



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월04일

(11) 등록번호 10-1574814

(24) 등록일자 2015년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C07K 16/22* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

*A61P 25/00* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7012080

(22) 출원일자(국제) 2008년10월27일

심사청구일자 2013년10월24일

(85) 번역문제출일자 2010년06월01일

(65) 공개번호 10-2010-0100848

(43) 공개일자 2010년09월15일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/064501

(87) 국제공개번호 WO 2009/056509

국제공개일자 2009년05월07일

(30) 우선권주장

07119847.7 2007년11월02일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/001,741 2007년11월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050095768 A\*

KR1020060119982 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

노파르티스 아게

스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

유니버시티 오브 취리히

스위스 체하-8006, 취리히 라미슈트라쎄 71 프

로레크토라트 포르슈

(72) 발명자

바르스케, 카르멘

독일 79540 피라흐 비르켄베크 10

프렌첼, 스테판

독일 79539 피라흐 테오도르-호이스-스트라쎄 46

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 개선된 NOGO-A 결합 분자 및 이의 제약적 용도

(57) 요약

본 발명은 1000 nM 미만의 해리 상수로 인간 NogoA 폴리펩티드 또는 인간 NiG에 결합할 수 있는 결합 분자, 이같은 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터; 결합 분자를 생산할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 시스템; 상기 정의된 바와 같은 발현 시스템을 포함하는 단리된 숙주 세포; 이같은 결합 분자의 제약으로서의 용도, 특히 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료에서의 용도; 상기 결합 분자를 포함하는 제약 조성물; 및 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료 방법을 제공한다.

(72) 발명자

**미르, 아니스, 쿠르소**

프랑스 에프-68870 바르텐하임 뒤 데 보쥬 6

**슈밥, 마르틴, 이.**

스위스 체하-8057 취리히 배르니나스트라쎄 96

**비탈리티, 알레산드라**

스위스 체하-4104 오베르빌 브루테르홀츠스트라쎄  
90

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

인간 NogoA 폴리펩티드 (서열 2) 또는 인간 NiG (서열 3)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 항원 결합 부위는

- \* 순서대로, 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10); 및
- \* 순서대로, 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)을 포함하는 것인, 단리된 결합 분자.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

- \* (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 중쇄 또는 이의 단편; 및
  - \* (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 경쇄 또는 이의 단편
- 를 포함하는 결합 분자.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 해리 상수가 1000 nM 미만인 결합 분자.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편이  $\gamma 4$  유형이고, 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편이  $\kappa$  유형인 결합 분자.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 결합 분자가 인간 또는 키메라 또는 인간화된 모노클로날(monoclonal) 항체인 결합 분자.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 서열 4 (IgG1 중쇄), 서열 5 (IgG1 경쇄), 서열 24 (IgG4 중쇄) 및 서열 25 (IgG4 경쇄)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 포함하는 결합 분자.

**청구항 7**

제1항의 결합 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

- \* 서열 14, 서열 15 및 서열 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열; 또는
  - \* 서열 17, 서열 18 및 서열 19로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열
- 을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 9**

제7항 또는 제8항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

**청구항 10**

발현 시스템 또는 이의 일부가 상용성 숙주 세포 내에 존재하는 경우 제1항의 결합 분자를 생산할 수 있는, 제7항 또는 제8항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 발현 시스템.

**청구항 11**

제10항의 발현 시스템을 포함하는 단리된 숙주 세포.

**청구항 12**

제7항에 따른 폴리뉴클레오티드를, 제7항 또는 제8항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 내에서; 또는 발현 시스템 또는 이의 일부가 상용성 숙주 세포 내에 존재하는 경우 제1항의 결합 분자를 생산할 수 있는, 제7항 또는 제8항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 발현 시스템 내에서 재조합 DNA 기술 또는 화학적 합성에 의해 발현시키는 단계를 포함하는, 제1항의 결합 분자를 생산하는 방법.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 개선된 NogoA 결합 분자, 예를 들어, 모노클로날(monoclonal) 항체, 이의 유도체 또는 Fab 단편에 관

[0001]

한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 성인 중추 신경계 (CNS)에서의 손상 후의 뉴런 재생은 축삭을 감싸는 억제성 수초 환경의 존재 및 흥터 조직의 형성으로 인해 제한된다. 최근 수년 동안, CNS가 손상 후 자발적으로 자신을 복구할 수 없는 이유의 분자적 이해에 대한 중요한 식견들이 수득되었다. 수초 내의 억제성 분자가 축삭 재생, 특히 손상 직후의 재생에 대한 주요 장애물이다. 현재까지, NogoA, 수초-관련 당단백질 (MAG) 및 수초-회소돌기아교세포 당단백질 (OMgp)이 신경돌기 증식(outgrowth)의 강력한 억제제로서 특성화되었다. 더욱이, 수초는 또다른 억제 성분, 예컨대 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸을 또한 함유한다. Nogo-A는 레티쿨론(reticulon) 단백질 패밀리의 구성원이고, Amino-Nogo 및 Nogo-66으로 명명된, 2개 이상의 생물학적으로 활성이고 약리학적으로 별개인 도메인들이 있다. 전자에 대한 수용체 부위는 현재까지 공지되어 있지 않지만, Nogo-66은 뉴런 수용체 NgR을 통해 시험관 내에서 및 생체 내에서 뉴런 성장을 억제한다. Nogo-66에 더하여, MAG 및 OMgp 또한 높은 친화력으로 NgR에 결합하고, 신경돌기 증식을 억제한다.

[0003] 신경 복구의 강화를 위해 현재 추구되는 새로운 연구 접근법은 콘드로이티네이스 ABC 효소를 사용한 흥터 조직의 소화, 후각 초성 세포(Olfactory ensheathing cell) 및 줄기 세포를 사용하는 연결(bridging) 기술, 및 뉴런 성장을 증진시키기 위한 단백질 성장 인자를 포함한다. 신경돌기 증식 억제제의 차단 작용은 세포내 신호전달 매개물, 예컨대 축삭 성장의 억제에서 중요한 연결물인 것으로 보이는 Rho (막-결합형 구아노신 트리포스파테이스 (GTPase))의 조절에 의해 달성될 수 있다. 고리형 아데노신 모노포스페이트 (cAMP)는 시험관 내에서 수초 관련 억제를 극복할 수 있고, 생체 내에서 재생을 유도할 수 있다. NgR 수용체의 펩티드 억제제 (NEP 1-40)가 척추 손상 후 래트에서 뉴런 재생장 및 기능 회복을 유도하도록 사용될 수 있다.

[0004] 상기 기술된 접근법의 사용에 더하여, 중추 및 말초 신경계의 신경돌기 성장 억제성 분자를 중화하기 위해, 특히 NogoA의 신경돌기 성장 억제 활성을 중화하기 위해 특정 모노클로날 항체를 사용하는 것에 또한 더 많은 관심이 집중되었다. 따라서, 모노클로날 항체 IN-1 또는 이의 IN-1 Fab 단편이 시험관 내에서 신경돌기 증식을 유도하고, 생체 내에서 발아(sprouting) 및 재생을 강화하는 것으로 나타났다 ([Schwab ME et al. (1996) Physiol. Rev. 76, 319-370]). IN-1에 대한 별법적인 항체들이 W02004/052932 (11C7-Ab) 및 W02005/028508 (3A6-Ab)에 또한 기술되었다. 신경돌기 성장 억제 활성에 대한 NogoA의 상이한 도메인들의 테스트에서 분자 내의 여러 억제성 도메인들이 묘사되었다 ([Chen et al. (2000) Nature 403, 434-439]; [GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444]; [Prinjha et al. (2000) Nature 403, 383-384]).

[0005] 일반적으로 천연 이뮤노글로불린 또는 항체는 각각의 위쪽 팔 끝에 항원-결합 부위가 있는 Y-형상의 다량체성 분자를 포함한다. 구조물의 나머지, 특히 Y의 대는 이뮤노글로불린과 관련된 이펙터 기능을 매개한다. 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성된다. 중쇄 및 경쇄 양쪽 모두 가변 도메인 및 불변부를 포함한다. 항원 결합 부위는 경쇄의 가변 도메인과 회합된 중쇄의 가변 도메인으로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 일반적인 구조가 동일하다. 더욱 특히, 항체의 항원 결합 특성은 초가변 영역 또는 상보성 결정 영역 (CDR)으로 칭해지는, 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 내의 3개의 특이적 영역에 의해 본질적으로 결정된다. 이러한 3개의 초가변 영역은 서열이 비교적 보존되고 결합에 직접적으로 수반되지 않는 4개의 프레임워크 영역 (FR)과 교대된다. CDR들은 루프(loop)를 형성하고, β-시트 입체형상을 주로 채택하는 프레임워크 영역에 의해 근접하게 유지된다. 회합된 경쇄의 CDR들과 함께 중쇄의 CDR들이 항체 분자의 항원 결합 부위를 본질적으로 구성한다. 무엇이 FR 또는 CDR 영역을 구성하는지에 관한 결정은 동일한 종에서 생성된 다수의 항체의 아미노산 서열을 비교함으로써 일반적으로 이루어진다. CDR 및 FR 영역을 확인하기 위한 일반적인 규칙은 당업자의 상식이고, 예를 들어, 웹사이트 ([www.bioinf.org.uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs/))에서 확인할 수 있다.

[0006] 일반적으로, 성인 중추 신경계 (CNS)에서의 손상 후 신경 조직의 재생을 유도하는 새롭고 개선된 방식이 여전히 명백하게 요구된다.

**발명의 내용**

[0007] 본 발명은 시험관내 및 생체내 실험에서 NogoA 활성을 조정하는 것에서의 성질이 우수하고, 성인 중추 신경계 (CNS)에서의 손상 후 뉴런 재생에 대한 양성 영향이 있는 새로운 모노클로날 인간 항체에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 NogoA 단백질 또는 이의 단편에 대한 새로운 결합 분자를 제공한다.

[0008] 한 실시양태에서, 따라서 본 발명은 인간 NogoA 폴리펩티드 (서열 2) 또는 인간 NiG (서열 3)에 특이적으로 결

합하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 항원 결합 부위는

- [0009] \* 순서대로, 각각이 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)과 각각 적어도 90% 동일한 초가변 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및
- [0010] \* 순서대로, 각각이 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)과 각각 적어도 90% 동일한 초가변 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3
- [0011] 을 포함하는 것인, 단리된 분자를 제공한다.
- [0012] 추가적인 실시양태에서, 본 발명의 상기 단리된 분자의 항원 결합 부위는
- [0013] \* 순서대로, 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10); 및
- [0014] \* 순서대로, 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)
- [0015] 을 포함한다.
- [0016] 또다른 실시양태에서, 본 발명은
- [0017] \* (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 중쇄 또는 이의 단편; 및
- [0018] \* (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 경쇄 또는 이의 단편
- [0019] 을 포함하는 결합 분자를 제공한다.
- [0020] 또다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 결합 분자는 해리 상수가 1000 nM 미만이다.
- [0021] 본 발명의 결합 분자의 별법적인 실시양태에서, 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편은  $\gamma 4$  유형이고, 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편은  $\kappa$  유형이다.
- [0022] 추가적인 실시양태에서, 본 발명에 따른 결합 분자는 인간 또는 키메라 또는 인간화된 모노클로날 항체이다.
- [0023] 또다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 결합 분자는 서열 4 (IgG1 중쇄), 서열 5 (IgG1 경쇄), 서열 24 (IgG4 중쇄) 및 서열 25 (IgG4 경쇄)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0024] 더욱이, 본 발명은 본 발명에 다른 결합 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 또한 제공한다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 본 발명의 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는
- [0026] \* 서열 14, 서열 15 및 서열 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열; 또는
- [0027] \* 서열 17, 서열 18 및 서열 19로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열
- [0028] 을 포함한다.
- [0029] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는
- [0030] \* 순서대로 서열 14, 서열 15 및 서열 16을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및
- [0031] \* 순서대로 서열 17, 서열 18 및 서열 19를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [0032] 을 포함한다.
- [0033] 또다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는
- [0034] \* 서열 6의 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 서열 7의 폴리뉴클레오티드 서열, 또는
- [0035] \* 서열 26의 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 서열 28의 폴리뉴클레오티드 서열
- [0036] 을 포함한다.
- [0037] 추가적으로, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 또한

제공한다.

- [0038] 또한, 본 발명은 발현 시스템 또는 이의 일부가 상용성 숙주 세포 내에 존재하는 경우 발현 시스템 또는 이의 일부가 상기 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리펩티드를 생산할 수 있는, 상기 정의된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 발현 시스템을 제공한다.
- [0039] 더욱이, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포를 또한 제공한다.
- [0040] 더욱이, 본 발명은 본 발명에 따른 결합 분자 및 담체를 포함하는 단리된 조성물을 또한 제공한다.
- [0041] 더욱이, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 및 담체를 포함하는 단리된 조성물을 또한 제공한다.
- [0042] 더욱이, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 본 발명에 따른 숙주 세포를 포함하는 단리된 조성물을 또한 제공한다.
- [0043] 본 발명은 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료를 필요로 하는 사람에게 본 발명에 따른 결합 분자를 투여하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0044] 본 발명은 본 발명에 따른 결합 분자, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 발현 시스템 각각, 또는 본 발명에 따른 숙주 세포를 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 제약 조성물을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 서방형 조성물이다.
- [0045] 본 발명은 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료를 필요로 하는 대상에게 본 발명에 따른 결합 분자, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 시스템 각각, 또는 본 발명에 따른 숙주 세포를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료 방법을 추가로 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 루이체(Lewy)-유사 병증 또는 기타 일반적인 치매, 두개, 대뇌 또는 척수 외상 후의 질환, 뇌졸중 및 탈수초 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 신경변성 질환이다. 추가적인 바람직한 실시양태에서, 탈수초 질환은 다발 경화증, 단상성 탈수초, 뇌척수염, 다초점성 백색질뇌증, 범뇌염, 마키아파바-비그나미 (Marchiafava-Bignami) 질환, 뇌교 수초용해증, 부신백색질형성장애, 펠리제우스-메르츠바하(Pelizaeus-Merzbacher) 질환, 해면 변성증, 알렉산더(Alexander) 질환, 카나반(Canavan) 질환, 이염성 백색질형성장애 및 크라베(Krabbe) 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0046] 별법적으로, 질환은 망막 또는 각막 세포의 변성을 직접적으로 또는 간접적으로 수반할 수 있는 퇴행성 안 장애이다. 바람직한 실시양태에서, 퇴행성 안 장애는 허혈성 망막병증, 전방 허혈성 시각 신경병증, 시각 신경염, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병 망막병증, 낭포성 황반 부종 (CME), 색소성 망막염, 스타가르트(Stargardt) 질환, 베스트(Best) 난황상 망막 변성, 레베르(Leber) 선천성 흑암시 및 기타 유전성 망막 변성, 병적 근시, 미숙아 망막병증 및 레베르 유전성 시각 신경병증, 각막 이식 또는 굴절교정 각막 수술의 후유증, 및 헤르페스 각막염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0047] 별법적으로, 질환은 정신과 용태이다. 바람직하게는, 상기 정신과 용태는 정신분열증 및 우울증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0048] 상기 지시된 치료 방법들에서, 투여는 바람직하게는 두개 내로 또는 수막강 내로 수행된다.
- [0049] 더욱이, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 시스템 내에서 재조합 DNA 기술에 의해 또는 화학적 합성에 의해 발현시키는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 결합 분자를 생산하는 방법을 또한 제공한다.
- [0050] 추가로, 본 발명은 본 발명에 따른 제약 조성물을 손상 부위에 국소적으로 투여하는 방법을 제공한다.
- [0051] 마지막으로, 본 발명은 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료에서 동시에, 별도로 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합 제제로서, 본 발명에 따른 결합 분자, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 시스템, 본 발명에 따른 숙주 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 제품들 중 하나 이상을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 또한 제공한다.
- [0052] 본 발명은 재조합 DNA 기술에 의해 또는 화학적 합성에 의해 본 발명의 결합 분자 및 이같은 결합 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터를 생산하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0053] 본 발명은 본 발명에 따른 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템, 또는 숙주 세포를 하나 이상

의 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 제약 조성물을 또한 제공한다. 본 발명은 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료에서 동시에, 별도로 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합 제제로서, 상기 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템 또는 상기 숙주 세포, 또는 이들의 약리학적으로 허용되는 유도체를 함유하는 제품을 또한 제공한다.

[0054] 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료를 필요로 하는 대상에게 본 발명의 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템, 또는 숙주 세포를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료 방법이 또한 구현된다.

[0055] 본 발명은 이러한 약리학적으로 조성물 및 제품이 결합 분자의 서방출을 위해 및/또는 손상 부위에서의 결합 분자의 국소적인 침착을 위해 사용될 수 있다는 것을 실시예에서 추가로 가리킨다.

**도면의 간단한 설명**

[0056] 도 1

6A3-IgG1 항체의 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 (서열 7) 및 아미노산 (서열 5). 밑줄이 그어진 구역은 리더(leader) 펩티드 (서열 22) 및 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 23)을 가리킨다.

도 2

6A3-IgG1 항체의 중쇄의 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 (서열 6) 및 아미노산 (서열 4) 서열. 밑줄이 그어진 구역은 펩티드 (서열 20) 및 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (서열 21)을 가리킨다.

도 3

6A3-Ig4의 경쇄 (서열 28; 상부) 및 중쇄 (서열 26; 하부) 가변부의 코딩 영역.

도 4

6A3-Ig4 가변부 및 불변부의 중쇄 (서열 24; 하부) 및 경쇄 (서열 25, 상부)의 아미노산 서열. 경쇄 (서열 31) 및 중쇄 (서열 30)의 리더 펩티드가 이탤릭체로 지시된다.

도 5

상부: 리더 (서열 22) 및 CDR-L1 (서열 11), CDR-L2 (서열 12) 및 CDR-L3 (서열 13) 서열이 있는 6A3-IgG1 항체 경쇄 아미노산 (서열 5).

하부: 리더 (서열 20) 및 CDR-H1 (서열 8), CDR-H2 (서열 9) 및 CDR-H2 (서열 10) 서열이 있는 6A3-IgG1 항체 중쇄 아미노산 (서열 4).

도 6

주형으로서의 M03.13 RNA 및 Nogo-A 특이적 프라이머를 사용하는 RT-PCR에서 약 200 bp의 독특한 DNA 단편이 초래되었다.

도 7

6A3 항체를 사용한 M03:13-세포 지질로부터의 면역침전된 Nogo-A의 이뮤노블롯(immunoblot) 검출.

M03.13 세포-용해물의 면역침전 (IP) 및 6A3 항 Nogo-A 항체로의 면역검출 후, 예상 크기 (190 kDa)의 1개의 강한 밴드가 6A3-IgG4 (레인 4) 및 11C7-IgG1 (레인 6) 항체 양쪽 모두에 대해 검출되었다.

도 8

도 8a: M03.13 세포의 면역형광 염색.

도 8b: HOG-세포의 면역형광 염색.

투과된(permeabilized) M03.13 세포 및 HOG 세포의 6A3-IgG4 및 알렉사-플루오르(Alexa-Fluor) 488-표지 항 인 간 2차 항체로의 면역형광 염색에서 세포의 매우 밝은 염색이 초래된 반면 (도 8a 및 8b, 왼쪽 부분), 2차 항체 만으로는 신호가 사실상 검출되지 않았다 (오른쪽 부분).

도 9

2개월까지 6명의 대상에서 측정된 6A3 항체의 혈청 농도.

도 10

2개월까지 6명의 대상에서 측정된 6A3 항체의 CSF 농도

도 11

원숭이 SCI 모델에서의 6A3 항체 치료가 병변 크기와 관계 없이 기능 회복의 속도 및 정도를 개선시킨다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0057]

성인 중추 신경계 (CNS)에서의 손상 후 뉴런 재생을 제공하기 위한 새롭고 개선된 방식에 대한 조사에서, 인간 이뮤노글로블린 유전자로 뮤린(murine) 대응부가 교체되어 있는 유전자 재구성 마우스인 HuMab-마우스™ (Medarex Inc)에서 생성된 신규 모노클로날 인간 항체 6A3가 시험관내 및 생체내 실험에서 NogoA 활성의 조정하는 것에서의 성질이 우수하다는 것이 뜻밖에 발견되었다. 6A3은 인간 NiG에 대해 생성되었고, IgG 이소타입이며, 종래 기술에 기술된 NogoA 항체들보다 성질이 우수하였다. 6A3 항체와 동일한 추가변 영역이 있는 또다른 NogoA 결합 분자를 구축하여, 6A3의 유리한 성질을 지니는 새로운 항체를 생성시키는 것이 현재 가능하다. 6A3-Ab의 유도체인, 6A3-IgG4 및 6A3-Fab는 각각 0.14 nM 및 1.1 nM의 높은 친화력으로 인간 NiG를 인식한다. 또한, 본 발명의 항체는 높은 안정성, 및 연장된 시험관 내 및 생체 내에서의 높은 반감기 및 유지를 나타낸다. 마지막으로, 본 발명의 결합 분자 및 항체는 도입 부위로부터의 서방출을 나타내어, 결합 분자가 손상 부위에 국소적으로 침착되는 것을 가능하게 한다. 연속 주입에 의한 척수 손상 동물 및 환자에서의 6A3 항체의 높은 뇌척수액 (CSF) 농도가 검출되었다. 예를 들어, 뇌척수액에서의 이러한 뜻밖에 높은 6A3-Ab 유지 및 거주는 항체를 뇌척수액 내로 지속적으로 주입하는 대신 볼루스(bolus) 주사 (예를 들어, 주 당 1-3회이지만, 2주, 3주 또는 4주 마다 1회의 더 긴 간격이 실행될 수 있음)를 사용하는 것을 가능하게 한다. 반복된 수막강내 볼루스 주사가 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 수막강내 투여를 통해, 예를 들어, 이동식 펌프에 연결된 외부(externalized) 카테터를 사용하여, 투여가 수행될 수 있다. 추가적인 바람직한 실시양태에서, 수막강내 볼루스 주사가 사용된다. 실험 섹션에서 본 발명의 결합 분자의 유리한 성질들이 추가로 설명된다.

[0058]

따라서, 본 발명은 NogoA 또는 NiG에 대한 결합 분자 (이하, "본 발명의 결합 분자" 또는 간단히 "결합 분자"로 지칭됨)를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 분자는 인간 NogoA 단백질 (서열 1에 의해 코딩되는 서열 2) 또는 인간 NiG 단백질 (NogoA의 가장 강력한 신경돌기 증식 억제성 단편이고, 인간 NogoA의 아미노산 번호 186에 시작하여 아미노산 번호 1004에서 끝남 = 서열 3)에 바람직하게는 1000 nM 미만의 해리 상수 (Kd), 또는 100 nM 이하의 Kd, 더욱 바람직하게는 100 nM 미만의 Kd, 또는 100 nM 이하의 Kd, 가장 바람직하게는 10 nM 미만의 Kd, 또는 10 nM 이하의 Kd로 결합한다. 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 면역침전 및 바이오센서 (biosensor) 친화력 방법 (실시예 4 참조)이 예를 들어 포함되는 표준 방법 (정성적 및 정량적 분석법 양쪽 모두 포함)에 의해 결합 반응이 표시될 수 있다. 더욱이, 인간 NogoA 및 인간 NiG에 대한 본 발명의 결합 분자의 결합, 및 기능 분석법에서의 이러한 결합 분자들의 효능이, 예를 들어 하기 기술되는 바와 같이, 신경돌기 증식 분석법에서 나타날 수 있다.

[0059]

따라서, 추가적인 실시양태에서, 본 발명의 결합 분자 (100 µg/ml, 바람직하게는 10 µg/ml, 더욱 바람직하게는 1.0 µg/ml, 더욱 더 바람직하게는 0.1 µg/ml의 농도)는 원숭이 뇌 단백질 추출물의 기관 상의 래트 소뇌 과립 세포의 신경돌기의 개수를, 인간 NogoA 폴리펩티드 또는 인간 NiG 폴리펩티드에 결합하지 않는 대조군 항체 (즉, 해리 상수가 1000 nM을 초과하는 항체)로 처리된 래트 소뇌 과립 세포의 신경돌기의 개수와 비교했을 때, 적어도 20%, 바람직하게는 50%, 가장 바람직하게는 80%만큼 강화시킨다.

[0060]

또다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 NogoA 폴리펩티드 (서열 2) 또는 인간 NiG 폴리펩티드 (서열 3)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 항원 결합 부위는

[0061]

\* 각각이 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)의 추가변 영역과 각각 적어도 90% 동일한 추가변 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 하나 이상; 및

[0062]

\* 각각이 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)의 추가변 영역과 각각 적어도 90% 동일한 추가변 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 하나 이상

[0063]

을 포함하는, 단리된 분자에 관한 것이다.

[0064]

CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 또는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3이 본 발명의 결합 분자 내에 존재하는 경우 인간

NogA 또는 NiG의 특이적 인식이 보장된다. 그럼에도 불구하고, 결합 분자 내에 오직 1개의 CDR-도메인만 존재하는 것도 인지되는 분자에 대한 특이적 결합을 확실하게 하는데 충분할 수 있다는 것이 당업자에게 공지되어 있다. "초가변 영역들 중 하나 이상"이라는 구절은 1개, 또는 2개 또는 3개의 초가변 영역을 의미한다. "적어도 90%의 동일성"이라는 구절은 90%를 초과하는 동일성, 바람직하게는 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 초과하는 동일성을 의미한다. 2개 이상의 아미노산 서열 동일성의 상대적인 동일성을 분석하는 컴퓨터 알고리즘, 예를 들어, 미국 국립보건원(National Institutes of Health) 웹사이트, [Altschul et al. 1994, Nature Genetics, 6: 119-129], [Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol.215:403-410], [Altschul et al. 1997, Nucleic Acids Research, 25:1389-1402], [Karlín and Altschul, 1990 PNAS, 87:2264-68], [Karlín and Altschul, 1993 PNAS, 90:5873-68]의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 사용하여, 2개의 아미노산 서열 간의 동일성 백분율을 결정할 수 있다.

- [0065] 본 발명은 인간 NogoA 폴리펩티드 (서열 2) 또는 인간 NiG (서열 3)에 1000 nM 미만의 해리 상수로 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 항원 결합 부위는
- [0066] \* 적어도 각각이 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)과 각각 적어도 90% 동일한 초가변 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및
- [0067] \* 적어도 각각이 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)과 각각 적어도 90% 동일한 초가변 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3
- [0068] 을 포함하는 것인, 단리된 분자에 관한 것이다.
- [0069] "순서대로 초가변 영역들을 포함하는 항원 결합 부위"라는 구절은 초가변 영역들이 서로 연속적이지 않은 항원 결합 부위를 포함한다; 바람직하게는, 상기 항체 영역에 항체 프레임워크 영역, 또는 비-항체 프레임워크 서열, 바람직하게는 인간 항체 프레임워크 영역이 산포된다.
- [0070] 본 발명에 따르면, 결합 분자는 하기 중 하나를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 또한 포함할 수 있다:
- [0071] \* 순서대로, 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10); 또는
- [0072] \* 순서대로, 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13); 또는
- [0073] \* 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물. "적어도 90%의 동일성"이라는 구절은 90%를 초과하는 동일성, 바람직하게는 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 초과하는 동일성을 의미한다.
- [0074] 본 발명에 따르면, 결합 분자는 하기를 또한 포함할 수 있다:
- [0075] \* 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)을 포함하는 제1 항원 결합 부위; 및
- [0076] \* 순서대로 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)을 포함하는 제2 항원 결합 부위; 또는
- [0077] \* 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물. 적어도 90%의 동일성은 90%를 초과하는 동일성, 바람직하게는 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과를 의미한다.
- [0078] 본 발명에 따르면, 결합 분자는 하기를 또한 포함할 수 있다:
- [0079] \* (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 중쇄 또는 이의 단편; 및
- [0080] \* (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 경쇄 또는 이의 단편; 또는
- [0081] \* 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물. 적어도 90%의 동일성은 90%를 초과하는 동일성, 바람직하게는 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 초과하는 동일성을 의미한다.

- [0082] 본 발명의 결합 분자에서, 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편은 감마 ( $\gamma$ ) 유형, 바람직하게는 감마 4 ( $\gamma 4$ ) 유형일 수 있고, 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편은 람다 ( $\lambda$ ) 또는 바람직하게는 카파 ( $\kappa$ ) 유형일 수 있다. 더욱이, 본 발명의 결합 분자는 인간 모노클로날 항체, 부분적으로 인간형인 모노클로날 항체 또는 키메라 모노클로날 항체, 또는 인간화된 모노클로날 항체일 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따르면, 결합 분자는 서열 4 (IgG1 중쇄), 서열 5 (IgG1 경쇄), 서열 24 (IgG4 중쇄) 및 서열 25 (IgG4 경쇄) 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0084] 추가적인 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 결합 분자는 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 및 CDR-H3-6A3 (상기 CDR-H1-6A3의 아미노산 서열은 서열 8이고, 상기 CDR-H2-6A3의 아미노산 서열은 서열 9이며, 상기 CDR-H3-6A3의 아미노산 서열은 서열 10임); 및 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함한다. 적어도 90%의 동일성은 90%를 초과하는 동일성, 바람직하게는 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 초과하는 동일성을 의미한다.
- [0085] 본 발명의 추가적인 양상에서, 본 발명의 결합 분자는 적어도 하기의 것들을 포함한다:
- [0086] a) 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 및 CDR-H3-6A3을 포함하고, 이때 상기 CDR-H1-6A3의 아미노산 서열은 서열 8이고, 상기 CDR-H2-6A3의 아미노산 서열은 서열 9이며, 상기 CDR-H3-6A3의 아미노산 서열은 서열 10인 제1 도메인; 및
- [0087] b) 순서대로 초가변 영역 CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 및 CDR-L3-6A3을 포함하고, 이때 상기 CDR-L1-6A3의 아미노산 서열은 서열 11이고, 상기 CDR-L2-6A3의 아미노산 서열은 서열 12이며, 상기 CDR-L3-6A3의 아미노산 서열은 서열 13인 제2 도메인; 또는
- [0088] c) 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물. 적어도 90%의 동일성은 90%를 초과하는 동일성, 바람직하게는 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 초과하는 동일성을 의미한다.
- [0089] 또한, 본 발명은
- [0090] a) 6A3의 중쇄 (서열 4)의 가변 영역; 또는
- [0091] b) 6A3의 경쇄 (서열 5)의 가변 영역, 또는 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물
- [0092] 중 하나를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 본 발명의 결합 분자를 또한 제공한다.
- [0093] 항원 결합 부위가 제1 및 제2 도메인을 포함하는 경우, 이들은 동일한 폴리펩티드 분자 상에 위치할 수 있거나, 또는, 바람직하게는, 각각의 도메인이 상이한 사슬 상에 위치할 수 있어, 제1 도메인은 이뮤노글로불린 중쇄 또는 이의 단편의 일부분이고, 제2 도메인은 이뮤노글로불린 경쇄 또는 이의 단편의 일부분이다.
- [0094] 본 발명의 결합 분자의 예로는 B-세포 또는 하이브리도마에 의해 생산된 항체 및 인간 또는 키메라 또는 인간화된 항체 또는 이들의 임의의 단편, 예를 들어 F(ab')<sub>2</sub>; 및 Fab 단편, 뿐만 아니라 단일쇄 또는 단일 도메인 항체 (미국 특허 공보 US20070065440A1에 기술됨)가 포함된다.
- [0095] 본원에서 사용된 "단일 도메인 항체"는 에피토프 또는 항원 또는 리간드에, 이러한 에피토프, 항원 또는 리간드에 결합하는 또다른 가변성 결합 도메인과 독립적으로, 특이적으로 결합할 수 있는 가변 도메인이다. 단일 도메인 항체는 동종다량체 또는 또다른 VH 또는 VL 도메인과의 이종다량체 내에 존재하고, 이때 또다른 도메인은 이러한 단일 도메인 항체에 의한 항원 결합에 필요하지 않고, 즉 단일 도메인 항체는 추가적인 VH 또는 VL 도메인과 독립적으로 항원에 결합한다. 바람직한 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 단리된 VH 단일 도메인 또는 단리된 VL 단일 도메인을 포함한다. 단일 도메인 항체가 유래되는 무손상 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 지니는 단일 도메인 항체를 수득하기 위한 기술이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, [Ward, et al., "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia coli", Nature 341:644-646]에 결합할 자신의 표적 에피토프에 대한 충분한 친화력이 있는 항체 중쇄 가변 영역 (VH 단일 도메인 항체)을 단리할 형태로 수득하기 위한 스크리닝 방법이 개시되어 있다.
- [0096] 단일쇄 항체는 일반적으로 아미노산 10개 내지 30개, 바람직하게는 아미노산 15개 내지 25개로 구성되는 펩티드 링커에 의해 공유 결합된 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인/영역으로 구성된다. 바람직한 방법은, 예를 들어,

scFv 분자와 함께 기술된 폴리펩티드 링커의 사용을 포함한다 ([Bird et al., (1988) Science 242:423-426]). 따라서, 이같은 구조물은 중쇄 및 경쇄의 불변부를 포함하지 않고, 소형 펩티드 스페이서는 전체 불변부보다 덜 항원성이어야 하는 것으로 여겨진다. "키메라 항체"는 항체 중쇄 또는 경쇄 사슬 또는 양쪽 모두의 불변 영역이 제1 종에서 유래된 한편, 중쇄 및 경쇄 양쪽 모두의 가변 영역은 제2 종으로부터 유래된 항체를 의미한다. 바람직하게는, "키메라 항체"는 중쇄 또는 경쇄 또는 양쪽 모두의 불변 영역은 인간에서 유래되는 한편, 중쇄 및 경쇄 양쪽 모두의 가변 도메인은 비-인간 (예를 들어, 뮤린, 원숭이, 래트, 돼지, 마우스, 닭, 조류)에서 유래되는 항체이다. "인간화된 항체"는 초가변 영역 (CDR)은 비-인간 (예를 들어, 뮤린)에서 유래되는 한편, 이뮤노글로불린의 모든 또는 실질적으로 모든 나머지 부분, 예를 들어 불변 영역 및 가변 도메인의 고도로 보존되는 부분, 즉 프레임워크 영역은 인간에서 유래되는 항체를 의미한다. 그러나, 인간화된 항체는 초가변 영역에 인접한 프레임워크 영역의 일부분 내에 뮤린 서열의 아미노산 몇개를 보유할 수 있다.

[0097] 초가변 영역은 임의의 종류의 프레임워크 영역, 바람직하게는 뮤린 또는 인간 기원의 프레임워크 영역과 회합될 수 있다. 적절한 프레임워크 영역이 ["Sequences of proteins of immunological interest", Kabat E. A. et al, US department of health and human services, Public health service, National Institute of Health]에 기술되어 있다. 바람직하게는, 결합 분자의 인간 중쇄의 불변부는 IgG 유형, 더욱 바람직하게는 IgG4 유형 (야 유형 포함)일 수 있고, 바람직하게는, 인간 경쇄의 불변부는 람다 ( $\lambda$ ) 또는 카파 ( $\kappa$ ) 유형, 더욱 바람직하게는 카파 ( $\kappa$ ) 유형일 수 있다.

[0098] 모든 인간에서 천연적으로 발견되는 단백질에 대해 생성된 모노클로날 항체가 비-인간 시스템, 예를 들어, 마우스에서 발달될 수 있다. 이의 직접적인 결과로서, 하이브리도마에 의해 생산된 이종(xenogenic) 항체는 인간에게 투여되는 경우 원치 않는 면역 응답을 유발하고, 이는 이종 이뮤노글로불린의 불변부에 의해 주로 매개된다. 항체가 장기간에 걸쳐 투여될 수 없기 때문에, 이는 이같은 항체의 용도를 명백하게 한정한다. 따라서, 인간에게 투여되는 경우 실질적인 동종(allogenic) 응답을 유발할 것 같지 않은 단일쇄, 단일 도메인, 키메라 또는 인간화된 항체를 사용하는 것이 특히 바람직하다.

[0099] 상기의 관점에서, 본 발명의 결합 분자는 하기의 것들을 적어도 포함하는 키메라 항체로부터 또한 선택될 수 있다:

[0100] a) (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 및 CDR-H3-6A3을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 중쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하고, 이때 상기 CDR-H1-6A3의 아미노산 서열은 서열 8이고, 상기 CDR-H2-6A3의 아미노산 서열은 서열 9이며, 상기 CDR-H3-6A3의 아미노산 서열은 서열 10인 하나의 이뮤노글로불린 중쇄 또는 이의 단편, 및

[0101] b) (i) 순서대로 초가변 영역 CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 및 CDR-L3-6A3을 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 경쇄의 불변부 또는 이의 단편을 포함하고, 이때 상기 CDR-L1-6A3의 아미노산 서열은 서열 11이고, 상기 CDR-L2-6A3의 아미노산 서열은 서열 12이며, 상기 CDR-L3-6A3의 아미노산 서열은 서열 13인 하나의 이뮤노글로불린 경쇄 또는 이의 단편; 또는

[0102] 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한 영역들을 포함하는, 이들의 직접적인 등가물.

[0103] 별법적으로, 본 발명의 결합 분자는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함하는 단일쇄 결합 분자로부터 선택될 수 있다:

[0104] a) 순서대로 초가변 영역 CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 및 CDR-H3-6A3을 포함하고, 이때 상기 CDR-H1-6A3의 아미노산 서열은 서열 8이고, 상기 CDR-H2-6A3의 아미노산 서열은 서열 9이며, 상기 CDR-H3-6A3의 아미노산 서열은 서열 10인 제1 도메인; 및

[0105] b) 순서대로 초가변 CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 및 CDR-L3-6A3을 포함하고, 이때 상기 CDR-L1-6A3의 아미노산 서열은 서열 11이고, 상기 CDR-L2-6A3의 아미노산 서열은 서열 12이며, 상기 CDR-L3-6A3의 아미노산 서열은 서열 13인 제2 도메인; 및

[0106] c) 제1 도메인의 N-말단 끝부분 및 제2 도메인의 C-말단 끝부분, 또는 제1 도메인의 C-말단 끝부분 및 제2 도메인의 N-말단 끝부분 중 하나에 결합된 펩티드 링커;

[0107] 또는 상기 초가변 영역들의 서열과 적어도 90% 동일한, 이들의 직접적인 등가물.

[0108] 주지된 바와 같이, 아미노산 1개 또는 여러개의 결실, 부가 또는 치환과 같은 아미노산 서열에서의 미량의 변화가 원래의 단백질의 대립유전자 변이체에 이를 수 있고, 이는 실질적으로 동일한 성질을 지닌다. 따라서, 용어

"이들의 직접적인 증가물"은

- [0109] (i) 결합 분자의 추가변 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 각각이 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)의 증가의 추가변 영역들에 대해 적어도 90% 동일하고, 더욱 바람직하게는 적어도 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 동일한 한편, CDR-H1은 CDR-H1-6A3에 대해 증가이고, CDR-H2는 CDR-H2-6A3에 대해 증가이며, CDR-H3은 CDR-H3-6A3에 대해 증가이고;
- [0110] (ii) 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 바람직하게는 1000 nM 미만의 해리 상수 (Kd), 더욱 바람직하게는 100 nM 미만의 Kd, 가장 바람직하게는 10 nM 미만의 Kd로 결합할 수 있는
- [0111] 임의의 본 발명의 추가변 영역, 임의의 본 발명의 항원 결합 부위, 임의의 본 발명의 항체 사슬 또는 이의 단편, 또는 임의의 본 발명의 단일 도메인 결합 분자 (분자 6A3), 또는
- [0112] (iii) 추가변 영역 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 각각이 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9), CDR-H3-6A3 (서열 10), CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12), 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)의 증가의 추가변 영역들에 대해 적어도 90% 동일하고, 더욱 바람직하게는 적어도 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 동일한 한편, CDR-H1은 CDR-H1-6A3에 대해 증가이고, CDR-H2는 CDR-H2-6A3에 대해 증가이고, CDR-H3은 CDR-H3-6A3에 대해 증가이고, CDR-L1은 CDR-L1-6A3에 대해 증가이고, CDR-L2는 CDR-L2-6A3에 대해 증가이고, CDR-L3은 CDR-L3-6A3에 대해 증가이고;
- [0113] (iv) 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 바람직하게는 1000 nM 미만의 해리 상수 (Kd), 더욱 바람직하게는 100 nM 미만의 Kd, 가장 바람직하게는 10 nM 미만의 Kd로 결합할 수 있는,
- [0114] 결합 부위 당 적어도 1개, 바람직하게는 2개의 도메인이 있는 임의의 본 발명의 결합 분자 (분자 6A3)을 의미한다.
- [0115] 따라서, 본 발명의 추가적인 실시양태는, 예를 들어, 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 1000 nM 미만의 해리 상수로 결합할 수 있고, 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 항원 결합 부위가
- [0116] \* 순서대로, 각각이 추가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)에 대해 각각 적어도 90%, 바람직하게는 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 동일한 추가변 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및/또는
- [0117] \* 순서대로, 각각이 추가변 영역 CDR-L1-6A3(서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)에 대해 각각 적어도 90%, 바람직하게는 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 동일한 추가변 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3
- [0118] 을 포함하는 결합 분자이다.
- [0119] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 결합 분자는 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 1000 nM 미만의 해리 상수로 결합할 수 있고,
- [0120] \* 순서대로, 각각이 추가변 영역 CDR-H1-6A3 (서열 8), CDR-H2-6A3 (서열 9) 및 CDR-H3-6A3 (서열 10)에 대해 각각 적어도 90%, 바람직하게는 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 동일한 추가변 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 제1 항원 결합 부위; 및
- [0121] \* 순서대로, 각각이 추가변 영역 CDR-L1-6A3 (서열 11), CDR-L2-6A3 (서열 12) 및 CDR-L3-6A3 (서열 13)에 대해 각각 적어도 90%, 바람직하게는 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 동일한 추가변 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 제2 항원 결합 부위
- [0122] 를 포함한다.
- [0123] 바이오센서 친화력 방법 (BIAcore)이 예를 들어 포함되는 다양한 분석법에서 이러한 해리 상수를 편리하게 테스트할 수 있다 (상기 참조). 또한, 결합 분자의 결합 및 기능적인 영향이, 예를 들어, 하기에 기술된 바와 같이, 바이오어세이에서 나타날 수 있다.
- [0124] 인간 중쇄의 불변부는  $\gamma 1$ ;  $\gamma 2$ ;  $\gamma 3$ ;  $\gamma 4$ ;  $\alpha 1$ ;  $\alpha 2$ ;  $\delta$  또는  $\epsilon$  유형, 바람직하게는  $\gamma$  유형, 더욱 바람직하게는  $\gamma 4$  유형일 수 있는 한편, 인간 경쇄의 불변부는  $\lambda$  또는  $\kappa$  유형 ( $\lambda 1$ ;  $\lambda 2$ ;  $\lambda 3$ ; 및  $\lambda 4$  아유형 포함)일 수 있지만, 바람직하게는  $\kappa$  유형이다. 이러한 불변부 모두의 아미노산 서열이 [Kabat et al., 상기 문헌]에서 제공된다.

- [0125] 본 발명의 결합 분자의 접합체, 예를 들어, 효소 또는 독소 또는 방사성동위원소 접합체가 본 발명의 범주 내에 또한 포함된다. 또다른 양상에서, NogoA 또는 NiG 결합 분자를 함유하는 조성물이 시험관내 또는 생체내 프로세스에서 수득될 수 있는, (비-폴리펩티드) 중합체성 안정화 모이어티(moiety)와의 결합 또는 회합, 예컨대 글리코실화에 의해 생체 내에서 안정화된다. 이러한 유형의 안정화의 예가, 예를 들어, W099/64460 (Chapman 등) 및 EP1,160,255 (King 등)에 기술되어 있고, 이들 각각은 거명에 의해 본원에 포함된다. 구체적으로, 이러한 참고문헌들에는 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 생체내 반감기를 증가시키기 위한 합성 또는 천연-발생 중합체 분자, 예컨대 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌, 폴리옥시알킬렌 또는 다당류의 용도가 기술되어 있다. 안정화 모이어티의 전형적인 예는 폴리알킬렌인 폴리에틸렌 글리콜 (또는 PEG)이다. PEG를 이뮤노글로불린 폴리펩티드에 연결시키는 프로세스가 이러한 참고문헌들에 기술되어 있고, 본원에서 "PEG화"로 지칭된다. 이에 기술된 바와 같이, 무작위로, 예컨대 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 표면 상의 라이신 또는 기타 아미노산에 PEG를 부착하는 것에 의해, 또는 부위-특이적으로, 예를 들어, 인공적으로 도입된 표면 시스템인 잔기에의 PEG 부착을 통해, NogoA 또는 NiG 결합 분자가 PEG화 될 수 있다. NogoA 또는 NiG 결합 분자에 따라, 무작위적이지만 중합체 부착 방법을 사용하는 것이 바람직할 수 있는데, 분자 상의 항원 결합 부위 또는 부위들 내 또는 이러한 부위 또는 부위들 주변에서의 부착에 의한 무작위 부착이 자신의 표적 항원에 대한 분자의 친화력 또는 특이성을 종종 변경시키기 때문이다.
- [0126] PEG 또는 또다른 중합체의 부가가 항체 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 항원-결합 친화력 또는 특이성을 방해하지 않는 것이 바람직하다. "항원-결합 친화력 또는 특이성을 방해하지 않는다"는 PEG가 연결된 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 IC50 또는 ND50이 동일한 항체 단일 가변 도메인이 있는, PEG가 연결되지 않은 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 IC50 또는 ND50 각각보다 10% 초과로 더 크지 않다는 것을 의미한다. 별법적으로, "항원-결합 친화력 또는 특이성을 방해하지 않는다"는 PEG가 연결된 형태의 NogoA 또는 NiG 결합 분자가 PEG화되지 않은 형태의 폴리펩티드의 항원 결합 활성의 적어도 90%를 유지한다는 것을 의미한다.
- [0127] 생체내 반감기를 증가시키는데 유용한 PEG 또는 기타 중합체는 일반적으로 크기가 약 5,000 내지 50,000 달톤, 예를 들어, 약 5,000 kD-10,000 kD, 5,000 kD-15,000 kD, 5,000 kD-20,000 kD, 5,000-25,000 kD, 5,000-30,000 kD, 5,000 kD-35,000 kD, 5,000 kD-40,000 kD, 또는 약 5,000 kD-45,000이다. 중합체 크기의 선택은 복합체의 의도되는 용도에 좌우된다. 예를 들어, 고히 조직, 예를 들어, 종양을 투과하기를 원하는 경우, 약 5,000 kD 정도로, 더 작은 중합체를 사용하는 것이 유리하다. 대신에, 복합체가 순환되면서 유지되는 것을 원하는 경우에는, 더 큰 중합체, 예를 들어, 25,000 kD 내지 40,000 kD 또는 그 이상이 사용될 수 있다.
- [0128] 본 발명의 제약 조성물은 "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"의 본 발명의 NogoA 또는 NiG 결합 분자를 포함한다. "치료적 유효량"은, 필요한 투여량 및 기간에서, 원하는 치료 결과를 달성하는데 효과적인 양을 지칭한다. 본 발명의 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 치료적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 응답을 유발하는 본 발명의 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 능력과 같은 인자들에 따라 변할 수 있다. 또한 치료적 유효량은 본 발명의 NogoA 또는 NiG 결합 분자의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료적으로 이로운 효과를 능가하는 양이다. "예방적 유효량"은, 필요한 투여량 및 기간에서, 원하는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 양을 지칭한다.
- [0129] 본원에서 사용된 "특이적으로 결합한다"라는 구절은 BIAcore® 표면 플라즈몬 공명 시스템 및 BIAcore® 키네틱 평가 소프트웨어를 예를 들어 사용하여 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정 시, 본 발명의 NogoA 또는 NiG 결합 분자가 1 μM 이하의 해리 상수 (Kd)로 항원에 결합하는 것을 지칭한다.
- [0130] "폴리펩티드"는, 본원에서 달리 특정되지 않는 한, N-말단 끝부분에서 시작하여 C-말단 끝부분에서 끝나는 아미노산 서열을 지니는, 서로 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산들을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 모노클로날 항체이고, 더욱 바람직하게는 키메라 (V-그래프트 (grafted)로 또한 칭해짐) 또는 인간화된 (CDR-그래프트로 또한 칭해짐) 모노클로날 항체이다. 인간화된 (CDR-그래프트) 모노클로날 항체는 어셉터(acceptor) 항체의 프레임워크 (FR) 서열 내로 도입된 추가적인 돌연변이를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0131] 본원에서 사용되는 폴리펩티드의 기능성 유도체는 본 발명의 폴리펩티드와 공통되는 정성적인 생물학적 활성이 있는, 즉 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 결합하는 능력이 있는 분자를 포함한다. 기능성 유도체는 본 발명에 따른 폴리펩티드의 단편 및 펩티드 유사체를 포함한다. 단편은 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드의 서열 내 영역을 포함한다. 용어 "유도체"는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체 및 공유결합 변형물을 규정하도록 사용된다. 본 발명에 따른 폴리펩티

드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드, 예를 들어 경쇄 및 중쇄의 초가변 영역의 기능성 유도체는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어, 특정 서열의 폴리펩티드의 아미노산 서열과의 전체적인 서열 동일성이 바람직하게는 적어도 약 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%이고, 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 결합하는 능력을 실질적으로 유지한다.

[0132]

본원에서 사용된 "가변 도메인"이라는 구절은 포유류 생식계열 이뮤노글로불린 V 영역으로부터 유래된 서열을 지니는 폴리펩티드를 지칭한다. 서열이 인간 개체로부터 단리되거나, 면역원에 응답하여 인간 이뮤노글로불린을 생성할 수 있고, 더욱 바람직하게는 자신의 종에 대해 내인성인 항체를 생산할 수 없는 비-인간 동물, 예컨대 설치류 예컨대 마우스로부터 단리되거나, 또는 클로닝된 인간 항체 유전자 서열들의 라이브러리 (또는 인간 항체 V 영역 유전자 서열들의 라이브러리)로부터 단리되는 경우, 또는 클로닝된 인간 생식계열 V 영역 서열들을 사용하여 하나 이상의 다양화된 서열들을 생성시킨 후 (무작위 또는 표적화 돌연변이유발에 의해), 이들을 원하는 표적 항원에의 결합에 대해 선별하는 경우에, 서열이 "포유류 생식계열 V 영역으로부터 유래"된다. 최소한, 인간 이뮤노글로불린 가변 도메인은 천연-발생 인간 이뮤노글로불린 가변 도메인 서열에 대한 아미노산 서열 유사성이 적어도 85%이다 (예를 들어, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% 또는 그 초과와 유사성 포함). 별법적으로, 또는 추가적으로, "가변 도메인"은 4개의 이뮤노글로불린 가변 도메인 프레임워크 영역 (FW1-FW4) (바람직하게는, 인간의 프레임워크 영역)을 포함하는 이뮤노글로불린 가변 도메인이고, 프레임워크 영역은 [Kabat et al. (1991)]에 기재되어 있다. "가변 도메인 프레임워크 영역"은 a) 프레임워크 영역, 바람직하게는 인간 프레임워크 영역의 아미노산 서열, 및 b) 인간 프레임워크 영역의 아미노산 서열의 8개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 프레임워크 영역을 포함한다. 항체 가변 도메인은 생식계열 항체 유전자 절편, 바람직하게는 인간의 절편에 의해 코딩되는 상응하는 프레임워크 영역의 아미노산 서열과 동일한 FW1-FW4의 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 생식계열 항체 유전자 절편, 바람직하게는 인간의 절편에 의해 코딩되는 상응하는 프레임워크 영역의 아미노산 서열에 비해 FW1-FW4 서열이 공동으로 10개 이하의 아미노산 서열 차이 (예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이하의 아미노산 서열 차이)를 함유하는 가변 도메인을 또한 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 "유니버설(universal) 프레임워크"라는 구절은 [Kabat et al. (1991)]에 정의된 바와 같이 서열 면에서 보존된 항체의 영역에 상응하거나 또는 [Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917]에 정의된 바와 같이 인간 생식계열 이뮤노글로불린 레퍼토리 또는 구조에 상응하는 단일 항체 프레임워크 서열을 지칭한다. 본 발명은 초가변 영역 단독에서의 변동을 통해 실질적으로 모든 결합 특이성의 유도를 허용하는 것으로 발견된 단일 프레임워크 또는 이같은 프레임워크들의 셋트의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 초가변 영역 또는 CDR이 NogoA 및/또는 NiG에 특이적으로 결합한다.

[0133]

용어 "공유결합 변형"은 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드; 또는 이의 단편의 유기 단백질성 또는 비-단백질성 유도체화제로의 변형, 이중성 폴리펩티드 서열에의 융합, 및 번역후 변형을 포함한다. 공유결합 변형된 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드는 가교에 의해 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 결합하는 능력을 여전히 지닌다. 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측면 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써, 또는 선택된 제조업 숙주 세포에서 기능하는 번역후 변형의 메커니즘을 이용함으로써 공유결합 변형이 전통적으로 도입된다. 일부 번역후 변형은 발현된 폴리펩티드에 대해 재조합 숙주 세포가 작용한 결과이다. 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기가 상응하는 글루타미닐 및 아스파르틸 잔기로 빈번하게 번역 후에 탈아미드화된다. 별법적으로, 이러한 잔기들이 중등도로 산성인 조건 하에 탈아민화된다. 또다른 번역후 변형에는 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세릴, 타이로신 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노기의 메틸화가 포함되고, 예를 들어 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]를 참조한다. 공유결합 변형물은 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드 및 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함하는 융합 단백질, 예컨대 면역부착소, 및 이중성 신호 서열에 대한 N-말단 융합물을 포함할 수 있다.

[0134]

천연 폴리펩티드 및 이의 기능성 유도체에 관한 "동일성"은 서열들을 정렬하고, 필요하다면 갭(gap)을 도입하여, 최대의 동일성 백분율을 달성한 후의 상응하는 천연 폴리펩티드의 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 이때 어떠한 보존성 치환도 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. N- 또는 C-말단 확장 또는 삽입은 동일성 또는 상동성을 감소시키는 것으로 해석되지 않아야 한다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 주지되어 있고, [Altschul et al., 상기 문헌]을 참조한다.

[0135]

"아미노산(들)"은 모든 천연 발생 L-α-아미노산을 예를 들어 지칭하고, D-아미노산을 포함한다. 아미노산은 주지된 단문자 또는 3문자 명칭에 의해 확인된다.

- [0136] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열에서 약간의 차이가 있는 분자를 지칭한다. 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체는 인간 NogoA 또는 인간 NiG에 결합하는 능력을 여전히 지닌다. 치환 변이체는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고, 동일한 위치에서 이를 대신하여 상이한 아미노산이 삽입된 변이체이다. 이러한 치환은 분자 내의 오직 1개의 아미노산이 치환된 경우의 단일 치환일 수 있거나, 또는 동일한 분자 내에서 2개 이상의 아미노산이 치환된 경우의 다중 치환일 수 있다. 삽입 변이체는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드 내의 특정 위치의 아미노산에 바로 인접하여 하나 이상의 아미노산이 삽입된 변이체이다. 아미노산에 바로 인접하였다는 것은 이러한 아미노산의  $\alpha$ -카르복시 또는  $\alpha$ -아미노 관능기 중 하나에 연결되는 것을 의미한다. 결실 변이체는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 예를 들어 특정 서열의 폴리펩티드 내의 하나 이상의 아미노산이 제거된 변이체이다. 통상적으로, 결실 변이체에서 분자의 특정 영역 내의 1개 또는 2개의 아미노산이 결실될 것이다.
- [0137] 재조합 DNA 기술에 의해 본 발명의 결합 분자가 생산될 수 있다. 일반적으로, 본 발명을 수행하는데 요구되는 핵산 분자 및 벡터 구축물이 표준 실험 매뉴얼, 예컨대 [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA]에 기재된 바와 같이 구축 및 제작될 수 있다. 이러한 견지에서, 결합 분자를 코딩하는 하나 이상의 DNA 분자가 구축되고, 적합한 제어 서열 하에 놓여서, 발현을 위한 적절한 숙주 생물 내로 전달되어야 한다.
- [0138] 매우 일반적인 방식으로, 따라서 본 발명에서
- [0139] (i) 본 발명의 추가변 영역, 항원 결합 부위, 항체 사슬 또는 이의 단편, 또는 단일 도메인 결합 분자를 코딩하는 DNA 분자; 및
- [0140] (ii) 재조합 수단에 의한 본 발명의 결합 분자의 생산을 위한 본 발명의 DNA 분자의 용도
- [0141] 가 제공된다.
- [0142] 당업계의 현재 상태는 숙련인이 본원에서 제공된 정보, 즉 추가변 영역의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 DNA 서열이 주어지면 본 발명의 DNA 분자를 합성할 수 있을 정도이다. 가변 도메인 유전자의 구축 방법이 예를 들어 EP 239 400에 기술되어 있고, 하기와 같이 간략하게 요약될 수 있다: 임의의 특이성의 모노클로날 항체의 가변 도메인을 코딩하는 유전자가 클로닝된다. 프레임워크 및 추가변 영역을 코딩하는 DNA 절편들이 결정되고, 접합부에서의 적절한 제한 부위와 함께 프레임워크 영역을 코딩하는 DNA 절편들이 융합되도록 추가변 영역을 코딩하는 DNA 절편들이 제거된다. 표준 절차에 의한 DNA 분자의 돌연변이유발에 의해 적합한 위치에서 제한 부위들이 생성될 수 있다. 상기에서 제공된 서열 CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3, CDR-H3-6A3, CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 및 CDR-L3-6A3에 따라 DNA 합성에 의해 이중 가닥 합성 CDR 카세트가 제조된다. 이뮤노글로불린 가변 도메인을 코딩하는 DNA 분자를 달성하기 위해 표준 프로토콜에 의해 이러한 카세트들이 접합부에서 프레임워크에 결합될 수 있도록 접착성 말단이 이러한 카세트들에 제공된다.
- [0143] 또한, 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA 구축물을 수득하기 위해 생산 하이브리도마 세포주로부터의 mRNA에 접근할 필요가 없다. 따라서, PCT 출원 WO 90/07861은 유전자의 뉴클레오티드 서열에 관한 서면 정보만 제공되었을 때 재조합 DNA 기술에 의한 모노클로날 항체의 생산을 위한 완전한 정보를 제공한다.
- [0144] 이러한 방법은 다수의 올리고뉴클레오티드의 합성, PCR 방법에 의한 이들의 증폭, 및 원하는 DNA 서열을 제공하기 위한 이들의 스플라이싱(splicing)을 포함한다.
- [0145] 박테리아 플라스미드, 박테리오파지, 인공 염색체 및 에피솜 벡터를 포함하여 수많은 벡터가 공개적으로 입수 가능하다. 하나 이상의 적절한 프로모터 및/또는 중쇄 및 경쇄 불변부를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터가 공개적으로 입수가능하다. 발현 벡터는 숙주 생물에 의해 인식되고 관심 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 일반적으로 함유한다. 이같은 프로모터는 유도성 또는 구성성일 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결됨"은 기술된 성분들이 이들의 의도된 방식으로 기능하는 것을 허용하는 관계에 있는 병렬을 지칭한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결"된 제어 서열은 제어 서열과 상용성인 조건 하에 코딩 서열의 발현이 달성되는 방식으로 결합된다. 따라서, 일단 본 발명의 DNA 분자가 제조되면, 적합한 발현 벡터 내로 간편하게 전달될 수 있다.
- [0146] 표준 방법, 예를 들어, WO 88/1649에 기술된 방법에 의해 단일쇄 항체를 코딩하는 DNA 분자가 또한 제조될 수

있다.

- [0147] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명의 결합 분자들 중 일부의 생산을 위한 재조합 수단은 하기에 기술되는 바와 같은 제1 및 제2 DNA 구축물을 포함한다:
- [0148] 제1 폴리뉴클레오티드는 하기의 것들을 포함할 수 있다:
- [0149] \* 서열 14, 서열 15 및 서열 16에 제시된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열; 또는
- [0150] \* 서열 17, 서열 18 및 서열 19에 제시된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열.
- [0151] 또다른 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 하기를 포함한다:
- [0152] \* 서열 14, 서열 15 및 서열 16에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열; 및
- [0153] \* 서열 17, 서열 18 및 서열 19에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열.
- [0154] 또다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 하기를 포함한다:
- [0155] \* 서열 6에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 서열 7에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는
- [0156] \* 서열 26에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 서열 28에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열.
- [0157] 또다른 실시양태에서, DNA 구축물은 중쇄 또는 이의 단편을 코딩하고, 하기를 포함한다:
- [0158] a) 프레임워크 및 추가변 영역들을 교대로 포함하는 가변 도메인을 코딩하고, 상기 추가변 영역들이 순서대로 DNA-CDR-H1-6A3 (서열 14), DNA-CDR-H2-6A3 (서열 15) 및 DNA-CDR-H3-6A3 (서열 16)을 포함하는 제1 부분으로서, 가변 도메인의 첫번째 아미노산을 코딩하는 코돈으로 시작하여 가변 도메인의 마지막 아미노산을 코딩하는 코돈으로 종결되는 제1 부분, 및
- [0159] b) 중쇄 불변부 또는 이의 단편을 코딩하는 제2 부분으로서, 중쇄의 불변부의 첫번째 아미노산을 코딩하는 코돈으로 시작하여 불변부 또는 이의 단편의 마지막 아미노산을 코딩하는 코돈으로 종결되고, 비-센스(non-sense) 코돈이 이어지는 제2 부분.
- [0160] 바람직하게는, 제2 부분은 인간 중쇄의 불변부, 더욱 바람직하게는 인간  $\gamma$ 4 사슬의 불변부를 코딩한다. 이러한 제2 부분은 계놈 기원의 DNA 단편 (인트론 포함), 또는 cDNA 단편 (인트론 없음)일 수 있다.
- [0161] 또다른 실시양태에서, DNA 구축물은 경쇄 또는 이의 단편을 코딩하고, 하기를 포함한다:
- [0162] a) 프레임워크 및 추가변 영역들을 교대로 포함하는 가변 도메인을 코딩하고, 상기 추가변 영역들이 순서대로 DNA-CDR-L1-6A3 (서열 17), DNA-CDR-L2-6A3 (서열 18) 및 DNA-CDR-L3-6A3 (서열 19)을 포함하는 제1 부분으로서, 가변 도메인의 첫번째 아미노산을 코딩하는 코돈으로 시작하여 가변 도메인의 마지막 아미노산을 코딩하는 코돈으로 종결되는 제1 부분, 및
- [0163] b) 경쇄 불변부 또는 이의 단편을 코딩하는 제2 부분으로서, 경쇄의 불변부의 첫번째 아미노산을 코딩하는 코돈으로 시작하여 불변부 또는 이의 단편의 마지막 아미노산을 코딩하는 코돈으로 종결되고, 비-센스 코돈이 이어지는 제2 부분.
- [0164] 바람직하게는, 제2 부분은 인간 경쇄의 불변부, 더욱 바람직하게는 인간  $\kappa$  사슬의 불변부를 코딩한다.
- [0165] 유리하게는 본 발명의 DNA 구축물은 앞서 기술된 부분들의 상류에 위치하고 리더 펩티드를 코딩하는 또다른 부분을 추가로 포함할 수 있고, 이러한 추가적인 부분은 리더 펩티드의 첫번째 아미노산을 코딩하는 코돈으로 시작하여 리더 펩티드의 마지막 아미노산으로 종결된다. 이러한 리더 펩티드는 사슬들이 발현되는 숙주 생물에 의한 사슬들의 분비를 위해 필요하고, 분비 후 숙주 생물에 의해 제거된다. 바람직하게는, DNA 구축물의 이러한 부분은 서열 20에 제시된 중쇄 리더 서열의 아미노산 서열 (IgG1의 중쇄, 위치 -19의 아미노산으로 시작하여 위치 -1의 아미노산으로 종결됨)과 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 서열 22에 제시된 아미노산 서열 (IgG1의 경쇄, 위치 -20의 아미노산으로 시작하여 위치 -1의 아미노산으로 종결됨), 서열 30에 제시된 중쇄 리더 서열의 아미노산 서열 (IgG4의 중쇄, 위치 -19의 아미노산으로 시작하여 위치 -1의 아미노산으로 종결됨)과 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 서열 31에 제시된 아미노산 서열 (IgG4의 경쇄, 위치 -20의 아미노산으로 시작하여 위치 -1의 아미노산으로 종결됨)을 지니는 리더 펩티드를 코딩한다.
- [0166] 각각의 DNA 구축물은 적절한 제어 서열의 제어 하에, 특히 적절한 프로모터의 제어 하에 놓인다. 발현을 위해

DNA 구축물이 전달될 숙주 생물에 대해 적절하다면, 임의의 종류의 프로모터가 사용될 수 있다. 그러나, 발현이 포유류 세포에서 일어나는 경우, 이뮤노글로불린 유전자의 프로모터를 사용하는 것이 특히 바람직하다.

- [0167] 원하는 항체가 세포 배양물에서 또는 트랜스제닉(transgenic) 동물에서 생산될 수 있다. 적절한 제어 서열 하에 놓인 제1 및 제2 DNA 구축물을 난자에 미세주사하는 단계, 이렇게 제조된 난자를 적합한 가임신 암컷 내로 전달하는 단계 및 원하는 항체를 발현하는 자손을 선별하는 단계를 포함하는 표준 방법에 따라 적절한 트랜스제닉 동물을 수득할 수 있다.
- [0168] 항체 사슬이 세포 배양물에서 생산되어야 하는 경우, 먼저 DNA 구축물이 단일 발현 벡터 내로 또는 2개의 분리되었지만 상용성인 발현 벡터 내로 삽입되어야 하고, 후자의 가능성이 바람직하다.
- [0169] 따라서, 본 발명은 상기 기술된 DNA 구축물들 중 하나 이상을 포함하는, 원핵생물 또는 진핵생물 세포주에서 복제될 수 있는 발현 벡터를 또한 제공한다.
- [0170] 따라서 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명은 발현 시스템 또는 이의 일부가 상용성 숙주 세포 내에 존재하는 경우 발현 시스템 또는 이의 일부가 본 발명의 폴리펩티드를 생산할 수 있는 발현 시스템에 또한 관련된다. 본 발명의 발현 시스템을 포함하는 단리된 숙주 세포가 또한 개시된다.
- [0171] 재조합 DNA 기술에 의해 또는 화학적 합성에 의해 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터를 생산하는 방법이 따라서 또한 본 출원에서 구현된다.
- [0172] 따라서 DNA 구축물을 함유하는 각각의 발현 벡터가 적절한 숙주 생물 내로 전달되어야 한다. DNA 구축물들이 2개의 발현 벡터 상에서 별도로 삽입되는 경우, 이들은 별도로 전달될 수 있거나 (즉 세포 당 1개 유형의 벡터), 또는 공동으로 전달될 수 있고, 후자 유형의 가능성이 바람직하다. 적절한 숙주 생물은 박테리아, 효모, 또는 포유류 세포주일 수 있고, 후자가 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 포유류 세포주는 림프 기원의 세포주, 예를 들어 골수종, 하이브리도마 또는 정상적인 불멸화 B-세포이지만, 어떠한 내인성 항체 중쇄 또는 경쇄도 발현하지 않는다.
- [0173] 숙주 생물이 다수의 벡터 카피를 함유하여, 세포 당 하나 이상의 DNA 구축물을 함유하는 것이 또한 바람직하다. 숙주 생물이 포유류 세포주인 경우, 표준 방법에 따라 카피수를 증폭시킴으로써 이러한 바람직한 목표가 달성될 수 있다. 증폭 방법은 약물에 대한 증가된 저항성에 대해 선별하는 것으로 일반적으로 구성되고, 이때 상기 저항성은 발현 벡터에 의해 코딩된다.
- [0174] 본 발명의 또다른 양상에서, (i) 하나 이상의 본 발명의 DNA 구축물로 형질전환된 생물을 배양하는 단계 및 (ii) 배양물로부터 본 발명의 활성 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 다사슬 결합 분자의 생산 방법이 제공된다.
- [0175] 별법적으로, 예를 들어, 중쇄 및 경쇄가 별도로 회수되어, 시험관내 리폴딩(refolding) 후 활성 결합 분자로 재구성될 수 있다. 재구성 방법은 당업계에 주지되어 있고, 이러한 방법의 예들이 EP 120 674 또는 EP 125 023에서 특히 제공된다.
- [0176] 따라서, 방법이 하기의 단계들을 또한 포함할 수 있다:
- [0177] (i) 본 발명의 결합 분자를 코딩하는 제1 DNA 구축물로 형질전환된 제1 생물을 배양하고, 배양물로부터 제1 결합 분자를 회수하는 단계,
- [0178] (ii) 본 발명의 결합 분자를 코딩하는 제2 DNA 구축물로 형질전환된 제2 생물을 배양하고, 배양물로부터 제2 결합 분자를 회수하는 단계, 및
- [0179] (iii) (i)에서 수득된 제1 결합 분자 및 (ii)에서 수득된 제2 결합 분자로부터 본 발명의 활성 결합 분자를 시험관 내에서 재구성시키는 단계.
- [0180] 필요하다면, 더 많은 결합 분자를 제공하기 위해 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개까지의 더 많은 생물 또는 세포가 생산 및 사용될 수 있다.
- [0181] 유사한 방식으로, 하기의 단계들을 포함하는 본 발명의 단일쇄 또는 단일 도메인 결합 분자를 생산하는 방법이 또한 제공된다:
- [0182] (i) 본 발명의 단일쇄 또는 단일 도메인 결합 분자를 각각 코딩하는 DNA 구축물로 형질전환된 생물을 배양하는

단계, 및

- [0183] (ii) 배양물로부터 상기 분자를 회수하는 단계.
- [0184] 본 발명의 NogoA 및 NiG 결합 분자는 하기에 기술되는 바와 같은 과립 세포 신경돌기 증식 모델에서 예를 들어 나타나는 바와 같이, 매우 양호한 신경 재생 활성을 나타낼 수 있다.
- [0185] 1. 과립 세포 신경돌기 증식 분석법 (시험관내)
- [0186] 뇌 조직 (피질 및 뇌간)을 취하고, 기존에 기술된 바와 같이 각각의 분석법을 위해 단백질 추출물을 새롭게 제조한다 ([Spillmann et al. 1998, Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220), J Biol Chem. 1998 Jul 24;273(30): 19283-93]). 간략하게, 동결된 조직의 조각 (예를 들어 0.25 g)을 4°C에서 프로티에이스 차단제 (10 µg/ml 아프로티닌(Aprotinin) - 5 µg/ml 류펩틴(Leupeptin) - 1 µg/ml 펩스타틴(Pepstatin) - 1 mM PMSF)가 있는 3-4 부피의 60 mM Chaps - 20 mM 트리스(Tris) pH 8.0 - 1 mM EDTA에서 균질화시킨다. 균질화물을 4°C에서 30분 동안 회전자 상에 놓고, TLA 100.3 로터 (Beckman TL-100 초원심분리기)에서 4°C에서 45분 동안 100,000 g에서 원심분리한다. 상등액으로부터, 흡광 분광광도계를 사용하여 단백질 농도를 결정한다.
- [0187] 소뇌 과립 세포를 기존에 기술된 바와 같이 생후 5-7일의 래트 소뇌 조직의 트립신 소화물로부터 정제한다 ([Niederost et al. 1999, Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans, J Neurosci. 1999 Oct 15; 19(20):8979-89]). 그후, 본 발명의 결합 분자를 30분 동안 테스트 기판 상에서 예비-인큐베이션하고, 세포를 첨가하기 전에 제거한다. 소뇌 과립 세포를 첨가하고, 24시간 동안 인큐베이션한다. 실험을 정지시키기 위해, 2 ml의 4% 완충 포름알데히드를 천천히 배양 접시에 첨가한다. 상기 기술된 바와 같이 제조된 원숭이 뇌 막 단백질 추출물을 그라이너(Greiner) 4-웰 접시 (Greiner, Nuertingen, Germany) 상에 배양 접시 1 cm<sup>2</sup> 당 단백질 15 µg으로 하룻밤 동안 흡착시킨다. 접시를 따뜻한 헵크(Hank) 용액으로 3회 세정한 후, 뉴런을 플레이팅한다. 생후 5-7일 래트 소뇌 과립 세포를 상기 기술된 바와 같이 제조하고, 50,000개의 세포/cm<sup>2</sup>으로 플레이팅한다. 세포를 24시간 동안 무혈청 배지에서 배양하고, 고정시키고, 신경돌기 마커 MAB 1b (케미콘(Chemicon) 모노클로날 항체, 1:200)로 면역염색한다. 세포체의 염색을 위해, DAPI (4',6-디아미디노-2-페닐-인돌, 디하이드로클로라이드, Molecular Probes)가 MAB1b로의 염색 후에 사용된다. 항체 실험을 위해, 항-Nogo-A mAb 또는 대조군 IgG Ab를 접시 상에서 30분 동안 예비-인큐베이션한 후 제거한다.
- [0188] 웰의 가장자리에 대해 규정된 거리의 4개의 필드를 관찰 필드 중앙을 통과하여 놓인 선과의 신경돌기의 모든 교차점을 계수함으로써 40× 대물렌즈를 사용하여 각각의 웰에 대해 무작위로 샘플링한다. 선에 접촉되는 모든 세포체를 또한 계수하고, 세포체 당 신경돌기의 인덱스 비율을 기존에 보고된 바와 같이 각 웰에 대해 계산한다 ([Simonen et al, 2003, Neuron 38, 201-211]). 모든 계수는 코드화된 실험으로 맹검으로 수행되고, 세포체 당 신경돌기의 인덱스로 표현된다. 결과는 평균 인덱스 신경돌기/세포체로 표현된다.
- [0189] 본 발명의 결합 분자와의 예비-인큐베이션에 의한, 상기 제조된 척수 추출물의 비-허용성 환경에서의 소뇌 과립 세포의 신경돌기 증식의 강화가 관찰될 수 있다.
- [0190] 하기에 간략하게 기술되는 생체내 척수 손상 모델에서 재생성 발아 및 신경돌기 증식 및 기능 회복을 측정함으로써 본 발명의 분자의 중화 활성이 또한 추정될 수 있다.
- [0191] 2. 래트 및 원숭이에서의 척수 손상 모델 (생체내)
- [0192] 척수의 등쪽 절반을 제8 흉추 수준에서 양측으로 횡절단함으로써 성체 루이스(Lewis) 래트를 미세수술로 손상시킨다. 척추후궁절제술, 마취 및 수술이 [Schnell and Schwab, 1993 Eur. J. Neurosci. 5:1156-1171]에 기술되어 있다.
- [0193] 신경해부학적 추적: 선행성(anterograde) 추적물질인 비오틴 텍스트란 아민 (BDA)을 펌프 또는 이식편에 대해 반대편인 피질 내로 주사함으로써 운동 및 감각 피질척수로를 추적한다. BDA가 10-14일 이내에 척수에 전달되고, [Broesamle et al., 2000 J. Neurosci. 20:8061-8068]에 기재된 바와 같이 기질로서 디아미노벤지딘 (DAB)을 사용하여 가시화된다.
- [0194] 양쪽 주요 경수 횡절단 (CST)을 포함하여 주로 등쪽 절반에서 척수 분절 T8의 약 40%를 파괴하는 척수 손상 2주 후: 대조군 동물에서 CST 추적은 피질척수로의 중등도의 반응성 발아를 나타낸다. 이러한 현상은 문헌에 주지된 손상에 응답하는 자발적인 발아에 상응한다. 본 발명의 결합 분자로 또는 본 발명의 결합 분자를 전달하

는 펌프로 치료되고 있는 손상된 래트는 병변 부위에서의 강화된 발아, 손상된 축삭의 재생 및 손상된 신경돌기의 신경돌기 증식을 나타낼 수 있다. 또한, 동물은 감각운동 기능의 개선된 회복을 나타낼 수 있다. 이같은 기능 테스트는 기존에 기술되어 있다 ([Merkler et al, 2001, J. Neuroscience 21, 3665-73]).

[0195]

3. 성체 원숭이 CNS에서의 항체의 조직 분포

[0196]

본 발명의 결합 분자를 IgG로서 정제하고, PBS 내에 3 mg/ml로 농축한다. 마우스 혈청에서 유래된 IgG (Chemicon Int., Temecula/CA, USA) 또는 밀 옥신에 대해 지시된 mAB (AMS Biotechnology, Oxon/UK)이 대조군 치료로 사용된다. 2마리의 수컷 성체 짧은꼬리 원숭이 (마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis))가 이러한 연구에서 수막강내 주입용으로 사용된다.

[0197]

수술 절차

[0198]

케타민 (Ketalar®; Parke-Davis, 5 mg/kg)의 근육내 주사에 의해 마취를 유도한다. 기관지 분비를 감소시키기 위해 아트로핀을 근육내 주사한다 (0.05 mg/kg). 프로포폴 1% (Fresenius®) 및 글루코스 4% 용액의 혼합물 (1 부피의 프로포폴 및 2 부피의 글루코스 용액)의 연속 관류를 위해 정맥내 카테터를 대퇴 정맥에 놓아, 더 깊은 마취를 유도한다. 그 후, 동물을 정위 프레임워크에 놓는다. 무균성 조건 하에, C2에서 Th1까지 수직 정중선 피부 절개를 수행한다. C2에서 Th1까지 근막 절단부(cut) 및 가시돌기를 노출시킨다. 척추주위 근육을 굽히고, C6, C7 및 Th1의 판을 절개한다. 그 후, 완전 C6 척추후궁절제술 및 상부 C7 반측척추후궁절제술을 수행한다. 경질막을 노출시키고, 제6 경추관으로 덮인 척수 부분의 입쪽(rostral) 구역에 상응하는 제7 및 제8 경추 분절 위로 세로로 절개한다. hNogo-A 항체를 전달하는 삼투압 펌프 (Alzet®, 2ML1; 유속 50 µg/시)에 연결된 폴리에틸렌 튜브 (길이 10 cm)를 경질막 아래에 삽입하고, 입쪽으로 수 밀리미터 밀어, 경질막에 봉합하여 부착시킨다. 삼투압 펌프를 좌측 옆구리에서 척추후궁절제술보다 수 센티미터 더 낮게 등 근육에 만들어진 공동 내에 놓고 고정한다. 튜브를 이의 궤도를 따라 근육 조직에의 봉합으로 고정한다. 근육 및 피부를 봉합하고, 프로포폴의 정맥 관류를 중단하고 나서 일반적으로 15-30분 후에 마취로부터 동물이 회복된다. 수술 후에 항생제 (암피실린(Ampiciline) 10%, 30 mg/kg, 피하)로 동물을 치료한다. 추가 용량의 카르프로펜(Carprofen)을 1주일 동안 매일 제공한다.

[0199]

삼투압 펌프 이식 8일 후 원숭이를 희생시킨다. 먼저 상기 언급된 바와 같은 케타민으로 진정을 유도한 후, 치사량의 펜토바르비탈 (90 mg/kg)을 복강내 주사하여 깊이 마취시킨다. 동물에게 0.4 리터의 0.9% 염수에 이어서 4 리터의 고정제 (0.1 M 포스페이트 완충제, pH=7.6 내의 파라포름알데히드의 4% 용액)를 심장을 통과해 관류시킨다. 증가되는 농도의 3가지 수크로스 용액 (고정제 내의 10%, 포스페이트 완충제 내의 20 및 30%)으로 관류를 계속한다.

[0200]

조직학적 절차, 면역-형광 및 면역조직화학

[0201]

원숭이의 뇌 및 척수를 조심스럽게 절개하고, 30% 수크로스에서 동결방지시키고, 냉동미세절단기에서 40 µm로 절개한다. 주입된 mAB의 검출을 위해, 항-인간 2차 항체 (Jackson Laboratories)가 사용된다. 이중 표지화를 위해 하기의 항체들을 사용할 수 있다: 내인성 Nogo-A에 대한 토끼 AS472 (친화성 정제됨) ([Chen, 2000]), 별아교세포를 위한 GFAP에 대한 토끼 항체, 및 라이소솜 국소화를 위한 카텡신(Cathepsin) D (DAKO)에 대한 토끼 항체. TRITC 또는 FITC가 커플링된 상응하는 2차 항체에 의해, 또는 ABC-DAB 시스템 (Vector)를 사용하여 모든 항혈청이 가시화된다. 절편들을 제이스 악시오포트(Zeiss Axiophot) 상에서의 표면형광(epifluorescence)에 의해 또는 공초점 현미경 (ZEISS LSM 410)에 의해 분석한다.

[0202]

척수를 주입 부위 및 이에 대해 6 cm 꼬리쪽에서 분석한다. 높은 수준의 본 발명의 결합 분자가 주입 부위에 존재한다. 더 꼬리쪽인 척수에서, 중심관 및 척수 표면은 강하게 표지되는 반면, 회색질 및 백색질은 더 균질한 표지화를 나타내지만, 이는 특수하고 배경에 비해 뚜렷하다. 전뇌에 유사한 상황이 존재하여, 표면 및 뇌실이 강하게 표지되고 Nogo-A 항체가 실질 내로 양호하게 침투된다.

[0203]

이러한 실험들은 CNS 세포 표면 항원에 대한 항체의 척수 수막강내 주입으로 본 발명의 결합 분자 및 항체가 CSF 순환을 통해 내부 (뇌실, 중심관) 및 외부 액체 공간 내에 양호하게 분포된다는 것을 나타낸다. IgG 항체는 뇌 및 척수 조직 내로 잘 투과된다. 음성 대조군 IgG 항체는 신속하게 유실되는 반면, Nogo-A에 대한 항체는 뇌 및 척수 조직 내에서 유지된다.

[0204]

4. 원숭이에서의 척수 병변에서의 신경 복구 및 기능적인 개선에 대한 테스트

[0205]

케타민 (Ketalar®; Parke-Davis, 5 mg/kg)의 근육내 주사에 의해 마취를 유도한다. 기관지 분비를 감소시키기

위해 아트로핀을 근육내 주사한다 (0.05 mg/kg). 프로포폴 1% (Fresenius®) 및 글루코스 4% 용액의 혼합물 (1 부피의 프로포폴 및 2 부피의 글루코스 용액)의 연속 관류를 위해 정맥내 카테터를 대퇴 정맥에 놓아, 더 깊은 마취를 유도한다. 그후, 동물을 정위 프레임워크에 놓는다. 무균성 조건 하에, C2에서 Th1까지 수직 정중선 피부 절개를 수행한다. C2에서 Th1까지 근막 절단부 및 가시돌기를 노출시킨다. 척추주위 근육을 굽히고, C6, C7 및 Th1의 판을 절개한다. 그후, 완전 C6 척추후궁절제술 및 상부 C7 반측척추후궁절제술을 수행한다. 분자를 병변에 인접하여 전달하기 위해, 펌프에 부착된 폴리에틸렌 튜브의 자유로운 팁을 경질막 아래에 병변에 대해 수 밀리미터 입쪽으로 고정한다.

[0206] 행위 손재주 시험을 공개된 절차에 따라 수행할 수 있다.

[0207] 25개의 구멍은 수평으로, 25개의 구멍은 수직으로 향하는 50개의 무작위로 분포된 구멍을 함유하는 퍼스펙스 (Perspex) 변형 "브링크만 보드(Brinkman board)" (10 cm × 20 cm) 앞에 있는 영장류 의자에 원숭이를 착석시켜 손재주를 훈련한다 ([Liu, 1999 15428, 동일 문헌]; [Rouiller, 1998 13239, 동일 문헌]). 섬유의 재생 및 발아를 기술된 바와 같이 평가할 수 있다. 우측 뇌반구에 주사된 선행성 추적물질은 비오틴닐화 텍스트란 아민 (BDA, Molecular Probe®; 염수 내의 10%)이다. 좌측 뇌반구에는, 형광 선행성 추적물질인 플루오레세인 텍스트란 (Molecular Probe®, 염수 내의 10%)이 주사된다. 추적물질을 가시화하기 위한 조직학적 프로세싱을 기존에 상세하게 기술된 바와 같이 수행할 수 있다 ([Rouiller, 1994 8322, 동일 문헌]).

[0208] 따라서, 본 발명은 하기를 또한 제공한다:

- [0209] (i) 포유류 신경계, 특히 인간 신경계의 신경 복구에서의 본 발명의 Nogo 및 NiG 결합 분자의 용도,
- [0210] (ii) 유효량의 본 발명의 Nogo 및 NiG 결합 분자를 신경 복구를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 신경계, 특히 인간 신경계의 신경을 복구하는 방법, 또는
- [0211] (iii) 본 발명의 결합 분자 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는, 포유류 신경계, 특히 인간 신경계의 신경 복구를 위한 제약 조성물.

[0212] 따라서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템, 및 숙주 세포를 제공한다. 특히, 상기 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템 또는 숙주 세포는 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료에서 또는 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료를 위한 의약의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0213] 본 발명은 본 발명에 따른 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템, 또는 숙주 세포를 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 제약 조성물을 또한 제공한다. 상기 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템 또는 숙주 세포, 또는 이들의 제약상 허용되는 유도체를 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료에서 동시에, 별도로 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합 제제로서 함유하는 제품이 또한 제공된다.

[0214] 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료를 필요로 하는 대상에게 유효량의 본 발명의 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 또는 시스템 또는 숙주 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 말초 신경계 (PNS) 및/또는 중추 신경계 (CNS)의 질환의 치료 방법이 또한 구현된다.

[0215] 약리학적 조성물 및 제품들이 결합 분자의 서방출을 위해 및/또는 손상 부위에서의 결합 분자의 국소적인 침착을 위해 사용될 수 있다는 것이 본 발명의 실시예에서 추가로 지시된다.

[0216] 본원에서 사용된 용어 "서방형" 또는 등가의 용어인 "제어 방출" 또는 "연장 방출"은 개체에 투여 후에 일정 기간에 걸쳐 활성 약물, 예컨대 폴리펩티드 약물 (본 발명의 NogoA 또는 NiG 결합 분자, 예컨대 NogoA 또는 NiG에 대해 지시된 항체가 포함)을 방출하는 약물 제형을 지칭한다. 약물 제형에 따라 일정 범위의 시간, 예를 들어, 수분, 수시간, 수일, 수주 또는 그 이상에 걸쳐 일어날 수 있는 폴리펩티드 약물의 연장 방출은 실질적으로 전체적인 투여량 단위가 즉각적인 흡수 또는 혈류를 통한 즉각적인 분포 동안 이용가능한 표준 제형과 대조적이다. 바람직한 연장 방출 제형은 단일 투여로부터의 혈중 약물 수준이, 예를 들어, 8시간 이상 동안, 12시간 이상 동안, 24시간 이상 동안, 36시간 이상 동안, 48시간 이상 동안, 60시간 이상 동안, 72시간 이상 동안, 84시간 이상 동안, 96시간 이상 동안, 또는 심지어, 예를 들어, 1주일 또는 2주일 이상 동안, 예를 들어, 1개월 이상 동안 지속되는 것을 초래한다. 연장 방출 제형은 당업계에 잘 기술되어 있고, 바람직한 항체 방출 프로파일에 따라 선택될 수 있다. 적절한 중합체에는 생분해성 및 비-생분해성 물질 예컨대 폴리락틱 글리콜릭 애시드 (PLGA)가 포함된다.

- [0217] 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 통상적으로 이뮤노글로불린 VH/VL 쌍이 결합하는 구조 단위를 지칭한다. 에피토프는 항체에 대한 최소 결합 부위를 정의하고, 따라서 항체 특이성의 표적을 나타낸다. 단일 도메인 항체의 경우, 에피토프는 단독으로 단일 가변 도메인이 결합하는 구조 단위를 나타낸다.
- [0218] 본원에서 사용된 용어 "중화"는, 본원에 기술된 바와 같은 NogoA 또는 NiG 결합 분자에 관하여 사용되는 경우, 결합 분자가 NogoA 또는 NiG의 측정가능한 활성 또는 기능을 방해한다는 것을 의미한다. 표적 항원, 예를 들어 Nogo 또는 NiG의 측정가능한 활성 또는 기능을 적어도 50%만큼, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과 내지 100% 까지 (100% 포함)만큼 감소시키는 경우 NogoA 또는 NiG 결합 분자는 "중화" 폴리펩티드이다. 당업자는 표적 항원의 측정가능한 활성 또는 기능의 이러한 감소를 이같은 활성 또는 기능의 하나 이상의 지표를 측정하는 표준 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 표적이 Nogo 또는 NiG인 경우, 하기 기술되는 신경돌기 성장 분석법을 사용하여 중화 활성을 평가할 수 있다.
- [0219] 특히, 본 발명의 결합 분자는 신경 섬유 손상 후의 축삭 재생 및 개선된 발아에 유용하다. 따라서, 본 발명의 분자는 특히 인간 대상에 대한 유용성이 광범위하다. 예를 들어, 본 발명의 결합 분자는 말초 신경계 (PNS) 및 중추 신경계 (CNS)의 다양한 질환의 치료에서, 즉 더욱 특히 신경변성 질환 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 루이체-유사 병증 또는 기타 일반적인 치매, 두개, 대뇌 또는 척수 외상 후의 질환, 뇌졸중 또는 탈수초 질환에서 유용하다. 이같은 탈수초 질환에는 다발 경화증, 단상성 탈수초, 뇌척수염, 다초점성 백색질뇌증, 범뇌염, 마키아파바-비그나미 질환, 뇌교 수초용해증, 부신백색질형성장애, 펠리제우스-메르츠바하 질환, 해면 변성증, 알렉산더 질환, 카나반 질환, 이엽성 백색질형성장애 및 크라베 질환이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 한 예에서, 본 발명의 결합 분자의 투여는 NogoA 단백질과 관련된 탈수초 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0220] 또다른 예에서, 손상된 부위 전반에 걸친 축삭 성장을 촉진하기 위해 본 발명의 결합 분자를 발현하는 세포가 척수 손상 부위에 이식될 수 있다. 이같은 이식된 세포는 손상 또는 외상 후의 척수 기능을 복원하기 위한 수단을 제공할 것이다. 이같은 세포는 후각 초성 세포 및 태아 신경의 여러 계통의 줄기 세포 또는 조직 이식편을 포함한다.
- [0221] 또한, 본 발명의 결합 분자는 망막 또는 각막 세포의 변성을 직접적으로 또는 간접적으로 수반할 수 있는 퇴행성 안 장애의 치료에 유용하고, 여기에는 일반적인 허혈성 망막병증, 전방 허혈성 시각 신경병증, 모든 형태의 시각 신경염, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막병증, 낭포성 황반 부종 (CME), 색소성 망막염, 스타가르트 질환, 베스트 난황상 망막 변성, 레베르 선천성 흑암시 및 기타 유전성 망막 변성, 병적 근시, 미숙아 망막병증 및 레베르 유전성 시각 신경병증, 각막 이식 또는 굴절교정 각막 수술의 후유증, 및 헤르페스 각막염이 포함된다.
- [0222] 추가로, 본 발명의 결합 분자는 정신과 용태, 특히 정신분열증 및 우울증의 치료에 유용하다.
- [0223] 이러한 적용증들에 대해, 예를 들어 사용될 특정한 본 발명의 분자, 투여 방식 및 치료될 용태의 성질 및 중증도에 따라, 적합한 투여량이 당연히 변할 것이다. 일반적으로, 투여량은 바람직하게는 1 µg/kg/일 내지 1 mg/kg/일의 범위일 것이다.
- [0224] 본 발명의 결합 분자는 편리하게 펌프에 의해 투여되거나, 또는 병변 부위에 치료제로서 주사되고, 예를 들어, 직접적으로 두개내 주사에 의해 CNS 내로 또는 수막강내 투여에 의해 척수 내로 병변 부위에 투여될 수 있다. 척수 주변의 액체가 채워진 공간은 거미막밑 공간 또는 수막강내 공간으로 칭해진다. 뇌척수액 (CSF)이 이러한 구역을 통과하여 흘러서, 뇌 및 척수를 적시고 보호한다. 수막강내 약물 펌프는 경구 투약보다 훨씬 더 효율적으로 작동할 수 있는데, 이는 경구 투약이 신체를 통하여 취하는 경로를 우회하여 의약을 CSF 내로 직접적으로 전달하기 때문이다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 수막강내 투여를 통해, 예를 들어, 이동식 펌프에 연결된 외부 카테터를 사용하여, 투여가 수행된다. 추가적인 바람직한 실시양태에서, 수막강내 볼루스 주사가 사용된다. 약물의 수막강내 투여를 위한 적절한 수단 및 방법이 당업계에 공지되어 있다. 펌프의 비제한적인 예는 알젯(Alzet)® 펌프 및 메드트로닉 싱크로메드(Medtronic SynchroMed)® 또는 이소메드(Isomed)® 주입 시스템이다. 결합 분자는 연속적으로 주입될 수 있거나, 또는 바람직하게는, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 14일, 21일, 또는 30일의 특정한 시간 간격으로 고정 용량으로, 예를 들어, 뇌척수액 내의 직접적인 볼루스 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0225] 본 발명의 결합 분자는 단독으로, 또는 다른 작용제와 조합되어, 또는 순차적으로 조합되어 제공될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 결합 분자는 추가적인 뉴런 손상 및 축삭 재생 억제제를 차단하기 위한 수단으로서의 뇌졸

중 또는 척수 손상 후의 항염증제 예컨대 코르티코스테로이드 (그러나 이에 한정되지 않음), 신경영양 인자 예컨대 신경 성장 인자 (NGF), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF) 또는 신경변성 질환을 위한 기타 약물 예컨대 엑셀론(Exelon)<sup>TM</sup> (Rivastigmine) 또는 레보도파(Levodopa) (L-DOPA (3,4-디하이드록시-L-페닐알라닌))와 조합되어 투여될 수 있다. 뇌졸중의 치료를 위한 또다른 적절한 조합 파트너는 알테플라제(Alteplase) 및 데스모테플라제(Desmoteplase) (DSPA; 예를 들어 W090/09438에 개시됨)이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 특히 뇌졸중의 치료를 위한 본 발명의 결합 분자 및 데스모플라제를 포함하는 조합물, 뿐만 아니라 상기 조합물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본원에서 사용될 때, 2개의 작용제는 이들이 동시에 투여되거나 작용제들이 동시에 작용할 방식으로 독립적으로 투여되는 경우에 조합 투여된다고 언급된다.

[0226] 코드 번호, 일반명 또는 상표명으로 확인되는 활성 성분들의 구조는 표준 개론서인 "더 머크 인덱스(The Merck Index)"의 현행판으로부터 또는 데이터베이스, 예를 들어 패튼츠 인터내셔널(Patents International) (예를 들어, IMS 월드 퍼블리케이션스(IMS World Publications)) 또는 IMS 헬스(IMS Health)에서 제공하는 또다른 데이터베이스로부터 취득될 수 있다. 이의 상응하는 내용이 거명에 의해 본원에 포함된다. 모든 당업자는 충분히 활성 성분들을 확인할 수 있고, 이러한 참고문헌들을 기초로, 또한 제작하여 제약학적 적응증 및 성질들을 표준 테스트 모델 (생체내 및 시험관내 양쪽 모두)에서 테스트할 수 있다.

[0227] 본 발명의 제약 조성물은 통상적인 방식으로 제작될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 분자를 포함하는 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게는 동결건조 형태로 제공된다. 즉각적인 투여를 위해, 조성물이 적절한 수성 담체, 예를 들어 무균성 주사용수 또는 무균성 완충 생리식염수 내에 용해된다.

[0228] 적절한 조성물을 구성하는 것을 보조하기 위해, 본 발명의 결합 분자, 및 본 발명의 결합 분자의 효과를 강화시키는 임의적인 제2의 약물이 혼합 또는 동시 투여를 위한 설명서와 함께 동일한 용기 내에 별도로 포장될 수 있다. 임의적인 제2 약물 후보물이 상기에서 제공된다.

[0229] 본 발명의 결합 분자 및 성장 인자 예컨대 NGF의 조합물의 상승작용적인 효과가 척수 손상 모델에 의해 생체 내에서 실현될 수 있다.

[0230] 본 발명은 본 발명의 결합 분자의 서방형 의약의 제조를 위한 본 발명의 제약 조성물의 용도에 또한 관련된다.

[0231] 본 발명은 손상 부위에서의 본 발명의 결합 분자의 국소적인 침착을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 제약 조성물의 용도에 또한 관련된다.

[0232] 추가로 본 발명은 본 발명의 결합 분자의 서방출 및 손상 부위에서의 본 발명의 결합 분자의 국소적인 침착을 위한 본 발명의 제약 조성물에 관한 것이다.

[0233] 본 발명은 본 발명의 결합 분자의 서방형 및 본 발명의 결합 분자의 국소적인 침착을 위한 방법에 또한 관련된다.

[0234] 하기의 실시예를 참조로 본 발명이 더욱 완전하게 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범주를 한정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0235] 하기의 실시예에서, 모든 온도는 섭씨 온도 (°C)이다.

[0236] 실시예에서 주목되는 모노클로날 항체는 서열 5로 표시되는 경쇄의 가변 영역 및 서열 4로 표시되는 중쇄의 가변 영역을 포함하는 본 발명에 따른 결합 분자 (6A3-IgG1), 또는 서열 25로 표시되는 경쇄의 가변 영역 및 서열 24로 표시되는 중쇄의 가변 영역을 포함하는 본 발명에 따른 결합 분자 (6A3-IgG4)이다.

[0237] 상기에서 제공된 단락들에서, 용어 "~를 포함하는"은 용어 "~로 구성되는"을 포함한다는 것이 명백하다.

[0238] 하기의 약자들이 사용된다:

- [0239] ELISA            효소 결합 면역흡착 분석법
- [0240] FACS            형광 활성화 세포 분류
- [0241] FITC            플루오레세인 이소티오시아네이트
- [0242] FBS            소 태아 혈청
- [0243] FCS            송아지 태아 혈청
- [0244] HCMV            인간 사이토메갈로바이러스 프로모터

[0245]	IgG	이뮤노글로불린 이소타입 G
[0246]	mAb	모노클로날 항체
[0247]	VH	중쇄의 가변 영역
[0248]	VL	경쇄의 가변 영역
[0249]	LC	경쇄
[0250]	HC	중쇄
[0251]	CDR	상보성 결정 영역
[0252]	BSA	소 혈청 알부민
[0253]	aa	아미노산
[0254]	bp	염기쌍
[0255]	CNS	중추 신경계
[0256]	HRP	양고추냉이 과산화효소
[0257]	RT	실온
[0258]	PBS	포스페이트-완충 염수
[0259]	TBS	트리스 완충 염수
[0260]	CEA	암종배아 항원
[0261]	IF	면역형광
[0262]	IgG	이뮤노글로불린 G
[0263]	PBS-T	포스페이트-완충 염수 + 0.05% 트윈(Tween) 20
[0264]	PFA	파라포름알데히드

[0265] **실시예**

[0266] 본 발명이 하기의 비제한적인 실시예에 의해 설명된다

[0267] **실시예 1:** 메다렉스(Medarex) 6A3 항-hu-NogoA 모노클로날 항체의 서열.

[0268] NogoA의 인간 NiG-단편에 대해 친화력이 높은 인간 IgG1 모노클로날 항체를 선별하였다. 인간 이뮤노글로불린 유전자를 지니는 재조합에 의해 재구성된 "메다렉스 마우스" (Medarex Inc. (Annandale, NJ))를 사용하여 표준 하이브리도마 기술에 의해 유도된 마우스 하이브리도마 세포 클론으로부터 원형(original) 모노클로날 항체가 분리되었다. 인간 NiG로 면역화된 메다렉스 마우스의 생성, 및 이의 하이브리도마의 생산은 당업계에 주지되어 있다; WO 2005/028508에 기술된 것과 유사한 조건을 따랐다. 대부분의 하이브리도마의 항체 생산 수준이 매우 낮았다; 따라서 재조합 DNA 기술을 이용하여, 세포주에서의 전체 항체 또는 Fab-단편의 고수준 생산을 위한 특수 발현 벡터를 구축하였다. 정제된 Ab 및 Ab의 Fab 단편의 생성이 주지되어 있고, 예를 들어 WO 2005/028508에 상세하게 기술되어 있다. 유사한 단계들을 따라서, 정제된 6A3-mAb 및 6A3-Fab를 생성시켰다.

[0269] 6A3-IgG1 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 하이브리도마 mRNA로부터 PCR (중합효소 연쇄 반응)에 의해 증폭시키고, 클로닝하고, 서열분석에 의해 특성화하였다 (도 1 및 2; 서열 7 및 6).

[0270] **실시예 2:** Fab 및 IgG4 생성.

[0271] 6A3 mAb는 IgG1 이소타입이다. 인간 IgG1 이소타입 항체는 세포 Fc 수용체에 대한 친화력이 높고, 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존적 세포독성 (CDC)을 유도할 수 있다 ([Jerries et al., 2002], [Hezareh et al., 2001]). 또한, IgG mAb는 Fc 수용체-매개 역-트랜스사이토시스(reverse transcytosis)를 통해 혈액-뇌 장벽을 가로질러 뇌에서 혈액으로 신속하게 유출되는 것으로 보고되었다 ([Zhang et al., 2001]). 6A3 IgG1 mAb의 잠재적인 Fc 수용체-매개 상호작용을 제거하기 위해, 재조합에 의해 이의 이소타입을 IgG4로 전환시켰고,

이는 또한 SP2/0 세포 및 대장균에서의 고용량 발현을 위한 1가 Fab 단편의 재조합 생산을 위한 것이었다.

[0272] 이러한 인간 항-Nogo-A 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인의 서열분석은 고용량 생산자 세포주에서의 6A3-Fab 단편 및 6A3-IgG4 이소타입 항체의 재조합 생산을 가능하게 하였다.

[0273] Fab 단편의 대장균 발현을 위해, 양쪽 모두의 cDNA (서열 7 및 서열 6)을 pASK116 내로 클로닝하였다. cDNA를 클로닝하는데 사용된 이러한 플라스미드는 마우스 IgG1/ $\kappa$ 의 불변 도메인 유전자를 제공한다 ([Skerra, 1994]). 항체 단편의 2개의 폴리펩티드 사슬은 테트라사이클린 프로모터의 전사 제어 하에 있는 오픈된 상에 코딩된다. 첫번째 시스트론은 Fab 단편의 중쇄 모이어티를 코딩한다. VH 도메인이 이의 N-말단에서 OmpA 신호 펩티드에, 이의 C-말단 끝부분에서 뮤린 클래스 IgG1의 CH1 도메인에 융합되었다. 두번째 시스트론은 PhoA 리더 펩티드 및 뮤린 CH1 도메인에 융합된 VL 도메인의 경쇄를 코딩한다. 발현 유도시, Fab 단편의 2개의 사슬이 대장균의 원형질막공간 내로 동시에 분비되게 되고, 여기에서 단백질 폴딩(folding), 디설피드 결합 형성 및 사슬 어셈블리가 발생하였다. 대장균에서의 Fab의 발현을 위해, 플라스미드들을 대규모 생산을 위해 BMP로 옮겼다.

[0274] SP2/0 세포에서의 IgG4 항체의 발현을 위해 6A3 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 클로닝하기 위해, 상응하는 cDNA들을 플라스미드 LCvec-AAL160 및 hcMCPfin 내로 클로닝하였다. IgG4 전장 항체의 발현을 위해, 플라스미드들을 LC 구축물은 NotI으로, HC 구축물은 PvuI으로 선형화시키고, SP2/0 세포 내로 형질감염시켰다.

[0275] his-태그(tag)가 있는 6A3 IgG4 및 6A3 Fab 1가 단편이 성공적으로 생산 및 정제되었다. 이러한 재조합 항체들은 BIAcore 실험 (하기 참조)에서 인간 NogoA 단편 hNiG에 대한 높은 친화력을 나타낸다. 0.14 nM 및 1.1 nM의 각각의 Kd 값은 인간 NogoA 단편 hNiG에 대한 높은 친화력을 유지하는 Ab의 올바르게 성공적인 클로닝 및 재조합 발현을 입증한다.

[0276] 6A3-Ig4의 중쇄 및 경쇄의 코딩 영역 및 아미노산 서열이 도 3 및 4에서 제시된다 (서열 24, 25, 28 및 28).

[0277] **실시예 3:** 6A3-Ab의 상보성 결정 영역의 결정.

[0278] 6A3-항체의 가변 중쇄 및 경쇄의 상보성 결정 영역을 웹사이트 [www.bioinf.org.uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs/) URL의 카바트(Kabat) 데이터베이스를 사용하여 결정하였다. 카바트 정의는 서열 가변성을 기초로 하고, 항체 가변 영역의 CDR을 결정하기 위해 가장 통상적으로 사용되는 방법이다 ([Wu TT, Kabat EA, 1970]).

[0279] CDR 앞의 전형적인 잔기는 LEWIG이어야 하는데 LEWVA가 발견된 CDR-H2를 제외하고는, 6개 모두의 CDR 정의가 실험에 의해 결정된 아미노산 서열과 잘 상관되었다 (도 5). 그러나, CDR-H2에 대해 다수의 변동이 가능하다.

[0280] **실시예 4:** NiG에 대한 마우스 6A3-IgG1, 6A3-IgG4 및 6A3 Fab의 바이오센서 친화력 측정

[0281] 마우스 6A3-IgG1 mAb, 6A3-IgG4 mAb, 및 6A3 Fab의 친화력을 제조사의 설명서에 따라 BIAcore 2000 광학 바이오센서 (Biacore (Uppsala, Sweden))를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 측정하였다. 아민-커플링 화학을 사용하여 CM5 센서 칩의 유동 세포 상에 재조합 인간 NiG를 공유결합으로 고정하였다. 간략하게, 0.025 M NHS 및 0.1 M EDC를 함유하는 용액 35  $\mu$ l를 주입함으로써 카르복시메틸화 텍스트란 매트릭스를 활성화시켰다. 센서 칩 상에서의 고정을 위해, 재조합 인간 NiG를 0.01 M 시트레이트 완충제 (pH 4) 내에 희석하고, 5  $\mu$ l/분의 유속으로 주입하여, 친화력 측정을 허용하는 커플링 수준을 달성하였다. 35  $\mu$ l의 1 M 에탄올아민 하이드로클로라이드 (pH 8.5)의 주입에 의해 나머지 NHS-에스테르 기의 비활성화를 수행하였다. 5  $\mu$ l 0.1M HCl을 주입함으로써 센서 칩의 표면을 재생시켰다. 친화력 측정을 위해, 항체들을 0.50 nM 내지 100 nM 범위의 여러 농도로 200  $\mu$ l/분의 유속으로 주입하였다. 각각의 주입 후, 표면 상의 결합 활성의 손실 없이 10  $\mu$ l 0.1 M HCl의 주입에 의해 센서 칩 표면을 재생시켰다. 제조사에 의해 공급되는 BIAevaluations 3.0 소프트웨어를 사용하여 반응 속도 상수 ka 및 kd, 및 친화력 상수 KA 및 KD를 평가하였다.

[0282] BIAcore에서의 친화력 측정: 재조합 인간 NogoA에 대한 마우스 6A3-IgG1 mAb, 6A3-IgG4 mAb, 및 6A3에서 유래된 1가 Fab 단편의 반응 속도 상수 및 친화력 결합 상수를 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술 (Biacore)을 사용하여 실시간으로 측정하였다. 이러한 분석을 위해, 재조합 인간 NiG를 센서 칩 표면 상에 커플링시키고, 여러 농도의 항체들을 주입하였다. 비-선형 곡선 피팅(fitting)에 의해 센소그램(sensogram)으로부터 결합 상호작용의 반응 속도 파라미터가 유래되었다. 인간 NiG에 대한 평형 시의 항체들의 친화력 상수는 6A3-IgG4, 6A3-IgG1, 6A3 Fab에 대해 KD 0.13 nM 내지 2.5 nM의 범위 내였다.

[0283] **실시예 5:** 인간 NogoA에 대한 항-NogoA 항체 NVP-6A3-Ab-NX-1 및 NVP-IIC7-NX-1의 결합.

[0284] 본 실시예에서, 내인성 인간 Nogo-A에 대한 항체의 결합이 제시된다. 이를 위해, Nogo-A의 올리고덴드라이트-

특이적 발현을 나타내는 것으로 기존에 특성화된 2개의 인간 세포주가 테스트되었고, 이어서 항체의 특이적 결합에 대해 테스트되었다. 인간 희소돌기아교세포 세포주 MO3.13 및 HOG가 본 발명가들의 2개의 항-Nogo-A 항체 NVP-6A3-Ab-NX-1 (6A3-Ab) 및 NVP-IIC7Ab-NX-1 (IIC7-Ab)를 내인성 Nogo-A에 대한 이들의 결합에 관하여 특성화하는데 사용되었다. 이러한 세포들은 임상 실험을 위한 또다른 항체 배치(batch)의 특성화를 위한 바이오어세이를 개발하는데 추가로 사용될 수 있다. 2개의 독립적인 실험 설정에서, 이러한 세포 내의 내인성 인간 Nogo-A에 대한 6A3-Ab의 결합이 분석 및 검출되었다.

[0285] 첫번째 설정에서는, 인간 Nogo-A에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR에 의해 Nogo-A mRNA의 존재에 대해 MO3.13 세포가 분석되었다. 두번째로, MO3.13 세포 용해물의 면역침전 및 면역검출에 의해 내인성 Nogo-A에 대한 양쪽 항체의 결합이 제시되었다. 마지막으로, MO3.13 및 HOG 세포와 6A3-Ab의 특이적 면역형광 염색으로 면역침전으로부터의 결과가 확증되었다.

[0286] 따라서, 6A3-AB 및 11C7-Ab 양쪽 모두 내인성 인간 Nogo-A에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 발견되었다.

[0287] 방법

[0288] 세포주: N. Cashman 박사 (University of Toronto)로부터 MO3.13 세포를 수득하였다. 이는 수술 검사물로부터 배양된 인간 희소돌기아교세포와 인간 횡문근육종 (RD)의 6-티오구아닌-저항성 돌연변이체의 융합물로부터 유래되었다. HOG 세포는 G. Dawson 박사 (University of Chicago)로부터 수득하였다. 이러한 세포주는 수술로 제거된 희소돌기아교세포종으로부터 확립되었다. 모든 세포들을 글루타맥스(Glutamax), 10% 송아지 태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 고-글루코스 돌베코 변형 이글 배지 (Gibco)에서 배양하였다

[0289] RT-PCR: 5×10<sup>5</sup>의 MO3.13 세포로부터 트리퓨어(Tripure) 시약 (Roche Diagnostics)을 사용하여 전체 RNA를 프랩(preparation)하였다. DNase 처리 후, 1 μg의 RNA를 20 μl의 전체 부피로 옴니스크립트(Omniscrypt) RT (Qiagen) 및 올리고dT-프라이머를 사용하여 역전사시켰다. PCR에 사용된 프라이머는 Nogo-A에 대해 특이적이고, 전장 인간 Nogo-A 내의 위치 1197에서 시작하는 194 bp 단편을 증폭시킨다 (5'-TGAGGGAAGTAGGGATGTGC-3' (서열 32), 5'-CAGGTGATGTACGCTCTGGA-3' (서열 33)). 2 μl cDNA (또는 0.1 μg RNA-RT), 5 μl 10× 완충제, 3 μl dNTP (각각 5 mM), 2.5 μl 5' 프라이머 (10 μM), 2.5 μl 3' 프라이머 (10 μM), 0.5 μl 핫스타(HotStar) Taq-중합효소 (Qiagen) 및 34.5 μl H2O를 사용하여 반응을 설정하였다. 하기의 PCR 사이클이 사용되었다: 95°C 15분, (94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 15초)×35, 72°C 10분 → 4°C. PCR 완료 후, 10 μl 분취량을 2% 에티뮴 브로마이드 아가로스 겔 상에서 분석하였다.

[0290] 면역침전 및 면역검출: 각각의 IP를 위해, 전면성장(confluency)으로 성장된 MO3.13 세포의 직경 10 cm의 배양 접시 1개를 PBS로 세정하고, 세포를 완전 프로테아제 억제제 카테일 (Roche Diagnostics)을 함유하는 M-PER 포유류 단백질 추출 시약 (Pierce) 500 μl 내에 용해시켰다. 용해물의 가용성 분획을 단백질 G-세파로스 (Sigma)로 15분 동안 실온에서 예비-클리닝(pre-cleaning)하였다. 예비-클리닝된 상등액에, 신선한 단백질 G-세파로스 및 상응하는 항체 (50 nM 최종 농도)를 첨가하고, 4°C에서 4시간 동안 회전 진탕기 상에서 인큐베이션하였다. 항체는 6A3 IgG4, 11C7 IgG1, 또는 관련되지 않은 단백질 (암종배아 항원)에 대한 항-CEA IgG4 (음성 대조군 역할)였다. 각각의 상등액 분취량을 결합되지 않은 분획의 분석을 위해 보관하였다; 세파로스를 TNS 완충제 (10 mM 트리스HCl pH 7.8, 1% (w/v) N-라우릴사르코신, 100 mM NaCl)로 4회, PBS로 1회 세정하고, 세파로스에 결합된 분획을 20 μl SDS-PAGE 로딩(loading) 완충제 (Invitrogen)로 용출시켰다. 샘플을 95°C로 5분 동안 가열하고, 각각 10 μl 분취량을 MES-완충제 내의 NuPage 4-12% 구배 겔 (Invitrogen) 상에 러닝(running)시켰다. 단백질을 4시간 동안 30 V에서 셀룰로스 막 상으로 블롯팅시키고, 폰슈(Ponceau) 염색으로 완전한 전달에 대해 분석하였다. 전달 후, 막을 하룻밤 동안 4°C에서 PBS-T 내의 웨스턴 차단 시약 (Roche Diagnostics)에서 차단하였다. 면역검출을 위해, 막을 1 nM 농도의 6A3-IgG4 항체와 함께 2시간 동안 실온에서, 이어서 항-인간 과산화효소-커플링 2차 항체와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. ECL-어드벤스(Advance) (Amersham)를 사용하여 신호를 검출하고, 1분 동안 필름에 노출시켰다.

[0291] 면역형광: MO3.13 및 HOG 세포를 8-웰 폴리-D-라이신-코팅 조직 챔버 슬라이드 (Becton Dickinson)에 플레이팅하고, 80% 전면성장까지 성장시켰다. PBS에서 세정한 후, 세포를 4% PFA에서 30분 동안 실온에서 고정시켰다. 10% FCS, 0.1% 트리톤(Triton) X-100으로 20분 동안 비-특이적 결합을 차단하였다. 세포를 1% FCS, 0.1% 트리톤 X-100에서 1시간 동안 6A3-IgG4 5 nM 또는 음성 대조군으로서의 완충제 단독과 함께 인큐베이션하였다. 항체 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 3회 세정하고, PBS 내에 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488-표지 항-인간 IgG 항체 (Molecular Probes)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다.

- [0292] 결과
- [0293] RT-PCR: MO3.13 RNA를 주형으로 사용한 RT-PCR에서 약 200 bp의 독특한 DNA 단편이 생성되었다 (도 6). 음성 대조군에서는 생성물이 검출되지 않았다 (역전사 부재 하의 RNA 및 H2O). 194 bps의 예상 크기에 PCR 단편이 존재하였고, 음성 대조군 (DNAse-처리 RNA 및 H2O)에서는 생성물이 증폭되지 않았다.
- [0294] 면역침전: MO3.13 세포-용해물의 면역침전 (IP) 및 6A3 항 Nogo-A 항체로의 면역검출 후 (도 7), 예상 크기 (190 kDa)의 1개의 강한 밴드가 6A3-IgG4 (레인 4) 및 11C7-IgG1 (레인 6) 항체 양쪽 모두에 대해 검출되었다. 관련되지 않은 단백질 (암종배아 항원)에 대한 항-CEA 대조군 항체로의 IP 후 (레인 1), 및 결합되지 않은 분획에서 (레인 5 및 7), 신호가 검출되지 않았다. IP 전의 미정제 MO3.13 세포 용해물에서 희미한 밴드가 가시적이었다 (레인 2). 더 낮은 분자량에서의 희미한 비-특이적 신호가 불용성 세포-용해물 분획에서 보였다 (레인 3).
- [0295] 면역형광: 투과된 MO3.13 세포 및 HOG 세포의 6A3-IgG4 및 알렉사-플루오르 488-표지 항 인간 2차 항체로의 면역형광 염색에서 세포의 매우 밝은 염색이 초래된 반면 (도 8a 및 8b, 왼쪽 부분), 2차 항체만으로는 신호가 사실상 검출되지 않았다 (오른쪽 부분).
- [0296] 토론
- [0297] PCR을 위해 Nogo-A 특이적 프라이머를 사용한 MO3.13 세포의 RT-PCR 분석에서는 예상 크기 (194 bp)의 DNA 단편이 초래된 반면, 역전사되지 않은 RNA 샘플 또는 물 대조군으로는 PCR 생성물이 검출되지 않았다. 이러한 결과로부터, 본 발명가들은 세포가 내인성 Nogo-A를 발현하는 것으로 결론지었다.
- [0298] MO3.13 세포 용해물로부터의 면역침전 및 항-Nogo-A 항체 6A3로의 면역검출은 예상 크기 (190 kDa)의 1개의 강한 Nogo-A 밴드를 나타냈다. 대조적으로, 항-CEA (IgG4) 대조군 항체에서는 상응하는 크기의 밴드가 산출되지 않았다. 6A3 및 11C7 면역침전으로부터 초래된 밴드들 간의 강도 차이는 아마도 단백질 G 세포파로스에 대한 상이한 항체 이소타입들의 상이한 친화력 (친화력 6A3 > 친화력 11C7)으로 인한 것 같다. MO3.13 세포 및 HOG 세포 양쪽 모두의 세포내 면역형광 염색으로부터의 결과는 6A3-IgG4가 내인성 Nogo-A에 결합한다는 것을 나타냈다.
- [0299] 이러한 결과들로부터, 2개의 세포주가 Nogo-A를 내인성으로 발현하고, 6A3 IgG4 (6A3-Ab) 항체 및 11C7 IgG1 (11C7-Ab) 항체 양쪽 모두 내인성 인간 Nogo-A에 특이적으로 결합하는 것으로 결론지어졌다. 이러한 발견들은 MO3.13 세포주가, 예를 들어 항체 특성화를 위해, Nogo-A 결합 분석법을 확립하는데 사용될 수 있다는 것을 시사한다.
- [0300] **실시예 6:** 뇌 손상을 입은 짧은꼬리 원숭이의 기능 회복에 대한 6A3 치료의 효과.
- [0301] 추가적인 연구에서, 짧은꼬리 원숭이에 기존에 기술된 손상을 입히고, 병변 시점으로부터 4주 동안 6A3 또는 대조군 IgG의 수막강내 주입으로 치료하였다. 영향을 받은 왼쪽 손에 대한 손재주를 본원에서 앞서 기술된 바와 같은 조건 하에 변형 브링크만 보드 테스트를 사용하여 결정하였다. 6A3 치료는 대조군 IgG 치료에 비해 기능 회복의 속도 및 정도를 개선시켰다. 실험 말기에 병변의 크기를 결정했을 때, 대조군 IgG로 치료된 원숭이의 기능 회복은, 50% 병변에 대한 90%에서 90% 병변에 대한 53%까지로 변하면서, 대략적으로 병변 크기와 반비례로 상관되는 것으로 발견되었다. 반대로, 항-Nogo-A mAb로 치료된 동물에서의 회복량은 병변 크기에 유의하게 영향을 받지 않았고, 6A3로 치료된 동물에 대해서, 병변 크기가 85%로 높은 경우에도 병변 전의 성과에 거의 도달하였다.
- [0302] **실시예 7:** 인간 대상에서의 6A3 항체의 CSF 유지 및 반감기
- [0303] 14일 동안의 CSF 주입 (15 mg/일 용량의 매일 주입) 후 인간 대상에서의 6A3 항체의 CSF 유지 및 반감기를 결정하였고, 개별적인 농도를 혈청 및 CSF에서 측정하였다 (도 9 및 10).
- [0304] 주입 기간 동안 측정된 수준과 비교하여, CSF 농도가 일정하게 유지되거나 매우 약간만 감소하였고, 2가지 사례에서는 제34일 및 제56일, 즉 최종 주입 후 약 20일 및 42일까지 지속되었으며, 이는 6A3의 CSF 내에서의 의외로 긴 거주 및/또는 반감기를 가리킨다. 이러한 약동학적 거동은 더 긴 간격으로의 상이한 투여 경로 및 용량 요법을 가능하게 할 것이다. 2일 이상 또는 수주의 간격 동안의 CSF 내로의 블루스 주사가 실행가능할 것이다. 6A3 항체는 제어 방출 제형, 예컨대 생분해성 또는 비-생분해성 중합체 및 이식물 내의 제형에 또한 적절할 것이다.

- [0305] **실시예 8:** 짧은꼬리 원숭이 SCI 모델에서의 효율
- [0306] 3마리의 원숭이에게 정확한 미세한 손가락 동작의 생성을 불구로 만드는 것으로 알려진 손상인, C7/C8 경계에서의 척수의 일측성 절개를 적용하고, 마우스 IgG 항체 (대조군 동물) 또는 6A3 항체 (치료 동물)를 4주 동안 1 mg/일의 용량으로 병변 부위로 수막강내 전달하는 삼투압 알젯(Alzet)® 펌프를 이식하였다 (도 11 및 [Freund et al., Nat Med 12:7 90-2, 2006]). 변형 브링크만 보드 테스트에서 수직 및 수평 슬롯으로부터의 음식물 펠렛 검색(retrieval)에 의해 손재주를 평가하였다. 또다른 행동 과제는 서랍으로부터의 음식물 펠렛 검색, 볼리스틱(ballistic) 팔 운동, 음식물을 붙잡기 위한 발 운동, 및 통증 및 불편에 대한 행동 관찰을 포함한다. 병변 전 60일부터 병변 후 120일까지 규칙적인 간격으로 테스트를 수행하였다.
- [0307] 원숭이에게 일측성 척수 절개를 적용하고, 4주 동안 1 mg/일 용량의 마우스 IgG 대조군 항체 (n=2, 즉 50% 병변의 대조군 1 및 90% 병변의 대조군 2) 또는 6A3 (n=2, 즉 85% 병변의 ATI1 및 80% 병변의 ATI2)으로 수막강내 치료하였다 (원숭이 체중: 대조군 1, 5.1 kg, 대조군 2, 4.1 kg, ATI 1, 5.0 kg, ATI 2, 4.5 kg). 결과는 특정 실험 일의 테스트 기간 동안의 펠렛의 총 개수로 표시된다. 성과 수준이 안정적으로 유지되었을 때의 병변 전 및 병변 후의 개별적인 행동 점수를 사용하여 값들을 계산하였다.
- [0308] 대조군 IgG로 치료된 원숭이와 비교하여, 원숭이에서의 6A3 항체 치료는 영향을 받은 왼쪽 손을 사용하는 수평 및 수직 슬롯으로부터의 음식물 펠렛 검색에서 점진적인 개선을 제공하였다. 대조군 원숭이는 수직 슬롯으로부터의 검색보다 더 나은 손재주를 필요로 하는 운동인 수평 슬롯으로부터의 펠렛 검색에서 전체적인 지속적인 결핍을 나타냈다.
- [0309] 브링크만 보드 테스트에서 회복이 최대 수준에 도달한 후, 원숭이들을 영향을 받은 왼쪽 손으로 서랍 손잡이를 붙잡는 능력, 이를 잡아당겨 여는 능력 및 서랍 내의 웰(well)로부터 음식물 펠렛을 뽑아내는 능력에 대해 테스트하였다. 대조군 IgG로 치료된, 90% 병변이 있는 원숭이 (대조군 2)는 전적으로 손잡이를 붙잡아 서랍을 열 수 없었다. 팔 운동이 정상보다 더 느렸고, 손 형태만들기가 비정상적이었다. 이는 병변 전의 활성화와 병변 및 대조군 IgG 항체로의 치료 후의 활성화 간의 뚜렷한 차이를 가리키는 이중 화살선으로부터 추론될 수 있고, 이는 오직 부분적인 회복만을 가리킨다. 6A3 항체로 치료된, 85% (ATI-1) 또는 80% (ATI-2) 병변이 있는 동물은, 병변 크기와 관계 없이, 신속하게 및 효율적으로 과제를 수행하는 능력을 회복하였다. 병변 전의 활성화와 병변 후 6A3 항체로 치료되었을 때의 활성화에 실질적인 차이가 없고, 이는 6A3 항체 치료로 인한 완전한 회복을 가리킨다. 따라서, IgG 대조군 항체 치료와 비교하여, 6A3 항체 치료가 짧은꼬리 원숭이에서의 뇌 손상 유도 후 회복에 대해 뚜렷한 이로운 효과를 제공한다.
- [0310] **실시예 9:** 임상 실험
- [0311] 적절한 임상 연구가 하기와 같이 기술된다:
- [0312] 연구에는 3개의 단계가 있다: 스크리닝 단계 (기준선 포함), 공개형(open-label) 치료 단계 및 22주 이상의 추적 단계. 독립적인 데이터 안정성 모니터링 위원회 협회 보드 (DSMB (Data Safety Monitoring Board))의 관리하에 연구가 수행된다.
- [0313] 총 22명의 환자가 4개의 부분적으로 중첩되는 순차적인 코호트에 등록되어, 6A3 항체의 연속적인 주입을 제공받았다. 모든 환자를 추가적인 안정성 평가를 위해 22주 이상 동안 추적하였다.
- [0314] 코호트에 의한 환자 배분 및 치료 용량 및 기간은 하기와 같았다:
- [0315] · 코호트 1: 3명의 하반신마비 환자에게 24시간에 걸쳐 5 mg [2.5 ml 부피]을 제공한다;
  - [0316] · 코호트 2: 3명의 하반신마비 환자에게 24시간에 걸쳐 30 mg [2.5 ml 부피]을 제공한다;
  - [0317] · 코호트 3: 6명의 하반신마비 환자에게 14일에 걸쳐 30 mg/일 [2.5 ml/일 부피] 이하를 제공한다;
  - [0318] · 코호트 4: 10명의 하반신마비 및 사지마비 환자에게 28일에 걸쳐 30 mg/일 [2.5 ml/일 부피] 이하를 제공한다.
- [0319] 주입 시작 후 6개월 이상의 기간 동안 환자를 면밀히 모니터링하였다. 활력 징후 측정, ECG 기록 (중앙 시설에 의한 해석), 및 혈액, 소변 및 CSF 시료를 기초로 하는 실험실 평가에 의해 환자의 상태를 면밀히 모니터링하였다. 유자격 임상의로 인해 ASIA 척도 (미국 척수 손상 협회(American Spinal Injury Association)의 척수 손상의 적용가능한 표준 신경학적 분류(Applicable Standard Neurological Classification of Spinal Cord Injury)) ([Ditunno, et al, 1994; American Spinal Cord Injury Association. Paraplegia 32(2): 7080])를

사용하는 신경학적 시험을 수행하여, 효능을 평가할 뿐만 아니라 척수 손상의 잠재적인 악화를 평가하였다. 총 4회의 대뇌 및 척수 MRI를 각각의 환자에게 수행하였다. 그후, 약동학 (PK) 분석을 위해 각각의 환자로부터 3회의 시점 (투약 전, 치료 단계 동안, 및 추적 단계 동안)에 CSF 샘플을 취득하였다. 치료 단계 및 추적 단계 동안 PK 분석을 위해 혈액 샘플을 또한 수득하였다. 모든 환자로부터의 데이터가 프로토콜에 따라 독립적인 DSMB에서 검토되었다.

도면

도면1

```

ATG GAA GCC CGA GCT CAG GTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA GAT ACC ACC GGA
M E A P A Q L L F L L L L L W L P D T T G

GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T

CTC TCC TGC AGG GGC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CCA CAG AAA CCT
L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K F

GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT CCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC
G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A

AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT
R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P

GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CCT AGC AAC TGG CCG ATC ACC TTC GGC CAA
E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q

GGG ACA CGA CTG CAG ATT AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA
G T R L E I K R T V A A P S V F I F P F

TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
S D E Q L K S G T A S V V C L L H N F Y

CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG
P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q

GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G

CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG
L S S P V T K S F N R G E C
    
```

도면2

```

ATG GAG TTT GGG CTG AOC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA GAA GGT GTC CAG TGT GAG
M E F G L S W V P L V A I L E G V Q C E

GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC
V Q L V E S G G G L V Q P G G S L E L S

TGT GCA GCT TCT GGA TTC ACC TTT AGT AAC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCG
C A A S G F T F S N Y W M S W V E Q A P

GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC ACC ATA AAG CAA GAT GGA AGT CAG AAA AAC TAT GTG
G K G L E W V A T I K Q D S S Q E N Y V

GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG
D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L

GNA TTG AAC AGC CTG AGA GGC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GAA CTC TTC
R L N S L R A E D T A V Y Y C A T E L F

GAT CTC TGG GGC GGT GGC TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG
D L R G R G S L V T V S S A S T K G P S

GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GGG GGC CTG GGC TGC
V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C

CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG AAG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC
L V K D Y P P E P V T V S W N S G A L T

AGC GGC GTG GAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA GAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC
S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S

GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTA GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC
V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H

AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT GAC
K P S N T K V D K E V E P K S C D K T H

ACA TGC CCA CCG TGC CCA TAA
T C P P C P
    
```

도면3

경쇄 가변부의 DNA 서열:

```

gaaatggtgacacagctccagccacctgtcttgtctccaggggaaagagccaccctctctgcagggcc
agtcagagtgtagcagctacttagcctggtaaccaacagaaaacctggccaggctccaggctctcatatgat
gcatccaacagggccaactggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggacagacttcaactcaccat
cagcagcctagagcctgaagatttgcagttattactgtcagcagcgtgcaactggccgatcactctggcca
agggacaagcttgaatcaaa
    
```

중쇄 가변부의 DNA 서열:

```

gaggtgcagctggaggctctggggaggcttggccaacctgggggtccctgagactctctgtgcagcttct
ggattcaccttagtaactatggatgagctgggtccgaggtccggggaaagggctggagtggtggccac
cataaagcaagatggaagtcagaaaaactatgtggactctgtgaagggccgattcaccatccaagagaaa
cgccaagaaactcactgtatctgagattgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgact
aactcttgatctctggggcctggctccctggctaccgtctctca
    
```

**도면4**

리더 서열을 포함하는, 6A3-IgG4 경쇄 가변부 및 불변부:

리더 **CDRL-1**  
MSVLTQVLALLLWLTGTRCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA  
 WY

**CDRL-2**

**CDRL-3**  
 QQKPGQAPRLLIY**DASNR**RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQ**  
**RSN**

**Cκ**  
**WP**ITFGQG**T**KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC

리더, CH1, 힌지 영역, CH2 및 CH3을 포함하는, 6A3-IgG4 중쇄의 완전한  
 아미노산 서열:

리더 **CDR-H1**  
MAWVWTLPLFLMAAAQSVQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNY**  
**WM**

**CDR-H2**  
**SW**V**R**QAPGKGLEW**V**ATIK**QDGSQ**KNYVDS**V**KGRFTISRDN**A**KN**S**LYLRLNSLR  
**AE**

**CDR-H3**  
 DTAVYYC**A**TE**LF**DLWGRGSLVT**V**SS

**CH1**  
 ASTKGPSV**F**PLAPCSRSTSE**S**TAA**L**GCLVKDYFPEP**V**TV**S**W**N**SGAL**T**SG**V**H**T**F  
**PAV** 힌지  
 LQSSGLY**S**LS**S**V**T**VPSS**L**GT**K**TY**T**C**N**VD**H**K**P**S**N**T**K**V**D**K**R**V  
**ES**K**Y**GP**P**C**P**S**C**P

**CH2**  
**A**PE**F**LG**G**PS**V**FL**F**PP**K**PK**D**TL**M**IS**R**TPE**V**TC**V**W**V**D**S**Q**E**D**P**EV**Q**FN**W**Y**V**D**G**VE  
**V**HN**A**KT**K**PRE**E**Q**F**N**S**TY**R**V**V**SV**L**TV**L**H**Q**D**W**LN**G**KEY**K**CK**V**SN**K**GL**P**SS**I**E**K**T**I**S  
**KAK**

**CH3**  
**G**Q**P**RE**P**Q**V**Y**T**LP**P**S**Q**E**M**T**K**N**Q**V**S**LT**C**L**V**K**G**F**Y**PS**D**IA**E**W**E**S**N**G**Q**P**E**NN**Y**K  
**T**TP**P**VL**D**SD**G**S**F**FL**Y**S**R**LT**V**DK**S**R**W**Q**E**GN**V**F**S**C**S**V**M**HE**A**L**H**N**H**Y**T**Q**K**S**L**S**L**  
**GK**

도면5

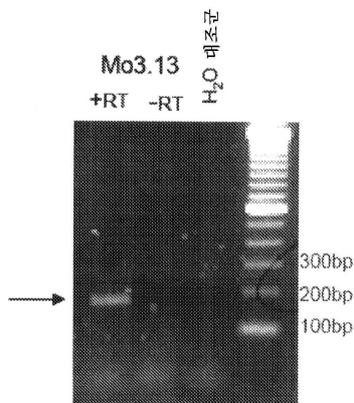
6A3-IgG1 경쇄 (CDR 포함):

리더  
M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G  
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T  
 CDR-L1  
L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P  
 CDR-L2  
G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A  
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
 CDR-L3  
E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q  
 G T R L E I K R T V A A P S V F I F P P  
 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y  
 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T  
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
 L S S P V T K S F N R G E C

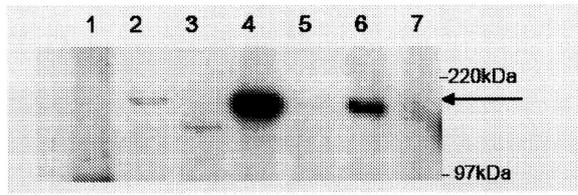
6A3-IgG1 중쇄 (CDR 포함):

리더  
M E F G L S W V F L V A I L E G V Q C E  
 V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S  
 CDR-H1  
C A A S G F T F S N Y W M S W V R Q A P  
 CDR-H2  
G K G L E W V A T I K Q D G S Q K N Y V  
 D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L  
 CDR-H3  
R L N S L R A E D T A V Y Y C A T E L F  
D L W G R G S L V T V S S A S T K G P S  
 V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C  
 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T  
 S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S  
 V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H  
 K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H  
 T C P P C P

도면6



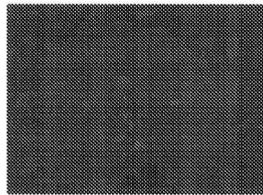
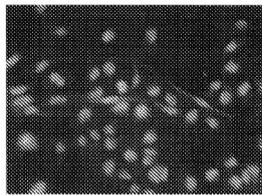
도면7



도면8

도 8a  
MO3.13 세포

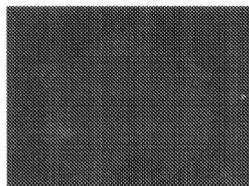
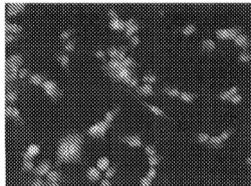
5mM 6A3  
IgG4



2차 항체  
단독

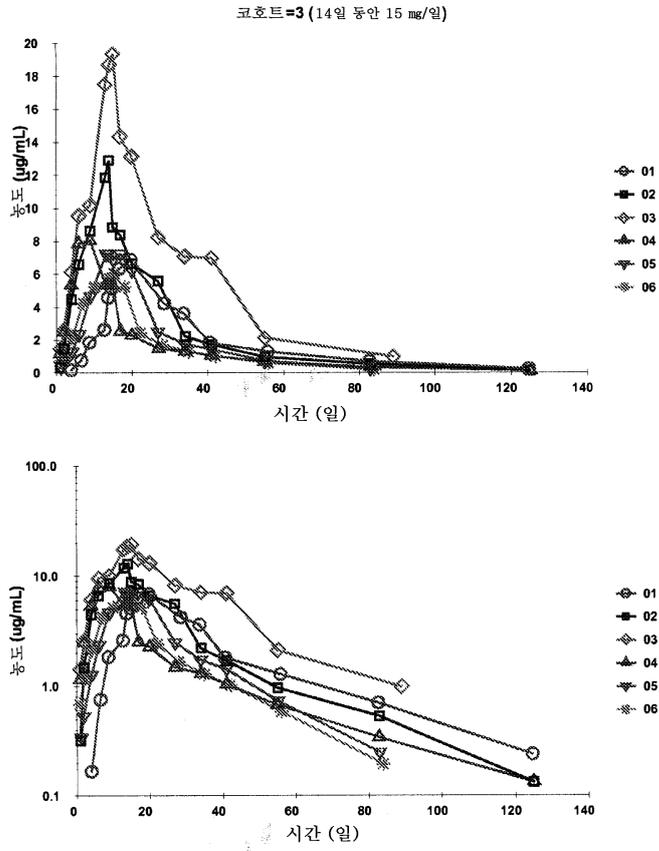
도 8b  
HOG 세포

5mM 6A3  
IgG4

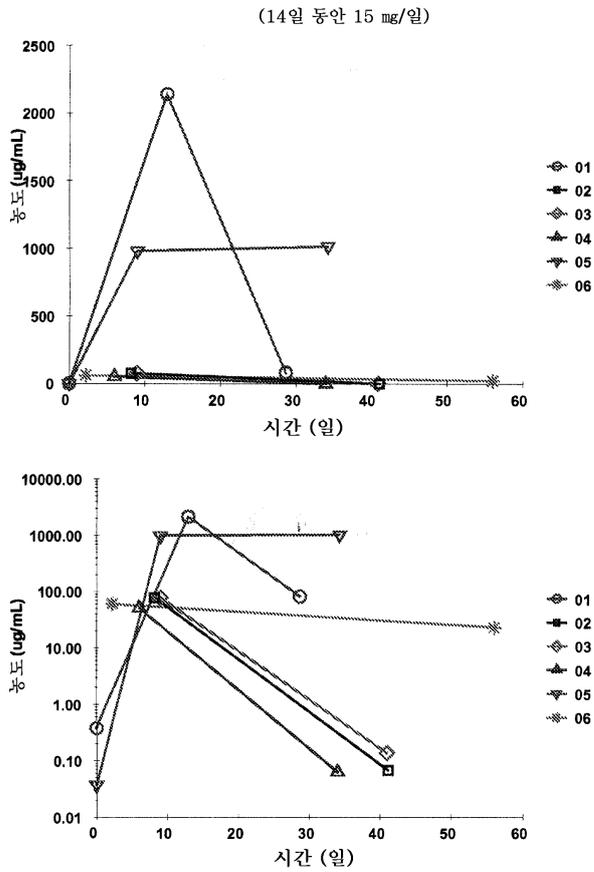


2차 항체 단독

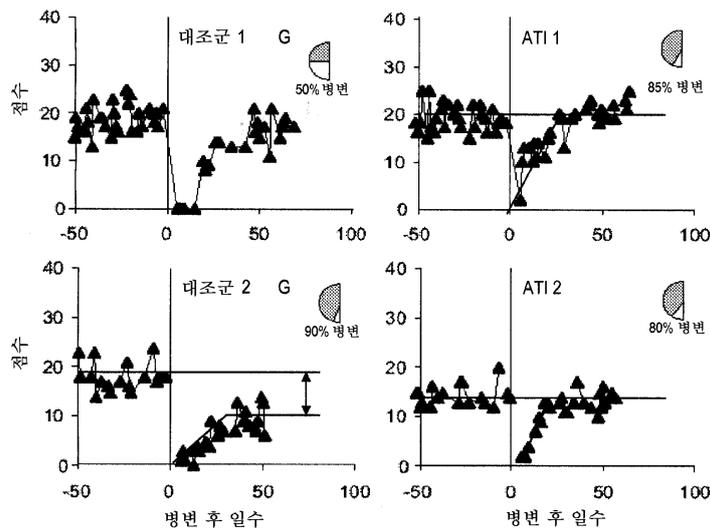
도면9



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS A.G.

University of Zurich

<120> Improved NOGO-A binding molecules and pharmaceutical use thereof  
 <130> NIAG-006-PCT  
 <150> 61/001,741  
 <151> 2007-11-02  
 <150> EP07119847.7  
 <151> 2007-11-02  
 <160> 33  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 3919  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(3579)  
 <223> Human NogoA  
 <400> 1

atg gaa gac ctg gac cag tct cct ctg gtc tcg tcc tcg gac agc cca 48

Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro  
 1 5 10 15

ccc cgg ccg cag ccc gcg ttc aag tac cag ttc gtg agg gag ccc gag 96

Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu  
 20 25 30

gac gag gag gaa gaa gag gag gag gaa gag gag gac gag gac gaa gac 144

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp

35 40 45

ctg gag gag ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc gcc gcc ggg ctg tcc 192

Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser  
 50 55 60

gcg gcc cca gtg ccc acc gcc cct gcc gcc ggc gcg ccc ctg atg gac 240

Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp  
 65 70 75 80

ttc gga aat gac ttc gtg ccg ccg gcg ccc cgg gga ccc ctg ccg gcc 288  
 Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala  
                   85                  90                  95  
 gct ccc ccc gtc gcc ccg gag cgg cag ccg tct tgg gac ccg agc ccg 336  
 Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro  
                   100                  105                  110  
 gtg tcg tcg acc gtg ccc gcg cca tcc ccg ctg tct gct gcc gca gtc 384  
  
 Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Val  
                   115                  120                  125  
 tcg ccc tcc aag ctc cct gag gac gac gag cct ccg gcc cgg cct ccc 432  
 Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro  
                   130                  135                  140  
 cct cct ccc ccg gcc agc gtg agc ccc cag gca gag ccc gtg tgg acc 480  
 Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr  
  
 145                  150                  155                  160  
 ccg cca gcc ccg gct ccc gcc gcg ccc ccc tcc acc ccg gcc gcg ccc 528  
 Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro  
                   165                  170                  175  
 aag cgc agg ggc tcc tcg ggc tca gtg gat gag acc ctt ttt gct ctt 576  
 Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu  
                   180                  185                  190  
  
 cct gct gca tct gag cct gtg ata cgc tcc tct gca gaa aat atg gac 624  
 Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp  
                   195                  200                  205  
 ttg aag gag cag cca ggt aac act att tcg gct ggt caa gag gat ttc 672  
 Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe  
                   210                  215                  220  
 cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gct tct ctt cct tct ctg tct cct 720  
  
 Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro  
 225                  230                  235                  240  
 ctc tca gcc gct tct ttc aaa gaa cat gaa tac ctt ggt aat ttg tca 768

Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser  
                           245                          250                          255  
 aca gta tta ccc act gaa gga aca ctt caa gaa aat gtc agt gaa gct 816  
 Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala  
                           260                          265                          270  
 tct aaa gag gtc tca gag aag gca aaa act cta ctc ata gat aga gat 864  
 Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp  
                           275                          280                          285  
 tta aca gag ttt tca gaa tta gaa tac tca gaa atg gga tca tcg ttc 912  
 Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe  
                           290                          295                          300  
  
 agt gtc tct cca aaa gca gaa tct gcc gta ata gta gca aat cct agg 960  
 Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg  
 305                          310                          315                          320  
 gaa gaa ata atc gtg aaa aat aaa gat gaa gaa gag aag tta gtt agt 1008  
 Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser  
                           325                          330                          335  
 aat aac atc ctt cat aat caa caa gag tta cct aca gct ctt act aaa 1056  
  
 Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys  
                           340                          345                          350  
 ttg gtt aaa gag gat gaa gtt gtg tct tca gaa aaa gca aaa gac agt 1104  
 Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser  
                           355                          360                          365  
 ttt aat gaa aag aga gtt gca gtg gaa gct cct atg agg gag gaa tat 1152  
 Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr  
  
                           370                          375                          380  
 gca gac ttc aaa cca ttt gag cga gta tgg gaa gtg aaa gat agt aag 1200  
 Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys  
 385                          390                          395                          400  
 gaa gat agt gat atg ttg gct gct gga ggt aaa atc gag agc aac ttg 1248  
 Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu

405	410	415	
gaa agt aaa gtg gat aaa aaa tgt ttt gca gat agc ctt gag caa act			1296
Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr			
420	425	430	
aat cac gaa aaa gat agt gag agt agt aat gat gat act tct ttc ccc			1344
Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro			
435	440	445	
agt acg cca gaa ggt ata aag gat cgt tca gga gca tat atc aca tgt			1392
Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys			
450	455	460	
gct ccc ttt aac cca gca gca act gag agc att gca aca aac att ttt			1440
Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe			
465	470	475	480
cct ttg tta gga gat cct act tca gaa aat aag acc gat gaa aaa aaa			1488
Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys			
485	490	495	
ata gaa gaa aag aag gcc caa ata gta aca gag aag aat act agc acc			1536
Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr			
500	505	510	
aaa aca tca aac cct ttt ctt gta gca gca cag gat tct gag aca gat			1584
Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp			
515	520	525	
tat gtc aca aca gat aat tta aca aag gtg act gag gaa gtc gtg gca			1632
Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala			
530	535	540	
aac atg cct gaa ggc ctg act cca gat tta gta cag gaa gca tgt gaa			1680
Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu			
545	550	555	560
agt gaa ttg aat gaa gtt act ggt aca aag att gct tat gaa aca aaa			1728

Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys  
565 570 575  
atg gac ttg gtt caa aca tca gaa gtt atg caa gag tca ctc tat cct 1776  
Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro  
580 585 590  
gca gca cag ctt tgc cca tca ttt gaa gag tca gaa gct act cct tca 1824  
Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser  
595 600 605  
cca gtt ttg cct gac att gtt atg gaa gca cca ttg aat tct gca gtt 1872  
Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val  
610 615 620  
cct agt gct ggt gct tcc gtg ata cag ccc agc tca tca cca tta gaa 1920  
Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu  
625 630 635 640  
gct tct tca gtt aat tat gaa agc ata aaa cat gag cct gaa aac ccc 1968  
Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro  
645 650 655  
cca cca tat gaa gag gcc atg agt gta tca cta aaa aaa gta tca gga 2016  
Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly  
660 665 670  
ata aag gaa gaa att aaa gag cct gaa aat att aat gca gct ctt caa 2064  
Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln  
675 680 685  
gaa aca gaa gct cct tat ata tct att gca tgt gat tta att aaa gaa 2112  
Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu  
690 695 700  
aca aag ctt tct gct gaa cca gct ccg gat ttc tct gat tat tca gaa 2160  
Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu  
705 710 715 720  
atg gca aaa gtt gaa cag cca gtg cct gat cat tct gag cta gtt gaa 2208  
Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu

725	730	735	
gat tcc tca cct gat tct gaa cca gtt gac tta ttt agt gat gat tca			2256
Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser			
740	745	750	
ata cct gac gtt cca caa aaa caa gat gaa act gtg atg ctt gtg aaa			2304
Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys			
755	760	765	
gaa agt ctc act gag act tca ttt gag tca atg ata gaa tat gaa aat			2352
Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn			
770	775	780	
aag gaa aaa ctc agt gct ttg cca cct gag gga gga aag cca tat ttg			2400
Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu			
785	790	795	800
gaa tct ttt aag ctc agt tta gat aac aca aaa gat acc ctg tta cct			2448
Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro			
805	810	815	
gat gaa gtt tca aca ttg agc aaa aag gag aaa att cct ttg cag atg			2496
Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met			
820	825	830	
gag gag ctc agt act gca gtt tat tca aat gat gac tta ttt att tct			2544
Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser			
835	840	845	
aag gaa gca cag ata aga gaa act gaa acg ttt tca gat tca tct cca			2592
Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro			
850	855	860	
att gaa att ata gat gag ttc cct aca ttg atc agt tct aaa act gat			2640
Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp			
865	870	875	880
tca ttt tct aaa tta gcc agg gaa tat act gac cta gaa gta tcc cac			2688
Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His			
885	890	895	

aaa agt gaa att gct aat gcc ccg gat gga gct ggg tca ttg cct tgc 2736  
  
 Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys  
                   900                                  905                                  910  
 aca gaa ttg ccc cat gac ctt tct ttg aag aac ata caa ccc aaa gtt 2784  
 Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val  
                   915                                  920                                  925  
 gaa gag aaa atc agt ttc tca gat gac ttt tct aaa aat ggg tct gct 2832  
 Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala  
  
                   930                                  935                                  940  
 aca tca aag gtg ctc tta ttg cct cca gat gtt tct gct ttg gcc act 2880  
 Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr  
 945                                  950                                  955                                  960  
 caa gca gag ata gag agc ata gtt aaa ccc aaa gtt ctt gtg aaa gaa 2928  
 Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu  
                                   965                                  970                                  975  
  
 gct gag aaa aaa ctt cct tcc gat aca gaa aaa gag gac aga tca cca 2976  
 Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro  
                   980                                  985                                  990  
 tct gct ata ttt tca gca gag ctg agt aaa act tca gtt gtt gac ctc 3024  
 Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu  
                   995                                  1000                                  1005  
 ctg tac tgg aga gac att aag aag act gga gtg gtg ttt ggt gcc 3069  
  
 Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala  
                   1010                                  1015                                  1020  
 agc cta ttc ctg ctg ctt tca ttg aca gta ttc agc att gtg agc 3114  
 Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser  
                   1025                                  1030                                  1035  
 gta aca gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc tct gtg acc atc agc 3159  
 Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser

1040	1045	1050	
ttt agg ata tac aag ggt gtg atc caa gct atc cag aaa tca gat			3204
Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp			
1055	1060	1065	
gaa ggc cac cca ttc agg gca tat ctg gaa tct gaa gtt gct ata			3249
Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile			
1070	1075	1080	
tct gag gag ttg gtt cag aag tac agt aat tct gct ctt ggt cat			3294
Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His			
1085	1090	1095	
gtg aac tgc acg ata aag gaa ctc agg cgc ctc ttc tta gtt gat			3339
Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp			
1100	1105	1110	
gat tta gtt gat tct ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gta ttt			3384
Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe			
1115	1120	1125	
acc tat gtt ggt gcc ttg ttt aat ggt ctg aca cta ctg att ttg			3429
Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu			
1130	1135	1140	
gct ctc att tca ctc ttc agt gtt cct gtt att tat gaa cgg cat			3474
Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His			
1145	1150	1155	
cag gca cag ata gat cat tat cta gga ctt gca aat aag aat gtt			3519
Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val			
1160	1165	1170	
aaa gat gct atg gct aaa atc caa gca aaa atc cct gga ttg aag			3564
Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys			
1175	1180	1185	
cgc aaa gct gaa tga aaacgccc aaataattagt aggagttcat ctttaaaggg			3619
Arg Lys Ala Glu			
1190			

gatattcatt tgattatagc ggggagggtc agggaagaac gaaccttgac gttgcagtgc 3679  
 agtttcacag atcgttgtta gatctttatt tttagccatg cactgttgtg aggaaaaatt 3739  
 acctgtcttg actgccatgt gttcatcatc ttaagtattg taagctgcta tgtatggatt 3799  
 taaaccgtaa tcatatcttt ttcctatctg aggcactggt ggaataaaaa acctgtatat 3859

tttactttgt tgcagatagt cttgccgcat cttggcaagt tgcagagatg gtggagctag 3919

<210> 2

<211> 1192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro

1                    5                    10                    15

Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu

                  20                    25                    30

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp

                  35                    40                    45

Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser

                  50                    55                    60

Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp

65                    70                    75                    80

Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala

                  85                    90                    95

Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro

                  100                    105                    110

Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Val

                  115                    120                    125

Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro

                  130                    135                    140

Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr

145                    150                    155                    160

Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro

	165	170	175
Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu			
	180	185	190
Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp			
	195	200	205
Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe			
	210	215	220
Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro			
225	230	235	240
Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser			
	245	250	255
Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala			
	260	265	270
Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp			
	275	280	285
Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe			
	290	295	300
Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg			
305	310	315	320
Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser			
	325	330	335
Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys			
	340	345	350
Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser			
	355	360	365
Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr			
	370	375	380
Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys			
385	390	395	400
Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu			
	405	410	415

Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr  
 420 425 430

Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro  
 435 440 445

Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys  
 450 455 460

Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe  
 465 470 475 480

Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys  
 485 490 495

Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr  
 500 505 510

Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp  
 515 520 525

Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala  
 530 535 540

Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu  
 545 550 555 560

Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys  
 565 570 575

Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro  
 580 585 590

Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser  
 595 600 605

Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val  
 610 615 620

Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu  
 625 630 635 640

Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro  
 645 650 655

Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly

660	665	670
Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln		
675	680	685
Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu		
690	695	700
Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu		
705	710	715
Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu		
725	730	735
Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser		
740	745	750
Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys		
755	760	765
Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn		
770	775	780
Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu		
785	790	795
Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro		
805	810	815
Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met		
820	825	830
Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser		
835	840	845
Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro		
850	855	860
Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp		
865	870	875
Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His		
885	890	895
Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys		
900	905	910

Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val

915 920 925

Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala

930 935 940

Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr

945 950 955 960

Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu

965 970 975

Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro

980 985 990

Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu

995 1000 1005

Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala

1010 1015 1020

Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser

1025 1030 1035

Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser

1040 1045 1050

Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp

1055 1060 1065

Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile

1070 1075 1080

Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His

1085 1090 1095

Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp

1100 1105 1110

Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe

1115 1120 1125

Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu

1130 1135 1140

Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His

1145                      1150                      1155  
 Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val  
 1160                      1165                      1170  
 Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys  
 1175                      1180                      1185

Arg Lys Ala Glu

1190  
 <210> 3  
 <211> 819  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(819)  
 <223> human Nig  
 <400> 3

Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile  
                     20                      25                      30  
 Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala  
                     35                      40                      45

Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His  
 50                      55                      60  
 Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys  
                     85                      90                      95  
 Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr  
                     100                      105                      110

Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala  
 115                      120                      125  
 Val Ile Val Ala Asn Pro Arg Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp

130                      135                      140  
 Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser  
                          165                      170                      175  
  
 Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu  
                          180                      185                      190  
 Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val  
                          195                      200                      205  
 Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly  
                          210                      215                      220  
 Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe  
 225                      230                      235                      240  
  
 Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser  
                          245                      250                      255  
 Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg  
                          260                      265                      270  
 Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu  
                          275                      280                      285  
 Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu  
                          290                      295                      300  
  
 Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala  
                          325                      330                      335  
 Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys  
                          340                      345                      350  
 Val Thr Glu Glu Val Val Ala Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp  
                          355                      360                      365  
  
 Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr  
                          370                      375                      380



625                      630                      635                      640  
 Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser  
                                  645                      650                      655  
 Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu  
                                  660                      665                      670  
 Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr  
                                  675                      680                      685  
  
 Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr  
                                  690                      695                      700  
 Thr Asp Leu Glu Val Ser His Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp  
 705                      710                      715                      720  
 Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu  
                                  725                      730                      735  
 Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp  
                                  740                      745                      750  
  
 Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro  
                                  755                      760                      765  
 Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys  
                                  770                      775                      780  
 Pro Lys Val Leu Val Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr  
 785                      790                      795                      800  
 Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser  
                                  805                      810                      815

Lys Thr Ser

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95  
 Ser Leu Tyr Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu  
 115 120 125  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 130 135 140  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 180 185 190  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 210 215 220  
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 245

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1                    5                    10                    15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20                    25                    30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Cys Asp Arg Leu Leu Ser Cys Arg

35                    40                    45

Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50                    55                    60

Cys Asp Arg Leu Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser

65                    70                    75                    80

Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

85                    90                    95

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Cys Asp Arg Leu

100                    105                    110

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile

115                    120                    125

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

130                    135                    140

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

145                    150                    155                    160

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

165                    170                    175

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

180                    185                    190

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

195                    200                    205

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

210                    215                    220



gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcgccaa 360  
 gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcacat ctgtttcat cttcccgcca 420  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 480  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag cacctgacg 600  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcaagtac ccatcagggc 660  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>

8

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Glu Leu Phe Asp Leu

1 5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1                    5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1                    5

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

agggccagtc agagtgttag cagctactta gcct 34

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213>

Mus musculus

<400> 15

gatgcatcca acagggccac t 21

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus  
 <400> 16  
 cagcagcgta gcaactggcc gatcacc 27  
 <210> 17  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 17  
 ggattcacct ttagtaacta ttggatgagc 30  
 <210> 18  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 18  
 accataaagc aagatggaag tcagaaaaac tatgtggact ctgtgaaggg c 51  
  
 <210> 19  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 19  
 gaactcttcg atctc 15  
 <210> 20  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 20  
 atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatth tagaaggtgt ccagtgt 57  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 21  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
 1                    5                    10                    15

Val Gln Cys

<210> 22

<211> 60

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1                    5                    10                    15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 24

<211> 460

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1                    5                    10                    15

Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20                    25                    30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35                    40                    45

Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50                    55                    60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val

65                    70                    75                    80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95  
 Ser Leu Tyr Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu  
 115 120 125  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 130 135 140  
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 180 185 190  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
 210 215 220  
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 245 250 255  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 275 280 285  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 290 295 300  
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 305 310 315 320  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val



Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser  
 100 105 110

Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

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

<210> 26

<211> 321

<212>

> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 26

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20	25	30	
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc			144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
35	40	45	
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc			192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct			240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg atc			288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile			
85	90	95	
acc ttc ggc caa ggg aca aag ctt gaa atc aaa			321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 27			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 27			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 28  
<211> 342

<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<220><221> CDS  
<222> (1)..(342)  
<400> 28

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gct tct gga ttc acc ttt agt aac tat 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct ccg ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg 144  
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

gcc acc ata aag caa gat gga agt cag aaa aac tat gtg gac tct gtg 192  
Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240

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

ctg cga ttg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

gcg act gaa ctc ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc tcc ctg gtc acc gtc 336  
Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu Val Thr Val

100 105 110  
 tcc tca 342  
 Ser Ser

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1 5 10 15

Val Gln Ala

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1                    5                    10                    15

Gly Thr Arg Cys

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> primer

<400> 32

tgaggaagt agggatgtgc 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> primer

<400> 33

cagtgatgt acgctctgga 20