

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680025588.X

[51] Int. Cl.

*A61K 38/00 (2006.01)*

*A01N 37/18 (2006.01)*

*A01N 61/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年5月6日

[11] 公开号 CN 101426512A

[22] 申请日 2006.5.12

[21] 申请号 200680025588.X

[30] 优先权

[32] 2005.5.12 [33] US [31] 60/679,995

[32] 2005.11.10 [33] US [31] 60/735,187

[86] 国际申请 PCT/US2006/018484 2006.5.12

[87] 国际公布 WO2006/124627 英 2006.11.23

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.14

[71] 申请人 生物基因 IDEC 麻省公司

地址 美国麻萨诸塞州

共同申请人 香港大学

[72] 发明人 李康善 萨文宜 苏国辉 吴武田

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健 刘玥

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 18 页

[54] 发明名称

治疗涉及神经退化的病症的方法

[57] 摘要

本发明提供了通过给药 Nogo 受体 - 1 拮抗剂，治疗涉及视网膜神经节细胞的死亡或退化的眼病的方法，所述眼病包括青光眼。

1. 促进呈现涉及神经细胞死亡的病症的信号或症状的哺乳动物中感觉神经元的再生或存活的方法，所述方法包括：将治疗有效量的NgR1拮抗剂给药于哺乳动物。

2. 权利要求1的方法，其中感觉神经元是毛细胞。

3. 权利要求2的方法，其中哺乳动物患有听力损失。

4. 权利要求1的方法，其中感觉神经元是视网膜神经节细胞(RGC)。

5. 权利要求4的方法，其中将NgR1拮抗剂直接给药于眼睛。

6. 权利要求5的方法，其中在玻璃体内给药NgR1拮抗剂。

7. 权利要求4的方法，其中通过胶囊植入体来给药NgR1拮抗剂。

8. 权利要求4-7任一项的方法，其中哺乳动物患有视神经病。

9. 权利要求8的方法，其中所述视神经病是青光眼。

10. 权利要求1-9任一项的方法，其中NgR1拮抗剂包括可溶形式的哺乳动物NgR1。

11. 权利要求10的方法，其中可溶形式的哺乳动物NgR1包括SEQ ID NO: 3的氨基酸26至310，具有最高达十个保守氨基酸置换。

12. 权利要求10的方法，其中可溶形式的哺乳动物NgR1包括SEQ ID NO: 4的氨基酸26至344，具有最高达十个保守氨基酸置换。

13. 权利要求10的方法，其中可溶形式的哺乳动物NgR1包括SEQ ID NO: 5的氨基酸27至310，具有最高达十个保守氨基酸置换。

14. 权利要求10的方法，其中可溶形式的哺乳动物NgR1包括SEQ ID NO: 6的氨基酸27至344，具有最高达十个保守氨基酸置换。

15. 权利要求10的方法，其中可溶形式的哺乳动物NgR1包括SEQ ID NO: 3的氨基酸26至310，除了至少一个半胱氨酸残基被不同的氨基酸置换。

16. 权利要求10的方法，其中可溶形式的哺乳动物NgR1包括SEQ ID NO: 5的氨基酸27至310，除了至少一个半胱氨酸残基被不同的氨基酸置换。

17. 权利要求15或权利要求16的方法，其中氨基酸C266被不同的氨基酸置换。

18. 权利要求15或权利要求16的方法，其中氨基酸C309被不同

的氨基酸置换。

19. 权利要求 15 或权利要求 16 的方法，其中所述氨基酸 C266 和氨基酸 C309 被不同的氨基酸置换。

20. 权利要求 17-19 任一项的方法，其中所述不同的氨基酸是丙氨酸。

21. 权利要求 10-20 任一项的方法，其中可溶形式的哺乳动物 NgR1 进一步包括融合部分。

22. 权利要求 21 的方法，其中融合部分是免疫球蛋白部分。

23. 权利要求 22 的方法，其中免疫球蛋白部分是 Fc 部分。

24. 权利要求 1-9 任一项的方法，其中 NgR1 拮抗剂包括结合哺乳动物 NgR1 的抗体或其抗原结合片段。

25. 权利要求 24 的方法，其中抗体选自多克隆抗体，单克隆抗体，Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')<sub>2</sub> 片段，Fv 片段，Fd 片段，双抗体和单链抗体。

26. 权利要求 24 的方法，其中抗体或其抗原结合片段结合由杂交瘤产生的单克隆抗体结合的多肽，所述杂交瘤选自：HB 7E11 (ATCC<sup>®</sup> 登录号 No. PTA-4587), HB 1H2 (ATCC<sup>®</sup> 登录号 No. PTA-4584), HB 3G5 (ATCC<sup>®</sup> 登录号 No. PTA-4586), HB 5B10 (ATCC<sup>®</sup> 登录号 No. PTA-4588) 和 HB 2F7 (ATCC<sup>®</sup> 登录号 No. PTA-4585)。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述单克隆抗体通过 HB 7E11 杂交瘤产生。

28. 权利要求 27 的方法，其中多肽包括选自以下的氨基酸序列：AAAFGLTLLEQLDLSDNAQLR (SEQ ID NO: 7); LDLSDNAQLR (SEQ ID NO: 8); LDLSDDAELR (SEQ ID NO: 9); LDLASDNAQLR (SEQ ID NO: 10); LDLASDDAELR (SEQ ID NO: 11); LDALSDNAQLR (SEQ ID NO: 12); LDALSDDAELR (SEQ ID NO: 13); LDLSSDNAQLR (SEQ ID NO: 14); LDLSSDEAELR (SEQ ID NO: 15); DNAQLRVVDPTT (SEQ ID NO: 16); DNAQLR (SEQ ID NO: 17); ADLSDNAQLRVVDPTT (SEQ ID NO: 18); LALSDNAQLRVVDPTT (SEQ ID NO: 19); LDLSDNAALRVVDPTT (SEQ ID NO: 20); LDLSDNAQLHVVDPTT (SEQ ID NO: 21) 和 LDLSDNAQLAVVDPTT (SEQ ID NO: 22)。

29. 权利要求 27 的方法, 其中多肽由选自以下的氨基酸序列构成: AAAFGLTLLEQLDLSDNAQLR (SEQ ID NO: 7); LDLSDNAQLR (SEQ ID NO: 8); LDLSDDAELR (SEQ ID NO: 9); LDLASDNAQLR (SEQ ID NO: 10); LDLASDDAELR (SEQ ID NO: 11); LDALS DNAQLR (SEQ ID NO: 12); LDALSDDAELR (SEQ ID NO: 13); LDLSSDNAQLR (SEQ ID NO: 14); LDLSSDEAELR (SEQ ID NO: 15); DNAQLRVVDPTT (SEQ ID NO: 16); DNAQLR (SEQ ID NO: 17); ADLSDNAQLRVVDPTT (SEQ ID NO: 18); LALS DNAQLRVVDPTT (SEQ ID NO: 19); LDLSDNAALRVVDPTT (SEQ ID NO: 20); LDLSDNAQLHVVDPTT (SEQ ID NO: 21) 和 LDLSDNAQLAVVDPTT (SEQ ID NO: 22)。

30. 权利要求 1-29 任一项的方法, 其中治疗有效量为 0.001mg/kg 至 10mg/kg。

31. 权利要求 30 的方法, 其中治疗有效量为 0.01mg/kg 至 1.0mg/kg。

32. 权利要求 31 的方法, 其中治疗有效量为 0.05mg/kg 至 0.5mg/kg。

33. 治疗哺乳动物听力损失或视神经病的方法, 所述方法包括将治疗有效量的 NgR1 拮抗剂给药于哺乳动物。

34. 权利要求 1-9 或 30-33 任一项的方法, 其中所述 NgR1 拮抗剂是 1D9 Fab。

## 治疗涉及神经退化的病症的方法

### 发明背景

#### 发明领域

本发明涉及神经生物学和药理学。更具体地，涉及通过给予 Nogo 受体-1 拮抗剂来治疗涉及神经退化的病症的方法，包括感觉神经元如视网膜神经节细胞和毛细细胞的退化。

#### 背景技术

视神经病是一组包括各种临床症状和病原学的眼病。青光眼是一种示范性视神经病，其包括视神经的生理改变，视盘上的可见物和相应的视野丢失，如果不治疗将会导致失明。青光眼还与提高的眼内压相关，除此之外还涉及其他因素。

目前的青光眼治疗是针对降低眼内压。药物治疗包括局部滴眼液或口服降低眼内流体产生或提高眼内流体流出的药物。然而，这些青光眼的药物治疗有时候与显著的副作用相关，如头疼，视力模糊，过敏反应，心肺并发症引起的死亡以及与其它药物潜在的相互作用。还使用外科手术治疗，但是它们也具有许多缺陷和不大的成功率。

因此，仍然需要用于视神经病的其他治疗方法，这些视神经病包括青光眼和特征在于视网膜神经节细胞（RGC）的退化或死亡的其他病症。

### 发明简述

本发明涉及治疗涉及感觉神经元退化或死亡的病症的方法。例如，本发明涉及治疗视神经病如青光眼和特征在于 RGC 退化或死亡的其他病症的方法。本发明的方法包括给予干扰 Nogo 受体（NgR）-介导的神经生长抑制的药剂，如例如 Nogo 受体-1 拮抗剂。

在一些实施方案中，本发明提供了促进呈现涉及 RCG 死亡的病症的信号或症状的哺乳动物中视网膜神经节细胞（RGC）的再生或存活的方法，包括将治疗有效量的 NgR1 拮抗剂给药于哺乳动物。在一些实施方案中，将 NgR1 拮抗剂直接给药于眼睛。在一些实施方案中，在玻

璃体内给药 NgR1 拮抗剂。在一些实施方案中，通过胶囊植入体来给药 NgR1 拮抗剂。在一些实施方案中，哺乳动物患有的一种或多种视神经病，例如青光眼。

通过 NgR (和相关的因子) 介导的神经生长的抑制和涉及 NgR 信号通路的操纵的治疗方法总地描述于例如 Lee 等, *Nature Reviews* 2: 1-7 (2003)。

在一些实施方案中，本发明的方法使用包括可溶形式的哺乳动物 NgR1 的 NgR1 拮抗剂。在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 包括 SEQ ID NO: 3 的氨基酸 26 至 310，具有最高达 10 个保守氨基酸置换。在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 包括 SEQ ID NO: 4 的氨基酸 26 至 344，具有最高达 10 个保守氨基酸置换。在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 包括 SEQ ID NO: 5 的氨基酸 27 至 310，具有最高达 10 个保守氨基酸置换。在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 包括 SEQ ID NO: 6 的氨基酸 27 至 344，具有最高达 10 个保守氨基酸置换。在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 缺失功能性信号肽。

在一些实施方案中，可溶形式的 NgR1 包括 SEQ ID NO: 3 的氨基酸 26-310，除了至少一个半胱氨酸残基被不同的氨基酸置换。在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 包括 SEQ ID NO: 5 的氨基酸 27-310，除了至少一个半胱氨酸残基被不同的氨基酸置换。在一些实施方案中，C266 被不同的氨基酸置换。在一些实施方案中，C309 被不同的氨基酸置换。在一些实施方案中，C266 和 C309 都被不同的氨基酸置换。在一些实施方案中，不同的氨基酸是丙氨酸。

在一些实施方案中，可溶形式的哺乳动物 NgR1 包括融合部分。在一些实施方案中，融合部分是免疫球蛋白部分。在一些实施方案中，免疫球蛋白部分是 Fc 部分。

在一些实施方案中，NgR1 拮抗剂包括结合哺乳动物 NgR1 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，抗体选自多克隆抗体，单克隆抗体，Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')<sub>2</sub> 片段，Fv 片段和 Fd 片段，双抗体 (diabody) 和单链抗体。在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段结合一种多肽，该多肽与杂交瘤产生的单克隆抗体结合，所述杂交瘤选自：HB 7E11 (ATCC® 保藏号 No.PTA-4587)，HB 1H2 (ATCC®

保藏号 No.PTA-4584), HB3G5( ATCC®保藏号 No.PTA-4586), HB5B10 ( ATCC®保藏号 No.PTA-4585)。在一些实施方案中, 多肽包括选自以下的氨基酸序列: AAAGLTLLEQLDLSDNAQLR ( SEQ ID NO: 7); LDLSDNAQLR ( SEQ ID NO: 8); LDLSDDAELR ( SEQ ID NO: 9); LDLASDNAQLR ( SEQ ID NO: 10); LDLASDDAELR ( SEQ ID NO: 11); LDALSDNAQLR ( SEQ ID NO: 12); LDALSDDAELR ( SEQ ID NO: 13); LDLSSDNAQLR ( SEQ ID NO: 14); LDLSSDEAELR ( SEQ ID NO: 15); DNAQLRVVDPTT ( SEQ ID NO: 16); DNAQLR ( SEQ ID NO: 17); ADLSDNAQLRVVDPTT ( SEQ ID NO: 18); LALS DNAQLRVVDPTT ( SEQ ID NO: 19); LDLSDNAALRVVDPTT ( SEQ ID NO: 20); LDLSDNAQLHVVDPTT ( SEQ ID NO: 21) 和 LDLSDNAQLAVVDPTT ( SEQ ID NO: 22)。在一些实施方案中, NgR1 拮抗剂是单克隆抗体 1D9。

在一些实施方案中, 治疗有效量为 0.001mg/kg 至 10mg/kg。在一些实施方案中, 治疗有效量为 0.01mg/kg 至 1.0mg/kg。在一些实施方案中, 治疗有效量为 0.05mg/kg 至 0.5mg/kg。

在一些实施方案中, 本发明提供了治疗哺乳动物视神经病的方法, 包括将治疗有效量的 NgR1 拮抗剂给药于哺乳动物。在特定的实施方案中, 视神经病是青光眼。

#### 附图简述

图 1A-1B 显示了 NgR1 在大鼠视网膜神经节细胞 (RGC) 中表达。GCL, 神经节细胞层; INL, 内核层; ONL, 外核层。标尺: A, 25 $\mu$ m; B, 200 $\mu$ m; C, 25 $\mu$ m。

图 2 显示了抗-rNgR1 抗体 1D9 与 rNgR1 的可溶性片段 (srNgR310) 的结合模型。

图 3 显示了 Nogo 受体-1 拮抗剂 (srNgR310-Fc) 治疗对背根神经节 (DGR) 神经元存活的体外剂量应答效果。

图 4A-4C 显示视神经横断模型。在离视盘 1.5mm 处将视神经横断。右眼是实验眼睛。FG=荧光金。

图 5 显示了 sNgR1(27-310)-Fc 蛋白质对视神经横断后受伤的视网膜神经节细胞 (RGC) 的存活的效果。sNgR1(27-310)-Fc 蛋白质治疗促

进了视神经横断后受伤的 RGC 的存活。P-值表示与其它组的比较。

图 6 显示了青光眼模型。在缘静脉和三支上巩膜静脉使用氩激光凝固诱导右眼中升高的眼内压。

图 7A-7C 显示了 Nogo 受体-1 拮抗剂 (srNgR310-Fc) 治疗在大鼠青光眼模型中对体内 RGC 的存活的效果。图 7A 和 7B sNgR1(27-310)-Fc 治疗促进了眼高压诱导后受伤的 RGC 的存活。图 7C.使用 sNgR1(27-310)-Fc 的治疗对降低激光处理后的眼内压 (IOP) 没有效果。

图 8 显示了 1D9 治疗对 DRG 神经元体外存活的效果。1D9 治疗保护了培养物中血清缺乏大鼠 p2 DRG 神经元 6 天。呈现了平均值且误差棒表示 S.E.M.

图 9A-9C 显示了单克隆抗-NgR1 抗体 (1D9) 的 Fab 片段对视神经横断模型中 DRG 神经元存活的效果。图 9A. 直方图表示视神经横断后使用大鼠 1D9 (070) 和对照治疗的 RGC 存活的平均百分比。图 9B. 直方图表示视神经横断后使用大鼠 1D9 (052) 和对照治疗的 RGC 存活的平均百分比。图 9C. 直方图表示视神经横断后使用大鼠 1D9 (070) 和对照治疗的 RGC 丧失的平均百分比, 星号表示与 PBS 组相比较的统计学差异 ( $P < 0.001$ )。误差棒表示 S.E.M.

图 10A 和 10B 显示了大鼠青光眼模型中 1D9 对体内 RGC 存活的效果。图 10A. 与 PBS 组相比较, 1D9 治疗促进了眼高压诱导后受伤 RGC 的存活。与 PBS 组相比较,  $P < 0.01$ 。图 10B. 对照 (PBS) 和治疗 (1D9) 组中的眼 IOP 测量值。玻璃体内注射 1D9 对降低激光处理后的 IOP 没有效果。所有动物接受两次激光凝固。在所有组中激光处理的眼睛中观察到 IOP 提高约 1.7 倍。

图 11 显示出大鼠青光眼模型中 Nogo 受体-1 拮抗剂 (Ala-Ala-rNgR310-Fc 和 Ala-Ala-hNgR310-Fc) 治疗对 RGC 体内存活的效果。Ala-Ala-rNgR310-Fc 和 Ala-Ala-hNgR310-Fc 治疗都促进了眼高压诱导后受伤 RGC 的存活。

#### 发明详述

除非另外指出, 在此所用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。万一冲突, 由包括定义的本申请来控制。此外, 除非上下文需要, 单数术语将包括复数, 且复



数术语将包括单数。将在此提及的所有出版物，专利和其他参考文献以其整体引入作为参考，用于所有目的，如同每个单个出版物或专利申请特意并单独表示引入作为参考一样。

尽管与在此所述那些相似或相等的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中，以下还是描述了合适的方法和材料。材料，方法和实施例只是说明性的，并不意味着限制。从详述和权利要求将清楚本发明的其他特征和优点。

在说明书和权利要求书中，用语“包括”或其变型“包含”或“含有”是指包括任何所述及的整数或整数组，但是不排除任何其他整数或整数组。

为了进一步定义本发明，提供下列术语和定义：

如在此所用的，“抗体”意思是完整的免疫球蛋白或其抗原结合片段。本发明的抗体可以是任何同型或类别（例如，M，D，G，E和A）或任何亚类的（例如，G1-4，A1-2），并且具有卡帕（ $\kappa$ ）或拉姆达（ $\lambda$ ）轻链。

如在此所用的，“人源化抗体”意思是其中至少一部分非人序列由人序列所替代的抗体。如何制备人源化抗体的实例可以见于美国专利 No.6,054,297，5,886,152 和 5,877,293。

如在此所用的，“治疗有效量”指的是以需要的剂量并持续需要的时间段获得所需治疗结果的量。

如在此所用的，“预防有效量”指的是以需要的剂量并持续需要的时间段获得所需治疗结果的量。通常，因为在疾病之前或在疾病的早期阶段在患者中使用预防剂量，预防有效量将低于治疗有效量。

如在此所用的，“患者”意思为哺乳动物，例如，人。

如在此所用的，“融合蛋白”意思是包括与另一个通常是异源多肽的多肽融合的蛋白质。

如在此所用的，“Nogo 受体拮抗剂”意思为抑制 Nogo 受体 1 与配体（例如，NogoA，NogoB，NogoC，MAG，OM-gp）结合的分子。Nogo 受体拮抗剂包括，但不限于，合成或天然序列肽，小分子化合物和抗体。本文中别处将详细描述示例性 NgR 拮抗剂。

如在此所用的，“Nogo 受体多肽”包括全长 Nogo 受体 1 蛋白及其片段。

## Nogo 受体拮抗剂

本发明是基于 Nogo 受体拮抗剂可以用于治疗涉及 RGC 死亡或退化的病症的发现，这些病症包括青光眼。本发明的 Nogo 受体拮抗剂促进感觉神经元的再生或存活。本发明特定的 Nogo 受体拮抗剂促进感觉神经元的再生或存活，但不促进 CNS 神经元的神经突生长。任何 Nogo 受体拮抗剂可以用于本发明的方法中。例如，可以用于本发明方法中的 Nogo 受体拮抗剂包括，但不限于：可溶性 Nogo 受体多肽；Nogo 受体蛋白的抗体及其抗原结合片段；和小分子拮抗剂。Nogo 受体拮抗剂还包括与 Nogo 受体配体相互作用和/或结合 Nogo 受体配体的抗体和其他化合物（包括多肽和小分子），配体如 NogoA, NogoB, NogoC, MAG, OM-gp。例如，在特定的实施方案中，Nogo 受体拮抗剂可以是 MAG 衍生物（参见，例如，U.S.专利申请 No.2004-012-1314）或 OM-gp 特异性结合剂（参见，例如，U.S.专利申请 No.2003-011-3326）。

## 可溶性 Nogo 受体-1 多肽

在本发明的一些实施方案中，所述拮抗剂是可溶性 Nogo 受体-1 多肽（Nogo 受体-1 也被不同地称为“Nogo 受体”，“NogoR”，“NogoR-1”，“NgR”，“NgR-1”，NgR1 和 NGR1）。全长 Nogo 受体-1 由信号肽，N-末端区（NT），八个亮氨酸富集重复（LRR），LRRCT 区（八个亮氨酸富集重复的亮氨酸富集重复结构域 C 端），C 端区（CT）和 GPI 锚定区。全长人和大鼠 Nogo 受体的序列显示于表 1 中。

表 1. 人和大鼠 Nogo 受体-1 多肽的序列

全长人 Nogo 受体 SEQ ID NO: 1	MKRASAGGSRL LAWVLWLQAWQVAAPCP GACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGIPAA SQRIFLHG NRISHVPAASFRA CRNL TILWLH SNVLARIDAA AFTGLALLEQLD LSDNAQLR SVDPATFHGLGRLHTLHLDR CGLQELGPGL FRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDLG NLTHLFLHG NRIS SVPERAFRGLHSLDRLLL HQNRVAHVHPHAFRDLGRLMTLYLFANNL SALPTEALAPLRALQYLRLNDNPWVCD CR ARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGR DLKRLAANDLQGC AVATGPYHPIWTGRAT DEEPLGLPKCCQPDAADKA
全长大鼠 Nogo 受体 SEQ ID NO: 2	MKRASSGGSRLPTWVLWLQAWRVATPCP GACVCYNEPKVTTSRPQQGLQAVPAGIPAS SQRIFLHG NRISYVPAASFQSCRNL TILWLH SNALAGIDAA AFTGLTLLEQLD LSDNAQLR VVDPTTFRGLGHLHTLHLDR CGLQELGPGL FRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLG NLTHLFLHG NRIPS VPEHAFRGLHSLDRLLL HQNHVARVHPHAFRDLGRLMTLYLFANNL SMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWVCD CR ARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLAGR DLKRLATSDLEGCAVASGPFRPFQTNQLTD EELLGLPKCCQPDAADKA

用于本发明方法中的可溶性 Nogo 受体多肽包括 NT 结构域；8 个 LRR 和 LRRCT 结构域，并且缺失信号序列和功能性 GPI 锚定区（即，无 GPI 锚定区或不能有效地连接细胞膜的 GPI 锚定区）。合适的多肽包括，例如，人 Nogo 受体的氨基酸 26-310（SEQ ID NO: 3）和 26-344（SEQ ID NO: 4）以及大鼠 Nogo 受体的氨基酸 27-310（SEQ ID NO:

5) 和 27-344 (SEQ ID NO: 6) (表 2)。可以用于本发明方法中的其他多肽描述于, 例如, 国际专利申请 PCT/US02/32007 和 PCT/US03/25004。

表 2。来自人和大鼠的可溶性 Nogo 受体多肽

人 26-310  SEQ ID NO: 3	PCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGI PAASQRIFLHG NRISHVPAASFRACRNL TL WLHSNVLARIDAAFTGLALLEQLDLS DNA QLRSDPATFHGLGRLHTLHLDR CGLQELG PGLFRGLAALQYLYLQDNALQALP DDTFR DLGNLTHLFLHG NRISVPERAFRGL HSLDR LLLHQNRVAHVHPHAFRDLGRLMT LYLFA NNLSALPTEALAPLRALQYLRLND NPWVC DCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPC SLPQRLA GRDLKRLAANDLQGCA
人 26-344  SEQ ID NO: 4	PCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGI PAASQRIFLHG NRISHVPAASFRACRNL TL WLHSNVLARIDAAFTGLALLEQLDLS DNA QLRSDPATFHGLGRLHTLHLDR CGLQELG PGLFRGLAALQYLYLQDNALQALP DDTFR DLGNLTHLFLHG NRISVPERAFRGL HSLDR LLLHQNRVAHVHPHAFRDLGRLMT LYLFA NNLSALPTEALAPLRALQYLRLND NPWVC DCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPC SLPQRLA GRDLKRLAANDLQGCAVATGPYH PIWTGR ATDEEPLGLPKCCQPDAADKA

<p>大鼠 27-310</p> <p>SEQ ID NO: 5</p>	<p>CPGACVCYNEPKVTTSRPQQGLQAVPAGIP ASSQRIFLHG NRISYVPAASFQSCRNLTLW LHSNALAGIDAAAFTGLTLLEQLDLSDNAQ LRVVDPTTFRGLGHLHTLHLDRCLQELGP GLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRD LGNLTHLFLHG NRIPSVPEHA FRGLHSLDRL LLHQNHVARVHPHAFRDLGRLMTLYLFAN NLSMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWVCD CRARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLA GRDLKRLATS DLEGCA</p>
<p>大鼠 27-344</p> <p>SEQ ID NO: 6</p>	<p>CPGACVCYNEPKVTTSRPQQGLQAVPAGIP ASSQRIFLHG NRISYVPAASFQSCRNLTLW LHSNALAGIDAAAFTGLTLLEQLDLSDNAQ LRVVDPTTFRGLGHLHTLHLDRCLQELGP GLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRD LGNLTHLFLHG NRIPSVPEHA FRGLHSLDRL LLHQNHVARVHPHAFRDLGRLMTLYLFAN NLSMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWVCD CRARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLA GRDLKRLATS DLEGCAVASGPFRPFQTNQL TDEELLGLPKCCQPDAADKA</p>
<p>在位置 266 和 309 具有 Ala-Ala 置 换 的 人 26-310</p> <p>SEQ ID NO: 23</p>	<p>PCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGI PAASQRIFLHG NRISHVPAASFRA CRNLTL WLHSNVLARIDAAAFTGLALLEQLDLSDNA QLRSVDPATFHGLGRLHTLHLDRCLQELG PGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFR DLGNLTHLFLHG NRIS SVPERA FRGLHSLDR LLLHQNRVAHVHPHAFRDLGRLMTLYLFA NNLSALPTEALAPLRALQYLRLNDNPWVC DARARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRL AGRDLKRLAANDLQGAA</p>

在位置 266 和 309 具有 Ala-Ala 置 换的大鼠 27-310	CPGACVCYNEPKVTTSRPQQGLQAVPAGIP ASSQRIFLHG NRISYVPAASFQSCRNLTLW LHSNALAGIDAAAFTGLTLLEQLDLSDNAQ LRVVDPTTFRGLGHLHTLHLDRCLQELGP GLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRD LGNLTHLFLHG NRIPSVPEHA FRGLHSLDRL LLHQNHVARVHPHAFRDLGRLMTLYLFAN NLSMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWVCD ARARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLA GRDLKRLATSDLEGAA
SEQ ID NO: 24	

作为融合蛋白组分的可溶性 Nogo 受体多肽也可以用于本发明的方法中。在一些实施方案中，融合蛋白的异种部分是免疫球蛋白恒定结构域。在一些实施方案中，免疫球蛋白恒定结构域是重链恒定结构域。在一些实施方案中，异种多肽是 Fc 片段。在一些实施方案中，Fc 连接可溶性 Nogo 受体多肽的 C 端。在一些实施方案中，融合 Nogo 受体蛋白是二聚体。

实例可溶性 NgR-Fc 融合蛋白是 sNgR310-Fc，其包括连接具有 SEQ ID NO: 5 的可溶性多肽 C-端的 Fc。

在特定实施方案中，用于本发明方法实践中的可溶性 Nogo 受体多肽包括 SEQ ID NO: 3，SEQ ID NO: 4，SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 的变体，具有最高达 5，10，15，20，25，30，35，40，45，50，55，60，65，70，75，80，85，90，95，100，110，120，130，140，150，160，170，180，190，200 或更多个保守氨基酸置换。产生相对于参照多肽的氨基酸序列具有多个保守氨基酸置换的多肽变体的方法是本领域已知的。实例/优选氨基酸置换列于表 3 中。

表 3

最初的残基	示例置换	优选置换
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn;	glu
Cys (C)	ser; ala	ser, ala
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Tpr (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

用于本发明方法中的特定可溶性 Nogo 受体多肽包括具有单个半胱氨酸残基的氨基酸置换的可溶性 NgR1 多肽。任何异种氨基酸可以置换本发明多肽中的半胱氨酸。使用哪种不同的氨基酸取决于各种标准，例如，置换对多肽片段的构象，多肽片段的电荷或多肽片段的亲水性的作用。在特定的实施方案中，半胱氨酸由小的不带电的氨基酸置换，其最少可能改变多肽的三维构象，例如，丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，优选丙氨酸。可以置换的半胱氨酸残基包括 C266, C309, C335 和 C336。

通过将编码多肽片段的多核苷酸工程化来制造这样的置换是本领域普通技术人员常规技术内的。

具有半胱氨酸置换的实例可溶性 NgR-Fc 融合蛋白是 Ala-Ala-人(h)NgR1-Fc, 其包括连接具有 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的可溶性多肽的 C-端的 Fc, 和 Ala-Ala-大鼠(r)NgR1-Fc, 其包括连接具有 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的可溶性多肽的 C-端的 Fc。(参见表 2)。

## 抗体

可以使用特异性结合免疫原性 Nogo 受体-1 多肽并抑制 Nogo 受体-1 结合配体(例如, NogoA, NogoB, NogoC, mAG, OM-gp)的抗体或其抗原结合片段来进行本发明的方法。或者, 可以使用 NogoA, NogoB, NogoC, mAG, OM-gp 的特异性抗体来进行本发明的方法。可以在体内或在体外产生用于本发明方法中的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中, 抗 Nogo 受体-1 抗体或其抗原结合片段是鼠或人的。在一些实施方案中, 抗 Nogo 受体-1 抗体或其抗原结合片段是重组的, 工程化的, 人源化的和/或嵌合的。在一些实施方案中, 抗体选自国际专利申请 No.PCT/US03/25004 中所述的抗体。用于本发明中的抗体可以进行修饰或不进行修饰而使用。

可以用于本发明方法中的抗体的示例抗原结合片段为 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb, 和含有互补性决定区(CDR)片段的片段, 单链抗体(scFv), 嵌合抗体, 双抗体和含有至少一部分免疫球蛋白的多肽, 所述免疫球蛋白足以赋予抗原与多肽(例如, 免疫粘合物)的特异性结合。

如在此所用的, Fd 意思为由 V<sub>H</sub> 和 C<sub>H1</sub> 结构域组成的片段, Fv 意思为由单臂抗体的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域组成的片段; 而 dAb 意思为由 V<sub>H</sub> 结构域组成的片段(Ward 等, *Nature* 341: 544-46 (1989))。如在此所用的, 单链抗体(scFv)意思为其中 V<sub>L</sub> 区和 V<sub>H</sub> 区通过合成的连接物配对形成单价分子的抗体, 这能够使得它们制成单一蛋白链(Bird 等, *Science* 242: 423-26 (1988) 和 Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83 (1988))。如在此所用的, 双抗体意思是一种双特异性抗体, 其中 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域在单一多肽链上表达, 但使用太短而不能允许同一链上两个结构域之间配对的连接物, 因此迫使所述结构域与另一条



链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点（参见，例如，Holliger 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-48(1993)和 Poljak 等，*Structure* 2: 1121-23 (1994)）。

## 免疫

可以通过免疫合适的宿主（例如，脊椎动物，包括人，小鼠，大鼠，绵羊，山羊，猪，牛，马，爬行动物，鱼类，两栖类以及在鸟类，爬行动物和鱼类的卵中）来生成用于本发明方法中的抗体。这些抗体可以是多克隆的或单克隆的，对于制备抗体的方法的综述，参见，例如，Harlow 和 Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体，实验室手册); Yelton 等，*Ann. Rev. of Biochem.*, 50: 657-80 (1981); 和 Ausubel 等 (1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (分子生物学的通用实验方案) (纽约: John Wiley & Sons)。可以通过本领域公知的几种方法中的任何一种来测定与免疫原性 Nogo 受体多肽的免疫反应性，这些方法包括，例如，免疫印迹测定法和 ELISA。用于本发明方法中的单克隆抗体可以通过所述的标准程序制得，例如 Harlow 和 Lane (1988)，上文。

例如，可以用免疫原性 Nogo 受体-1 多肽对宿主进行免疫，用或不用佐剂。合适的多肽描述于，例如，国际专利申请 PCT/US01/31488，PCT/US02/32007 和 PCT/US/03/25004 中。还可以用 Nogo 受体-1 免疫宿主，该 Nogo 受体-1 与完整或破坏细胞的细胞膜和通过结合 Nogo 受体-1 多肽鉴定的抗体相连。用来生产抗体的其他合适技术包括将淋巴细胞暴露于 Nogo 受体-1 或本发明的免疫原性多肽，或者，筛选噬菌体或类似载体中的抗体文库。参见 Huse 等，*Science* 246: 1275-81(1989)。

还可以通过筛选重组组合抗体文库来分离用于本发明方法中的抗 Nogo 受体-1 抗体。用于制备和筛选这些文库的方法是本领域已知的。商业上存在可用于生成噬菌体展示文库的方法和材料（例如，the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System，目录号 27-9400-01; Stratagene SurfZAP<sup>TM</sup> 噬菌体展示试剂盒，目录号 240612; 以及来自 MorphoSys 的其他商品）。从重组免疫球蛋白展示文库中筛选和分离抗 Nogo 受体-1 抗体后，可以从展示包装中（例如，从噬菌体基因组中）回收编码选定抗体的核酸并通过标准重组 DNA 技术亚克隆至其他表达

载体中。为了表达通过筛选组合文库分离的抗体，将编码抗体重链和轻链或其可变区的 DNA 克隆至重组表达载体中并引入宿主细胞中。

如之前所述的产生多克隆抗-NgR1 抗体。Li, W.等, *J. Biol. Chem.* 279: 43780-43788 (2004)。所用的抗原是 srNgR310-Fc (Li, S.等, *J. Neurosci.* 24: 10511-10520 (2004)) 和表达大鼠 NgR1 的 COS-7 细胞。通过 ELISA 结合测试和 FACS 分析来表征单克隆抗体 1D9。1D9 只结合大鼠 NgR1 且不识别人或小鼠 NgR1, 也不识别 NgR2 和 NgR3。根据标准方法纯化 Fab 片段并发现对初级神经元上的 rhoA 激活具有最小的作用。结合人 NgR1 的单克隆抗体描述于, 例如, PCT 公开 No.WO2005/016955A2 中, 在此将其整体引入作为参考。

### Nogo 受体拮抗剂的用途

本发明涉及治疗涉及神经退化的病症的方法, 包括感觉神经元如视网膜神经节细胞和毛细胞的退化。例如, 本发明涉及促进呈现涉及神经细胞死亡病症的信号或症状的哺乳动物中感觉神经元再生或存活的方法, 包括将治疗有效量的本发明的 Nogo 受体-1 拮抗剂给药于哺乳动物。在特定的实施方案中, 本发明涉及促进呈现涉及神经细胞死亡病症的信号或症状的哺乳动物中感觉神经元再生或存活的方法, 没有促进 CNS 神经突生长, 包括将治疗有效量的本发明的 Nogo 受体-1 拮抗剂给药于哺乳动物, 其促进神经元的存活或再生但不促进神经突生长。

本发明包括治疗视神经病的方法, 视神经病包括但不限于, 例如, 青光眼, 视神经鞘脑膜瘤和神经胶质瘤, Graves' 眼病, 良性或恶性眼窝肿瘤, 转移性损伤, 由邻近的副鼻窦或中间的颅窝引起的肿瘤, 巨大垂体腺瘤, 脑瘤或脓肿, 大脑创伤或出血, 脑膜炎, 蛛网膜粘附, 假性脑瘤, 海绵窦血栓形成, 硬膜窦血栓形成, 脑炎, 占位性脑损伤, 严重的高血压病或肺气肿, 缺血性视神经病(包括前缺血性视神经病), 视网膜血管阻塞, 糖尿病视网膜病, 黄斑变性, 色素性视网膜炎和 Leber 氏病(参见, 例如, U.S. 专利 No.6,162,428 和 U.S. 专利申请 No.20040228795 和 20040192699)。

本发明的一些实施方案中, RGC 退化或死亡与疾病, 失调或病症相关, 包括但不限于, 青光眼。本发明的一些实施方案中, 毛细胞退

化或死亡与疾病，失调或病症相关，包括但不限于，听力损失，包括年龄相关的听力损失。

### Nogo 受体拮抗剂药物组合物

用于本发明方法中的 Nogo 受体拮抗剂可以配制成药物组合物，用于给药于哺乳动物，包括人。用于本发明方法中的药物组合物包括药物学上可接受的载体。

用于这些药物组合物中的药物学上可接受的载体包括，例如，离子交换剂，矾土，硬脂酸铝，卵磷脂，血清蛋白，如人血清白蛋白，缓冲物质如磷酸盐，甘氨酸，山梨酸，山梨酸钾，饱和植物脂肪酸的偏甘油酸酯混合物，水，盐或电解质，如硫酸鱼精蛋白，磷酸氢二钠，磷酸氢钾，氯化钠，锌盐，胶态氧化硅，三硅酸镁，聚乙烯吡咯烷酮，基于纤维素的物质，聚乙二醇，羧甲基纤维素钠，聚丙烯酸酯，蜡，聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物，聚乙二醇和羊毛脂。

用于本发明方法中的组合物可以通过任何合适的方法来给药，例如，胃肠外，心室内，口服，通过吸入喷雾，局部，直肠，鼻，口腔，阴道或通过植入的储存器，例如，胶囊植入物（参见，例如，Sieving 等，*PNAS* 103 (10): 3896-3901 (2006)）或隐性眼镜（参见，例如，U.S. 专利 No. 6,410,045 和 Gulsen, D. 和 Chauhan A., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45 (7): 2342-2347 (2004)）。如在此所用的术语“胃肠外”包括皮下，静脉内，肌内，关节内，滑膜内，胸骨内，鞘内，肝内，病灶内和颅内注射或灌输技术。本发明的方法中，Nogo 受体拮抗剂必须穿越眼睛。在 Nogo 受体拮抗剂是可溶性 Nogo 受体或抗 Nogo 受体抗体的情况中，通常以滴眼液或在眼内例如玻璃体内给药拮抗剂。在 Nogo 受体拮抗剂是传送到其他远侧部位后可以穿越眼睛的分子的情况中，给药途径可以是以下所述的各种途径中的一种或多种。

用于本发明方法中的无菌可注射形式的组合物可以是水性或油质的悬浮液。可以根据本领域已知的技术使用合适的分散或湿润剂和悬浮剂来配制这些悬浮液。无菌可注射制剂还可以是无毒的胃肠外可接受的稀释剂和溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如作为 1,3-丁二醇中的溶液。在可以使用的可接受的载体和溶剂中，为水，林格溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。为

此，可以使用任何温和的固定油，包括合成的单或双甘油酯。脂肪酸，如油酸及其甘油酯衍生物可以用于可注射物的制备中，天然药物学上可接受的油也是如此，如橄榄油或蓖麻油，特别是其多聚氧乙基化形式。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂，如羧甲基纤维素或相似的分散剂，其通常用于药物学上可接受剂型的配制中，包括乳剂和悬浮液。通常用于制造药物学上可接受的固体，液体或者其他剂型的其他常用表面活性剂，如吐温，司盘和其他乳化剂或生物利用率增强剂也可用于配制目的。

胃肠外制剂可以是单次注射剂量，灌输或负荷单次剂量，接着连续剂量。这些组合物可以一天给药一次或“按需”给药。

用于本发明方法中的特定药物组合物以任何口服可接受的形式来口服给药，包括，例如，胶囊，片剂，水性悬浮液或溶液。特定药物组合物还可以通过鼻气雾剂或吸入来给药。可以将这样的组合物制成盐水溶液，使用苯甲醇或其他合适的防腐剂，提高生物利用率的吸收促进剂，碳氟化合物和/或其他常规增溶剂或分散剂。

可以结合载体物质来生产单一剂型的 Nogo 受体拮抗剂的量将根据接受治疗的患者和特定的给药模式而变化。组合物可以作为单剂量，多剂量或在已确定的时间段内进行灌输来给药。还可以调节剂量方案以提供最佳的所需反应（例如，治疗或预防反应）。

本发明的方法使用“治疗有效量”或“预防有效量”的 Nogo 受体拮抗剂。用于本发明方法中的治疗或预防有效量可以根据诸如个体的病态，年龄，性别和体重这些因素而变化。治疗或预防有效量是其中治疗有效效果超过任何毒性或有害效果的量。

对于任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于许多因素，包括特定的 Nogo 受体拮抗剂，患者的年龄，体重，一般健康，性别和饮食，以及给药时间，排泄速率，药物组合和待治疗的特定疾病的严重程度。医护人员判断这些因素是本领域的普通技术。拮抗剂的量将取决于待治疗的个体患者，给药途径，剂型，所用化合物的特征，疾病的严重程度和所需的效果。通过本领域公知的药理学和药物动力学原理可以确定拮抗剂的量。

在本发明的方法中，通常在眼内例如玻璃体内给药 Nogo 受体拮抗剂。可以将根据本发明方法给药的组合物进行配制，使得每天给药

0.001-10mg/kg 体重的 Nogo 受体拮抗剂。在一些实施方案中，剂量为 0.01-1.0mg/kg 体重每天。在一些实施方案中，所述剂量为 0.05-0.5mg/kg 体重每天。

还可以将补充活性化合物掺入本发明方法中所用的组合物中。例如，可以将 Nogo 受体抗体或其抗原结合片段，或可溶性 Nogo 受体多肽或融合蛋白与一种或多种另外的治疗剂共同配制和/或共同给药。

所述组合物还可以包括分散于作为化合物合适的传送或支持系统的生物可降解载体材料中的 Nogo 受体拮抗剂。持续释放载体的合适例子包括以诸如栓剂或胶囊的成形物形式存在的半透过性聚合物基质。可植入的或微胶囊持续释放基质包括聚交酯 (U.S. 专利 No.3,773,319; EP58,481), L-谷氨酸和  $\gamma$ -乙基-L-谷氨酰胺的共聚物 (Sidman 等, *Biopolymers* 22: 547-56 (1985)); 聚(2-羟乙基-丙烯酸酯), 乙烯醋酸乙烯酯 (Langer 等, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982)), 聚-D-(-)-3 羟基丁酸 (EP133,988) 或由聚醚砜, 乙酸内酰胺和聚乙烯吡咯烷酮构成的膜 (Tao 等, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 3292-3298 (2002))。

## 实施例

### 实施例 1

#### 在大鼠视网膜神经节细胞中表达 NgR1

免疫组织化学显示出 NgR1 在大鼠视网膜神经节细胞 (RGC) 中表达。在离开视盘 1.5mm 处将年轻雌性 Spargue Dawley 大鼠的视神经在眼窝内横断。将一片用 6% 氟-金浸渍的明胶海绵施加在就在视盘后面新横断的视神经上来标记存活的 RGC。2 天后，将动物牺牲，将视网膜固定于 4% 多聚甲醛中并包埋于石蜡中。使用鼠抗-NgR1 抗体 1D9 对视网膜切片进行免疫组织化学；并通过缀合德克萨斯红的对抗鼠 IgG 的二抗来检测。将切片在荧光显微镜下检测。NgR1 染色显示为红色，荧光-金染色显示为蓝色。图 1A-1B。

### 实施例 2

单克隆抗-NgR1 抗体 1D9 与可溶性大鼠 Nogo 受体 310 (srNgR310) 的结合

对 1D9 Fab 和大鼠 NgR1 可溶性片段 (srNgR310) 的共结晶复合物进行的结构分析显示出该抗体在大鼠 NgR1 上的 N-端帽和亮氨酸富集重复结构域的连接点附近结合。图 2。为了 srNgR310-Fc 与 1D9 Fab 的结晶, 用木瓜蛋白酶分裂每个大分子, 从 Fc 部分中纯化出来并储存于 10mM Hepes pH7, 50mM NaCl 中。将复合物各自制备成 80 $\mu$ M, 与储存器溶液以 2: 1 的体积比混合, 该溶液由 14% Peg3350, 0.4M 醋酸锌, 0.1M 氯化镁构成。将溶液在 20 $^{\circ}$ C 孵育 1hr 并在 12,000xg 离心 3 分钟来除去沉淀物。通过将 3-5 $\mu$ L 上清液覆盖含有 50%至 100%存储器溶液的孔, 在 20 $^{\circ}$ C 使晶体生长。薄片样晶体在 20 $^{\circ}$ C 生长一周的时间段。通过快速转移至 0.2M 醋酸锌, 8% Peg3350, 25%乙二醇中 2 分钟来冷冻保护晶体, 然后通过快速转移至液氮中来冷冻。

在国家同步辐射光源 (National Synchrotron Light Source) (Upton, NY) 在射束线 X25, 大约 10 $\mu$ m 厚的晶体衍射成 3.2 $\text{\AA}$ 。使用 HKL 数据包 v.1.97 (Otwinowski, Z., 和 Minor, W. Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode(处理以振动模式收集的 X-射线衍射数据)。Methods Enzymol 276: 307-326 (1997)) 的数据处理揭示了晶体属于 P21212 空间组以及大约的细胞三维  $a=90.6\text{\AA}$ ,  $b=188.6\text{\AA}$ ,  $c=125.5\text{\AA}$ , 且  $\alpha=\beta=\gamma=90$ , 与每个不对称单元的 2Fab-NgR1 复合物相符合。

利用关于浸湿晶体的多重同晶置换实验的信息来解释晶体结构以鉴定沿着分子置换的结合 NgR 的常见汞位点。通过汞和金同晶差异帕特逊投影图的检查来鉴定空间组, 其中在  $w=0$  哈克切面鉴定出一致的 5 个  $\sigma$  峰。利用基于人 NgR1 结构 (pdb 密码子 1OZN) 的大鼠 NgR 同源模型 (He, X. L.等, *Neuron* 38: 177 (2003)) 和用于 1D9 Fab 的同源模型, 用 MOLREP (Vagin, A. 和 Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for Molecular replacement (MOLREP: 分子置换的自动化程序)。J. Appl. Cryst. 30: 1022-1025 (1997)) 的分子置换导致一个 NgR1, 一个 Fab 和第二个 NgR1 分子的放置, 结果是 48%的 R-因素和 Fab 的 CDR 片段的清楚的密度。通过将从不同的特逊投影图鉴定的汞位点作图至 NgR1 分子上接近 Asp138 和 His182 的相等位置来证实模型的放置。在密度中没有清楚地鉴定其他的 Fab 片段。用 42%的 R-因素和 46%的 Rfree 继续进行两个 NgR1 和 1Fab 的提炼, 使用 CNX (Brunger, A.T.

等, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 905-921 (1998)) 至 3.2 Å 分辨率。

表 4 显示出 1D9 Fab 和大鼠 NgR1 之间的接触。列出了其中来自 Fab 的原子与大鼠 NgR1 内的原子是在 3.9Å 内的接触并且与主链或侧链可以形成氢键的那些接触具有附属的星号 (\*)。

表 4

CDR L1	CDR L2	CDR L3
KSSQSLNSRNRKNYLA	WASTRES	MQSYNLFT
N31 - 1D9 Y71 - NgRI		
R33 - 1D9 Y71, D97*, A94 - NgRI		
N34 - 1D9 S70*, Y71 - NgRI		

CDR H1	CDR H2	CDR H3
GFSLSSYGVH	VIWSGGNTHYNSALMS	VGIYYEGAWFAY
F27 - 1D9 P26 - NgRI	S53- 1D9 S79* - NgRI	G99- 1D9 A53 - NgRI
S28 - 1D9 P26 - NgRI	G54- 1D9 R81 - NgRI	Y101- 1D9 P73*, A74*, S76*, A50, V51* - NgRI
S30 - 1D9 A57* - NgRI	N56 - 1D9 Q78* - NgRI	Y102- 1D9 Y71, P73, A50, V51*, L36*- NgRI
S31 - 1D9 G54 - NgRI		E103- 1D9 Q49, A50, V51, P52, A53*-NgRI
Y32 - 1D9 P26, P28 - NgRI		G104-1D9 A53 - NgRI

\*表示 H-键相互作用

### 实施例 3

#### 可溶性 Nogo 受体 (310) -Fc 促进了体外神经存活

从成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠分离 P1 或 P2 大鼠背根神经节 (DRG) 神经元并置于含有 Ham's F12 培养基的 96-孔培养平板中, 该培养基含有 5%热灭活的供体马血清 (JRH Bioscience, Logan, UT), 5%热灭活的 FBS (JRH Bioscience) 和 50ng/ml 鼠神经生长因子 (JRH Bioscience)。涂布后, 从培养基中除去神经生长因子 (NGF) 并在递增浓度的 srNgR310-Fc (或作为对照的大鼠 IgG) 的存在或不存在下将细胞保持 7 天。将细胞固定并对于存活的核染色。该实验的结果表明 srNgR310-Fc 促进了缺乏 NGF 下的 DRG 神经元的存活 (图 3)。

在分开的实验中, 从大鼠胚胎 (18 天的胚胎) 分离皮层神经元并置于 96-孔培养平板中。涂布后, 从培养基中除去神经生长因子 (NGF) 并将细胞在 srNgR310-Fc 的存在或不存在下保持 7 天。将细胞固定并对存活的核染色。该实验的结果表明 srNgR310-Fc 还促进了缺乏 NGF 下的皮层神经元的存活 (表 5)。

表 5 存活的 DRG 神经元的数量

使用 NGF	没有 NGF	没有 NGF / 使用 5 $\mu$ M srNgR310-Fc
25.2 $\pm$ 2.4	2.5 $\pm$ 0.3	11.1 $\pm$ 2.7

### 实施例 4

#### srNgR310-Fc 促进视网膜神经节细胞的体内存活

我们使用视神经横断模型证实了 srNgR310-Fc 在体内促进了神经元存活(图 4A-4C)。在离视盘 1.5mm 处将年轻成年雌性 Spargue Dawley 的右侧视神经在眼窝内横断 (图 4A)。将一片用 6%氟-金 (FG) 浸泡的明胶海绵施加在就在视盘后面的新横断位点来标记存活的 RGC (图 4B)。将动物分成 2 组 (每组 n=6), 通过玻璃体内注射接受 2 $\mu$ g srNgR310-Fc 或 PBS (4 $\mu$ l) (图 4C)。在视神经横断后立即进行玻璃体内注射。

在第 5 天, 将每只动物左侧的视神经横断并使用 6%FG 来表达存活的 RGC 来作为内部对照。用过量的戊巴比妥将动物牺牲, 并将解剖



的视网膜放入 4%多聚甲醛中。形成四个放射状切口，将视网膜分成四个象限（上方，下方，鼻和颞部）。然后在用封固介质（Dako）平着封固之前，将视网膜在相同固定剂中后固定 1 小时。图 4B。使用紫外线滤器（发射波长=330-380nm）在荧光显微镜下检测载玻片。在 200X200mm 的目镜网格下，沿着每个象限的中线从视盘开始至视网膜的外周边缘以 500nm 的间隔计数标记的 RGC。通过比较损伤眼睛与对侧眼睛中存活 RGC 的数量来表示每种处理得到的存活 RGC 的百分比。所有数据表示为平均 $\pm$ SEM。通过 One-way ANOVA, 接着 Tukey-Kramer post hoc 测试来评价统计学差异。对于  $p < 0.05$ , 认为差异是显著性的。

数据表明与 PBS 处理的动物（其各自只显示出大约 50%的神经元存活）相比较时，srNgR310-Fc 处理的动物显示出显著的神经元存活（大约 80%）（图 5）。这些结果证实了 NgR 拮抗剂还在体内促进了的神经元存活。

### 实施例 5

srNgR310-Fc 促进了大鼠青光眼模型中视网膜神经节细胞的存活

我们在公认的青光眼模型中测试了 srNgR310-Fc (Woldemussie 等, “Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension,” (激光诱导的慢性眼高压大鼠中通过 brimonidine 分视网膜神经节细胞的神经保护) Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 42, 2849-2855 (2001))。在该模型中，氩激光器用于通过激光凝固缘和巩膜排出管而阻止水状液流出，导致眼内压确实的提高（参见图 6）。

在称重大约 250-280g 的成年雌性 Sprague-Dawley 中进行实验。就在第一次激光操作之前，使用眼压计测量基线 IOP 来获得正常的 IOP 读数。通过在 peri-limbal 区域周围以 270°电弧激光凝固巩膜和边缘静脉来诱导右眼升高的 IOP。以 7 天的间隔将激光处理进行两次。将大约 20 和 60 激光照射（1W, 0.1 秒，斑大小：50-100mm）各自应用至巩膜上静脉和缘静脉。每次操作后 3 天监控 IOP 来证实激光处理的眼睛中 IOP 的升高。在第一个激光凝固后立即在眼窝内注射 2 $\mu$ g/眼 srNgR310-Fc 或 PBS。进行第二次激光凝固时，将一片用 6%氟-金浸泡的明胶海绵施加至上丘来逆行标记 RGC。第二次激光操作后三天，将

动物牺牲并将视网膜平着封固。

在所有视网膜的三个象限（鼻，下方 & 颞部）中计数 RGC 的数量。通过比较相同动物的激光处理的眼睛和对侧的对照眼睛，将 RGC 密度的改变表示为 RGC 的百分比丢失。在所有激光操作的眼睛中观察到 IOP 的一致升高。与假对照左眼相比较，激光操作眼睛中的 IOP 高 1.5 倍。数据表明 srNgR310-Fc 的单次玻璃体内注射促进了 IOP 升高的眼睛中的 RGC 存活（图 7A）。

另一个实验证实了这些结果。在该实验中，用 srNgR310-Fc 的处理与 PBS 对照相比较提高了激光处理后整个和外周视网膜中 RGC 的存活，而用 sNgR1(27-310)-Fc 处理在降低激光处理后的 IOP 中没有效果（P-值表示与 PBS 组的比较）（图 7B-7C）。

### 实施例 6

#### 抗-NgR1 抗体 1D9 促进了体外神经元存活

从成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠分离 P1 或 P2 大鼠背根神经节（DRG）神经元并置于含有 Ham's F12 培养基的 96-孔培养平板中，该培养基含有 5%热灭活的供体马血清（JRH Bioscience, Logan, UT），5%热灭活的 FBS（JRH Bioscience）和 50ng/ml 鼠神经生长因子（JRH Bioscience）。涂布后，从培养基中除去神经生长因子（NGF）并在 1D9 存在下将细胞保持 6 天。将存活细胞固定，并对  $\beta$ -III 微管蛋白染色，并使用 Cellomics Arrayscan 计数。该实验的结果表明 1D9 处理保护了培养物中缺乏血清的大鼠 p2 DRG 神经元 6 天（图 8）。获得至少两个具有相似结果的实验。对于大脑神经元获得相似的结果（数据未显示）。

### 实施例 7

#### 单克隆抗-NgR1 抗体促进体内视网膜神经节细胞的存活

使用视神经横断模型测试了嵌合单克隆抗-NgR1 抗体 Fab 片段（1D9 Fab）促进神经元存活的能力。该实施例中所用的实验方案与实施例 4 中描述的相似。简而言之，将嵌合 Fab 在玻璃体内给予（每只眼睛 2 $\mu$ g）视神经横断的大鼠。监控视网膜神经节细胞存活。结果表明 1D9 处理导致视网膜神经节细胞在急性或慢性损伤后提高的存活。

大鼠中通过玻璃体内注射的 1D9 Fab 的两个分开制剂（各自称为

1D9.3-1027.070 和 1D9.3-10692.052) 的直接给药引起 RGC 存活的显著提高, 与其中单独给予缓冲剂的对照实验相比较 (图 9A-C)。

### 实施例 8

#### 单克隆抗-NgR1 抗体 1D9 促进大鼠青光眼模型中视网膜神经节细胞的存活

我们在公认的青光眼模型中测试了抗-NgR1 抗体 Fab 片段 (1D9 Fab) (Woldemussie 等, “Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension,” (激光诱导的慢性眼高压大鼠中通过 brimonidine 分视网膜神经节细胞的神经保护) *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 2849-2855 (2001))。如上所述, 氩激光用于通过缘和巩膜排出管的激光凝固阻断水状液流出, 导致眼内压 (IOP) 确实的提高。

在称重大约 250-280g 的成年雌性 Sprague-Dawley 中进行实验。就在第一次激光操作之前, 使用眼压计测量基线 IOP 来获得正常的 IOP 读数。通过在 peri-limbal 区域周围以 270° 电弧激光凝固巩膜和边缘静脉来诱导右眼升高的 IOP。以 7 天的间隔将激光处理进行两次。将大约 20 和 60 激光照射 (1W, 0.1 秒, 斑大小: 50-100mm) 各自应用至巩膜上静脉和缘静脉。每次操作后 3 天监控 IOP 来证实激光处理的眼睛中 IOP 的升高。在第一个激光凝固后立即在眼窝内注射 2 $\mu$ g/眼 1D9 或 PBS。在牺牲前 2 天通过在 ocular stump 放置一片用 6% 氟-金浸泡的明胶海绵来逆行标记存活的 RGC。在预定的时间 (手术后 7 和 14 天), 将动物杀死并将它们的眼睛解剖出来并平着封固。

在目镜网格 (200 $\mu$ m X 200 $\mu$ m) 下以 500 $\mu$ m 间隔沿着每个象限的中线从视盘开始至视网膜的外周边缘计数标记的 RGC。所有数据表示为平均 $\pm$ SEM。通过 One-way ANOVA, 接着 Tukey-Kramer post hoc 测试来评价统计学差异。对于  $p < 0.05$ , 认为差异是显著性的。通过比较相同动物的激光处理的眼睛和对测的对照眼睛, 将 RGC 密度的改变表示为 RGC 的百分比损失。在所有激光操作的眼睛中观察到一致的 IOP 升高。在所有组的激光处理的眼睛中观察到 IOP 提高约 1.7 倍。数据表明 1D9 的注射与 PBS 组相比较促进了眼高压诱导后眼睛中的 RGC 存活, 而 1D9 对降低激光处理后的 IOP 没有效果 (图 10A-B)。

### 实施例 9

#### Ala-Ala-rNgR310-Fc 和 Ala-Ala-hNgR310-Fc 促进了大鼠青光眼模型中视网膜神经节细胞的存活

如上所述，通过氩激光凝固缘和三支巩膜上静脉人为升高大鼠右眼的眼内压。通过单次玻璃体内注射，在受伤后立即将 2 $\mu$ g/眼的 Ala-Ala-rNgR310-Fc, Ala-Ala-hNgR310-Fc, 抗-NgR1 1D9 Fab 或 PBS 给药于眼睛 [2 $\mu$ g/2 $\mu$ l 每只眼]。在第 7 天，进行第二次激光凝固程序来维持眼睛内的眼内压。在第 10 天，将一片用 6% 氟-金浸泡的明胶海绵置于上丘表面上来逆行标记视网膜神经节神经元。在第 14 天将动物牺牲，并将视网膜平着封固和固定。在目镜网格下 (200 $\mu$ m $\times$ 200 $\mu$ m) 以 500 $\mu$ m 的间隔沿着每个象限的中线从视盘至视网膜的外周边缘计数存活的视网膜神经节神经元的数量[定义为显示出氟-金荧光的细胞体]。将右眼的存活视网膜神经节神经元的总数标准化至左眼的并表示为视网膜神经节神经元的 % 损失。每个实验组含有 3-5 只动物并使用 One-way ANOVA 或 t-测试来进行统计学分析。数据表明 Ala-Ala-rNgR310-Fc, Ala-Ala-hNgR310-Fc 或抗-NgR1 1D9 Fab 的注射促进了眼高压诱导后眼睛中的 RGC 存活在，与 PBS 组相比较(图 11)。

尽管通过用于清楚理解目的的说明和实施例相当详细地描述了前述的发明，本领域技术人员根据本发明的教导显而易见的是可以形成特定的改变和改进而没有脱离所附权利要求的实质或范围。

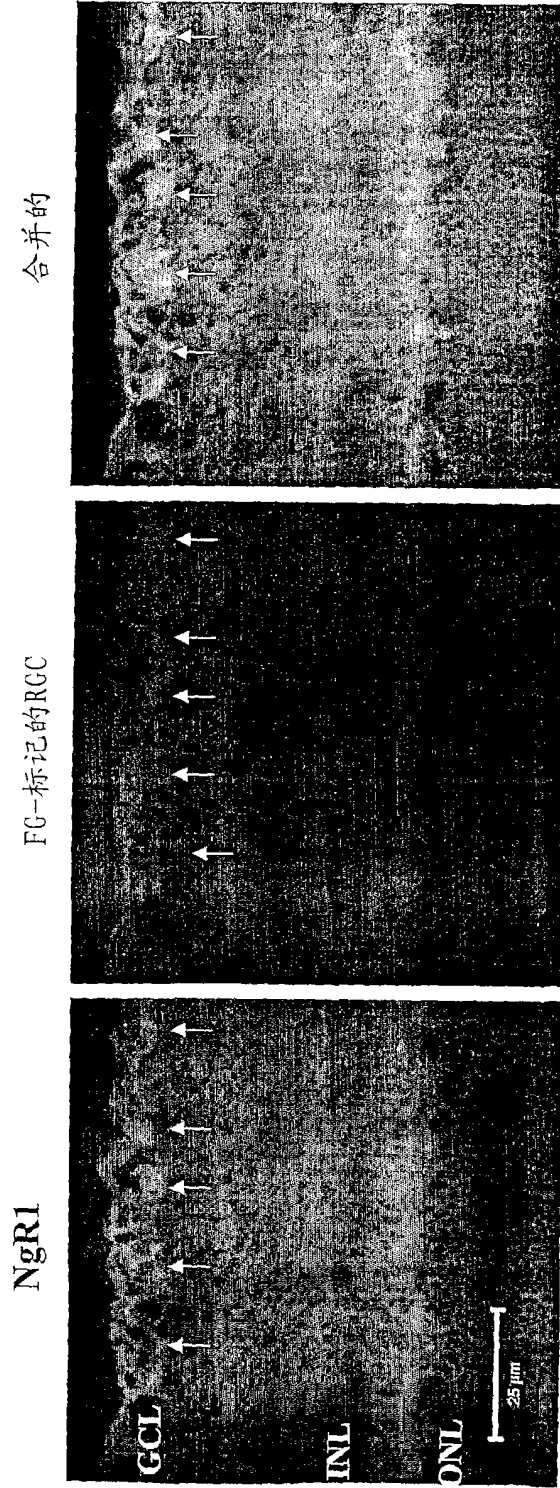


图 1A

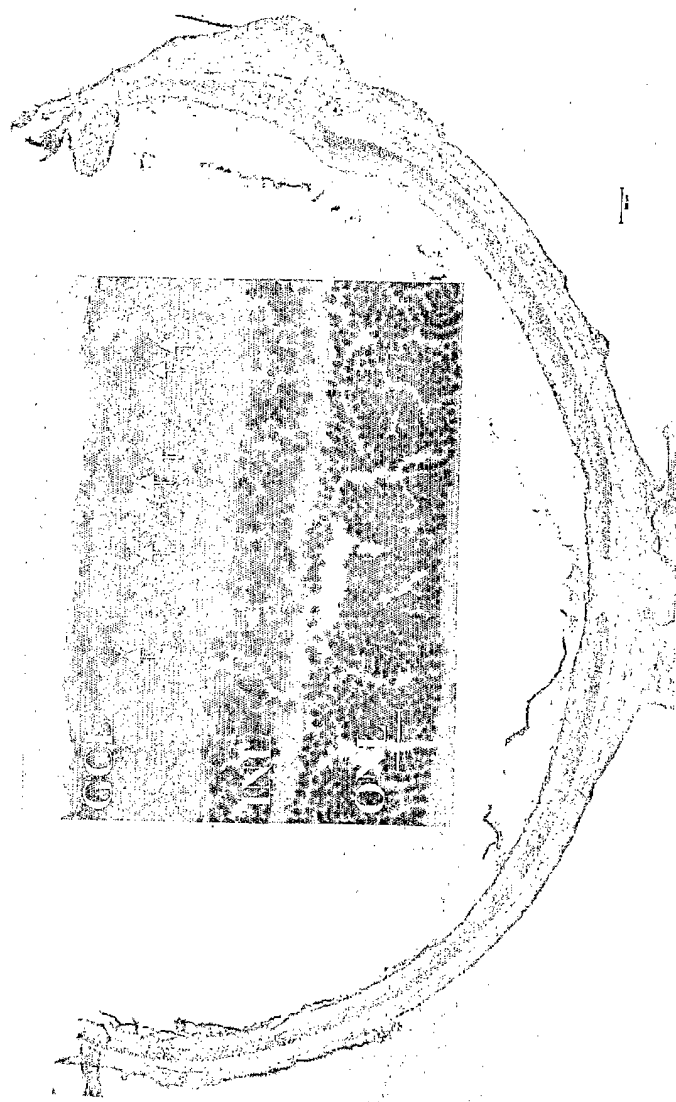


图 1B

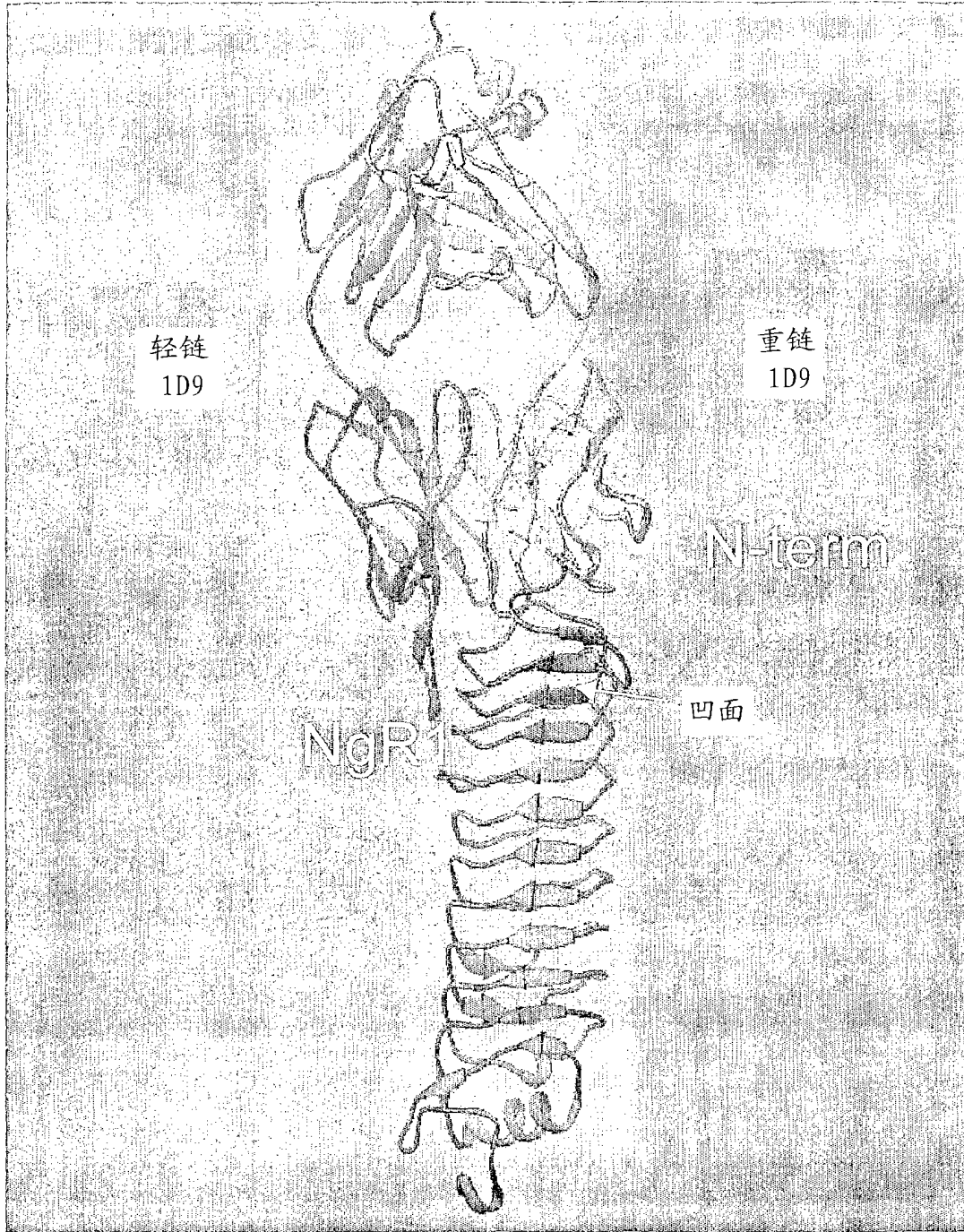


图 2

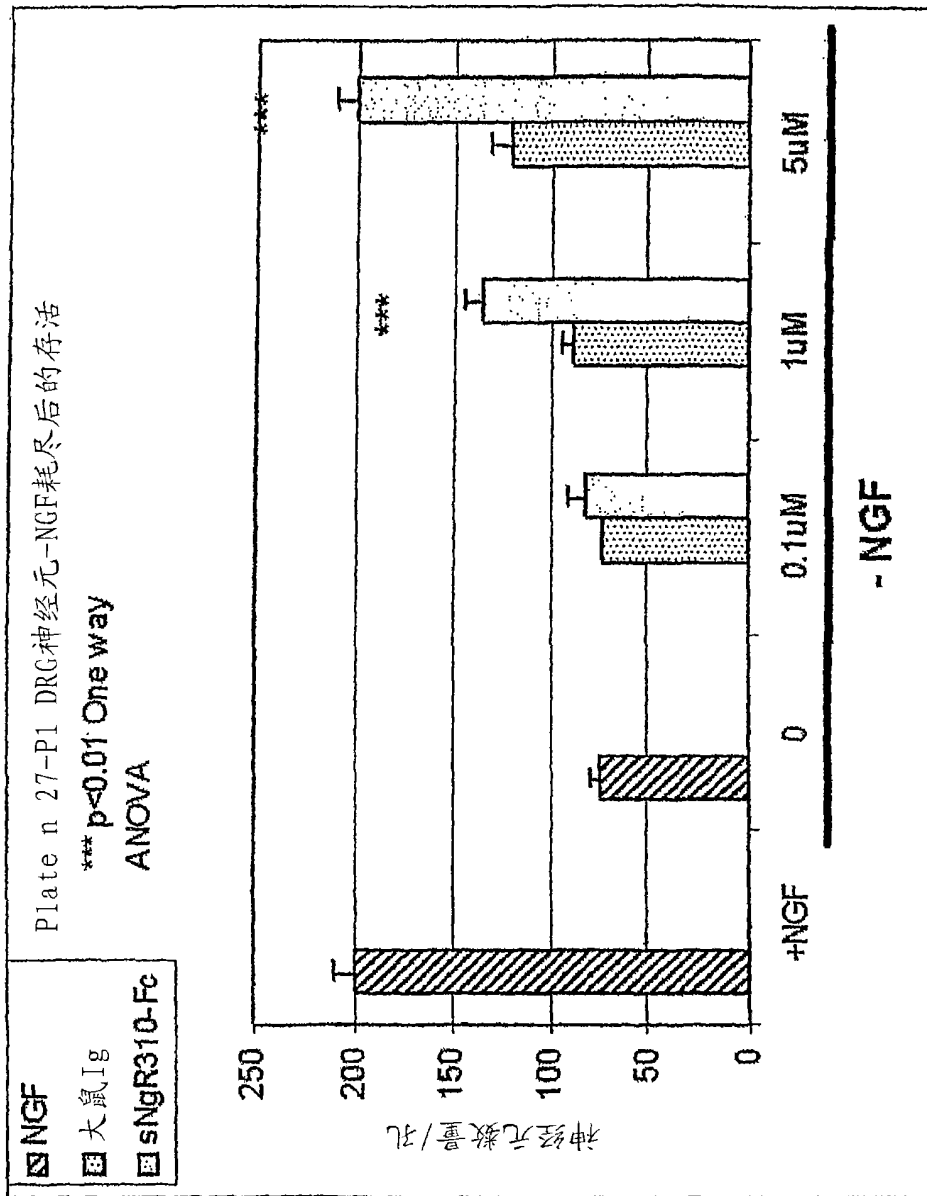


图 3



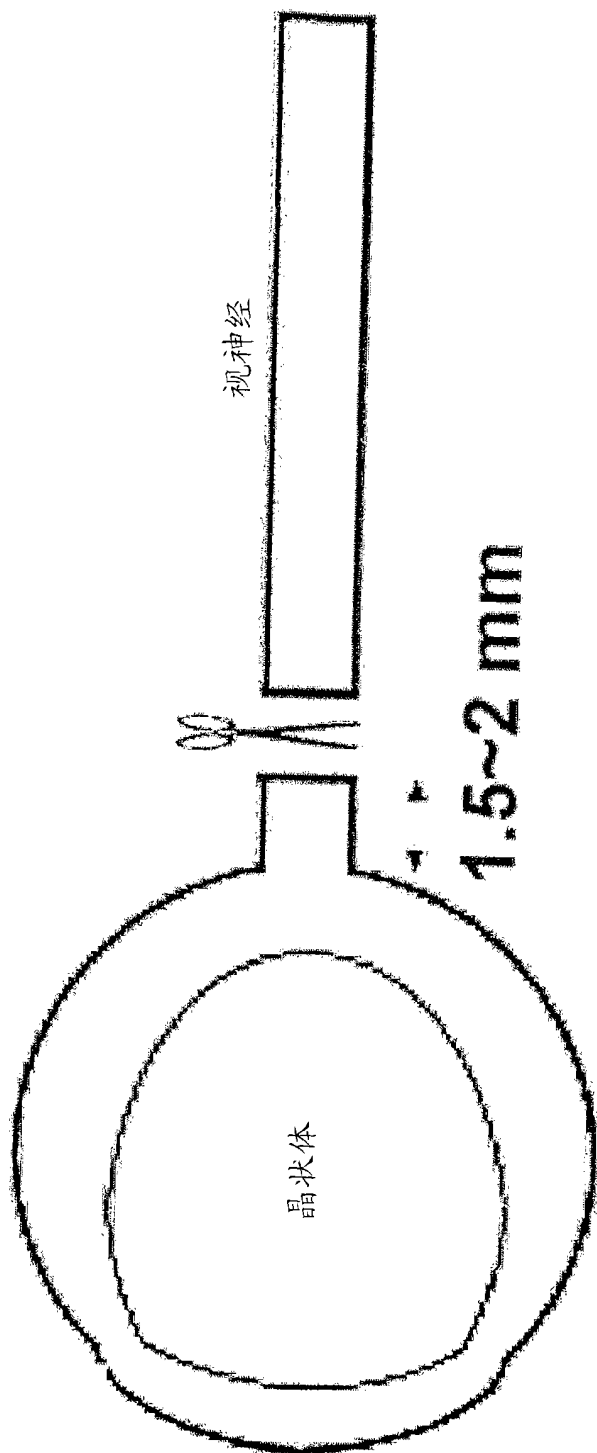


图 4A

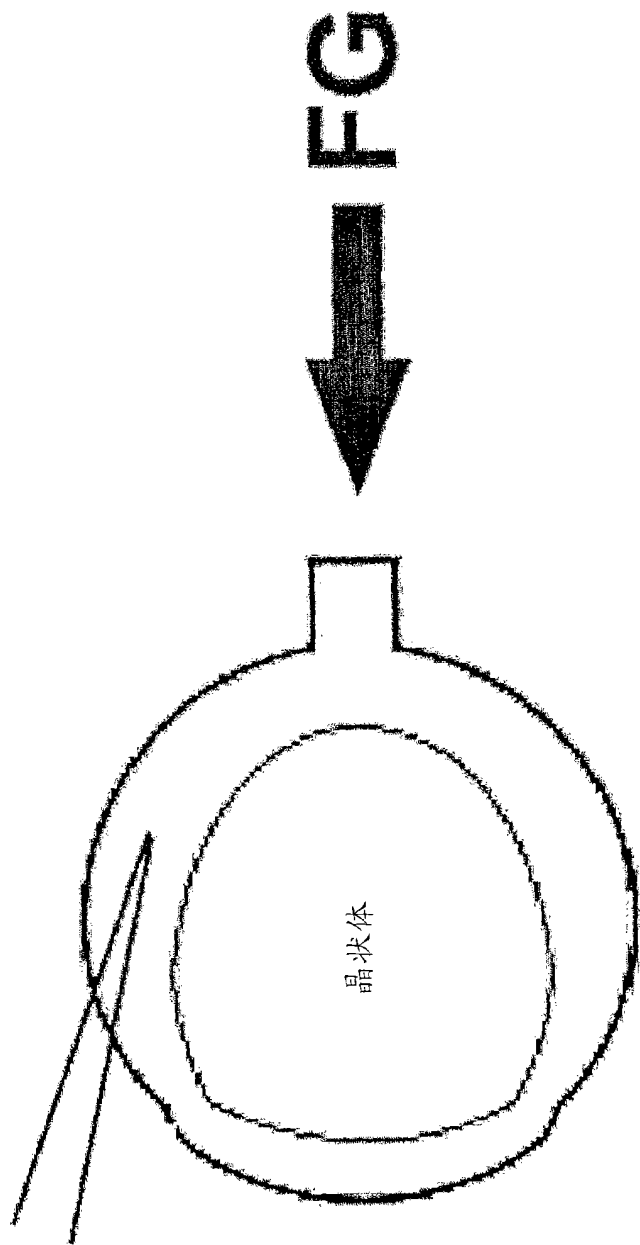


图 4B

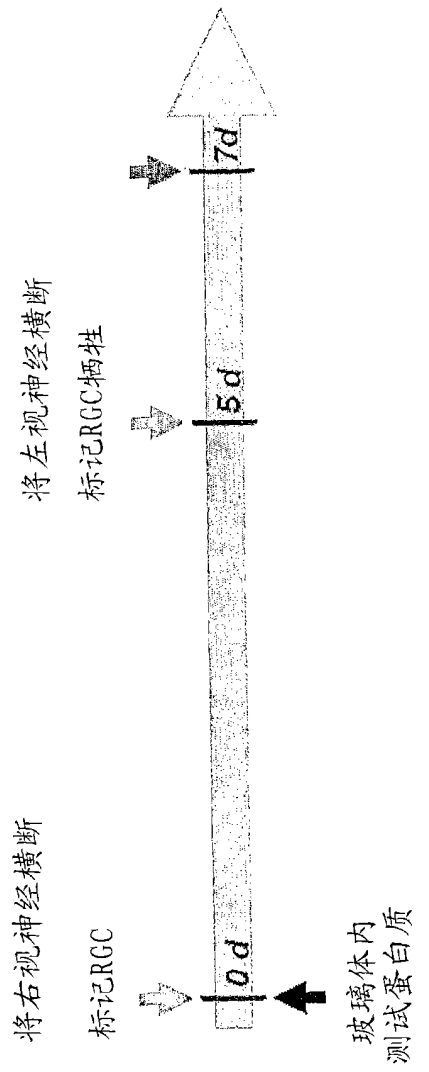


图 4C

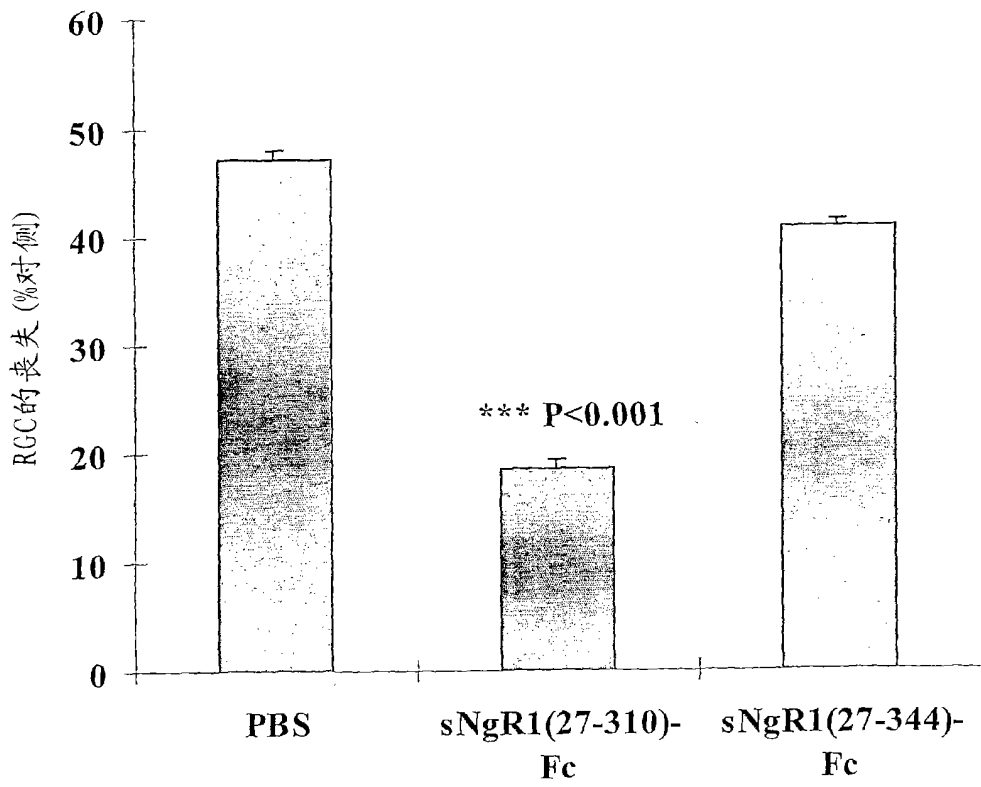


图 5

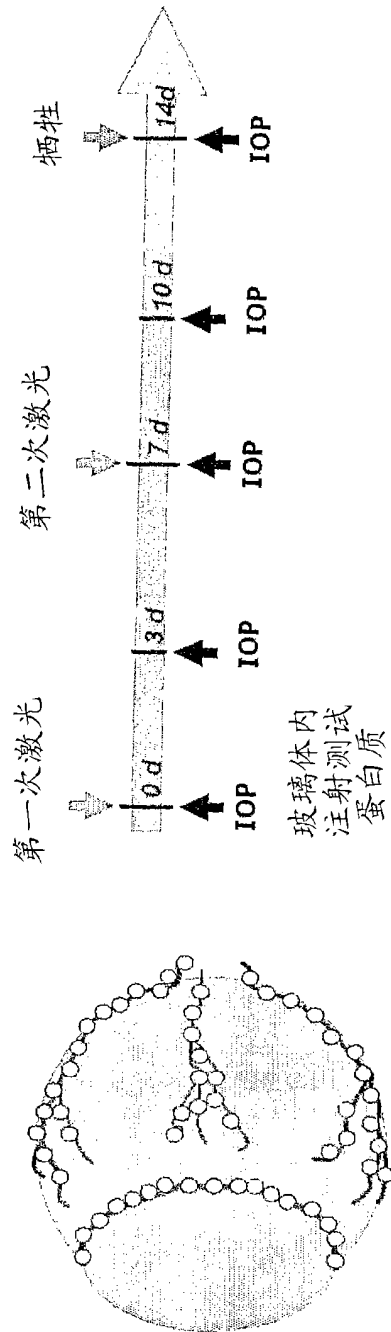
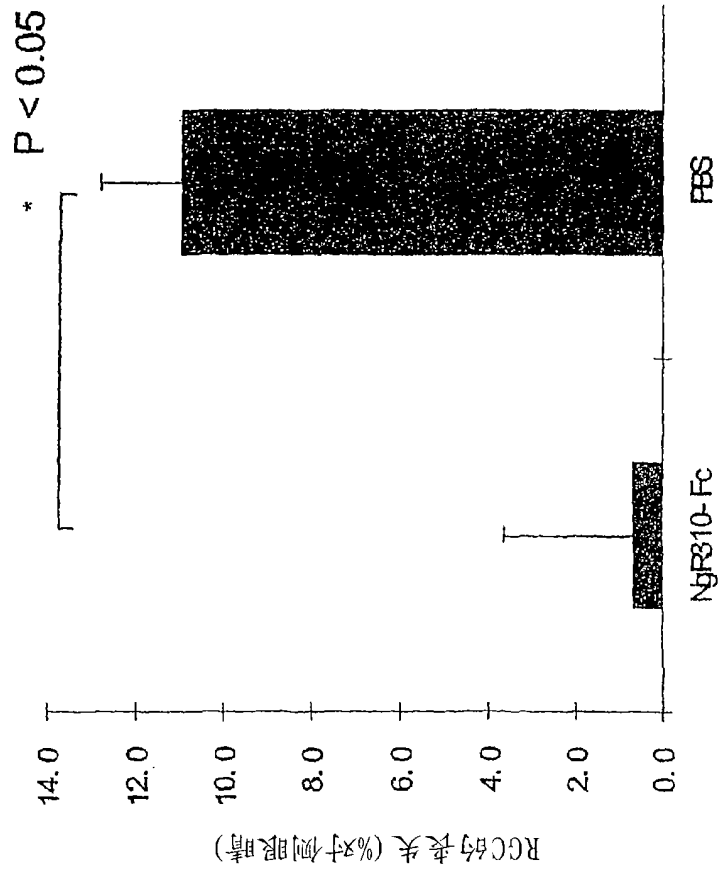


图 6

sNgR310-Fc促进了激光凝固青光眼模型中的RGC存活



呈现了来自6只大鼠6只眼睛的平均值且误差棒表示SEM

图 7A

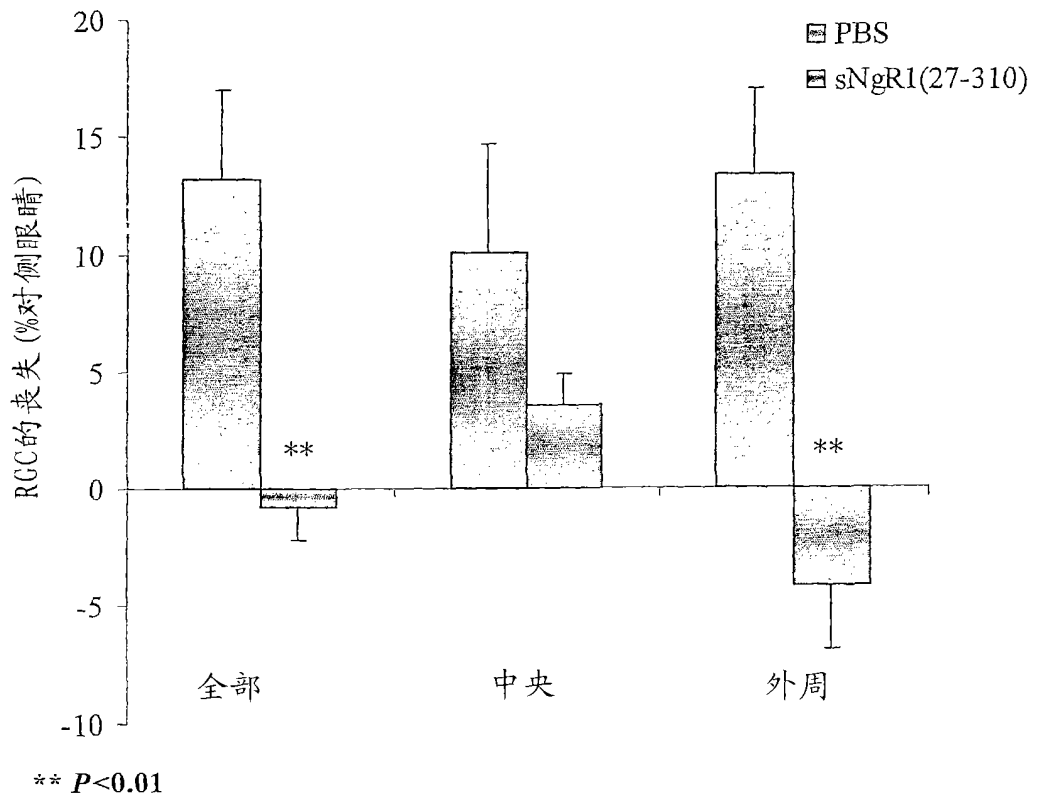


图 7B

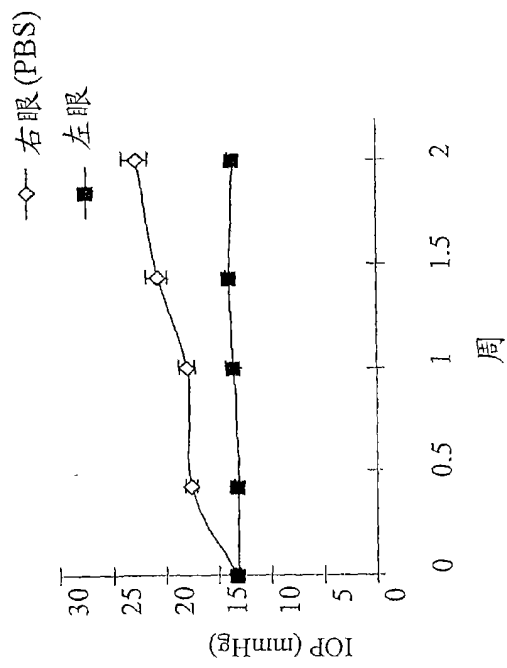
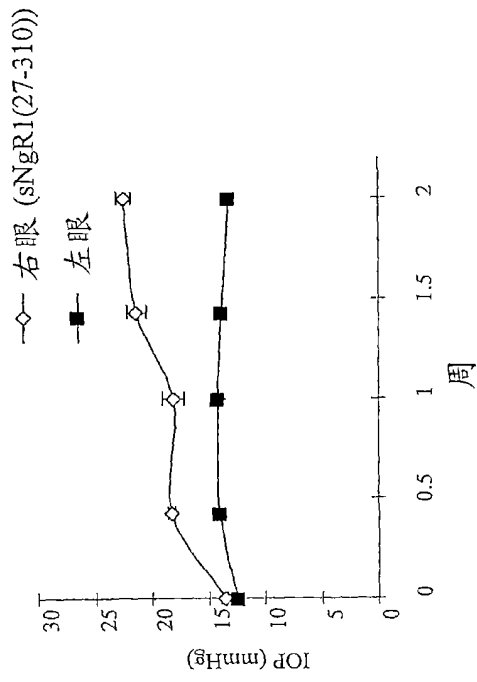


图 7C



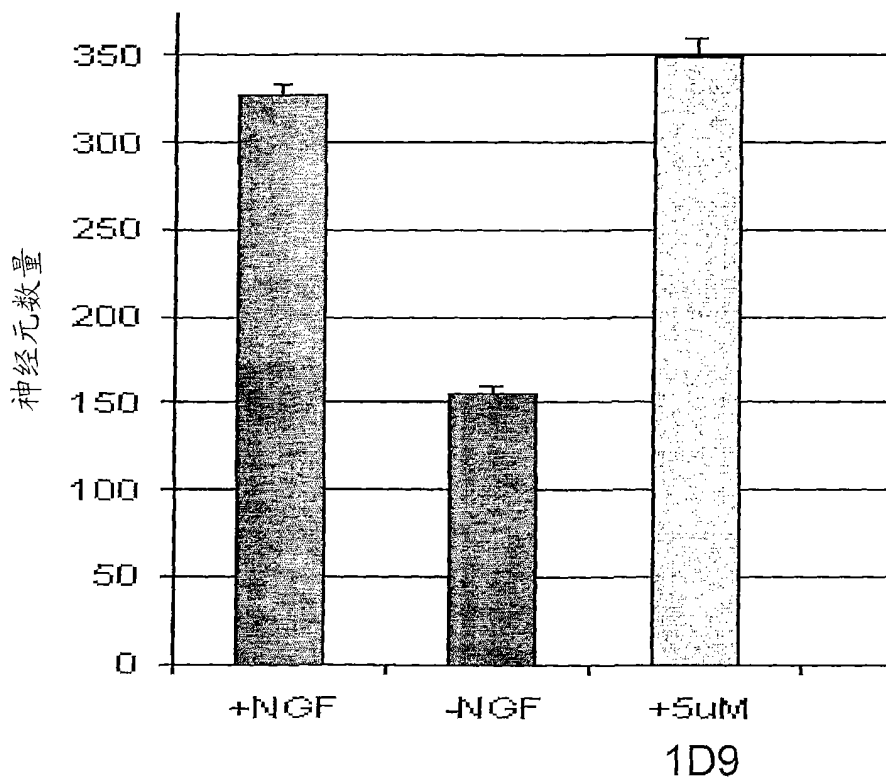


图 8

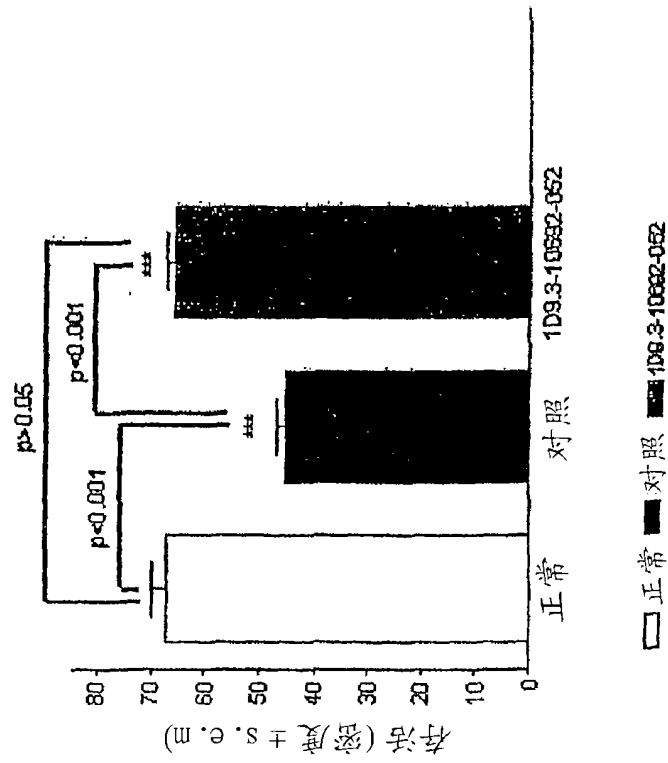


图 9B

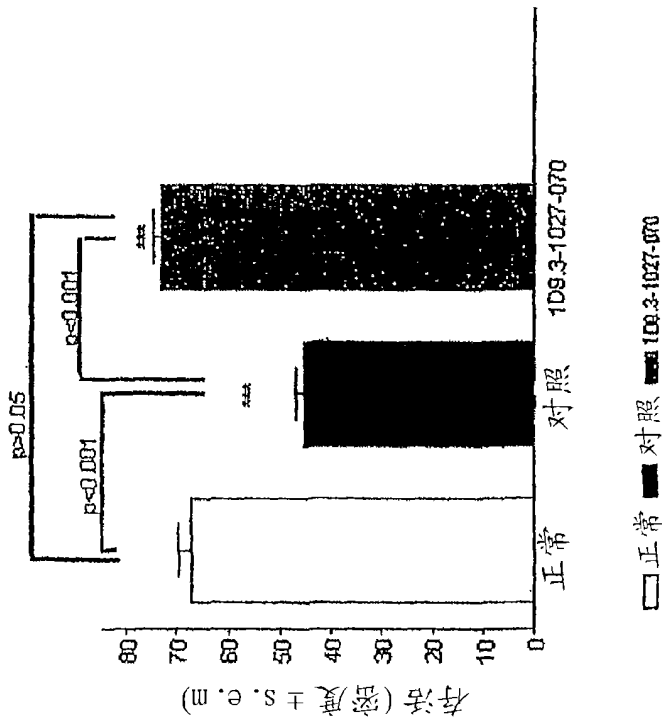


图 9A

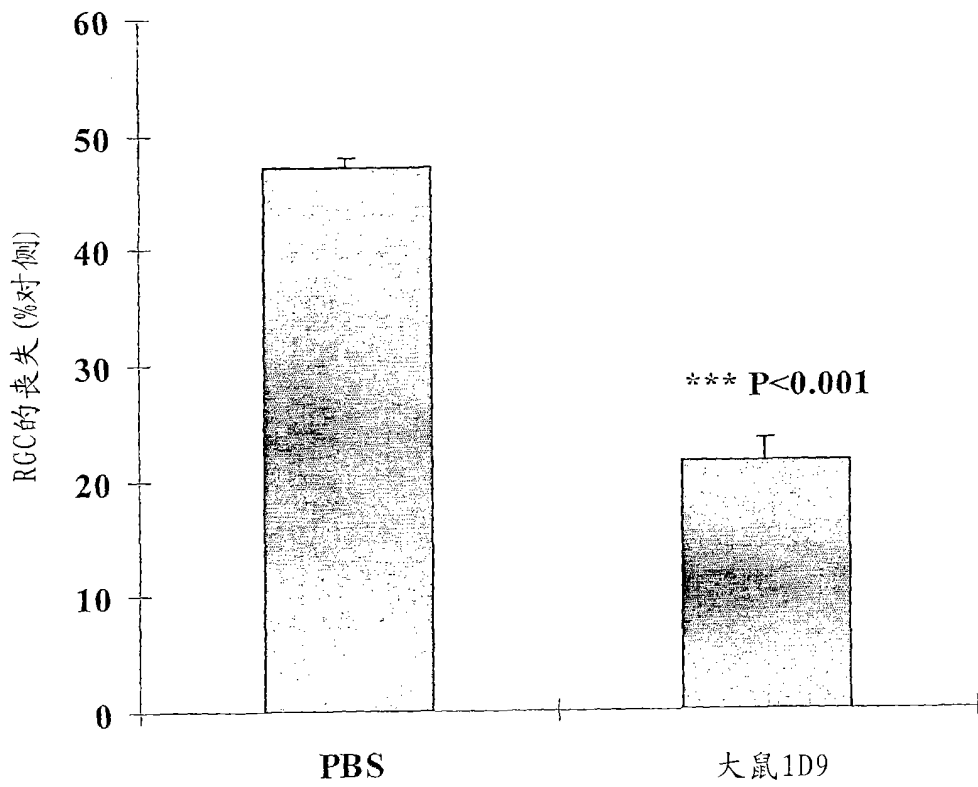


图 9C

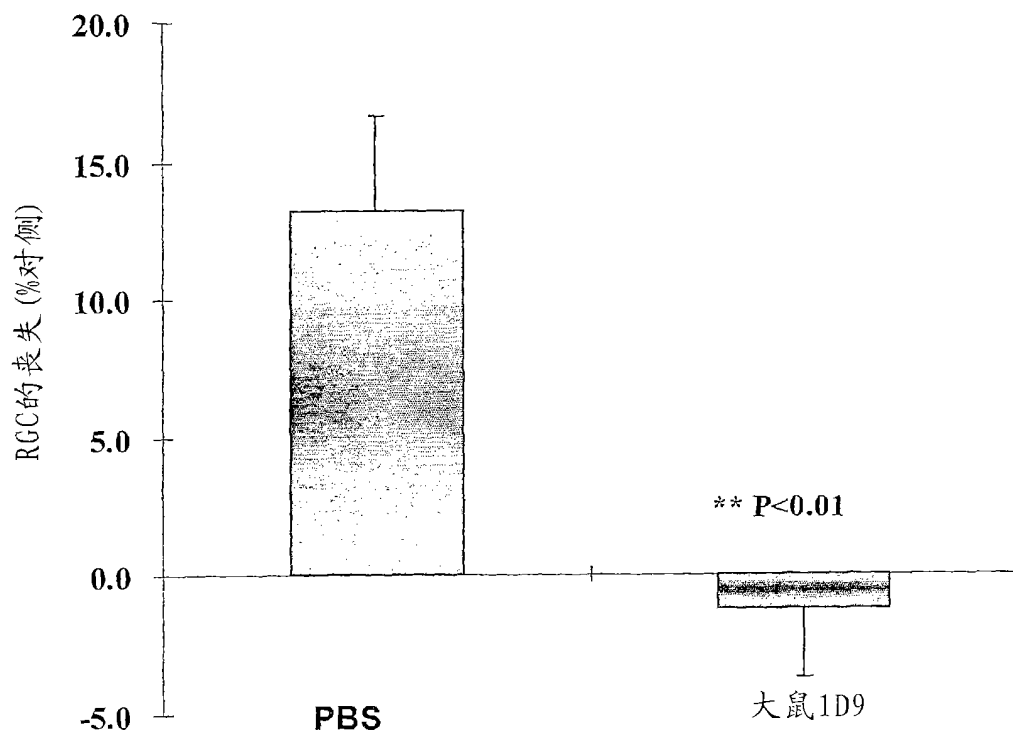


图 10A

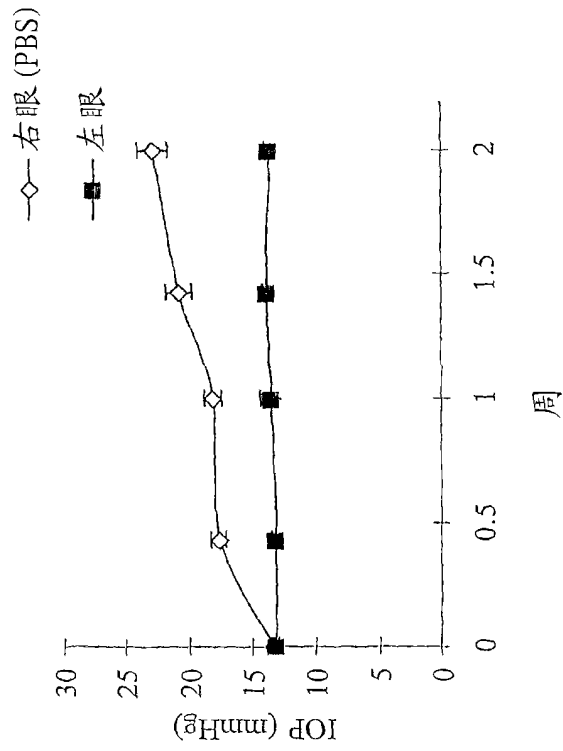
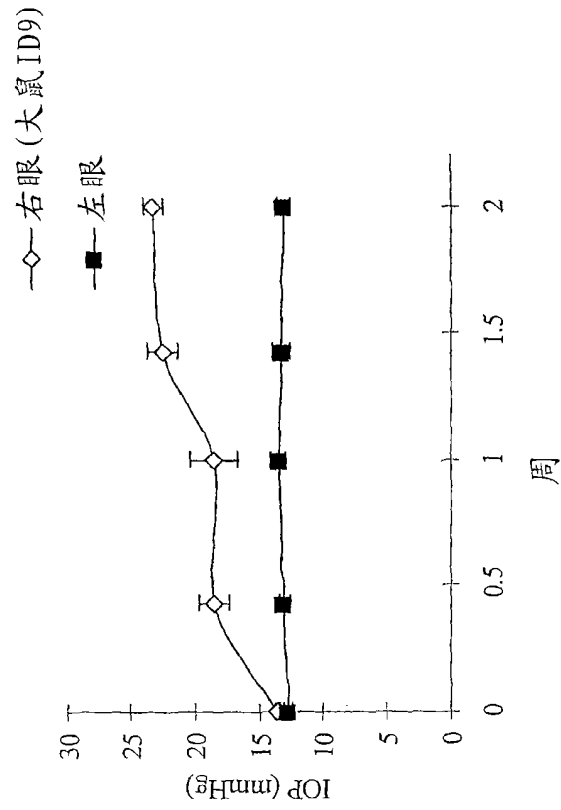


图 10B

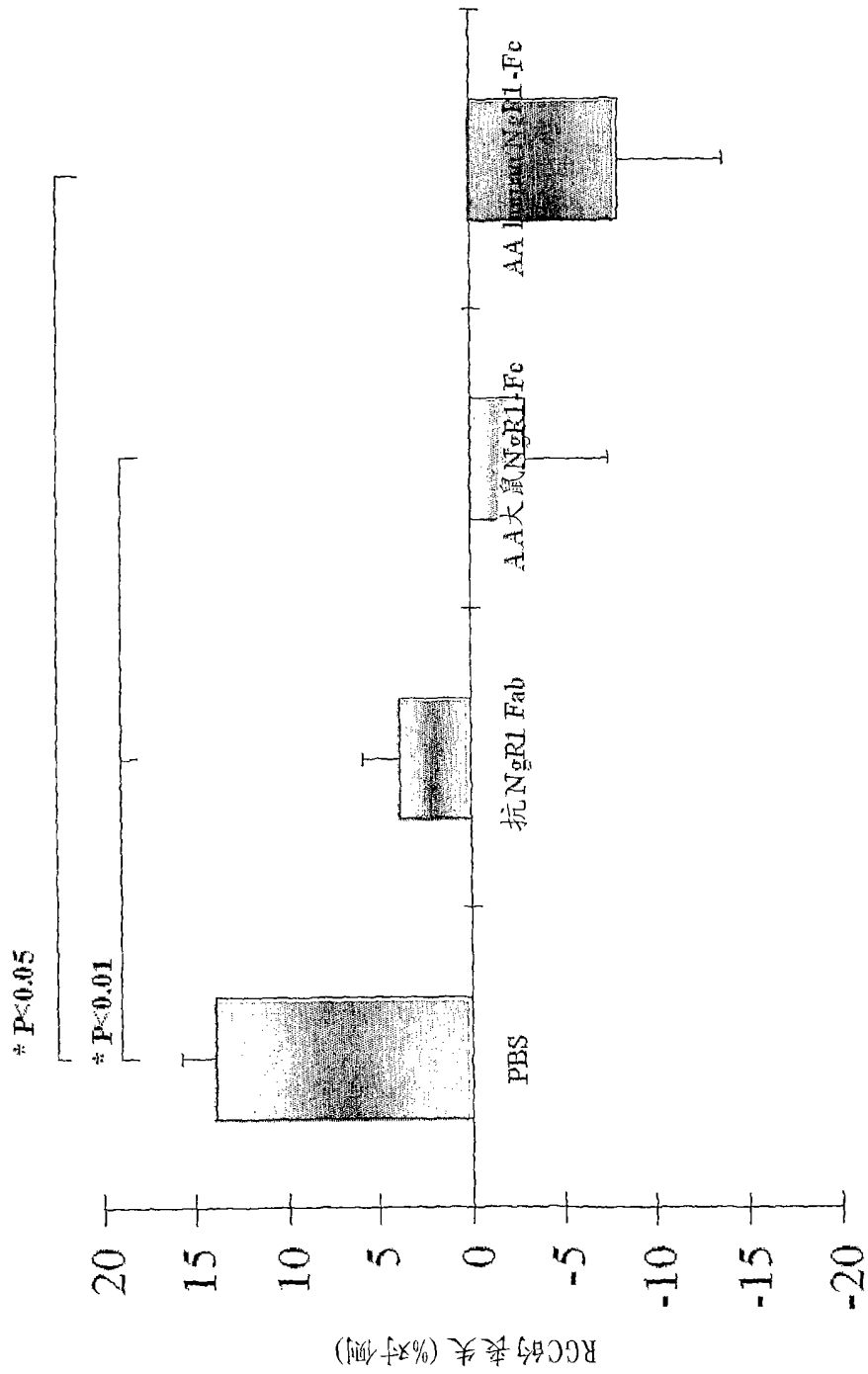


图 11