗体で治療することができる障害の非限定的な例としては本発明の抗体の医薬組成物に関する下記セクションに記載する障害が挙げられる。

【００７０】

ＮｇＲは神経変性又は神経変性プロセスの阻害に関連する神経疾患を伴うため、麻痺を生じる各種疾患に関連する病理において重要な役割を果たすことが認められている。このような疾患としては、筋委縮性側索硬化症、腕神経叢損傷、外傷性脳損傷を含む脳損傷、脳性麻痺、フリードライヒ運動失調症、ギラン・バレー症候群、白質ジストロフィー、多発性硬化症、ポリオ後遺症、二分脊椎、脊髄損傷、脊髄性筋萎縮症、脊髄腫瘍、脳卒中、横断性脊髄炎が挙げられる。更に、ＮｇＲは認知症、老人性認知症、軽度認知障害、アルツハイマー関連認知症、ハンチントン舞踏病、遅発性ジスキネジア、運動亢進症、躁病、梅毒性パーキンソン病、スチール・リチャードソン症候群、ダウン症候群、重症筋無力症にも役割を果たすことが認められている。

【００７１】

ＮｇＲとそのリガンドは既知炎症因子を伴う炎症又は自己免疫状態の発生と進行にも関与していると思われる（Ｔｅｎｇ　＆　Ｔａｎｇ，２００５；Ｆｏｎｔｏｕｒａ　＆　Ｓｔｅｉｎｍａｎｎ，２００６）。これらの疾患として、限定されないが、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶反応、臓器移植に伴う急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、グレーブス病、、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、シェーンライン・ヘノッホ紫斑病、顕微鏡的腎血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性Ｉ型多腺性内分泌不全症及びＩＩ型多腺性内分泌不全症、シュミット症候群、成人（急性）呼吸窮迫症候群、脱毛症、先天性脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎性関節症、腸病性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱症、尋常性天疱瘡、紅斑性天疱瘡、類天疱瘡、線状ＩｇＡ疾患、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、特発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症関連疾患、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣不全、早発卵巣不全、線維性肺疾患、特発性線維化性肺胞炎、炎症後間質性肺

疾患、間質性肺炎、結合組織病関連間質性肺疾患、混合性結合組織病関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性エリテマトーデス関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、ショーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連肺疾患、薬物誘発性間質性肺疾患、線維症、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、１型自己免疫性肝炎（旧称自己免疫性又はルポイド肝炎）、２型自己免疫性肝炎（抗ＬＫＭ抗体肝炎）、自己免疫性低血糖症、黒色表皮症を伴うＢ型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、１型乾癬、２型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患ＮＯＳ、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状エリテマトーデス、特発性男性不妊症ないしＮＯＳ、精子自己免疫、多発性硬化症（全サブタイプ）、交感性眼炎、結合組織病続発性肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、ショーグレン症候群、高安動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール性肝傷害、胆汁鬱滞症、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アレルギー及び喘息、Ｂ群連鎖球菌（ＧＢＳ）感染症、精神障害（例えば鬱病及び統合失調症）、Ｔｈ２型及びＴｈ１型疾患、急性及び慢性疼痛（各種疼痛）、及び癌（例えば肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び直腸癌）及び血液悪性疾患（白血病及びリンパ腫）が挙げられる。本願のヒト抗体又は抗体部分は自己免疫疾患、特に炎症に関連するもの（例えばリウマチ性脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎）に罹患したヒトを治療するために使用することができる。

【００７２】

ＮｇＲが他の蛋白質と相互作用することも知られており、このような蛋白質として、限定されないが、細胞接着、細胞移動、細胞トラッキング、軸索経路検出に関連する蛋白質及び細胞外マトリックス蛋白質が挙げられる。本願に含まれる可能な治療薬組み合わせとしては、ＮｇＲに対する抗体とセマフォリン（特にＳｅｍａ－１ａ，１ｂ；Ｓｅｍａ－２ａ；Ｓｅｍａ３Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ；Ｓｅｍａ４Ａ，Ｄ；Ｓｅｍａ５Ａ；Ｓｅｍａ６Ｄ；Ｓｅｍａ７Ａ；Ｓｅｍａ　ＶＡ）、プレキシン（プレキシン－Ａ１－４，プレキシン－Ｂ１－３，プレキシン－Ｃ１，プレキシン－Ｄ１，Ｔｉｍ－２）、ニューロピリン（ニューロピリン－１及びニューロピリン－２）、カドヘリン（Ｅ－カドヘリン及びＮ－カドヘリン）、ネトリン（ネトリン－１）、エフリン（ＥｐｈＡ３，４，６，７，８；Ｂ２，Ｂ３）Ｅｐｈ受容体、Ｅｐｈリガンド、Ｉｇ　ＣＡＭ、テナスシン－Ｃ、ＣＳＰＧ、テナスシン、Ｓｅｍａ３Ａ、フィブロネクチン、ラミニン－１、コラーゲン（例えばコラーゲン－ＩＶ）、Ｒｏｂｏ、Ａｂｌ、Ｎ－カドヘリン、Ｌ１、ＮＣＡＭが挙げられる。

【００７３】

ＮｇＲは細胞外アミロイド前駆体蛋白質フラグメント（Ａβ）と相互作用することも記載されている。従って、本願はＮｇＲとＡβ種（Ａβ１－４０、Ａβ１－４２、Ａβオリゴマー、Ａβマルチマー、Ａβグロブロマー）に対する抗体間の組み合わせを含む。この型の併用療法はアルツハイマー病の治療に有用であると思われる。この組み合わせは神経突起伸長／神経保護に加え、ＡＤ患者におけるプラーク沈着と認知能力の改善という二重の効果があると思われる。軸索及び樹状突起の萎縮はアルツハイマー病の非常に初期の特徴であり、併用治療が非常に有効であると思われる。

【００７４】

更に、従来記載されているように、上記パートナーの任意１種間の二重特異性抗体も使用することができる。上記のようなこのような抗体製剤は、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、多発性硬化症、末梢神経損傷、統合失調症、鬱病、不

安症、加えて上記の可塑性及び神経突起成長及び神経毒性に関連する疾患のいずれものの治療に有用であると思われる。

【００７５】

本願の抗体は細胞内標的蛋白質に到達するように膜貫通導入を可能にするペプチドと併用してもよい。このようなペプチド配列として、限定されないが、ｔａｔ、アンテナペディア、ポリアルギニン、所定の抗菌ペプチドが挙げられる。このようなペプチドは細胞原形質膜のみならず、血液脳関門、腸粘膜、髄膜等の上皮及び内皮膜も含めた膜を通して導入を可能にする。

【００７６】

このようなペプチドは細胞シグナル伝達阻害剤を細胞に導入することもでき、このような阻害剤としてはＲＯＣＫ、低分子量ＧＴＰアーゼ、アクチン及びミエリン安定剤等のＮｇＲシグナル伝達分子に対する抗体又は小分子が挙げられる。

【００７７】

本願の抗体又は抗体部分は前段落に記載したようなＮｇＲ活性が関与する障害の治療に有用な１種以上の補助的な小分子治療剤と併用投与することもできる。当然のことながら、本願の抗体又はその抗原結合部分は単独で使用することもできるし、補助剤（例えば，治療剤）と併用することもでき、前記補助剤はその所期目的に合わせて当業者により選択される。例えば、補助剤は本発明の抗体により治療される疾患又は病態を治療するために有用であると当業者に認められている治療剤とすることができる。補助剤は治療用組成物に有益な属性を付与する物質（例えば組成物の粘性を変化させる物質）でもよい。好ましい組み合わせとしては限定されないが、抗精神病薬が挙げられ、限定されないが、例えばリスペリドン、オランザピン、クエチアピン、フェノチアジン（クロルプロマジン、フルフェナジン、レボメプロマジン、ペリシアニン、ペルフェナジン、プロクロルペラジン、プロマジン、チオリダジン、トリフルオペラジン）、ブチロフェノン（ベンペリドール、ハロペリドール）、ゾテピン、ロキサピン、アリピプラゾール、セルトラリン、ジプラシドン、Ｒｈｏキナーゼ活性の小分子阻害剤（ＲＯＣＫ）（例えばファスジル、ジメチルファスジル又は他の任意ＲＯＣＫ阻害剤）、ＧＡＢＡ　Ａ受容体又は代謝型グルタミン酸受容体（ｍＧｌｕＲｓ）に対する低分子量受容体リガンド、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤＳ）、抗炎症性コルチコステロイド（例えばメチルプレドニゾロン）が挙げられる。

【００７８】

本発明の医薬組成物

本願の抗体及び抗体部分は対象への投与に適した医薬組成物に配合することができる。本願の医薬組成物は「治療有効量」又は「予防有効量」の本発明の抗体又は抗体部分を含有することができる。「治療有効量」とは必要な用量と期間で所望治療結果を達成するために有効な量を意味する。抗体又は抗体部分の治療有効量は、当業者が決定することができ、個体の疾患状態、年齢、性別及び体重並びに抗体又は抗体部分が個体に所望応答を誘発する能力等の因子により異なる。治療有効量は、抗体又は抗体部分の有益な治療作用が毒性又は有害作用を上回る量でもある。「予防有効量」とは、必要な用量と期間で所望予防結果を達成するために有効な量を意味する。一般に、予防用量は、初期疾患ステージ又はそれ以前の対象に使用するので、予防有効量は治療有効量よりも少なくなる。

【００７９】

一般に、医薬組成物は本発明の抗体又は抗体部分と医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する。本明細書で使用する「医薬的に許容可能なキャリヤー」は生理的に適合可能な全溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤等を包含する。医薬的に許容可能なキャリヤーの例としては水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等の１種以上とその組み合わせが挙げられる。多くの場合には、例えば糖類、多価アルコール（例えばマンニトール、ソルビトール）又は塩化ナトリウム等の等張化剤を組成物に加えることが好ましい。医薬的に許容可能なキャリヤーとしては更に抗体又は抗体部分の保存期間又は効力を増す微量の補助物質（例えば湿潤剤

、乳化剤、防腐剤又は緩衝液）も挙げられる。

【００８０】

本願の組成物は各種形態を取ることができる。これらの形態としては、例えば液体、半固体及び固体剤形が挙げられ、例えば溶液（例えば注射溶液及び輸液溶液）、分散液、懸濁液、錠剤、ピル、散剤、リポソーム及び座剤が挙げられる。好ましい剤形は所期投与方法及び治療用途により異なる。典型的な好ましい組成物は他の抗体をヒトに受動免疫するために使用されているものと同様の組成物等の注射溶液又は輸液溶液の形態である。好ましい投与方法は非経口投与（例えば静脈内、皮下、腹膜内、筋肉内）である。好ましい１態様では、静脈内輸液又は注射により抗体を投与する。別の好ましい態様では、筋肉内又は皮下注射により抗体を投与する。更に別の好ましい態様としては抗体の髄腔内投与が挙げられる。

【００８１】

治療用組成物は一般に製造及び保存条件下で無菌安定でなければならない。組成物は溶液、マイクロエマルション、分散液、リポソーム又は高薬剤濃度に適した他の規則的構造として製剤化することができる。滅菌注射溶液は必要量の活性化合物（即ち抗体又は抗体部分）を必要に応じて上記成分の１種又はその組み合わせと共に適切な溶媒に加えた後に濾過滅菌することにより製造することができる。一般に、分散液は塩基性分散媒と上記から選択される必要な他の成分を含有する滅菌ビークルに活性化合物を加えることにより製造される。滅菌注射溶液の調製用滅菌凍結乾燥粉末の場合には、好ましい製造方法は予め滅菌濾過しておいたその溶液から活性成分と所望の付加成分のいずれかの粉末を生成する真空乾燥と噴霧乾燥である。例えばレシチン等のコーティングの使用、分散液の場合には必要な粒度の維持及び界面活性剤の使用により、溶液の適正な流動性を維持することができる。吸収を遅らせる物質（例えばモノステアリン酸塩やゼラチン）を組成物に加えることにより、注射用組成物の長期吸収が可能になる。

【００８２】

本発明の抗体及び抗体部分は当分野で公知の各種方法により投与することができるが、多くの治療用途に好ましい投与経路／方法は皮下注射、静脈内注射又は輸液である。当業者に自明の通り、投与経路及び／又は方法は所望結果により異なる。ある態様において、化合物の迅速な放出を防止するキャリヤーを活性化合物に配合することができ、例えばインプラント、経皮パッチ及びマイクロカプセル送達システム等の制御放出製剤が挙げられる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸等の生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤の多数の製造方法が特許登録されており、あるいは一般に当業者に公知である。例えばＲｏｂｉｎｓｏｎ編，Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７８参照。

【００８３】

ある態様において、本願の抗体又は抗体部分を例えば不活性希釈剤又は同化性可食性キャリヤーと共に経口投与することができる。化合物（及び所望により他の成分）を硬又は軟シェルゼラチンカプセルに封入してもよいし、錠剤に圧縮してもよいし、対象の食事に直接添加してもよい。経口治療投与には、化合物に賦形剤を添加し、内服錠、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤、ウェハース剤等の形態で使用することができる。本発明の化合物を非経口投与以外の方法で投与するためには、その不活性化を防止するための材料を化合物に被覆したり、化合物と併用投与することが必要な場合がある。

【実施例】

【００８４】

以下、実施例により本願を更に説明するが、これらの実施例は本願の例証のみを目的とし、その範囲を限定するものではない。

【００８５】

（実施例１）
抗体の作製
Ａ／Ｊマウス（Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｍｅ）が組換えヒト及びラットＮｇＲ蛋白質（夫々配列番号１及び配列番号２）により免疫された。組換えヒト又はラットＮｇＲ蛋白質５０ｕｇを初回注射では完全フロイントアジュバントに加え、２回目以降はＩｍｍｕｎｅａｓｙ（登録商標）（Ｑｉａｇｅｎ）に加えてマウスに４回皮下免疫した。融合の４日前に、マウスに抗原１０ｕｇを静脈内注射した。融合については、ケーラーとミルスタインの標準技術（Ｋｏｈｌｅｒ　Ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ　Ｃ；Ｎａｔｕｒｅ　Ｖｏｌ．２５６，４９５－４９７頁（１９７５））を使用して免疫動物からの脾細胞をＳＰ２／０－Ａｇ１４骨髄腫細胞と５：１の比で融合させた。融合から７～１０日後に、顕微鏡でハイブリドーマコロニーが観察されたので、上清をＥＬＩＳＡアッセイにより試験した。ＰＢＳ中１ｕｇ／ｍｌの組換えヒト又はラットＮｇＲ蛋白質をＥＬＩＳＡプレートに４℃で一晩被覆し、室温で１時間ブロックした。希釈した上清を温置し、結合をヤギ抗マウスＩｇＦｃ－ＨＲＰコンジュゲートで検出した。ＥＬＩＳＡで陽性の抗体産生ハイブリドーマ細胞をスケールアップし、限界希釈法によりサブクローニングした。Ｚｙｍｅｄ　ＥＩＡアイソタイプキットを使用して抗体のアイソタイプを決定した。

【００８６】
各種ＥＬＩＳＡフォーマットが確立されており、ヒト、ラット又はマウスＮｇＲと結合する抗体を同定するための最初のスクリーニングとして日常的に使用されている。ＥＬＩＳＡアッセイで反応した抗体を次に、組換えヒトＮｇＲ又は組換えラットＮｇＲを安定に発現するＨＥＫ又はＣＨＯ細胞と結合させ、形質移入していない細胞又は対照細胞と結合しないものについて試験した。ＥＬＩＳＡフォーマット用として、可溶性受容体を作製した（上記参照）。ＦＡＣＳ試験には、全長ＮｇＲ蛋白質を組換え細胞株で発現させた。ＥＬＩＳＡ結合アッセイとＦＡＣＳアッセイにおけるＭａｂ５０（配列番号３及び配列番号４）とＭａｂ５１（配列番号５及び配列番号６）の結果を表２に示す。

【００８７】
【表２】

表 2.Mab50 及び Mab51 の結合特性の一覧

モノクローナル抗体	ELISA 結合	ELISA 結合	FACS 結合	FACS 結合	FACS 結合	FACS 結合	アイソタイプ
	HuNgR 6×His	ラット NgR 6×His	HEK203 NGR	HEK293 対照	CHO K1 ラット NGR	CHO K1 対照	
Mab50	陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性	IgG2a,k
Mab51	陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性	IgG2a,k

【００８８】
同一実験プロトコールを使用して他の抗体Ｍａｂ１、Ｍａｂ５２、Ｍａｂ５３、Ｍａｂ５４、Ｍａｂ５５、Ｍａｂ５６、Ｍａｂ５７、Ｍａｂ５８、Ｍａｂ５９、Ｍａｂ６０、Ｍａｂ６１及びＭａｂ６２を得た。

【００８９】
（実施例２）
ＥＬＩＳＡによる抗体特異性と結合親和性の測定
実施例１で作製したモノクローナル抗体の特異性を測定するために、ＮｇＲ－Ｆｃ（ヒトＮｇＲのアミノ酸Ｍｅｔ１～Ｓｅｒ４４７とヒトＦｃフラグメントを含む融合蛋白質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ））とラットＮｇＲ（配列番号２）を使用してＥＬＩＳＡを実施した。２種のリガンドを９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ；０．２μｇ／ウェル）に固定化した。ブロッキング試薬として、Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２中２％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を室温で２時間使用した。モノクロー

ナル抗体は１０，０００ｎｇ／ｍｌの濃度から出発して使用した。西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ｓｉｇｍａ）で標識した二次抗マウス抗体で結合抗体を検出し、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（ＴＭＢ，Ｐｉｅｒｃｅ）を標準条件下で使用して発色させた。ｍＡｂ５０とｍＡｂ５１はヒトＮｇＲと特異的に結合した。ヒトＮｇＲ－Ｆｃ０．２μｇ／ウェルを使用した場合には、どちらのモノクローナル抗体でも２０ｎｇ／ｍｌ未満の濃度で５０％結合が認められた（図１Ａ）。同様の実験でｍＡｂ５０とｍＡｂ５１はラットＮｇＲのアミノ酸から構成されるポリペプチドにも特異的に結合した。９６ウェルマイクロタイタープレートのウェル当たり０．２μｇのラットＮｇＲを使用した場合には、どちらのモノクローナル抗体でも２０ｎｇ／ｍｌ未満の濃度で５０％結合が認められた（図１Ｂ）。本発明のその他のモノクローナル抗体（ｍＡＢ）もヒト及びラットＮｇＲと結合した。各抗体で得られたシグナルの差から結合親和性に相違があると思われた（表３参照）。

【００９０】

【表３】

表3. ヒト又はラットNgを使用したmAbのEC50値の一覧

mAb	EC50	
	ヒトNgR ng/ml	ラットNgR ng/ml
1	10	10
4	8	>100
52	3	4
53	3	2
54	5	4
55	2	10
56	8	20
57	20	>100
58	5	15
59	15	15
60	2	5
62	10	7

【００９１】

（実施例３）

ドットブロットとウェスタンブロットを使用した可溶性ヒト及びラットＮｇＲとの抗体結合の特性決定

ドットブロットのために、異なる濃度の蛋白質２μｌを乾燥ニトロセルロース膜上のＴＴＢＳ緩衝液にスポットした。ウェスタンブロットのために、２０％メタノールを添加したＮｏｖｅｘ転写用緩衝液に濾紙とニトロセルロースを１０分間浸漬した。ブロッティングはＮｏｖｅｘチャンバーで定電流（１００ｍＡ）下に２時間室温で実施した。

【００９２】

スポット当たりの蛋白質の添加量は、

ａ）１００μｇ／ｍｌ～～２００ｎｇ／スポット

ｂ）５０μｇ／ｍｌ～～１００ｎｇ／スポット

ｃ）１０μｇ／ｍｌ～～２０ｎｇ／スポット

ｄ）５μｇ／ｍｌ～～１０ｎｇ／スポット

ｅ）１μｇ／ｍｌ～～２ｎｇ／スポット

ｆ）５００ｎｇ／ｍｌ～～１ｎｇ／スポット

とした。プローブをスポット後、膜を１０分間室温で乾燥した後、免疫検出プロトコールを開始した。

【００９３】

試験した全モノクローナル抗体はヒト及びラットＮｇＲと結合した。異なる抗体で得られたシグナル間の差から結合親和性に相違があると思われた。（ＭＡＢ６１はニトロセルロース膜のプローブに使用した条件下でブロット上に高いバックグラウンドを示した。）ＮｇＲ「対照」に対する抗体を除去するとシグナルを示さなかったので、結合は抗体依存性であった。

【００９４】

モノクローナル抗体はウェスタンブロットにて変性ＮｇＲと様々に反応した。ＭＡＢ１のみがヒト及びラットＮｇＲに顕著なシグナルを示した。抗体の結合能の対照として、蛋白質をＳＤＳゲルから転写させた後に非変性ヒトＮｇＲと非変性ラットＮｇＲを含むドットをニトロセルロース膜にスポットした。これらのドットを陽性対照として利用した処、全モノクローナル抗体は同一ニトロセルロース膜上の非変性蛋白質と結合することが確認された。結果を表４にまとめる。

【００９５】

【表４】

表4. ドットブロット及びウェスタンブロット分析

	ドットブロット		ウェスタンブロット	
抗体	hNgR	rNgR	hNgR	rNgR
MAB1	+++	++	+++	++
MAB52	+++	+++	-	-
MAB53	+++	++	~	-
MAB54	++	+	-	-
MAB55	+++	++	~	-
MAB56	++	+	-	-
MAB57	++	~	-	-
MAB58	++	+	-	-
MAB59	+++	++	~	-
MAB60	+++	++	~	-
MAB61	++	+	-	-
MAB62	+++	++	~	-

＋＋＋:非常に強いシグナル;＋＋:強いシグナル;＋:シグナル;－:シグナルなし;
～:関連シグナルなし

【００９６】

（実施例４）

ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６と可溶性ヒトＮｏｇｏ受容体（ｈＮｇＲ－Ｆｃ）の結合の競合

モノクローナル抗体を更に特性決定するために、実施例２の競合アッセイと同様の結合アッセイを使用し、実施例１で作製したｍＡｂの、ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６のヒトＮｇＲ－Ｆｃへの結合を阻害する能力を試験した。ヒトＮｇＲ－Ｆｃ（０．２μｇ／ウェル）を５０ｍＭ炭酸Ｎａ緩衝液（ｐＨ９）中で９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ）に４℃で一晩固定化した後、Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２中２％ＢＳＡで室温にて２時間ブロッキング段階を実施した。ウェルに一定濃度のＡＰ－Ｎｏｇｏ６６（終濃度Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２＋０．１％ＢＳＡ中０．１５ｎＭ）を加え、Ａｂ濃度を徐々に増加させた。プレートを９０分間室温で温置した。各温置段階中に、プレートを洗浄用緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．２＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で洗浄した。ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６の結合をＡｔｔｏＰｈｏｓ基質（Ｒｏｃｈｅ）で

検出し、蛍光単位をＰｏｌａｒｓｔａｒ（ＢＭＧ）計器で測定した。図２はｍＡｂ５０とｍＡｂ５１について０分と３０分で行った測定の相対蛍光単位（ＲＦＵ）を示す。上記結合はｍＡｂ５０とｍＡｂ５１により完全に阻害され、ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６とヒトＮｇＲ－Ｆｃの結合を５０％阻害するためにはどちらの抗体も１０倍モル過剰量が必要であった。ｍＡｂ１を除く他の抗体ｍａｂ５２、ｍＡｂ５３、ｍＡｂ５４、ｍＡｂ５５、ｍＡｂ５６、ｍＡｂ５７、ｍＡｂ５８、ｍＡｂ５９、ｍＡｂ６０、ｍＡｂ６１及びｍＡｂ６２もｍＡｂ５０及び５１で認められたと同様の濃度範囲でＡＰ－Ｎｏｇｏ６６と可溶性Ｎｏｇｏ受容体の結合を阻害した。

【００９７】

（実施例５）

ＨＥＫ２９３ｆ細胞におけるＡＰ－Ｎｏｇｏ６６とヒト及びラットＮｇＲの結合のｍＡＢ５０及びｍＡｂ５１による競合

実施例１に記載したように作製したｍＡｂの結合特性と競合特性を更に特性決定するために、ヒト又はラットＮｇＲを一過的に発現するＨＥＫ２９３ｆ細胞の懸濁液を使用した。形質移入から４８時間後に細胞を９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ）に撒き、リン酸緩衝食塩水（１％ＢＳＡを添加したＰＢＳ）で洗浄した。１μｇ／２００μｌのＡＰ－Ｎｏｇｏ６６（終濃度４０ｎＭ）と種々の濃度のモノクローナル抗体（２０μｇ、４、０．８及び０．１６μｇ／２００μｌ）を加え、４℃で１時間温置した。同一アイソタイプのモノクローナル抗体を陰性対照として使用した。ＺｅｎｏｎマウスＩｇＧ２ａ標識キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒで標識した抗アルカリホスファターゼ抗体（Ｓｉｇｍａ）でＡＰ－Ｎｏｇｏ６６の結合を検出した。二次抗体を４℃で１時間温置した。温置後に、細胞をＰＢＳで洗浄し、ＦＡＣＳ分析した。２０μｇ／２００μｌ濃度（２０倍モル過剰）では、ポリクローナルＮｇＲ抗体とＮｇＲ－Ｆｃ（いずれもＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）はＡＰ－Ｎｏｇｏ６６結合を６０％～７０％阻害し、ｍＡｂ５０及び５１はＡＰ－Ｎｏｇｏ６６結合を約９０％阻害した。ｍＡｂ５０及びｍＡＢ５１をラット及びヒトＮｇＲ中に２０μｇの濃度で使用した場合の抗体アイソタイプ対照を図３ａに示す。抗体アイソタイプ対照は黒線（左端のシグナル）で示し、抗体不在下のＡＰ－Ｎｏｇｏ６６結合は赤線（右端シグナル）で示す。ヒト及びラットＮｇＲはいずれも同等にＡＰ－Ｎｏｇｏ６６と結合した。ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６蛍光はヒト及びラットＮｇＲを発現するＨＥＫ２９３ｆ細胞で両者抗体の存在下では低強度側に移動する（斜線部；緑色）。異なる抗体濃度を使用すると、コルモゴロフ・スミルノフ（Ｋ－Ｓ）アッセイにより測定した場合にヒト及びラットＮｇＲの両者でＡＰ－Ｎｏｇｏ６６に対して２倍モル過剰のモノクローナル抗体５０及び５１でIC_{50}が認められた。

【００９８】

図３ｂは種々の濃度、即ち２０．０μｇ，４．０，０．８及び０．１６μｇ／２００μｌのｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１による結果を示す。本発明の他のｍＡｂはｍＡｂ５０及び５１で認められたと同様の濃度範囲でＡＰ－Ｎｏｇｏ６６とＨＥＫ２９３ｆ細胞で発現させたＮｏｇｏ受容体の結合を阻害した。ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６とＨＥＫ２９３ｆ細胞で発現させたヒトＮｇＲの結合の５０％競合に必要な抗体量を示す表５参照。

【００９９】

【表５】

表5. AP-Nogo 66とヒト及びラットHEK293f細胞との競合

mAb	50% 競合(μg)
50	0,5
51	0,5
52	3
53	3
54	0,8
55	0,6
56	0,8
57	0,2
58	0,2
59	3
60	0,8
62	0,3

【０１００】

（実施例６）

ＮＴｅｒａ２細胞中でＡＰ－Ｎｏｇｏ６６により誘導された神経突起伸長阻害のｍＡＢ５０及びｍＡｂ５１による中和

ヒトＮＴｅｒａ－２細胞及び齧歯類（マウス皮質ニューロン、ラット皮質ニューロン及びラット小脳顆粒細胞ニューロン）細胞型と、リガンドとしてＡＰ－Ｎｏｇｏ６６及びミエリンを使用してインビボ状況に近似する機能システムで神経突起伸長に及ぼす本発明の抗体の効果を試験した。

【０１０１】

ＮＴｅｒａ２細胞（ヒト奇形癌細胞株）はレチノイン酸を使用して神経突起様細胞に分化させることができ、この細胞はポリクローナル抗体とＮｇＲの適度の結合（ＦＡＣＳ結合）により示されるようにＮｇＲ　ｍＲＮＡ（ＰＣＲ）と細胞表面蛋白質を発現する。夫々アイソタイプ対照抗体（非斜線領域）とｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１（斜線領域）（図４）を使用してＦＡＣＳ分析により細胞表面上のＮＴｅｒａ－２細胞による天然ヒトＮｇＲの発現を検出した。両者抗体とＮｔｅｒａ－２細胞の表面で発現されるＮｇＲ細胞の結合を斜線領域により示す。

【０１０２】

これらの分化細胞における神経突起伸長又は成長円錐崩壊の分析はヒトニューロンに可能な限り近似するインビトロシステムである。ＮＴｅｒａ２細胞（Ｇｅｒｍａｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ，ＤＭＳＺ，Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇから入手）を融解し、ＤＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ　＃３１９６６－０２１＋１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）＋５％ウマ血清（ＰＳ））を加えた１７５ｃｍ^{2}培養フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ　ｂｉｏ－ｏｎｅ　＃６６０１７５）に撒いた。数日間培養後、細胞を再培養した。このために、細胞をＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ　＃１４１９０－０９４）で１回洗浄し、トリプシン／ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ　＃２５３００－０５４）で洗浄し、トリプシン／ＥＤＴＡの存在下で５分間温置した。分化のために、細胞を再懸濁し、１７５ｃｍ^{2}フラスコでＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ　３１９６６－０２１，Ｌｏｔ．Ｎｒ．３０９２５９４）＋１０％ＦＣＳ＋５％ＰＳ＋１％ペニシリン／ストレプトマイシン（５０００／５０００単位／ｍＬ）＋レチノイン酸（ＳＩＧＭＡ　＃Ｒ２６２５）終濃度１０μＭに細胞２．５×１０^{6}個を撒いた。

【０１０３】

分化のために、終濃度１０μＭのレチノイン酸（ＳＩＧＭＡ　＃Ｒ２６２５）を３週間にわたって週２回ＮＴｅｒａ２細胞に加えた。２１日間分化後に、細胞を再培養した。こ

のために、細胞をＰＢＳで１回洗浄し、トリプシン／ＥＤＴＡで洗浄し、トリプシン／ＥＤＴＡの存在下で５分間温置した。細胞を再懸濁し、１：６に分割し、１７５ｃｍ^{2}フラスコ６本でＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ　３１９６６－０２１，Ｌｏｔ．Ｎｒ．３０９２５９４）＋１０％ＦＣＳ＋５％ＰＳ＋１％ＰｅｎＳｔｒｅｐ）に撒き、２～３日間培養した。２～３日後に細胞をＰＢＳで洗浄し、物理的に剥がし、５分間１０００ｒｐｍで遠心し、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（Ｇｉｂｃｏ　＃２１１０３－０４９）＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｇｉｂｃｏ　＃２５０３０－０２４）＋ペニシリン／ストレプトマイシン＋Ｂ２７－サプリメントに再懸濁し、三角フラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ　＃４３１１４３）で予備凝集させた。こうして、細胞１０^{6}個／ｍＬを２×１５ｍＬ凝集培地（Ｎｅｕｒｏｂｓａｌｍｅｄｉｕｍ（Ｇｉｂｃｏ　＃２１１０３－０４９）＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｇｉｂｃｏ　＃２５０３０－０２４）＋ペニシリン／ストレプトマイシン＋Ｂ２７－サプリメント）に加え、３７℃，５％ＣＯ２下に一晩温和に撹拌し、阻害基質と対照基質を事前被覆した９６ウェルプレート（Ｂｉｏｃｏａｔ　Ｐｏｌｙ－Ｄ－Ｌｙｓｉｎ　Ｃｅｌｌｗａｒｅ　９６－Ｗｅｌｌ　Ｂｌａｃｋ／Ｃｌｅａｒ　Ｐｌａｔｅ　Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＃３５　４６４０（３５　６６４０））に撒いた。阻害基質では、９６ウェルプレートの半数に滅菌ＰＢＳ中ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６（ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６濃度は１５μｇ／ｍＬとした）＋ラミニン（Ｓｉｇｍａ，Ｌ－２０２０，Ｌｏｔ　０１４Ｋ４０６０，（ストック溶液．１ｍｇ／ｍＬ）；ウェル当たり最終ラミニン量２０μｇ）１００μＬを事前被覆した。許容基質では、プレートの残りの半数にラミニン１００μｌ（２０μｇ）を被覆した。２時間温置後に、プレートをＰＢＳで２回洗浄し、培地４０μｌを補充した各ウェルに予め凝集させた懸濁液５０μｌを撒いた。プレートを３７℃で２時間温置し、最後に、予め希釈したｍＡｂ５０又はｍＡｂ５１溶液１０μｌを加え、最終抗体濃度１～１００μｇ／ｍＬとした。細胞を３７℃，５％ＣＯ２下に一晩温置し、翌日、２％パラホルムアルデヒド（ＳＩＧＭＡ　＃Ｐ－６１４８）で固定し、その後の分析に備えて４℃で保存した。ソフトウェアＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　ＬＥ　Ｒｅｌ．４．１を使用し、標準評価パラメーター（凝集面積及び凝集面積＆神経突起成長面積）を使用して神経突起伸長の分析を実施した。

【０１０４】

上記方法によりＮＴｅｒａ２凝集物からの神経突起伸長を定量した。結果を図５に示す通り、ｍＡｂ５０では２μｇ／ｍｌ、ｍＡｂ５１では１μｇ／ｍｌで神経突起伸長の有意な改善を観測することができる。Ｎｏｇｏ６６処理に対する有意差：＊＝ｐ値＜０．０５；＊＊＊＝ｐ値＜０．００．１。

【０１０５】

抗体Ｍａｂ５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１及び６２でも神経突起伸長阻害の改善が得られた。Ｍａｂ１とＭａｂ４はＡＰ－Ｎｏｇｏ６６による神経突起伸長の阻害を示さなかった。

【０１０６】

（実施例７）

ｈＮｇＲの欠失変異体：抗体の発現、精製及び結合。

【０１０７】

ＧＰＩリンカー形成（４５０最終アミノ酸）と膜結合を阻止するようにＣ末端アミノ酸を欠失させると共に、分泌蛋白質量を潜在的に増加させるように分泌シグナルを使用することにより、ｈＮｇＲを可溶性蛋白質として発現させた。使用した発現システムは２９３Ｆ細胞における発現プラスミドの一過的形質移入に基づくものとした。Ｎｉ－ＮＴＡ（ニッケル－ニトリロ三酢酸）ビーズを使用することによりＨｉｓタグ付き分泌蛋白質を捕獲した。ｈｉｓタグを付けた無関係の蛋白質（ＲＧＭ　Ａ－Ｈｉｓ）を陰性対照として使用してＰＡＧＥとウェスタンブロットにより溶出後の蛋白質の純度とサイズを分析した。これらの調製物におけるＮｇＲ－蛋白質をより良好に調整するために、全欠失変異体を検出すると予想されるｈＮｇＲに対するポリクローナル抗体（ＡＦ１２０８）を使用してドットブロットによりＮｇＲの量を測定した。異なるＮｇＲ欠失変異体に調整量の蛋白質を使

用するドットブロットを実施した。上記抗体による免疫検出にドットブロットを使用した。

【０１０８】

ＮｇＲ欠失変異体を発現する２９３Ｆ細胞の細胞培養上清を非精製ＮｇＲ源として使用して抗体とＮｇＲ欠失変異体の結合を更に特性決定した。

（ｉ）フルニエらによるＮｇＲ欠失変異体の作製（Ｔｒｕｎｃａｔｅｄ Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｎｏｇｏ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｂｉｎｄｓ Ｎｏｇｏ－６６ ａｎｄ Ｂｌｏｃｋｓ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ａｘｏｎ Ｇｒｏｗｔｈ ｂｙ Ｍｙｅｌｉｎ；Ａｌｙｓｏｎ Ｅ．Ｆｏｕｒｎｉｅｒ，Ｇｒａｈａｍ Ｃ．Ｇｏｕｌｄ，Ｂｅｔｔｙ Ｐ．Ｌｉｕ，Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｍ．Ｓｔｒｉｔｔｍａｔｔｅｒ；Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｏｃｔｏｂｅｒ １５，２００２，２２（２０）：８８７６－８８８３）。ヒトＮｇＲの７種類の欠失変異体が文献に記載されている（Ｆｏｕｒｎｉｅｒら）。これらの７種類の変異体構築物がｐＳｅｃＴａｇ２Ａ ＩｇＫ／ｈＮｇＲ ２７－４５０／Ｍｙｃ／Ｈｉｓから作製された。この構築物はｐＳｅｃＴａｇ２Ａベクターに ＩｇＫリーダーペプチドとＣ末端Ｍｙｃ及びＨｉｓタグに融合したヒトＮｇＲのアミノ酸２７－４５０のコーディング領域を含む。以下の構築物を作製した：

【０１０９】

【化１】

- pSecTag2AigK/hNgR 27-450/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR 58-450/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 58-106/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 106-155/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 155-202/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 203-250/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 260-310/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR 27-310/Myc/His

【０１１０】

ｐＳｅｃＴａｇ２ＡｉｇＫ／２７－３１０／Ｍｙｃ／Ｈｉｓを除く全構築物はＱｕｉｋ Ｃｈａｎｇｅ ＩＩ ＸＬ Ｓｉｔｅ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，＃２００５２１）を使用して作製され、形質転換は大腸菌ＸＬ１０ Ｇｏｌｄ細胞中にて実施された。ｐＳｅｃＴａｇ２ＡｉｇＫ／ＮｇＲ／２７－３１０／Ｍｙｃ／Ｈｉｓについて、コーディング配列の相当領域を増幅し、ｐＳｅｃＴａｇ２Ａにクローニングした。ＮｇＲコーディング領域の異なる部分を欠失させるために以下の変異誘発及び増幅プライマーを使用した。

【０１１１】

【化２】

1. pSecTag2AigK/hNgR 58-450/Myc/His

Mey 1008 ： **センスプライマー**
GCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTATGCGCCAGCCAGCGCATCTTCCTGC
ACGGC
ベクター配列
アミノ酸A58から開始するhNgR配列

Mey 1009 ： **アンチセンスプライマー**
GCCGTGCAGGAAGATGCGCTGGCTGGCGCATAAGCTTCGTACGGCGCGC
CTGGC
ベクター配列
アミノ酸A58から開始するhNgR配列

2. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 58-106/Myc/His

Mey 1014 ： センスプライマー
GCTGTGCCCGTGGGCATCCCTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCTGGACCTCAGCGATAATGC
アミノ酸A58までのhNgR配列
アミノ酸L106から開始するhNgR配列

Mey 1015 ： アンチセンスプライマー
GCATTATCGCTGAGGTCCAGCTGCTCCAGGAGGGCAGCAGGGATGCCCACGGGCACAGC
アミノ酸A58までのhNgR配列
アミノ酸L106から開始するhNgR配列

3. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 106-154/Myc/His

Mey 1021 ： センスプライマー
GCGGCTGCCTTCACTGGCCTGGCCGCCCTGCAGTACCTCTACCTGCAGGACAACGC
アミノ酸A105までのhNgR配列
アミノ酸A155から開始するhNgR配列

Mey 1022 ： アンチセンスプライマー
GCGTTGTCCTGCAGGTAGAGGTACTGCAGGGCGGCCAGGCCAGTGAAGGCAGCCGC
アミノ酸A105までのhNgR配列
アミノ酸A155から開始するhNgR配列

4. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 155-202/Myc/His

Mey 1023 ： センスプライマー
CGGGGCTGTTCCGCGGCCTGGCTAGCCTCGACCGTCTCCTACTGCACCAGAACCGC
アミノ酸A154までのhNgR配列
アミノ酸S203から開始するhNgR配列

Mey 1024 ： アンチセンスプライマー
GCGGTTCTGGTGCAGTAGGAGACGGTCGAGGCTAGCCAGGCCGCGGAACAGCCCCG
アミノ酸A154までのhNgR配列
アミノ酸S203から開始するhNgR配列

5. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 203-250/Myc/His

Mey 1025 ： センスプライマー
GAGCGCGCCTTCCGTGGGCTGCACGCCCTGCAGTACCTGAGGCTCAACGACAACC
アミノ酸H202までのhNgR配列
アミノ酸A251から開始するhNgR配列

Mey 1026 ： アンチセンスプライマー
GGTTGTCGTTGAGCCTCAGGTACTGCAGGGCGTGCAGCCCACGGAAGGC
GCGCTC
アミノ酸H202までのhNgR配列
アミノ酸A251から開始するhNgR配列

6. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 260-310/Myc/His

Mey 1027 ： センスプライマー
GCGTGCCCTGCAGTACCTGAGGCTCAACGACGTGGCCACCGGCCCTTACCAT
CCCATCTG
アミノ酸D259までのhNgR配列
アミノ酸V311から開始するhNgR配列

Mey 1028 ： アンチセンスプライマー
CAGATGGGATGGTAAGGGCCGGTGGCCACGTCGTTGAGCCTCAGGTACTGCA
アミノ酸D259までのhNgR配列
アミノ酸V311から開始するhNgR配列

7. pSecTag2AigK/hNgR27-310/Myc/His

Mey 1016 ： センスプライマー
CCCCAAGCTTATGCCCAGGTGCCTGC
アミノ酸C27から開始するhNgR配列

Mey 1030 ： アンチセンスプライマー
CCCCGAATTCCAGCGCAGCCCTGCAGGTC
アミノ酸A310までのhNgR配列

【０１１２】
図６の模式図参照。
【０１１３】
（ｉｉ）ＮｇＲ欠失変異体の発現
ヒトＮｇＲのＣ末端アミノ酸を欠失させると、膜固定性及び細胞上清中の可溶性受容体蛋白質の存在が失われる。Ｎ末端において、ｈＮｇＲのシグナルペプチド（アミノ酸１－２７）をベクター中にコードされているシグナルペプチドで置換した。従って、ｈＮｇＲのアミノ酸２７から開始し、ｈＮｇＲのアミノ酸４５０を終点とするＮ末端及びＣ末端欠失変異体（ｈＮｇＲ２７－４５０）をこれらの全変異体の基礎として使用し、細胞上清中に可溶性蛋白質の存在を可能にした。更に、これらの変異体にはこれらの蛋白質の精製を可能にするための短いアミノ酸タグを加えた。ｈＮｇＲ変異体のＤＮＡを２９３Ｆ細胞で一過的に発現させた。７２時間後に遠心により細胞上清を回収した。下記方法により蛋白質精製を実施した。ヒトＮｇＲの７種類の異なる変異体をコードする以下のＤＮＡによる形質移入を実施した。
【０１１４】

【化３】

- pSecTag2AigK/hNgR **27-450**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR **58-450**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ **58-106**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ **106-155**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ **155-202**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ **203-250**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ **260-310**/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR **27-310**/Myc/His

【０１１５】
ｈＮｇＲ変異体のＤＮＡを２９３Ｆ細胞で一過的に発現させた。
【０１１６】
（ｉｉｉ）Ｎｉ－キレート親和性（Ｎｉ－ＮＴＡ）を使用したＮｇＲ蛋白質の精製
Ｎｉ－ＮＴＡスーパーフロービーズ（Ｑｉａｇｅｎ　Ｑｉａｇｅｎ　＃１０１８６１１）を使用した。ビーズ上清を１３５００ｒｐｍで遠心し、上清を捨て、ビーズを新鮮なＰＢＳに再懸濁することにより、ビーズをＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で３回洗浄した。ビーズ懸濁液２００μｌを細胞培養上清３０ｍｌに使用した。ビーズを細胞培養上清と共に４℃でローテータで６０ｒｐｍにて温置し、温置後に遠心（１０分間，３０００ｒｐｍ）し、ビーズをペレット化した。上清を捨て、ビーズをＰＢＳで３回洗浄した。溶出用緩衝液（ＰＢＳ，１６０ｍＭ　ＮａＣｌ，１５０ｍＭイミダゾール）２５０μｌを使用して結合性蛋白質をビーズから溶出させた。室温のローテータで３０分間温置後、１３．５００ｒｐｍで３分間遠心することによりビーズをペレット化した。上清を除去した。溶出した蛋白質をその後の分析に備えて－２０℃で凍結させた。ｈＮｇＲの欠失変異体によるドットブロット実験からのデータを表６にまとめる。
【０１１７】

【表６】

表6.

抗体	変異体							
	1	2	3	4	5	6	7	8
AF1208	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
MAB1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	~
MAB4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	~
MAB50	++	-	-	-	-	+++	-	~
MAB51	++	-	-	-	-	+++	-	~
MAB52	++	-	-	-	-	+++	-	++
MAB53	++	-	-	-	-	+++	-	++
MAB54	+	-	-	-	-	+	-	~
MAB55	+	-	-	-	-	+	-	~
MAB57	~	-	-	-	-	-	-	-
MAB58	++	-	-	-	~	++	-	~
MAB59	++	-	-	-	~	++	-	~
MAB60	+++	-	-	-	~	++	-	+
MAB61	+	-	-	-	-	+	-	+
MAB62	+		-	-	~	+	-	~

＋＋＋:非常に強いシグナル;＋＋:強いシグナル;＋:シグナル;－:シグナルなし;
～:関連シグナルなし

【０１１８】

（実施例８Ａ）

ＭＡＧ－ＦｃとＮｇＲ－Ｆｃの結合の競合

モノクローナル抗体を更に特性決定するために、実施例２の競合アッセイと同様の結合アッセイを使用して実施例１で作製した２種類のｍＡｂがＭＡＧ－ＦｃとヒトＮｇＲ－Ｆｃの結合を阻害する能力を試験した。ＮｇＲ－Ｆｃ（０．２μｇ／ウェル，Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を４℃の５０ｍＭ炭酸Ｎａ緩衝液（ｐＨ９）中、９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ）に固定化した後、Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２中２％ＢＳＡで室温にて２時間ブロッキング段階を実施した。ＭＡＧ－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｒａｔ　ＭＡＧ／Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａ，Ｃａｔａｌｏｇ　＃５３８－ＭＧ）をＺｅｎｏｎヒトＩｇＧ標識キット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）により西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した。ウェルに一定濃度の標識ＭＡＧ－Ｆｃ（Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２＋０．１％ＢＳＡ中終濃度５０ｎｇ／ｍｌ）と、指定濃度のｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１を加えた。未標識ＭＡＧ－ＦｃをＮｇＲ－Ｆｃ対照として使用してこれを６０分間室温で温置した。各温置段階中、プレートを洗浄用緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．２＋０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０）で洗浄した。３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（ＴＭＢ，Ｐｉｅｒｃｅ）を標準条件下で使用して標識ＭＡＧ－Ｆｃを発色させた。図７に示すように、ｍＡｂ５０（黒三角）とｍＡｂ５１（白三角）はＭＡＧ－ＦｃとヒトＮｇＲの結合を阻害しなかった。ＭＡＧ－ＦｃとＮｇＲ－Ｆｃは標識ＭＡＧ－Ｆｃ（黒円）とヒトＮｇＲ－Ｆｃの結合に競合した（ヒトＮｇＲのアミノ酸Ｍｅｔ１～Ｓｅｒ４４７とヒトＦｃフラグメントを含む融合蛋白質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）；黒四角）。従って、ｍＡｂ５０とｍＡｂ５１はこれらの条件下でＮｇＲとの結合に関してＭＡＧと競合しなかった（図７）。他の抗体はいずれもこれらの条件下でＮｇＲとの結合に関してＭＡＧと競合しなかった。

【０１１９】

（実施例８Ｂ）

ＯＭｇｐとＮｇＲ－Ｆｃの結合の競合

モノクローナル抗体を更に特性決定するために、実施例８ａの競合アッセイと同様の結合アッセイを使用して実施例１で作製した２種類のｍＡｂの、ｏＭｇｐのヒトＮｇＲ－Ｆ

ｃへの結合を阻害する能力を試験した。ＮｇＲ－Ｆｃ（０．２μｇ／ウェル，Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を４℃の５０ｍＭ炭酸Ｎａ緩衝液（ｐＨ９）中、９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ）に固定化した後、Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２中２％ＢＳＡで室温にて２時間ブロッキング段階を実施した。ウェルに一定濃度のヒトＯＭｇｐ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ／１６７３－ＯＭ；Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．２＋０．１％ＢＳＡ中終濃度５００ｎｇ／ｍｌ）と、指定濃度のｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１を加えた。この混合物を６０分間室温で温置した。西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ｒｏｃｈｅ）で標識した抗Ｈｉｓ抗体を使用してＯＭｇｐを検出した。各温置段階中、プレートを洗浄用緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．２＋０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０）で洗浄した。３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（ＴＭＢ，Ｐｉｅｒｃｅ）を標準条件下で使用して標識抗Ｈｉｓ抗体を発色させた。

【０１２０】

表７に示すように、ｍＡｂ５０とｍＡｂ５１はＯＭｇｐとヒトＮｇＲの結合を部分的に阻害した（３０～４０％範囲）。ｍＡｂ５２とｍＡｂ５９以外の他の抗体も、１００倍モル過剰を上回る８０μｇ／ｍｌまでの濃度でもＯＭｇｐとヒトＮｇＲの結合を部分的に阻害した（表７）。

【０１２１】

【表７】

表7.

mAb	最大競合(%)
1	26
4	9
50	33
51	36
52	0
53	27
54	23
55	35
56	37
57	17
58	32
59	0
60	5
62	22

【０１２２】

（実施例９）

ラットＤＲＧ細胞におけるＡＰ－Ｎｏｇｏ６６により誘導した神経突起伸長阻害のｍＡＢ５０及びｍＡｂ５１による中和

生後３～６日の子ラットからの後根神経節（ＤＲＧ）を使用して神経突起伸長に及ぼすＮｇＲ抗体の作用を調べた。

【０１２３】

ＤＲＧを作製するために、子ラット６～８匹を外科用鋏で断頭した。腹側臓器と椎骨を除去することにより腹側から脊柱を摘出した。次に、精密鋏により脊柱を縦方向に切開した。ＤＲＧを付けたまま脊髄を摘出し、ＰＢＳを加えた１０ｃｍペトリ皿に移した。２本の精密鉗子を使用することによりＤＲＧから脊髄と結合神経線維を分離し、ＰＢＳ　１ｍｌを加えた３５ｍｍペトリ皿に移した。全ＤＲＧを採取後、コラゲナーゼのＰＢＳ溶液（４ｍｇ／ｍｌコラゲナーゼタイプＩ，Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ　＃ＣＬＳ－１）０，５ｍｌを加え、ＤＲＧを２０～３０分間３７℃で温置した。トリプシン溶液（ＰＢＳ中０，５％トリプシン（ＳＥＲＶＡ　＃３７２９０））０，５ｍｌを加え、ＤＲＧを更に１５～２５分間３７℃で温置した。ＤＲＧを１５ｍｌチューブに移し、培地（ＤＭＥＭ　Ｎｕｔ

Ｍｉｘ　Ｆ１２（Ｇｉｂｃｏ　＃３１３３０－０３８）＋５％ＦＣＳ（Ｇｉｂｃｏ，熱不活化）＋５％ウマ血清（Ｓｉｇｍａ，熱不活化）＋１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ　＃１５１４０－１２２））１０ｍｌを加えた。ＤＲＧがチューブの底に沈降後、上清を除去した。パスツールピペットに３～５回通した後、口径の小さいパスツールピペットに更に２～３回通すことによりＤＲＧを培地２ｍｌ中で解離させた。細胞塊の沈降後、解離した細胞を含む上清を新しいチューブに移した。５分間１０００ｒｐｍで遠心することにより細胞を採取し、培地２ｍｌに再懸濁し、カウントし、神経成長因子（ＮＧＦ；終濃度６２，５μｇ／ｍｌ，Ｒｏｃｈｅ　＃１０１４３３１）を加えた培地で所望細胞密度まで希釈した。ポリリジンを被覆し、更にコーティング溶液１００μｌ（滅菌水５０ｍｌで希釈したラミニン（１ｍｇ／ｍｌ　Ｓｉｇｍａ　＃Ｌ－２０２０）バイアル１本）を被覆しておいた９６ウェルプレート（例えばＢｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＃３５６６４０）のウェル当たり８０μｌの容量で細胞４０００～７０００個を撒いた後、３０分間～３時間３７℃で温置した。細胞培養後、濃度を増加しながら容量１０μｌの抗体を加えた。CO_2インキュベーターで３７℃にて２時間温置後、１０μｌのＡＰ－Ｎｏｇｏ６６を加えた。細胞を１８～３０時間増殖させ、４％パラホルムアルデヒドのＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水；Ｇｉｂｃｏ　＃１４１９０－０９４）溶液１００μｌを加えた後に４℃で少なくとも１２時間温置することにより固定させた。９６ウェルプレートの代わりに、ポリリジンを被覆したカバースリップ（例えばＢｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＃３５４０８５）と２４ウェルプレート（例えばＦａｌｃｏｎ　＃３５３０４７）を併用し、コーティング溶液５００μｌを加えることにより被覆した。抗βＩＩＩチューブリン抗体（例えばＡｂｅａｍ　＃ａｂｌ４５４５）とＣｙ３標識二次抗体（例えばＪａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　＃７１５－１６５－１５１）を併用して間接免疫蛍光により神経突起伸長を可視化した。ビスベンズイミド（Ｈ３３２５８）を二次抗体に加えることにより神経を染色した。ＢＤＴＭ　Ｐａｔｈｗａｙ　Ｂｉｏｉｍａｇｅｒ（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で１０倍の倍率で顕微鏡写真を撮影し、ＡｔｔｏＮＯ（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）ソフトウェアを使用して神経突起長を測定した。神経突起伸長を画像１枚当たりのＤＲＧ数に正規化した。図８は１例としてＡＰ－Ｎｏｇｏ６６により誘導した神経突起伸長阻害のｍＡｂ５０による中和を示す。図９は夫々抗体ｍＡｂ５０及びｍＡｂ５１を使用した実験の結果を示す。ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６を加えると、ＡＰ－Ｎｏｇｏ６６を加えない対照条件（１本目の棒グラフ）に比較して神経突起伸長の長さは著しく減少する（２本目の棒グラフ）。どちらの抗体もＡＰ－Ｎｏｇｏ６６により誘導した神経突起伸長の阻害を用量依存的に中和した。ＤＲＧ数に正規化した神経突起長は抗体を加えずにＡＰ－Ｎｏｇｏ６６を加えた場合（２本目の棒グラフ）に比較してどちらの抗体でも５０μｇ／ｍｌで統計的に有意差を示す（最後の棒グラフ）。

【０１２４】

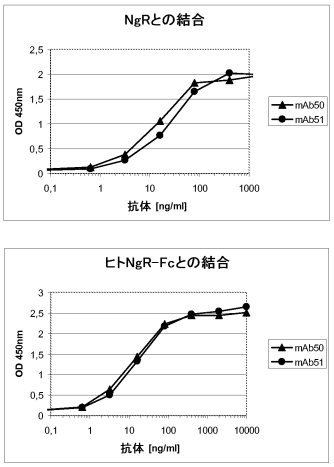
抗体Ｍａｂ５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１及び６２でも神経突起伸長阻害の改善が得られた。Ｍａｂ１とＭａｂ４はＡＰ－Ｎｏｇｏ６６による神経突起伸長の阻害を改善しなかった。

【０１２５】

これらの結果から、このような抗体は成長阻害環境で神経突起成長を刺激する潜在能力があると結論することができる。

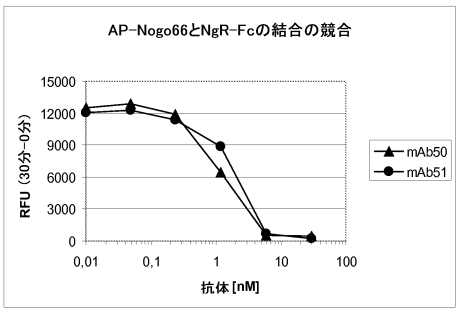
【図１】

FIGURE 1A AND 1B



【図２】

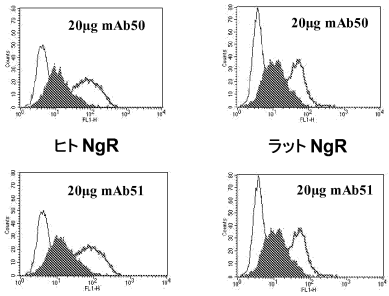
FIGURE 2



【図３】

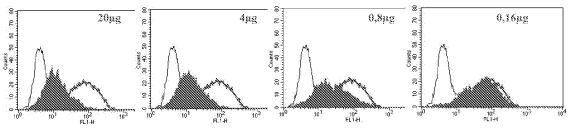
FIGURE 3

A.AP-Nogo66の、夫々組換えヒト及びラットNgRを発現するHEK293f細胞との結合の競合

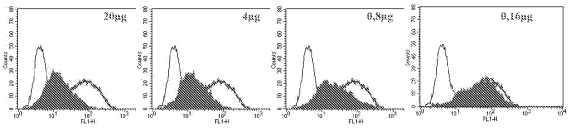


B.AP-Nogo66の、組換えヒトNgRを発現するHEK293f細胞との結合の競合

mAb50:AP-Nogo66(1μg)の、HEK293f細胞上のヒトNgRとの競合



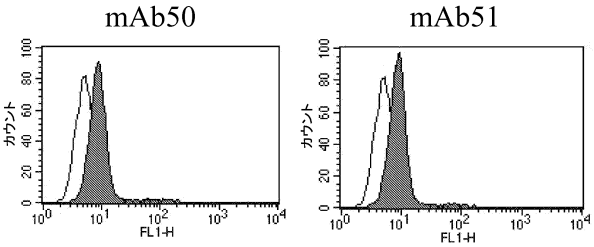
mAb51:AP-Nogo66(1μg)の、HEK293f細胞上のヒトNgRとの競合



総括表：数値は、AP-Nogo66の、組換えヒトNgRを発現するHEK293f細胞との結合の50%競合を示す。

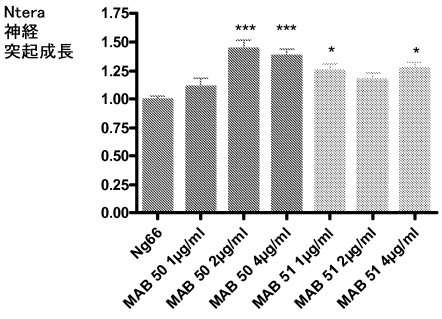
【図４】

FIGURE 4



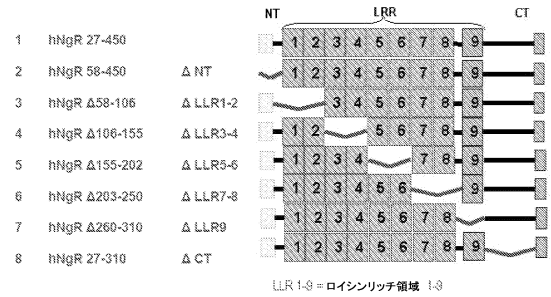
【図５】

FIGURE 5



【図６】

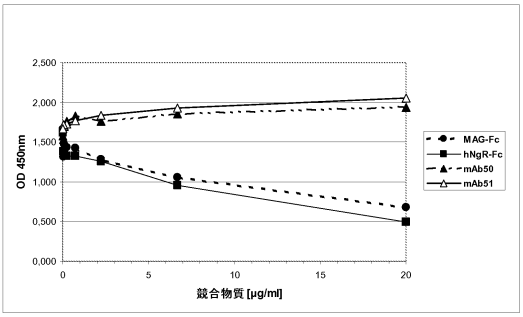
FIGURE 6



欠失を「Δ」記号により示す

【図７】

FIGURE 7

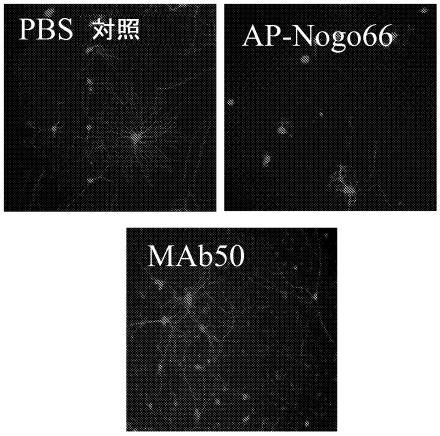


【配列表】

0005653622000001.app

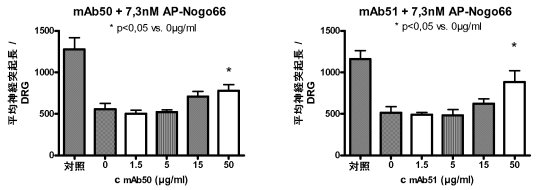
【図８】

FIGURE 8



【図９】

FIGURE 9



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P	21/08	
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P	43/00	111
A61P 21/02	*(2006.01)*	A61P	43/00	121
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	21/02	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P 9/10	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 25/28	*(2006.01)*	A61P	9/10	
A61P 25/14	*(2006.01)*	A61P	25/28	
A61P 25/18	*(2006.01)*	A61P	25/14	
A61P 25/16	*(2006.01)*	A61P	25/18	
A61P 21/04	*(2006.01)*	A61P	25/16	
A61P 27/06	*(2006.01)*	A61P	21/04	
		A61P	27/06	

(72)発明者 メツツラー, マリオ
ドイツ国、６７１４７・フオルスト、バインシユトラーセ・１１２・ハー
(72)発明者 モーラー, アヒム
ドイツ国、６７２６９・グリユンシユタツト、イム・ツアウンシユツケン・１０
(72)発明者 ミユーラー, ラインホルト
ドイツ国、６７１０５・シツフアーシユタツト、オストリング・６６・アー
(72)発明者 ミユーラー, ベルンハルト・カー
ドイツ国、６７４３５・ノイシユタツト、アルトバツハシユトラーセ・１０・アー
(72)発明者 ガユール, タリク
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７４６、ホリストン、ワシントン・ストリート・１０１４
(72)発明者 バーロウ, イブ・エイチ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５４１、プリンストン、ジエフアーソン・ロード・４
(72)発明者 シユミツト, マルテイン
ドイツ国、６４６２５・ベンスハイム、ミツテルシユトラーセ・４９・ベー
(72)発明者 マイヤー, アクセル
ドイツ国、６８７２３・シユベツツインゲン、ケーニツヒゼツカー・４
(72)発明者 トイツシユ, ニコル
ドイツ国、６４６８３・アインハウゼン、イム・ベールヒエン・２９・アー

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 国際公開第２００５／０１６９５５（WO, A1）
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, ２００４年, Vol.279, No.42, p.43780-43788
Neuroscience 2002 Abstract, 333.1, http://www.sfn.org/absarchive/abstract.aspx

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １６／００－１６／４６
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＷＰＩ
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）