

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/08 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480033267.5

[43] 公开日 2006年12月13日

[11] 公开号 CN 1878792A

[22] 申请日 2004.9.17

[21] 申请号 200480033267.5

[30] 优先权

[32] 2003.9.19 [33] GB [31] 0321997.9

[86] 国际申请 PCT/EP2004/010489 2004.9.17

[87] 国际公布 WO2005/028508 英 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.11

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

共同申请人 苏黎士大学

[72] 发明人 C·巴尔斯克 S·弗伦泽尔

A·K·米尔 M·E·施瓦布

A·维塔利蒂

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 3 页 说明书 33 页 序列表 94 页

[54] 发明名称

NOGO - A 结合分子及其药物用途

[57] 摘要

本发明提供能够以解离常数 < 1000nM 结合人 NogoA 多肽或人 NiG 或人 NiG - D20 或人 NogoA 342 - 357 的结合分子、编码该结合分子的多核苷酸；含有所述多核苷酸的表达载体；含有能够产生结合分子的多核苷酸的表达系统；含有如上定义的表达系统的分离的宿主细胞；该结合分子作为药物的用途，特别是在神经修复治疗中的用途；含有所述结合分子的药物组合物；以及治疗神经修复相关疾病的方法。

1. 结合分子，该结合分子能够以解离常数 < 1000 nM 结合人 NogoA 多肽 (SEQ ID NO: 5) 或人 NiG (SEQ ID NO: 7) 或人 NiG-D20 (SEQ ID NO: 24) 或人 NogoA_342-357 (SEQ ID NO: 6)。

2. 结合分子，该结合分子能够以解离常数 < 1000 nM 结合人 NogoA 多肽 (SEQ ID NO: 5) 或人 NiG (SEQ ID NO: 7) 或人 NiG-D20 (SEQ ID NO: 24) 或人 NogoA_342-357 (SEQ ID NO: 6)，并含有至少一个抗原结合位点，所述抗原结合位点含有：

- 依次的高变区 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3，其中每个高变区与其等价高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9) 和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10) 至少 50% 同源；或

- 依次的高变区 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3，其中每个高变区与其等价高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12) 和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13) 至少 50% 同源。

3. 结合分子，该结合分子能够以解离常数 < 1000 nM 结合人 NogoA 多肽 (SEQ ID NO: 5) 或人 NiG (SEQ ID NO: 7) 或人 NiG-D20 (SEQ ID NO: 24) 或人 NogoA_342-357 (SEQ ID NO: 6)，并含有：

- 第一个抗原结合位点，其依次含有高变区 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3，其中每个高变区与其等价高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9) 和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10) 至少 50% 同源；和

- 第二个抗原结合位点，依次含有高变区 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3，其中每个高变区与其等价高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12) 和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13) 至少 50% 同源。

4. 结合分子，该结合分子含有至少一个抗原结合位点，所述抗原结合位点含有：

● 依次的高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9) 和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10); 或

● 依次高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12) 和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13); 或

● 它们的直接等价物。

5. 结合分子, 该结合分子含有:

● 第一个抗原结合位点, 其依次含有高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9) 和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10); 和

● 第二个抗原结合位点, 其依次含有高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12) 和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13); 或

● 它们的直接等价物。

6. 根据权利要求 1 至 5 的结合分子, 该结合分子至少含有:

● 一个免疫球蛋白重链或其片段, 该免疫球蛋白重链或其片段含有(i) 可变结构域, 所述可变结构域依次含有高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9) 和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10) 和(ii)人重链恒定部分或其片段; 和

● 一个免疫球蛋白轻链或其片段, 该免疫球蛋白轻链或其片段含有(i) 可变结构域, 所述可变结构域依次含有高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12) 和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13) 和(ii)人轻链恒定部分或其片段; 或

● 它们的直接等价物。

7. 根据权利要求 6 的结合分子, 其中人重链恒定部分或其片段为 $\gamma 4$ 型且人轻链恒定部分或其片段为 κ 型。

8. 根据权利要求 1 至 7 的结合分子, 该结合分子是人或嵌合型或人源化单克隆抗体。

9. 结合分子, 该结合分子含有如 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所

示的多肽序列。

10. 多核苷酸，该多核苷酸含有编码根据权利要求 1 至 9 中任一项的结合分子的多核苷酸。

11. 多核苷酸，该多核苷酸含有

● 如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 中所示多核苷酸序列；或

● 如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 中所示多核苷酸序列。

12. 表达载体，该表达载体含有根据权利要求 10 或 11 多核苷酸。

13. 表达系统，该表达系统含有根据权利要求 10 或 11 的多核苷酸，其中当所述表达系统或其部分存在于合适的宿主细胞中时，表达系统或其部分能够产生权利要求 1 至 9 中任一项的多肽。

14. 分离的宿主细胞，该宿主细胞含有根据权利要求 13 的表达系统。

15. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的结合分子作为药物的用途。

16. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的结合分子在神经修复治疗中的用途。

17. 药物组合物，该药物组合物含有与至少一种可药用载体或稀释剂联合的根据权利要求 1 至 9 中任一项的结合分子。

18. 治疗神经修复相关疾病的方法，包括给需要这类治疗的受试者施用有效量的根据权利要求 1 至 9 中任一项的结合分子。

19. 治疗神经修复相关疾病的方法，包括给需要这类治疗的受试者施用有效量的根据权利要求 1 至 9 中任一项的结合分子。

NOGO-A 结合分子及其药物用途

技术领域

本发明涉及 NogoA 结合分子，例如单克隆抗体或其 Fab 片段。

背景技术

由于存在包盖(ensheaths)轴突的抑制性髓鞘环境和瘢痕组织的形成，成人中枢神经系统(CNS)损伤后的神经再生是有限的。在过去几年中，关于 CNS 为何不能在损伤后自发修复自身的分子理解得到了重要的认识。髓鞘中的抑制性分子是轴突再生的主要障碍(特别是在损伤之后立即的抑制)。至今，将 NogoA、髓鞘相关糖蛋白(MAG)和髓鞘少突细胞糖蛋白(myelin-oligodendrocyte glycoprotein, OMgp)表征为神经突生长的有力抑制物。另外，髓鞘也含有其它抑制性成分，例如硫酸软骨素蛋白聚糖。Nogo-A 是浆膜(reticulon)蛋白家族成员，至少具有被称为氨基-Nogo 和 Nogo-66 的两个生物学活性和药理学活性有别的结构域。前者的受体位点至今尚未知，Nogo-66 通过神经元受体 NgR 体外和体内抑制神经元生长。除了 Nogo-66, MAG 和 OMgp 也以高亲和力与 NgR 结合并抑制神经突生长。

目前所寻求的增强神经修复的可能的研究方法包括使用酶(软骨素酶 ABC)消化瘢痕组织、使用包盖的嗅觉细胞和干细胞以及蛋白质生长因子来加强神经元生长的桥连技术(bridging techniques)。神经突生长抑制物通过调制细胞内信号介质(例如膜结合的鸟苷三磷酸酶(GTPase) Rho)的阻断作用似乎是抑制轴突生长的关键环节。环腺苷酸(cAMP)可以在体外克服髓鞘相关抑制并在体内诱导再生。使用 NgR 受体的肽抑制物(NEP1-40)在大鼠脊髓损伤后诱导神经元再生和功能恢复。

除了使用上述方法，也将注意力集中于使用某些单克隆抗体以中和中

枢及外周神经系统的神经突生长抑制分子,具体为中和 NogoA 的神经突生长抑制活性。因此已显示,单克隆抗体 IN-1 或其 IN-1 Fab 片段体外诱导神经突生长并体内增强出芽和再生(Schwab ME 等人,(1996)Physio. Rev. 76,319-370)。对 NogoA 不同结构域关于神经突生长抑制活性的测试已描述了该分子内几个抑制性结构域(Chen 等人,(2000) Nature 403,434-439; GrandPre 等人,(2000) Nature 403, 439-444; Prinjha 等人,(2000) Nature403, 383-384)。

天然免疫球蛋白或抗体包括在每个上臂具有抗原结合位点的、通常为 Y 形的多聚分子。该结构的其余部分(特别为 Y 的茎)介导与免疫球蛋白相关的效应物功能。抗体由 2 条重链和 2 条轻链组成。重链和轻链都含有可变结构域和恒定部分。抗原结合位点由与轻链可变结构域结合的重链可变结构域组成。重链和轻链可变结构域具有相同的大体结构。更具体而言,抗体的抗原结合特性基本上由重链和轻链可变结构域中 3 个特定区域决定,所述特定区域被称为高变区或互补决定区(CDR)。这 3 个高变区与 4 个序列相对保守并且不直接涉及结合的构架区(FR)交替。CDR 形成环并与构架区保持紧密靠近,其中构架区很大程度上采取了 β 折叠构型。重链 CDR 与结合的轻链 CDR 基本组成抗体分子的抗原结合位点。通常通过比较相同物种中产生的大量抗体的氨基酸序列确定 FR 或 CDR 区的组成。鉴定 CDR 和 FR 区的一般规则是本领域技术人员的普通知识,并且可见于例如网站 <http://www.bioinf.org.uk/abs/>。

发明内容

令人惊奇地发现针对人 NiG 的 IgG 型新单克隆人抗体(此后称为“3A6”)比现有技术 NogoA 抗体具有更好的特性,尤其是关于与包括人在内的不同物种的 NogoA 的结合亲合力以及关于其在给定抗体浓度下较高的 NogoA 神经突生长中和活性,所述单克隆人抗体由 Medarex Mice (具有人免疫球蛋白基因的基因重组小鼠)产生(Schwab ME 等人,(1996) Physio. Rev. 76, 319-370)。此外,可以构建其它与所述抗体具有相同高变

区的 NogoA 结合分子。

因此，本发明提供针对 NogoA 具体区域或表位的结合分子（此后称为“本发明的结合分子”或简称为“结合分子”）。本发明的结合分子优选以解离常数（Kd）<1000 nM、更优选以 Kd <100 nM、最优选以 Kd <10 nM 结合人 NogoA_342-357（人 NiG 中 3A6 的表位；= SEQ ID NO: 6）、人 NogoA（SEQ ID NO: 5）或人 NiG（最有力的 NogoA 神经突生长抑制性片段，在人 NogoA 的 186 位氨基酸开始，并在 1004 位氨基酸结束，= SEQ ID NO: 5）。可以通过标准方法（定量测定法）显示结合反应，包括例如在实施例 6 中描述的 ELISA 方法以及在实施例 7 中描述的生物传感器亲和力方法。另外，可以在例如如下所述的神经突生长测定中显示与人 NogoA 的结合以及几乎更重要的功效。

因此，在优选的实施方案中，与以对照抗体处理的大鼠小脑颗粒细胞的神经突数量相比，该结合分子（以 100 $\mu\text{g/ml}$ 、优选 10 $\mu\text{g/ml}$ 、更优选 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 甚至更优选 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度）将猴脑蛋白质提取物底物上的大鼠小脑颗粒细胞的神经突数量增加至少 20%、优选 50%。最优选 80%，所述对照抗体不结合人 NogoA、人 NiG 或 NogoA_342-357 多肽（即解离常数 >1000 nM）。

在另一个优选的实施方案中，本发明的结合分子含有至少一个抗原结合位点，所述抗原结合位点依次含有高变区 CDR-H1-3A6、CDR-H2-3A6 和 CDR-H3-3A6，及它们的直接等价物，所述 CDR-H1-3A6 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 8，所述 CDR-H2-3A6 基因具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9，所述 CDR-H3-3A6 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 10。

在本发明的另一方面，本发明的结合分子含有至少一个抗原结合位点，所述抗原结合位点含有：

a)依次为高变区 CDR-H1-3A6、CDR-H2-3A6 和 CDR-H3-3A6；所述 CDR-H1-3A6 具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列，所述 CDR-H2-3A6 具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列，所述 CDR-H3-3A6 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 10；或

b)依次为高变区 CDR-L1-3A6、CDR-L2-3A6 和 CDR-L3-3A6, 所述 CDR-L1-3A6 具有 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列, 所述 CDR-L2-3A6 具有 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列, 所述 CDR-L3-3A6 具有 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; 或

c) 其直接等价物。

在本发明的另一方面, 本发明的结合分子含有至少

a) 第一个依次含有高变区 CDR-H1-3A6、CDR-H2-3A6 和 CDR-H3-3A6 的结构域, 所述 CDR-H1-3A6 具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列, 所述 CDR-H2-3A6 具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列, 所述 CDR-H3-3A6 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 10; 和

b) 第二个依次含有高变区 CDR-L1-3A6、CDR-L2-3A6 和 CDR-L3-3A6 的结构域, 所述 CDR-L1-3A6 具有 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列, 所述 CDR-L2-3A6 具有 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列, 所述 CDR-L3-3A6 具有 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; 或

c)其直接等价物。

另外, 本发明也提供下列本发明的结合分子, 所述结合分子含有至少一个抗原结合位点, 其中抗原结合位点含有

a) 3A6 (SEQ ID NO: 2) 重链可变部分; 或

b) 3A6 (SEQ ID NO: 3) 轻链可变部分, 或其直接等价物。

当抗原结合位点含有第一个和第二个结构域两者时, 二者可以位于同一多肽分子上, 或优选各结构域可以在不同链上, 第一个结构域为免疫球蛋白重链或其片段的部分, 第二个结构域为免疫球蛋白轻链或其片段的部分。

本发明的结合分子的实例包括由 B 细胞或杂交瘤产生的抗体、以及人或嵌合或人源化抗体或其任何片段 (例如 F(ab')₂ 和 Fab 片段) 以及单链或单结构域抗体。

单链抗体由通过肽接头共价连接的抗体重链和轻链可变结构域组成, 所述肽接头通常由 10 至 30 个氨基酸、优选 15 至 25 个氨基酸组成。因此,

这样的结构不含有重链和轻链的恒定部分，而且认为小的肽间隔应当比整个恒定部分抗原性更弱。“嵌合抗体”指其中重或轻链的恒定区或二者为人源而重链和轻链两者的可变结构域为非人（例如鼠）源的抗体。“人源化抗体”指其中高变区（CDR）为非人（例如鼠）源而该免疫球蛋白其它部分全部或基本全部（例如恒定区或可变区的高度保守部分，即构架区）为人来源。然而人源化抗体可以在邻近高变区的构架区中保留鼠序列的少数氨基酸。

高变区可以与任何种类（优选鼠或人起源）的构架区联合。在《Sequences of proteins of immunological interest》，Kabat E. A.等人，US department of health and human services, Public health service, National Institute of Health 中描述了合适的构架区。结合分子人重链的恒定部分可以优选为 IgG4 型（包括亚型），人轻链的恒定部分可以优选为 κ 或 λ 型，更优选为 κ 型。

在非人体系（例如小鼠）中可能出现针对天然存在于所有人中的蛋白质的单克隆抗体。作为其直接结果，当施用于人时，由杂交瘤产生的异基因抗体引起主要由该异基因免疫球蛋白恒定部分介导的不需要的免疫应答。这显然限制了这类抗体的使用，因为不能将其长时期施用。因此特别优选使用施用于人时可能不引起实质性同种异型应答的单链、单结构域、嵌合或人源化抗体。

根据前述观点，本发明更优选的结合分子选自嵌合抗体，所述嵌合抗体至少含有：

a) 一条免疫球蛋白重链或其片段，其含有 (i) 依次含有高变区 CDR-H1-3A6、CDR-H2-3A6 和 CDR-H3-3A6 的可变结构域，和(ii)人重链恒定部分或其片段；所述 CDR-H1-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8)，所述 CDR-H2-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)，所述 CDR-H3-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 10)，和

b) 一条免疫球蛋白轻链或其片段，其含有 (i) 依次含有高变区 CDR-L1-3A6、CDR-L2-3A6 和 CDR-L3-3A6 的可变结构域，和(ii) 人轻

链恒定部分或其片段；所述 CDR-L1-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11)，所述 CDR-L2-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 12)，所述 CDR-L3-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 13)；

或其直接等价物。

另外，本发明的结合分子可以选自含有抗原结合位点的单链结合分子，所述抗原结合位点含有

a) 第一个依次含有高变区 CDR-H1-3A6、CDR-H2-3A6 和 CDR-H3-3A6 的结构域；所述 CDR-H1-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8)，所述 CDR-H2-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)，所述 CDR-H3-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8)；和

b) 第二个依次含有高变区 CDR-L1-3A6、CDR-L2-3A6 和 CDR-L3-3A6 的结构域，所述 CDR-L1-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11)，所述 CDR-L2-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 12)，所述 CDR-L3-3A6 具有氨基酸序列 (SEQ ID NO: 13)；和

c) 与第一个结构域 N 末端和第二个结构域 C 末端或与第一个结构域 C 末端和第二个结构域 N 末端结合的肽接头；

或其直接等价物。

众所周知，氨基酸序列的较小改变例如一个或几个氨基酸的缺失、添加或置换可能导致具有基本一致特性的原始蛋白质的等位形式。因此，术语“其直接等价物”指本发明的任何单结构域结合分子 (分子 X)：

(i) 其中结合分子的每个高变区 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 与 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9) 和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10) 等价高变区至少 50 或 80% 同源，优选至少 90% 同源，更优选至少 95、96、97、98、99% 同源，而 CDR-H1 与 CDR-H1-3A6 等价，CDR-H2 与 CDR-H2-3A6 等价，CDR-H3 与 CDR-H3-3A6 等价；且

(ii) 能够优选以解离常数 (K_d) < 1000 nM、更优选以 $K_d < 100$ nM，最优选以 $K_d < 10$ nM 结合人 NogoA、人 NiG 或人 NogoA₃₄₂₋₃₅₇，或

每个结合位点具有至少两个结构域的本发明的结合分子 (分子 X'):

(iii)其中每个高变区 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 与 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9)、CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10)、CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12)和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13)等价高变区至少 50 或 80 % 同源, 优选至少 90 % 同源, 更优选至少 95、96、97、98、99 % 同一, 而 CDR-H1 与 CDR-H1-3A6 等价, CDR-H2 与 CDR-H2-3A6 等价, CDR-H3 与 CDR-H3-3A6 等价, CDR-L1 与 CDR-L1-3A6 等价, CDR-L2 与 CDR-L2-3A6 等价, CDR-L3 与 CDR-L3-3A6 等价; 且

(iv) 能够优选以解离常数 (Kd) < 1000 nM、更优选以 Kd < 100 nM, 最优选以 Kd < 10 nM 结合人 NogoA、人 NiG 或人 NogoA₃₄₂₋₃₅₇。

因此本发明的另一个实施方案是例如能够以解离常数 < 1000 nM 结合人 NogoA、人 NiG 或人 NogoA₃₄₂₋₃₅₇、并含有至少一个抗原结合位点的结合分子, 所述抗原结合位点含有

- 依次为高变区 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3, 其中每个高变区与其等价高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9)和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10)至少 50 %、优选 80、90、95、96、97、98、99 % 同源; 或

- 依次为高变区 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3, 其中每个高变区与其等价高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12)和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13) 至少 50 %、优选 80、90、95、96、97、98、99 % 同源。

另外, 能够以解离常数 < 1000 nM 结合人 NogoA、人 NiG 或人 NogoA₃₄₂₋₃₅₇ 并含有

- 依次含有高变区 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的第一个抗原结合位点, 其中每个高变区与其等价高变区 CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 8)、CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 9)和 CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 10)至少 50 %、优选 80、90、95、96、97、98、99 % 同源; 和

● 依次含有高变区 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的第二个抗原结合位点，其中每个高变区与其等价高变区 CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 11)、CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 12) 和 CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 13) 至少 50%、优选 80、90、95、96、97、98、99% 同源。

可以在多种测定法中方便地测试所述解离常数，包括例如在实施例 7 中描述的生物传感器亲和力方法。另外，可以在如下所述的生物测定法中显示结合分子的结合和功能效果。

人重链恒定部分可以是 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 δ 或 ϵ 型，优选为 γ 型，更优选为 $\gamma 4$ 型，而人轻链恒定部分可以是 κ 或 λ 型（包括 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 和 $\lambda 3$ 亚型），但是优选为 κ 型。Kabat 等人（如上）给出了所有这些恒定部分的氨基酸序列。

本发明的结合分子的缀合物（例如酶或毒素或放射性同位素缀合物）也包括于本发明范围内。

除非在此另外说明，“多肽”包括任何肽或蛋白质，所述肽或蛋白质包含通过肽键彼此连接的氨基酸、具有在 N 末端起始并在 C 末端结束的氨基酸序列。本发明的多肽优选为单克隆抗体，更优选为嵌合（也称为 V 嫁接的）或人源化（也称为 CDR 嫁接的）单克隆抗体。人源化（CDR 嫁接的）单克隆抗体可能或不可能含有另外引入受体抗体构架区（FR）序列中的突变。

此处所使用的多肽功能衍生物包括与本发明的多肽具有相同定性生物学活性的分子，即具有结合人 NogoA、人 NiG 或人 NogoA₃₄₂₋₃₅₇ 的能力。功能衍生物包括根据本发明的多肽的片段和肽类似物。片段含有根据本发明的多肽序列（例如指定序列）内的区域。使用术语“衍生物”定义根据本发明的多肽（例如指定序列）的氨基酸序列变体和共价修饰物。根据本发明的多肽（例如指定序列，例如轻链和重链高变区）的功能衍生物优选与根据本发明的多肽的氨基酸序列（例如指定序列）具有至少约 65%、更优选至少约 75%、甚至更优选至少约 85%、最优选至少约 95、96、97、98、99% 全序列同源性，并基本保留结合人 NogoA、人 NiG 或人

NogoA_342-357 的能力。

术语“共价修饰”包括以有机蛋白质或非蛋白质衍生剂修饰根据本发明的多肽（例如指定序列）或其片段、与异源多肽序列融合和翻译后修饰。共价修饰的多肽（例如指定序列）仍然具有通过交联而结合人 NogoA、人 NiG 或人 NogoA_342-357 的能力。传统上，通过将靶定的氨基酸残基与能够与所选侧链或末端残基反应的有机衍生试剂反应，或通过所选重组宿主细胞内起作用的翻译后修饰的固定（harnessing）机制引入共价修饰。某些翻译后修饰是重组宿主细胞对所表达多肽的作用。谷氨酰胺和天冬酰胺残基经常脱酰胺基为相应的谷氨酰和天冬氨酰残基。另外，这些残基在弱酸性条件下脱氨基。其它翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化作用；丝氨酰、酪氨酸或苏氨酰残基的羟基基团的磷酸化；赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基基团的甲基化，见例如 T. E. Creighton, 《Proteins: Structure and Molecular Properties》，W. H. Freeman & Co., San Francisco, 第 79-86 页（1983）。共价修饰物例如包括融合蛋白质，所述融合蛋白质含有根据本发明的多肽（例如指定序列）及其氨基酸序列变体，例如免疫粘附素，以及异源信号序列的 N 末端融合物。

在此将关于天然蛋白质与其功能衍生物的“同源性”定义为：比对序列并引入空位（如果有必要）以得到最大百分比同源性并且不考虑任何保守置换为序列同源性部分后，候选序列中与相应天然多肽残基一致的氨基酸残基的百分数。无论 N 或 C 末端延长或插入均不被解释为降低一致性或同源性。比对方法及计算机程序广为人知。

“氨基酸”指所有天然存在的例如 L- α -氨基酸，并包括 D-氨基酸。氨基酸以公知的单字母或三字母名称表示。

术语“氨基酸序列变体”指与根据本发明的多肽（例如指定序列）相比，其氨基酸序列有所不同的分子。根据本发明的多肽（例如指定序列）的氨基酸序列变体仍然具有结合人 NogoA 或人 NiG 或更优选 NogoA_342-357 的能力。置换变体是根据本发明的变体的多肽（例如指定序列）中至少去除一个氨基酸残基、并在相同位置将不同的氨基酸插入其

位置的变体。这些置换可能是单一的，其中该分子中仅一个氨基酸被置换，或者它们可能是多重的，其中在同一分子中两个或更多氨基酸被置换。插入变体是根据本发明的变体的多肽（例如指定序列）中紧邻具体位置的氨基酸插入一个或多个氨基酸的变体。与氨基酸紧邻指与氨基酸 α -羧基或 α -氨基官能团连接。缺失变体是根据本发明的变体的多肽（例如指定序列）中去除一个或更多氨基酸的变体。通常，缺失变体将在分子的具体区域内缺失一个或两个氨基酸。

可以通过重组 DNA 技术产生本发明的结合分子。就此而言，必须构建一个或多个编码该结合分子的 DNA 分子，将该 DNA 分子置于适宜的控制序列下并转移到合适的宿主生物中表达。

因此在非常普遍的方式中提供

(i) DNA 分子，所述 DNA 分子编码本发明的单结构域结合分子、本发明的单链结合分子、本发明的结合分子的重或轻链及其片段；和

(ii) 本发明的 DNA 分子在通过重组方法产生本发明的结合分子中的用途。

本领域目前的技术水平是，基于在此提供的信息（即高变区的氨基酸序列和编码它们的 DNA 序列），技术人员将能够合成本发明的 DNA 分子。在例如 EP 239 400 中描述了构建可变结构域基因的方法，可以简要概括如下：克隆基因，所述基因编码无论何种特异性的单克隆抗体的可变结构域。确定编码构架区和高变区的 DNA 节段，并去除编码高变区的 DNA 节段从而以合适的限制位点在连接点将编码构架区的 DNA 节段融合在一起。可以在适当的位置通过标准方法诱变 DNA 分子而产生限制位点。通过根据上文给定的 CDR-H1-3A6、CDR-H2-3A6、CDR-H3-3A6、CDR-L1-3A6、CDR-L2-3A6 和 CDR-L3-3A6 序列合成 DNA 而制备双链合成 CDR 盒。给这些盒提供粘性末端，从而通过能够得到编码免疫球蛋白可变结构域的 DNA 分子的标准方案将其在接点与构架连接。

另外，没有必要为了获得编码本发明的单克隆抗体的 DNA 构建体而使用来自生产杂交瘤细胞系的 mRNA。因此，PCT 申请 WO 90/07861 提

供了仅给出关于基因核苷酸序列书面信息时通过重组 DNA 技术生产单克隆抗体的完整说明书。

该方法包括合成许多寡核苷酸、通过 PCR 方法将其扩增、以及将其剪接以产生所需 DNA 序列。

可以通过公共途径获得含有合适的启动子或编码重链和轻链恒定部分的基因的表达载体。因此，一旦制备本发明的 DNA 分子，可以将其便利地转移到适宜的表达载体中。

也可以通过在例如 WO 88/1649 中描述的标准方法制备编码单链抗体的 DNA 分子。

在本发明的具体实施方案中，产生部分本发明的结合分子的重组方法包括如下所述的第一个和第二个 DNA 构建体：

第一个 DNA 构建体编码重链或其片段，并含有：

a) 编码含有构架区和高变区二者之一的可变结构域的第一部分，所述高变区依次含有 DNA-CDR-H1-3A6 (SEQ ID NO: 14)、DNA-CDR-H2-3A6 (SEQ ID NO: 15) 和 DNA-CDR-H3-3A6 (SEQ ID NO: 16)，所述第一部分以编码该可变结构域第一个氨基酸的密码子开始，并以编码该可变结构域最后一个氨基酸的密码子结束，和

b) 编码重链恒定部分或其片段的第二部分，该部分以编码该重链恒定部分第一个氨基酸的密码子开始，并以编码该恒定部分或其片段最后一个氨基酸的密码子结束，随后为无义密码子。

第二部分优选编码人重链恒定部分，更优选人 $\gamma 4$ 链恒定部分。第二部分可以是基因组来源的 DNA 片段（含有内含子）或 cDNA 片段（无内含子）。

第二个 DNA 构建体编码轻链或其片段，并含有：

a) 编码含有构架区和高变区二者之一的可变结构域的第一部分，所述高变区依次含有 DNA-CDR-L1-3A6 (SEQ ID NO: 17)、DNA-CDR-L2-3A6 (SEQ ID NO: 18) 和 DNA-CDR-L3-3A6 (SEQ ID NO: 19)，所述第一部分以编码该可变结构域第一个氨基酸的密码子开始，并以编码该可变结构域最

后一个氨基酸的密码子结束，和

b) 编码轻链恒定部分或其片段的第二部分，该部分以编码该轻链恒定部分第一个氨基酸的密码子开始，并以编码该恒定部分或其片段最后一个氨基酸的密码子结束，随后为无义密码子。

第二部分优选编码人轻链恒定部分，更优选人 κ 链恒定部分。

第一个或第二个 DNA 构建体有利地含有位于第一部分上游、编码部分前导肽的第三部分，所述第三部分以编码该前导肽第一个氨基酸的密码子开始，并以编码该前导肽最后一个氨基酸的密码子结束。该肽是表达这些链的宿主生物分泌它们所需要的，并且随后由宿主生物去除。第一个 DNA 构建体的第三部分优选编码前导肽，该前导肽具有 SEQ ID NO: 21 中所示重链前导序列的氨基酸序列（以-19 位氨基酸起始，以-1 位氨基酸结束）。同样，第二个 DNA 构建体的第三部分优选编码前导肽，该前导肽具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 23 中所示的氨基酸序列（轻链，以-18 位氨基酸起始，以-1 位氨基酸结束）基本一致。

将每个 DNA 构建体置于合适的控制序列的控制下，具体而言为合适的启动子的控制下。可以使用任何种类的启动子，条件是其适合于该 DNA 构建体将转入以表达的宿主生物。然而，如果表达发生在哺乳动物细胞中，特别优选使用免疫球蛋白基因启动子。

可以在细胞培养或转基因动物中产生所需抗体。可以根据标准方法获得合适的转基因动物，所述标准方法包括将置于合适的控制序列下的第一个和第二个 DNA 构建体微注射到卵细胞中，将如此制备的卵细胞转移到适宜的假孕雌性动物中，并选择表达所需抗体的后代。

当不得不在细胞培养中制备抗体链时，必须首先将 DNA 构建体插入到单独的表达载体中或两个分离但是兼容的表达载体中，优选后一种可能性。

因此，本发明也提供能够在原核或真核细胞系中复制的表达载体，所述表达载体至少含有上述 DNA 构建体之一。

然后将每个含有 DNA 构建体的表达载体转移到合适的宿主生物中。

将 DNA 构建体分别插入两个表达载体时，可以将其分别转移（即每个细胞一类载体）或共转化，优选后一种可能性。合适的宿主生物可以是细菌、酵母或哺乳动物细胞系，优选后者。更优选哺乳动物细胞系为淋巴起源（例如骨髓瘤、杂交瘤或常规永生化 B 细胞），但是不表达任何内源性抗体重或轻链。

也优选宿主生物每个细胞含有该载体的大量拷贝。如果宿主生物是哺乳动物细胞系，可以通过根据标准方法扩增拷贝数达到所述需要的目标。扩增方法通常由选择增加的药物抗性组成，所述抗性由该表达载体编码。

在本发明的另一方面，提供产生本发明的多链结合分子的方法，该方法包括(i)培养以本发明的第一个和第二个 DNA 构建体转化的生物和(ii)从培养物中回收本发明的活性结合分子。

另外，可以分别回收重链和轻链，并在体外重折叠后重构为活性结合分子。重构方法为本领域所公知；在 EP 120 674 或 EP 125 023 中具体提供了方法实例。方法因此可以包括：

(i)培养以本发明第一个 DNA 构建体转化的第一种生物，并从培养物回收所述重链或其片段，和

(ii)培养以本发明第二个 DNA 构建体转化的第二种生物，并从培养物回收所述轻链或其片段，和

(iii) 从由(i)中获得的重链或其片段和从(ii)中获得的轻链或其片段体外重构本发明的活性结合分子。

以类似的方式，也提供产生本发明的单链或单结构域结合分子的方法，该方法包括：

(i)培养以分别编码本发明的单链或单结构域结合分子的 DNA 构建体转化的生物，和

(ii)从培养物回收所述分子。

本发明的结合分子显示很好的神经再生活性，例如颗粒细胞神经突生长模型中所示。

1. 颗粒细胞神经突生长测定（体外）

如前所述 (Spillmann 等人, 1998, Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor(bNI-220), J Biol Chem. 1998 Jul 24; 273 (30): 19283-93) 取脑组织 (皮层和脑干) 并新鲜制备蛋白质提取物用于各测定。于 4°C 将一块冰冻组织 (例如 0.25 g) 在 3-4 倍体积含有蛋白酶阻断剂 (10 µg/ml 抑酶肽, 5 µg/ml 亮抑酶肽, 1 µg/ml 抑胃酶肽, 1 mM PMSF) 的 60mM Chaps-20mM Tris pH 8.0-1 mM EDTA 中匀浆。将匀浆物于 4°C 置于旋转器上 30 分钟, 并在 TLA 100.3 转子 (Beckman TL-100 超速离心机) 中于 4°C 以 100000g 离心 45 分钟。使用 BioRad 测定上清液蛋白质浓度。如前所述 (Niederost 等人, 1999, Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans, J Neurosci.1999 Oct 15;19 (20): 8979-89) 从出生后 5-7 天大鼠小脑组织的胰蛋白酶解离物中纯化小脑颗粒细胞。然后将本发明的结合分子在测试底物上预孵育 30 分钟并在加入细胞前去除。加入小脑颗粒细胞并孵育 24 小时。向培养皿中缓慢加入 2 ml 4% 甲醛缓冲液终止实验。将如上所述制备的猴脑膜蛋白质提取物在 Greiner 4 孔皿 (Greiner, Nuertingen, Germany) 上以每 cm² 培养皿 15 µg 蛋白质吸收过夜。接种神经元前用温暖的 Hank 溶液将皿洗三次。如上所述制备出生后 5-7 天大鼠的小脑颗粒细胞, 并以 50,000 细胞/cm² 接种。将细胞在无血清培养基中培养 24 小时, 固定并用神经突标志物 MAB 1b (Chemicon 单克隆抗体, 1:200) 免疫染色。以 MAB 1b 染色后使用 DAPI (4', 6-二脒基-2-吡啶苯二氢氯化物, Molecular Probe) 进行胞体染色。将抗 Nogo-A mAb 或对照 IgG Ab 在皿上预孵育 30 分钟用于抗体实验, 随后去除。使用 40× 物镜以经过视野中心放置的线计数所有神经突横断面, 在距孔边缘明确距离处为各孔随机取样四个区域。也计数所有接触该线的胞体, 并如先前报导 (Simonen 等人, 2003, Neuron 38, 201-211) 计算各孔每个胞体神经突的指数比 (index ratio)。在编码的实验上以盲法完成所有计数, 并以每胞体神经突的指数表示。结果以平均指数神经突/胞体表示。

通过与本发明的结合分子预孵育, 可以观察到在上面制备的脊髓提取

物的非容许环境中小脑颗粒细胞神经突生长增强。例如，下面给出颗粒细胞神经突生长模型中人 3A6-IgG1 和 IgG4 抗体的中和作用的典型特征：

	指数神经突/胞体	与对照 IgG 比较增加的 %
无抗体	0.87	
+ 对照 IgG	0.90	
3A6IgG1 0.1 μ g/ml	1.44	60 %
3A6IgG4 0.1 μ g/ml	1.43	59 %
+ 对照 IgG	0.92	
3A6IgG1 10.0 μ g/ml	1.69	84 %
3A6 IgG4 10.0 μ g/ml	1.55	68 %

也可以通过测量下文简述的体内脊髓损伤模型中再生性萌发和神经突生长和功能恢复评估本发明分子的中和活性。

2. 大鼠和猴的脊髓损伤模型（体内）

通过在第八胸椎水平双侧横断脊髓背侧半部，显微手术损伤成年 Lewis 大鼠。Schnell 和 Schwab 1993 (Eur. J. Neurosci. 5:1156-1171) 中描述了椎板切除术、麻醉和手术。

神经解剖学示踪：通过向相对泵或移植物 (graft) 一侧的皮质内注射顺向示踪物生物素葡聚糖胺 (BDA) 示踪运动和感觉皮层脊髓束。BDA 在 10-14 天内被输送至脊髓，如 Brösamle 等人所述 (2000 J. Neuro sci. 20: 8061-8068) 使用二氨基联苯胺 (DAB) 为底物显像。

脊髓损伤两周后破坏脊髓 T8 节段的大约 40%，主要在背侧半部，包括两个主要的 CST：对照动物 CST 示踪显示该束中等程度的反应性萌发。该现象与文献中公知的适应损伤的自发性萌发相吻合。以本发明的结合分子或以泵递送的本发明结合分子处理的损伤大鼠可能表现出损伤位点萌发和受损轴突再生和受损神经突的神经突再生增强。另外，动物可能表现出感觉运动功能恢复提高。这类功能测试先前已有描述 (Merkler 等人, 2001, J. Neuroscience 21, 3665-73)。

3. 抗体在成年猴 CNS 中的组织分布

将抗体 3A6 以 IgG 纯化并在 PBS 中浓缩至 3 mg/ml。使用抗小麦生长素的小鼠血清来源的 IgG (Chemicon Int., Temecula/CA, USA) 或 mAB (AMS Biotechnology, Oxon/UK) 作为对照处理。在该研究中使用两只成年雄性恒河猴 (*Macaca fascicularis*) 用于鞘内输注。

手术程序

肌肉注射氯胺酮 (Ketalar[®]; Parke-Davis, 5 mg/kg, 肌肉注射) 诱导麻醉。肌肉注射阿托品 (0.05 mg/kg) 以降低支气管分泌物。在股静脉内放置静脉内导管用于连续注入以异丙酚 1% (Fresenius[®]) 和葡萄糖 4% 溶液的混合物 (1 体积的异丙酚和 2 体积的葡萄糖溶液), 诱导更深麻醉。然后将动物置于立体定位架中。在无菌条件下, 从 C2 至 Th1 实施垂直中线皮肤切口。暴露筋膜切口和 C2 至 Th1 棘突。缩回脊柱旁肌肉并切开 C6、C7 和 Th1 椎板。然后实施完整 C6 椎板切除术和上部 C7 半椎板切除术。暴露硬脑膜, 在第七和第八颈椎髓节段 (对应于由第六颈椎板覆盖的脊髓部分的喙带(rostral zone)) 上方纵向切入。把与递送 hNogo-A 抗体的渗透泵 (Alzet[®], 2ML1; 流量: 50 μ g/小时) 连接的聚乙烯管 (10 cm 长) 插入硬脑膜下, 沿喙(rostrally)推动数毫米并以缝合线附着于硬脑膜。在低于椎板切除术数厘米处主要由左侧背部肌肉组成的腔中放置并保护渗透泵。通过与肌肉缝合沿其轨道保护该管。缝合肌肉和皮肤, 动物通常在中断异丙酚静脉灌注 15-30 分钟后从麻醉中恢复。以抗生素 (氨苄青霉素 10%, 30mg/kg, 皮下注射) 对动物进行术后处理。一周内每日给以额外剂的卡洛芬。

植入渗透泵 8 天后将猴处死。首先如上所述以氯胺酮诱导镇静, 随后通过腹腔注射致死剂量的戊巴比妥 (90 mg/kg) 获得深麻醉。以 0.4 升 0.9% 盐水、随后为 4 升固定剂 (4% 多聚甲醛于 0.1 M 磷酸盐缓冲液中, pH = 7.6) 穿心灌注动物。以三个浓度递增的蔗糖溶液 (10% 于固定剂中, 20 和 30% 于磷酸盐缓冲液中) 连续灌注。

组织学操作、免疫荧光和组织化学

小心地解剖猴脑和脊髓，冷藏于 30% 蔗糖中，并在恒冷切片机中以 40 μm 切片。使用人二级抗体 (Jackson Laboratories) 检测注入的 mAb。可以使用下列抗体用于双标记：兔 AS472 (经过亲和纯化) 用于内源性 Nogo-A (Chen, 2000)；兔抗 GFAP 抗体用于星型胶质细胞；兔抗组织蛋白酶 D (DAKO) 抗体用于溶酶体定位。以相应的耦连 TRITC 或 FITC 的二级抗体或使用 ABC-DAB 系统 (Vector) 对所有抗血清显像。通过 Zeiss Axiophot 上表面荧光或通过共聚焦显微镜 (ZEISSLSM410) 分析切片。

在注入位点及其下方 6 cm 处分析脊髓。在注入位点存在高水平的 3A6。在更下方的脊髓，中央沟和索被强烈标记，而灰质和白质显示更加均一、然而却是特异并明显于背景的标记。类似的情况出现在表面和脑室强烈标记且 Nogo-A 抗体良好地渗透到软组织中的前脑。

这些实验显示脊髓鞘内注入抗 CNS 细胞表面抗原的抗体引起该抗体通过 CSF 循环在内部 (脑室、中央沟) 和外部液体空间内的良好分布。该 IgG 抗体充分渗透到脑和脊髓组织中。尽管对照 IgG 被迅速洗出，抗 Nogo-A 抗体保留在组织中。

4. 猴脊髓损伤中的神经修复和功能改善测试

肌肉注射氯胺酮 (Ketalar[®]; Parke-Davis, 5 mg/kg, 肌肉注射) 诱导麻醉。肌肉注射阿托品 (0.05 mg/kg) 以降低支气管分泌物。在股静脉内放置静脉内导管用于连续注入异丙酚 1% (Fresenius[®]) 和葡萄糖 4% 溶液的混合物 (1 体积的异丙酚和 2 体积的葡萄糖溶液)，诱导更深麻醉。然后将动物置于立体定位架中。在无菌条件下，从 C2 至 Th1 实施垂直中线皮肤切口。暴露筋膜切口和 C2 至 Th1 棘突。缩回脊柱旁肌肉且切开 C6、C7 和 Th1 椎板。然后实施完整 C6 椎板切除术和上部 C7 半椎板切除术。为了在紧邻损伤处递送该分子，在硬脑膜下距损伤数毫米处沿喙固定附着于泵的聚乙烯管的自由尖端。

可以根据发表的操作实施动作手灵巧性 (Behavioural manual Dexterity) 测试。让猴坐在塑胶玻璃改良的“Brinkman 板”(10 cm \times 20 cm) 前的灵长动物椅中训练手灵巧性，所述“Brinkman 板”含有 50 个随机分

布的孔,25个孔为水平朝向,25个为垂直朝向{Liu, 1999 15428/id; Rouiller, 199813239/id}。2.7.可以按照已描述的评估纤维的再生和萌发。注射到右侧半球中的顺向示踪物为生物素葡聚糖胺(BDA, Molecular Probe[®], 10%于盐溶液中)。在左侧半球内,注射荧光顺向示踪物荧光素葡聚糖(Molecular Probe[®], 10%于盐水中)。可以如先前的详细描述{Rouiller, 1994 8322/id}实施示踪物显像的组织学处理。

因此本发明也提供:

(i)本发明的结合分子在哺乳动物神经系统(特别是人神经系统)的神经修复中的用途,

(ii)哺乳动物神经系统(特别是人神经系统)的神经修复方法,该方法包括给需要这类治疗的患者施用有效量的本发明结合分子,或

(iii)用于哺乳动物神经系统(特别是人神经系统)神经修复的药物组合物,该组合物包含本发明的结合分子和可药用载体或稀释剂。

具体而言,本发明的结合分子有益于神经纤维损伤后的轴突再生和萌发增加。因此本发明的分子具体对人受试者具有广泛效用。例如,本发明的结合分子有益于治疗多种外周(PNS)和中枢(CNS)神经系统疾病,即,更具体为神经变性疾病,例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、Lewy样病理或其它普通痴呆、颅、脑或脊髓损伤后疾病、中风或脱髓鞘疾病。这类脱髓鞘疾病包括(但不限于)多发性硬化、单相脱髓鞘、脑脊髓炎、多灶性白质脑病、全脑炎、胼胝体脱髓鞘性脑病综合征(Marchiafava-Bignami病)、佩利措伊斯-梅茨巴赫病(pontine myelolysis)、肾上腺脑白质营养不良、Pelizaeus-Merzbacher病、海绵样变性、亚历山大病、嘉拿芬病(Canavan's disease)、异染性白质营养不良和克腊伯氏病(Krabbe's disease)。在一个实例中,施用本发明的结合分子可以用于治疗与NonoA蛋白质相关的脱髓鞘疾病。在另一个实施例中,可以将表达本发明的结合分子的细胞移植到脊髓损伤位点以促进遍及损伤位点的轴突生长。这类移植的细胞将提供损伤或创伤后恢复脊髓功能的方法。这类细胞可以包括嗅觉包盖细胞和胎儿神经或组织移植物的不同系的

干细胞。

长时程延迟的 Nono-A 阻滞对中风后大鼠功能恢复和神经解剖学可塑性的影响是 Shih-Yen Tsai, Anay Pradham, Josh Rosales, Anis K. Mir, Martin E. Schwab, Gwendolyn L Kartje 于 2004 年发表的摘要的主题。使用渗透泵将纯化的抗氨基 Nogo-A 抗体施用于大脑中动脉阻塞 (MCAO) 8 周后的成年大鼠。使用熟练上肢伸展试验 (skilled forelimb reaching test) 和阶梯步行试验 (ladder rung walking test) 检查功能恢复。初步结果显示, 即使在中风两个月后以抗氨基 Nono-A 阻滞处理, 也能提高功能恢复。

此外, 本发明的结合分子可用于变性眼病的治疗, 所述变性眼病可能直接或间接涉及视网膜或角膜细胞变性, 一般包括缺血性视网膜病、前部缺血性视神经病、所有形式的视神经炎、老年黄斑病变、糖尿病视网膜病、黄斑囊状水肿 (CME)、视网膜色素变性、斯特格病变 (Stargardt's disease)、Best's vitelliform 视网膜变性 (Best's vitelliform retinal degeneration)、莱伯先天性黑朦 (Leber's congenital amaurosis) 和其它遗传性视网膜变性、病理性近视、早产儿视网膜病和莱伯遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy)、角膜移植和角膜屈光手术的后效、以及疱疹角膜炎。

另外, 本发明的结合分子可用于精神病症 (特别是精神分裂症和抑郁) 的治疗。

对于这些适应症, 合适的剂量当然将依赖于例如将采用的本发明具体分子、施用模式和所治疗疾病的性质和严重性。一般而言, 剂量将优选在 $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至 $1 \text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 范围内。在损伤位点作为治疗剂通过泵便利地施用或注射本发明的结合分子, 例如, 可通过颅内直接施用于 CNS 损伤位点或鞘内施用于脊髓损伤位点。

可以单独、或组合、或与其它制剂连续组合提供本发明的结合分子。例如, 可以与抗炎症剂 (作为中风或脊髓损伤后阻止进一步的神经元损伤和轴突再生抑制的方法, 例如而限于皮质类固醇)、神经营养因子 (例如 NGF、BDNF) 或其它神经变性疾病药物 (例如 ExelonTM 或左旋多巴) 组合使用本发明的结合分子。其它合适的治疗中风的组合配偶体为 Alteplase

和 Desmoteplase (DSPA, 例如公开于 WO90/09438)。在一个实施方案中, 本发明提供含有本发明的结合分子和具体治疗中风的 Desmoteplase 的组合以及含有所述组合的药物组合物。如此处所用的, 当两种制剂同时施用, 将该两种制剂组合施用, 或者以两种制剂将同时起作用的方式单独施用。

目录号、属名或商品名确定的活性成分的结构可以从标准目录《The Merck Index》的现行版本或从数据库, 例如国际专利(例如 IMS World Publications)或其它由 IMS Health 提供的数据库获得。其相应内容在此引用作为参考。任何本领域技术人员完全可以鉴定该活性成分, 并且基于这些参考也能够标准测试模型(体外和体内)中制造和测试这些药物适应症(pharmaceutical indication)和性能。

可以通过常规方式制造本发明的药物组合物。例如, 优选以冻干形式提供本发明的含有本发明分子的组合物。将其溶解于合适的水性载体(例如注射用无菌水或无菌缓冲生理盐水)中用于即刻施用。

为了帮助构成合适的组合物, 可以在同一容器中分别包装本发明结合分子和任选的增强本发明结合分子效果的另一种药物, 并附带指导混合的说明或指示。上文提供了任选的第二种候选药物。

可以通过脊髓损伤模型在体内证明本发明的结合分子与生长因子(例如 NGF)的组合物协同效应。

通过参考下列实施例, 本发明将得到更详尽的理解。然而, 不应将其解释为限制本发明的范围。

在下列实施例中所有温度为摄氏度(°C)。

实施例中关注的单克隆抗体是含有轻链可变部分(SEQ ID NO: 3)和重链可变部分(SEQ ID NO: 2)的本发明结合分子。

使用下列缩写:

ELISA	酶联免疫吸附试验
FACS	荧光活化细胞分选术
FITC	异硫氰酸荧光素

HCMV	人巨细胞病毒启动子
FBS	胎牛血清
IgG	免疫球蛋白同种型 G
MAb	单克隆抗体
PBS	磷酸盐缓冲盐水
PCR	聚合酶链式反应

实施例 1: 方法:

人 Nogo-A 表达构建体 (pRK7-hNogo-A) 的产生: 使用标准程序以双重过滤设置 (duplicate filter sets) 筛选构建在 λ gt10 (Clontech) 中的人 cDNA 文库。使用标准方案通过 PCR 从人全脑 cDNA (Clontech) 扩增人 Nogo-A 片段, 随后克隆到 pBluescript 中、酶切并分离, 或直接用作筛选探针。使用 400bp XhoI/SmaI 片段作为 5'探针, 以引物 CA-NA-2F: 5'-AAG CAC CAT TGA ATT CTG CAG TTC C-3' (SEQ ID NO: 29)和 CA-NA-3R: 5'-AAC TGC AGT ACT GAG CTC CTC CAT CTG C-3' (SEQ ID NO: 30)扩增 3'探针。阳性克隆被分离、亚克隆并确定序列。为了获得全长人 Nogo-A cDNA, 使用人 Nono-A 序列中唯一的 EcoR1 限制位点组装重叠克隆, 并亚克隆到 Bluescript 载体中, 命名为 PbsnogoA。为了获得 pRK7-hNogo-A, 通过定向克隆将全长 cDNA 插入真核表达载体 pRK-7 中。

用于细菌生产的人 NiG (hNiG) 表达质粒 (pET28a-hNiG) 的产生: 使用引物组: 正向 5'- GTC GCG GAT CCA TGG AGA CCC TTT TTG CTC TTC-3' (SEQ ID NO: 31); 反向 5'- GTT CTC GAG TTA TGA AGT TTT ACT CAG-3' (SEQ ID NO: 32)从 PbsnogoA PCR 扩增各自的编码区后, 将编码的 hNiG DNA 片段与用于细菌表达的 N 端 His-和 T7-标签框内亚克隆到 pET28a (Novagen) 的 BamHI/XhoI 中。将最终的质粒命名为 pET28a-hNiG。然后以 1 mM 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 在大肠杆菌 (E. coli) B21 中诱导 hNiG 的表达。

小鼠 NiG 外显子 3 (mNiG 外显子 3) 表达质粒的产生: 以引物: 正向 5'-GTG CGG ATC CAT GGA TTT GAA GGA GCA GC-3' (SEQ ID NO: 33); 反向 5'-GTT TCT CGA GTG AAG TTT TAT TCA GCT C-3' (SEQ ID NO: 34)从小鼠基因组 BAC 模板扩增编码小鼠外显子 3 的区域, 并亚克隆到 pET28a 的 BamHI/XhoI 克隆位点中。将最终的质粒构建体命名为 pET28a-mNiG 外显子 3。

猴 NiG 的克隆: 从冰冻的猴脑组织分离聚腺苷酸化 RNA, 并使用寡聚 dT 引物合成 cDNA。使用序列特异性引物和校正读码酶通过 PCR 扩增覆盖该 cDNA 5'和 3'区的两个重叠片段。使用人 NiG cDNA 的已知序列设计引物。用于扩增 5'片段的引物为 5'-TCCACCCCGGCCGCGCCCAA-3' (SEQ ID NO: 35)和 5'-AATGATGGGCAAAGCTGTGCTG-3' (SEQ ID NO: 36), 用于扩增 3'片段的引物为 5'-GGTACAAAGATTGCTTATGAAACA-3' (SEQ ID NO: 37)和 5'-AGCAGGGCCAAGGCAATGTAGG-3' (SEQ ID NO: 38)。然后亚克隆这两个片段, 对每个片段至少测序 4 个独立克隆。使用上述引物通过重叠 PCR 组装全长 cDNA, 克隆得到的产物并再次测序。

如上定义的重组 NogoNiG 蛋白质的产生: 在大肠杆菌中表达细菌 Nogo-A 缺失文库。通过在含有 0.75 mg/ml 溶菌酶的超声处理缓冲液 (20 mM Tris、50 mM NaH₂PO₄、100 mM NaCl, pH 8.0) 中重复超声, 或通过以 B-PerTM (Pierce) 或 8 M 尿素溶解而提取蛋白质。根据 Novagen 周质蛋白质纯化方案从周质间隙获得表达的带有 pelB 前导序列的 NiG。使用 Co²⁺-TalonTM 金属亲和树脂 (Clontech) 分批纯化 pET28 构建体上清液。在用树脂分批纯化的过程中以超声处理缓冲液逐渐取代 8 M 尿素和 B-PerTM 而将该缓冲液溶解的裂解物置于非变性条件。以含有 250 mM 咪唑的超声处理缓冲液在重力柱 (BioRad) 上洗脱蛋白质。通过在 Superdex 200 HiLoad 16/60 上凝胶过滤进一步纯化 NiG 蛋白质。根据厂商 (Amersham Pharmacia) 说明用 G 琼脂糖柱分批纯化 pGEX-6P 构建体上清液。通过将溶解的 GST-Nogo-66 与 PreScission 蛋白酶孵育以及随后

的 HPLC 纯化完成 GST-Nogo-66 的切割。通过 IMAC 纯化的重组 Nogo 的制备型 SDS-PAGE, 由 BioRad Electro-Eluter 以 250 mA 洗脱 1 小时到 50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.2% (w/v) CHAPS 中、以及随后 30 秒的反转电极极性实施凝胶电洗脱。使用 Pierce 考马斯染料并 BSA 作为标准蛋白质确定经色谱纯化的蛋白质的蛋白质浓度。基于银染凝胶 (Merril CR, Dunau ML, Goldman D (1981) A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 110:201-207) 的条带强度以 BSA 为标准蛋白质估计经凝胶洗脱的蛋白质的蛋白质浓度。

实施例 2: 人 3A6-IgG mAb 的产生

以相应于人 Nogo-A 特定序列的人 NiG 皮下免疫 Medarex 小鼠 (以人免疫球蛋白基因重组)。通过标准杂交瘤技术以该小鼠脾细胞与杂交瘤细胞系融合产生 3A6 单克隆抗体。用人 NiG 70 μg /小鼠在颈背和肋腹皮下注射实施 Medarex 小鼠的免疫, 浓度为 1.9 ml 中 1.5 mg, 并混合 TiterMax 佐剂。皮下注射 180 μl /小鼠, 随后加强数次。在 96 孔板中实施使用 ELISA 确定血清中抗 Nogo-A Ab 效价, 所述 96 孔板以 PBS 中 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人 NiG 于室温 (RT) 孵育 4 小时包被 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$)。将板轻弹并重新填充封闭缓冲液 (PBS+5% BSA) 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 盖盖并于 RT 孵育 1 小时或于 4 度过夜, 然后以自来水清洗 4 次, 重新填充 PBS 并轻弹。在 PBS+10% FCS (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$) 中稀释小鼠血清, 于 RT 孵育 2 小时或于 4 度过夜。使用的小鼠血清稀释液为: 1:100、1:1000、1:10000、1:30000。重复清洗步骤。在 PBS/0.1% BSA/0.1% Nonidet 40 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$) 中稀释山羊 F(ab')₂ 抗人 IgG Fc 特异性 HRP 缀合 Ab, 并于 RT 孵育 2 小时或于 4 度过夜。重复清洗步骤。以 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 添加 BM 蓝 POD 底物, 于室温避光孵育 15 分钟, 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 添加 1 M H₂SO₄ 以终止 HRP 底物反应。使用酶标测定仪于 450 nm 测定 O:D。如上所述以 ELISA 进行杂交瘤和克隆的筛选。人 NiG (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 大肠杆菌)。ELISA 对 IgG 同种分型 (Isotyping)。进行实验以确定该抗体的 IgG 亚类。以人 NiG 包被板, 以 1:10 至 1:100 的稀释度使用培养物上清液。通过使用一组小鼠抗人 IgG 亚类 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) HRP 缀合的 mAb

孵育 4 小时评估抗体反应性。使用抗 MCP1 IgG1 mAb 作为阳性对照。如上所述进行 Elisa。从 ELISA 中具有最高抗人 NiG 血清效价的小鼠完成杂交瘤的产生，并选作融合。通过吸入 CO₂ 处死小鼠。无菌取脾脏并制备单细胞悬液。在无钙、镁的 PBS 中清洗。在 PBS 中清洗小鼠骨髓瘤细胞 (PAIO)。与小鼠骨髓瘤细胞添加相等数量的 5 千万个小鼠脾细胞，并于 RT 以 900 RPM 旋转 10 分钟。小心地完全去除上清液。于 RT，2-3 分钟内在轻微搅拌下逐滴添加 1 ml 融合试剂 PEG 4000 (50 : 50 在 PBS 中)。于 37 度在水浴中温和振荡 90 秒。在 5 分钟内逐滴添加 5 至 10 ml RPMI 1640 培养基以稀释 PEG，于 RT 放置 10 分钟。添加另外 20 ml 无血清培养基并离心。重悬于适量 HAT 培养基 (RPMI+10% FCS+20ml/升 50 × HAT) 中。将融合细胞以 100 μl/孔置于含有 Balb/c 小鼠腹膜细胞饲养层 (1 ml/孔) 的孔中。提前 24 小时制备小鼠腹膜细胞，并准备 HAT 培养基中 1 ml 培养物和 24 孔 Costar 板。一只小鼠的产量足够一块 24 孔板 = 约 2000 个细胞/孔。处死后，使用 10 ml 注射器和 18 号 (18 gauge) 针头以 5 ml 0.34 M 蔗糖清洗腹腔。将 6 只小鼠的集合收集到 1 管中，离心、重悬于 HAT 培养基中、并等分到孔中。培养基是具有 Glutamax 的 RPMI 1640，含有 100 μM 次黄嘌呤、1.6 μM 胸苷、0.4 μM 氨基蝶呤、50 μM β 巯基乙醇、50 μg/ml 庆大霉素、10% 热灭活的 FCS。依赖于生长速度和杂交瘤外观，每 3 或 4 天更换培养基的 50%，14 天后通过省去氨基蝶呤将 HAT 培养基更换为 HT 培养基。筛选杂交瘤和克隆世代。当孔达到约 80% 汇合率时，在如上所述的 ELISA 中以 1:3 的稀释度测试上清液。通过有限稀释从抗 Nogo Ab 阳性的杂交瘤进行单细胞克隆。通过有限稀释，以 0.5 个细胞/100 μl/孔接种进行克隆。建立 4 × 96 个 100 μl 孔。使用小鼠 PE 细胞作为饲养层。显微镜检查克隆生长，进行筛选前一天添加 100 μl 培养基。个体杂交瘤的生长速率不同，但是培养物大约需要 10 天达到足够密集以产生重组的抗体。以 1:10、1:100 的稀释度完成上清液的筛选。培养扩增的阳性克隆并使其适于在滚瓶中生产的 1% 低血清条件，并使用 A 蛋白亲和从培养物上清液进行纯化。

实施例 3: 小鼠 3A6 mAb 和 Fab 3A6 的产生和纯化

使用 A 蛋白琼脂糖 Cl-4B 柱 (Pharmacia; 11 cm 床高)。简言之, 以 4 ml/分钟上样校正 pH 至 8.1 的培养物上清液, 使用 100 mM Na_2HPO_4 , pH 8.1 以 8 ml/分钟将柱清洗至基线。最后使用 50 mM NaH_2PO_4 (pH 3.0)、140 mM NaCl 以 8 ml/分钟洗脱结合的物质, 并立即以 5 N NaOH 中和 (pH 7.0) 并无菌过滤。于 280 nm 监测吸光率。最终通过超滤和/或对 PBS 透析进一步浓缩纯化物质部分。在 10 kDa ULTRASETTE™ 切向流装置 (Filtron Technology Corporation) 上过滤所有用于纯化的缓冲液以去除可能的内毒素污染物。出于同样原因, 以 20% 乙醇大量清洗 A 蛋白树脂, 所有管道/泵在使用前以 0.1 M NaOH 处理。使用 1.35 作为 1mg/ml 的参照吸收, 在 280 nm 分光光度测量蛋白质浓度。使用 4-20% Novex 梯度凝胶在还原条件下通过 SDS-PAGE 常规评定纯度。根据厂商 (Endotell AG, Allschwil, Switzerland) 说明, 通过经典鲎变形细胞裂解物 (Limulus Amoebocyte Lysate, LAL) 反应测量内毒素含量。

Fab 片段的产生: 将部分小鼠 3A6 mAb 对 100 mM 醋酸钠, pH 5.5、2 mM EDTA 彻底透析, 并调节至浓度 6 mg/ml。在 0.25 mM 半胱氨酸存在下通过木瓜蛋白酶酶切 (1:200 w/w 比) 产生 F_{ab} 片段。允许该反应于 37 °C 进行 16 小时, 然后通过大大过量添加特异性木瓜蛋白酶抑制剂 E64 (N-[N-(L-3-反式-carboxirane-2-羧基)-L-亮氨酸]-胍丁胺, (10 μM) 终止。然后将酶切的抗体通过 A 蛋白 Sepharose Fast Flow 柱以去除完整物质和 Fc 片段。将 F_{ab} 片段对 PBS 大量透析并浓缩至大约 3mg/ml。(木瓜蛋白酶和 E64 来自 Roche Molecular Biochemicals)。

实施例 4: VL 和 VH 区的 HPLC、质谱分析和 N 端氨基酸测序:

a) 还原和烷基化: 将纯化、干燥的 3A6 抗体溶解于 40 μl 8M 尿素、0.4M NH_4HCO_3 (pH 8.3) 中。添加 60 μg DTT (Calbiochem) (预先溶解于 10 μl 与蛋白质相同的缓冲液中)。在氩气下于 50 °C 实施 30 分钟还原 (DTT 比蛋白质巯醇摩尔过量 100 倍)。将样品在还原后冷却至室温。添加溶解于与蛋白质相同的缓冲液的碘乙酰胺 (Sigma Ultra, 1-1149) 304 μg 。

于室温避光实施胺甲酰甲基化作用 (Carboxamidomethylation) 15 分钟。添加 1 μ l β -巯基乙醇猝灭该反应。

b) 重链和轻链的分离: 通过具有 DR5 泵系统和二极管阵列 UV 探测器的 Hewlett Packard 1090M HPLC System 的反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离胺甲酰甲基化抗体重链和轻链。层析条件为: 填充 R1/H 材料的 PerSeptive Biosystems Poros 2.1 \times 100 mm 柱; 流速为 0.5 ml/分钟; 溶剂: (A) 水中 0.1% TFA 和 (B) 0.09% TFA/乙腈/水 9: 1; 于 80 $^{\circ}$ C 在 8 分钟内梯度 25-70% B; 于 218/280 nm 检测。

c) LC-ESI-MS: 使用装备 Micromass Z 型电喷雾电离源 (ESI) 的 Q-Tof (Micromass, Manchester, UK) 四极杆飞行时间混合串联质谱仪进行质谱分析。获取质量范围一般为 m/z 500-2000。使用 MassLynx 软件记录并处理数据。使用马心脏肌红蛋白 (MW 16951.5) 的多电荷离子峰完成 500-2500 m/z 范围的定标。

d) 重链和轻链的 HPLC-MS: 在使用以 PerSeptive Biosystems POROS R1/H 填充的 1 mm \times 150 mm LC 预装柱的 HP1100 HPLC 系统 (Hewlett Packard, Palo-Alto, CA, USA) 上实施还原且胺甲酰甲基化的重链和轻链的分离。将该柱保持在 60 $^{\circ}$ C。使用安装 Valco 模型 C6UW HPLC 阀 (Valco, Houston, TX, USA) 和 10 μ l 注射环的 CTC PAL 自动取样器 (CTC, Zwingen, Switzerland) 将 10 μ l 的样品体积注射到柱上。由 MassLynx 软件 (Micromass, Manchester, UK) 控制 HPLC。在 214 nm UV 检测。洗脱液 A 是含有 0.05% TFA 的水。洗脱液 B 是含有 0.045% TFA 的水:乙腈为 1:9 的混合物。于 80 $^{\circ}$ C 在 20 分钟内运行 20% B 至 90% B 的梯度。流速一般为 60 μ l/分钟。将 LC 系统的总流量无任何分流地引入 UV 检测室、然后是 ESI 源。使用 MassLynx 软件 (Micromass, Manchester, UK) 控制 HPLC 系统并处理来自 UV 探测器的信号。检测到下列 5 个信号:

表 1:

测量:	信号整合
A=50614.2 Da	具有胺甲酰甲基化半胱氨酸 (CAMCys) 的 H 链
B=5077645 Da	信号 A + 162 Da (= 己糖)
E=23727.8 Da	具有 CAMCys 的 L 链

d) V_L 和 V_H 区的 N 端氨基酸测序: 使用从 HPLC 收集的 H+L 链峰用于序列分析。在 Hewlett Packard G1000A N 端蛋白质测序系统上确定氨基酸序列。该系统对保留在微型吸附双相柱 (miniature adsorptive biphasic column) 上的蛋白质样品实施自动化 Edman 化学法。使用优化的化学方法 (双耦连 3.0) 增强化学效率、将滞后最小化从而将测序分析延伸至约 50 个残基。在装备三泵体系 (ternary pumping system) 和窄孔 (2.1 mm × 25 cm) PTH 柱的联机 Hewlett Packard HP1090 HPLC 系统上实施 PTH 氨基酸分析。

结果:

从质量分析确定小鼠 3A6-IgG1 的同源重链和轻链。H 链为单糖基化的。重链和轻链的总质量分析对二链显示单一质量。小鼠 3A6-IgG1 的 HPLC 色谱显示单峰。在继还原和烷基化后的 HPLC 纯化后, 可以获得纯的重链和轻链。对轻链和重链实施 N 端序列降解。通过序列降解鉴定 L 链和 H 链 N 端序列的氨基酸。

轻链

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF

实施例 5: 人 3A6 mAb 重链和轻链基因的克隆

根据厂商说明使用 TriPure 试剂 (Rochediagnostics, Germany, Cat.# 1667157) 从 10^7 个杂交瘤细胞 (3A6 克隆) 制备总 RNA。使用 Oligotex Resin (Qiagen, Germany, cat.# 70022) 从上面制备的总 RNA 分离 mRNA 用于 cDNA 合成。

使用下列条件通过反转录产生 cDNA: 2 μ l mRNA、2 μ l 10 \times 反转录缓冲液、2 μ l (dT)₂₀ 引物 (10 M)、0.5 μ l RNasin (Promega, 40 U/ml)、2 μ l dNTP (各 5 mM)、1 μ l Omniscript™ 反转录酶 (Qiagen, Cat # 05110), 10.5 μ l ddH₂O, 反应: 于 37 °C 1 小时。使用校正读码酶 ProofStart™ DNA 聚合酶进行扩增编码 V_H 和 V_L 的 cDNA 的 PCR。

轻链和重链的 PCR: 反应混合物: 2 μ l cDNA、5 μ l 10 \times 反应缓冲液、3 μ l dNTP (各 5 mM)、2 μ l 5'引物 (10 μ M) (见表 2)、2 μ l 3'引物 (10 μ M) (见表 2)、1 μ l ProofStart (Qiagen, Cat # 202203)、36 μ l ddH₂O。PCR 条件: 95 °C/5 分钟, (95 °C/40 秒, 53 °C/1 分钟, 72 °C 1 分钟) \times 35, 72 °C/10 分钟。将产生的 PCR 产物直接连接到 pCRbluntTOPO (Invitrogen) 中。将该连接产物转染到 TOP 10 细胞 (Invitrogen) 中并挑取若干克隆。在 ABI 测序仪上测定 3A6 mAb 重链 (V-H, SEQ ID NO: 43) 和 3A6 mAb 轻链 (V-L, SEQ ID NO: 44) 可变部分的 cDNA 的核苷酸序列。对来自两个独立实验 (RNA \rightarrow cDNA \rightarrow RT-PCR) 的 mAb3A6 轻链 cDNA 的总共 10 个克隆进行测序和比对。随后的 V-H 和 V-L 的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO: 2 (V-H) 和 SEQ ID NO: 3 (V-L) 中。用于 V_H 和 V_L cDNA 的 PCR 扩增的引物, 所有引物由 MWG Biotech, Germany 合成。

表 2

引物	序列	SEQ ID NO:
5'-V _L 前导序列	gctatggccATCGAAGCCCCAGCTCAG	39
3'-C _K	ttaggaattcCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG	40
5'-V _H 前导序列	aatgtcgaccATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGG	41
3'-C _H 铰链	ttagTTATGGGCACGGTGGGCATGTGTGAG	42

IgG4 表达载体的克隆

V_H 区的分子克隆

使用引物#1 和#2 通过 PCR 从重组 pCRII 质粒扩增 V_H cDNA。以 *Bst*EII 切割产生的 PCR 片段, 并亚克隆到 HCcassAAL 的 *Hinc*II/*Bst*EII 位点, 产生中间质粒 nogohccass。通过使用引物 IgG4HC5'完成重链前导

序列在-2 位的氨基酸交换 (谷氨酰胺取代天冬氨酸)。通过自动化测序核实正确序列, 并通过 *XbaI/BamHI* 酶切释放 V_H cDNA 片段。连接到经 *BamHI/XbaI* 酶切的 hcMCPfin 中产生最终的 AnogoHC3A6 表达构建体。

V_L 区的分子克隆

使用引物#3 和#4 通过 PCR 从重组 pCRII 质粒扩增 V_L cDNA, 由此引入 *MluI* 和 *HindIII* 位点。通过引入 *HindIII* 限制位点, 发生连接区的氨基酸交换 (R→K)。这导致将 J5 型连接区改变为 J2 型。将产生的 PCR 片段亚克隆到 pCRII-blunt 中并核实序列。通过 *MluI/HindIII* 酶切释放正确片段, 并连接到表达载体 LCvec-AAL160 中, 由此产生最终质粒 AnogoLC3A6。

引物 #	说明	序列	SEQ ID NO:
1	IgG4HC5'	CAGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG	
2	IgG4HC3'	aaaTTGGTGGAGGCTGAGGAGACG	
3	IgG4LC5'	aaaaacgcgttgtGAAATTGTGTTGACACAGTCT	
4	IgG4LC3'	aaaaaagcttTGTCCTTGGCCGAAGGTGATC	

人 3A6 mAb 的表征

实施例 6: 使用 ELISA 的 3A6 和 Fab 与人 Nogo-A 的结合

以 PBS 中的 0.4-2 $\mu\text{g/ml}$ Nogo 蛋白质片段包被 (100 $\mu\text{l/孔}$) Greiner 96 孔 PS 板 (#655161), 盖盖并于室温孵育 4 小时。将板轻弹并以 200 $\mu\text{l/孔}$ 封闭缓冲液 (PBS+2% BSA) 重新填充, 盖盖并于 RT 孵育 1 小时或于 4°C 过夜, 然后用水清洗 3 次、用 PBS 清洗 2 一次。将不同浓度的人 3A6 IgG1、IgG4 mAb 或 3A6 Fab 稀释于 PBS + 2% BSA (100 $\mu\text{l/孔}$) 中, 并于 RT 孵育 2 小时或于 4°C 过夜。重复清洗步骤, 添加 PBS/0.1% BSA/0.1% Nonidet 40 中以 1:5000 稀释的缀合马辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊抗人 IgG (Jackson Immuno Research #109-036-098) 或对于 3A6 Fab 以 1: 5000 稀释于 PBS/0.1% BSA/0.1% Nonidet 40 的驴抗人 HRP (Jackson Immuno Research 709-035-149) (100 $\mu\text{l/孔}$), 于 RT 孵育 2 小时或于 4°C 过夜, 重复清洗步骤。通过添加 100 $\mu\text{l/孔}$ BM 蓝 POD (Roche #1484281) 开始 HRP

反应，并于 RT 避光孵育 15 分钟。以 50 μ l/孔添加 1 M H_2SO_4 终止 HRP 底物反应，使用设定为 450 nm 的酶标测定仪（Packard Spectra Count）确定光密度。

结果：

人 3A6 IgG1、IgG4 mAb 和 3A6 Fab 以 0.01-10 nM 范围内的极低浓度与人 NiG 结合。

实施例 7: 小鼠 3A6-IgG1、3A6-IgG4 和 3A6 Fab 对 Nogo-A 结构域的生物传感器亲合力测量

根据厂商说明使用 BIAcore 2000 光学生物传感器（Biacore, Uppsala, Sweden）通过表面等离子共振（SPR）测量小鼠 3A6-IgG1 mAb、3A6-IgG4 mAb 的亲合力和 3A6 Fab 的亲合力。使用胺耦连化学法将重组人 NiG 共价固定于 CM5 传感器芯片流动室上。简而言之，通过注射 35 μ l 含有 0.025M NHS 和 0.1 M EDC 的溶液活化羧甲基化的葡聚糖底物。为了固定在传感器芯片上，将重组人 NiG 稀释于 pH 4 的 0.01 M 柠檬酸缓冲液中，并以 5 μ l/分钟的流速注射以达到允许亲合力测量的耦连水平。通过注射 35 μ l 1 M 的乙醇胺盐酸溶液（pH 8.5）实施残余 NHS 酯基的失活。通过注射 5 μ l 0.1 M HCl 再生传感器芯片表面。对于亲合力测量，以不同浓度（0.50 nM 至 100 nM 范围内）于 200 μ l/分钟的流速注射抗体。每次注射后传感器芯片表面以注射 10 μ l 0.1 M HCl 再生而不损失该表面的结合活性。使用厂商提供的 BIAevaluations 3.0 软件确定动力学常数 k_a 和 k_d 以及亲合力常数 K_A 和 K_D 的数值。

BIAcore 中的亲合力测量：使用表面等离子共振（SPR）技术（Biacore）实时测量小鼠 3A6-IgG1 mAb、3A6-IgG4 mAb 以及 3A6 来源的单价 Fab 片段对重组人 NogoA 的动力学和亲合力结合常数。对于该分析，将人 NiG 耦连到传感器芯片表面，并注射不同浓度的抗体。通过非线性曲线拟合从传感图获得结合相互作用的动力学参数。抗体与人 NiG 平衡的亲合力常数对于 3A6-IgG4、3A6-IgG1、3A6 Fab 在 K_D 0.14 nM 至 2.7 nM 范围。

实施例 8: 使用 Pepsot 分析的 3A6 mAb 表位鉴定

从 Jerini Peptide Technologies, Berlin, Germany 购买 Pepsot 膜。第一次孵育之前, 将该膜以乙醇漂洗 1 分钟、以 TBS 漂洗 3 次, 每次 10 分钟。每次以一级抗体孵育之前, 于 4°C 将该膜在封闭缓冲液中孵育过夜。以 TBS-T 清洗 10 分钟后, 于 RT 将该膜以封闭缓冲液中的一级抗体孵育 3 小时。抗体浓度为 $c(3A6) = 0.6 \text{ nM}$ 。以 TBS-T 清洗三次 (每次 10 分钟) 后, 将该膜于 RT 与 1:500 000 稀释于封闭缓冲液中的相应二级抗体孵育 2 小时。以 TBS-T 清洗三次后, 根据厂商说明将该膜与化学发光检测试剂 (ECL Advance, Amersham Biosciences) 孵育并对胶片曝光。

使用人和猴 Nogo-A 蛋白的蛋白质印迹分析:

根据标准方法进行蛋白质印迹分析。将 10 ng 从大肠杆菌纯化的人 NiG 施加于各泳道, 实施 SDS-PAGE 并转移至硝化纤维素膜。于 4°C 在封闭缓冲液中封闭过夜。抗体 (1 nM 于 0.5% 封闭缓冲液中) 与肽 (10、100 和 1000 倍摩尔过量的肽, 人 NiG 肽表位 HNQQELPTALTKLVKED、错乱肽 (Scrambled peptide) H-ETQLAKLPVDLKTQE: Jerini Peptide Technologies, Berlin, Germany) 于 RT 孵育 1 小时后, 将膜加入该溶液并在摇床上于 RT 孵育 1 小时。以 TBS-T 清洗三次 (每次 10 分钟) 后, 将膜与以 1:100000 稀释于封闭缓冲液的相应二级 HRP 标记抗体 (来自 Jackson Immuno Research 的山羊抗人 IgG Fab2) 于 RT 孵育 1 小时。以 TBS-T 清洗三次后, 根据厂商说明将该膜与化学发光检测试剂 (ECL Advance, Amersham Biosciences) 孵育并对胶片曝光 15 秒。根据标准方法进行恒河猴 NiG 的蛋白质印迹分析。将在 IPTG 诱导下表达猴 NiG 的大肠杆菌 pET28-猴 NiG 细胞裂解液的等分试样施加于各泳道。将没有诱导表达的相同细胞的细胞裂解液上样作为阴性对照。实施 SDS-PAGE 并转移至硝化纤维素膜。于 4°C 在封闭缓冲液中封闭过夜。抗体 (1 nM 于 0.5% 封闭缓冲液中, Roche Applied Science) 与肽 (10-、100-和 1000 倍摩尔过量的肽, 序列: NQQELPIALTKLVKEED, Jerini Peptide Technologies) 于 RT 孵育 1 小时后, 将膜加入该溶液并在摇床上于 RT 再孵育 1 小时。以 TBS-T 清洗

三次(每次 10 分钟)后,将膜与以 1:100000 稀释于封闭缓冲液的抗人 HRP 标记的二级抗体于 RT 孵育 1 小时。以 TBS-T 清洗三次后,根据厂商说明将该膜以化学发光检测试剂(ECL Advance, Amersham Biosciences)孵育并对胶片曝光 15 秒。

ELISA 中 3A6 mAb 与人和猴肽表位的结合

将 Greiner 96 孔 PS 板以 PBS 中的 8 $\mu\text{g/ml}$ 错乱肽 H-ETQLAKLPVDLKTQE、人 NiG 肽表位 3A6 IgG4 H-NQQELPTALTKLVKED 和肽表位 3A6 IgG4 猴 NiG、H-NQQELPIALTKLVKEED 包被(100 μl /孔),盖盖并于室温孵育 4 小时。将板轻弹并以 200 μl /孔封闭缓冲液(PBS+5% BSA)重新填充,盖盖并于 RT 孵育 1 小时或于 4 摄氏度过夜孵育,然后用自来水清洗 4 次,以 PBS 重新填充并轻弹。将 mAb 3A6 IgG4 稀释于 PBS+2% BSA 中(100 μl /孔),并于 RT 孵育 2 小时或于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。mAb 稀释物:10 nM 至 0.001 nM。重复清洗步骤。将二级 Ab 稀释于 PBS/0.1% BSA/0.1% Nonidet 40 中(100 μl /孔),于 RT 孵育 2 小时或于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。重复清洗步骤。以 100 μl /孔添加 BM 蓝 POD 底物,并于室温避光孵育 15 分钟,以 50 μl /孔添加 1 M H_2SO_4 以终止 HRP 底物反应。使用设定为 450 nm 的酶标测定仪测定 OD。

结果:

人 3A6 mAb 的表位定位:表位定位得到人 NiG 蛋白质中的序列 ELPTALTKLV。

蛋白质印迹中 mAb 3A6 与合成肽结合人 NiG 的竞争:

为了证实通过 pepspot 技术获得的结果,实施蛋白质印迹竞争实验。使用含有推定表位序列(NQQELPTALTKLVKED)的合成 16 肽用于与全长人 NiG 竞争结合 3A6 抗体。在与膜结合的人 NiG 孵育之前,使用合成肽与抗体的不同摩尔比将 3A6 抗体(1 nM)与合成肽孵育 1 小时。该肽的 10 倍摩尔过量显示出对人 NiG(大肠杆菌中产生)的检测信号的显著降低。100 倍过量导致该信号的进一步降低,该肽的 1000 倍摩尔过量几乎完全抑制 3A6 与人 NiG 的结合。相反,具有相同氨基酸成分但是具有不同序列(错

乱的)的肽的1000倍过量对该抗体与人NiG的结合没有任何影响。

mAb 3A6 与猴 NiG 的结合: 与合成肽表位的竞争

使用含有表位序列(NQQELPIALTKLVKEED)的合成17肽与大肠杆菌中表达的全长恒河猴NiG竞争结合3A6抗体。在与膜结合的猴NiG孵育之前,使用合成肽与抗体的不同摩尔比将3A6抗体(1 nM)与合成肽孵育1小时。100倍过量导致信号的降低,该肽1000倍摩尔过量基本抑制了3A6与猴NiG的结合。相反,具有相同氨基酸成分但是具有不同序列(错乱的)的肽的1000倍过量对该抗体与人NiG的结合没有任何影响。

ELISA 中 3A6 IgG4 与人和猴 NiG 肽表位的结合

使用ELISA实施该mAb与表位和错乱序列的详细结合分析。结果明确显示该mAb以浓度依赖的方式在极低浓度(0.001至1.0 nM)与猴和人肽表位结合,所述浓度与其在BIAcore中对人NiG的0.14 nM的KD相当。此外,结合是特异性的,错乱的对照肽没有结合。

<110> 诺瓦提斯公司

<120> 有机化合物

<130> 4-32761P1/UNZ

<160> 44

<170> PatentIn版本3.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(18)

<223> 大鼠NogoA_342-357

<400> 1

Ser Tyr Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu

1 5 10 15

Glu Ala

<210> 2

<211> 221

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(221)

<223> 具有前导序列的3A6重链的可变部分

<400> 2

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Gly Leu Leu Lys Gly Val

1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Asp Phe Arg

35 40 45

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

50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Val Arg Pro Val Trp Met Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val

130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr

145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180

185

190

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser

195

200

205

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala

210

215

220

<210> 3

<211> 238

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(238)

<223> 具有前导序列的3A6轻链

<400> 3

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

35 40 45

Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys
100 105 110

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

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

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

<210> 4

<211> 3919

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3579)

<223> 人NogoA

<400> 4

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 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 aaacgcccaa aataattagt aggagtcat ctttaaaggg 3619

Arg Lys Ala Glu

1190

gatattcatt tgattatacg ggggagggtc agggaagaac gaaccttgac gttgcagtgc 3679

agtttcacag atcgttgta gatctttatt tttagccatg cactgttggtg aggaaaaatt 3739

acctgtcttg actgccatgt gttcatcatc ttaagtattg taagctgcta tgtatggatt 3799

taaaccgtaa tcatatcttt ttctatctg aggcaactggt ggaataaaaa acctgtatat 3859

tttactttgt tgcagatagt cttgccgcat cttggcaagt tgcagagatg gtggagctag 3919

<210> 5

<211> 1192

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

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 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

705 710 715 720

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

785 790 795 800

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
865 870 875 880

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> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(18)

<223> 人NogoA_342-357

<400> 6

Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu

1 5 10 15

Glu Ala

<210> 7

<211> 819

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(819)

<223> 人Nig

<400> 7

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

Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val

385 390 395 400

Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu

405 410 415

Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu

420 425 430

Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln

435 440 445

Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile

450 455 460

Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val

465 470 475 480

Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu

 485 490 495

Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile

 500 505 510

Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro

 515 520 525

Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro

 530 535 540

Asp His Ser Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val

545 550 555 560

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

 565 570 575

Glu Thr Val Met Leu Val Lys Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu

580

585

590

Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro

595

600

605

Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn

610

615

620

Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys

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> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(10)

<223> 3A6重链的高变部分

<400> 8

Gly Phe Asp Phe Arg Arg Asn Trp Met Ser

1

5

10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(17)

<223> 3A6重链的高变部分

<400> 9

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(9)

<223> 3A6重链的高变部分

<400> 10

Pro Val Trp Met Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(16)

<223> 3A6轻链的高变部分

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1

5

10

15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(7)

<223> 3A6轻链的高变部分

<400> 12

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(9)

<223> 3A6轻链的高变部分

<400> 13

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr

1 5

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(30)

<223> DNA-CDR-H1-3A6

<400> 14

ggattcgatt ttagaagaaa ttggatgagt

30

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(51)

<223> DNA-CDR-H2-3A6

<400> 15

gaaattaatc cagatagcag taagataaac tatacgccat ctctaaagga t

51

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(27)

<223> DNA-CDR-H3-3A6

<400> 16

ccggtctgga tgtatgctat ggactac

27

<210> 17

<211> 48

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(48)

<223> DNA-CDR'1-3A6

<400> 17

aagtcaagtc agagcctctt gcatagtgat ggaaagacat atttgaat

48

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<223> DNA-CDR'2-3A6

<400> 18

ctgggtgtcta aactggactc t

21

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(27)

<223> DNA-CDR'3-3A6

<400> 19

tggcaaggta cacatTTTcc tcagacg

27

<210> 20

<211> 54

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

<223> 3A6的重链前导序列

<400> 20

atg gat ttt ggg ctg att ttt ttt att gtt ggt ctt tta aaa ggg gtc

48

<211> 57

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<223> 3A6的轻链前导序列

<400> 22

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa 48

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu

1 5 10 15

acc agc ggt 57

Thr Ser Gly

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 23

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu

1 5 10 15

Thr Ser Gly

<210> 24

<211> 181

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(181)

<223> 人Nig-D20

<400> 24

Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser
 1 5 10 15

Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser
 20 25 30

Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val
 35 40 45

Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val
 50 55 60

Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu
 65 70 75 80

Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met

85 90 95

Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu

100 105 110

Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile

115 120 125

Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro

130 135 140

Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro

145 150 155 160

Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu

165 170 175

Pro Val Asp Leu Phe

180

<210> 25

<211> 3492

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3492)

<223> 大鼠NogoA

<400> 25

atg gaa gac ata gac cag tcg tcg ctg gtc tcc tcg tcc acg gac agc 48

Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Thr Asp Ser

1 5 10 15

ccg ccc cgg cct ccg ccc gcc ttc aag tac cag ttc gtg acg gag ccc 96

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

20 25 30

gag gac gag gag gac gag gag gag gag gag gac gag gag gag gac gac 144

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

35 40 45

gag gac cta gag gaa ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc gca gcc ggg 192
 Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly
 50 55 60

ctg tcc gca gct gcg gtg ccg ccc gcc gcc gcc gcc gcg ccg ctg ctg gac 240
 Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp
 65 70 75 80

ttc agc agc gac tcg gtg ccc ccc gcg ccc cgc ggg ccg ctg ccg gcc 288
 Phe Ser Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
 85 90 95

gcg ccc cct gcc gct cct gag agg cag cca tcc tgg gaa cgc agc ccc 336
 Ala Pro Pro Ala Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro
 100 105 110

gcg gcg ccc gcg cca tcc ctg ccg ccc gct gcc gca gtc ctg ccc tcc 384
 Ala Ala Pro Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser
 115 120 125

aag ctc cca gag gac gac gag cct ccg gcg agg ccc ccg cct ccg ccg 432
 Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Pro Pro Pro
 130 135 140

cca gcc ggc gcg agc ccc ctg gcg gag ccc gcc gcg ccc cct tcc acg 480
 Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr
 145 150 155 160

ccg gcc gcg ccc aag cgc agg ggc tcc ggc tca gtg gat gag acc ctt	528
Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu	
165 170 175	
ttt gct ctt cct gct gca tct gag cct gtg ata ccc tcc tct gca gaa	576
Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu	
180 185 190	
aaa att atg gat ttg atg gag cag cca ggt aac act gtt tcg tct ggt	624
Lys Ile Met Asp Leu Met Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly	
195 200 205	
caa gag gat ttc cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gcc tct ctt cct	672
Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro	
210 215 220	
tct cta tct cct ctc tca act gtt tct ttt aaa gaa cat gga tac ctt	720
Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu	
225 230 235 240	
ggt aac tta tca gca gtg tca tcc tca gaa gga aca att gaa gaa act	768
Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr	
245 250 255	
tta aat gaa gct tct aaa gag ttg cca gag agg gca aca aat cca ttt	816
Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe	
260 265 270	

gta aat aga gat tta gca gaa ttt tca gaa tta gaa tat tca gaa atg 864
 Val Asn Arg Asp Leu Ala Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met
 275 280 285

gga tca tct ttt aaa ggc tcc cca aaa gga gag tca gcc ata tta gta 912
 Gly Ser Ser Phe Lys Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala Ile Leu Val
 290 295 300

gaa aac act aag gaa gaa gta att gtg agg agt aaa gac aaa gag gat 960
 Glu Asn Thr Lys Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp Lys Glu Asp
 305 310 315 320

tta gtt tgt agt gca gcc ctt cac agt cca caa gaa tca cct gtg ggt 1008
 Leu Val Cys Ser Ala Ala Leu His Ser Pro Gln Glu Ser Pro Val Gly
 325 330 335

aaa gaa gac aga gtt gtg tct cca gaa aag aca atg gac att ttt aat 1056
 Lys Glu Asp Arg Val Val Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp Ile Phe Asn
 340 345 350

gaa atg cag atg tca gta gta gca cct gtg agg gaa gag tat gca gac 1104
 Glu Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala Asp
 355 360 365

ttt aag cca ttt gaa caa gca tgg gaa gtg aaa gat act tat gag gga 1152
 Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr Tyr Glu Gly
 370 375 380

agt agg gat gtg ctg gct gct aga gct aat gtg gaa agt aaa gtg gac 1200
 Ser Arg Asp Val Leu Ala Ala Arg Ala Asn Val Glu Ser Lys Val Asp
 385 390 395 400

aga aaa tgc ttg gaa gat agc ctg gag caa aaa agt ctt ggg aag gat 1248
 Arg Lys Cys Leu Glu Asp Ser Leu Glu Gln Lys Ser Leu Gly Lys Asp
 405 410 415

agt gaa ggc aga aat gag gat gct tct ttc ccc agt acc cca gaa cct 1296
 Ser Glu Gly Arg Asn Glu Asp Ala Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Pro
 420 425 430

gtg aag gac agc tcc aga gca tat att acc tgt gct tcc ttt acc tca 1344
 Val Lys Asp Ser Ser Arg Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Ser Phe Thr Ser
 435 440 445

gca acc gaa agc acc aca gca aac act ttc cct ttg tta gaa gat cat 1392
 Ala Thr Glu Ser Thr Thr Ala Asn Thr Phe Pro Leu Leu Glu Asp His
 450 455 460

act tca gaa aat aaa aca gat gaa aaa aaa ata gaa gaa agg aag gcc 1440
 Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys Ala
 465 470 475 480

caa att ata aca gag aag act agc ccc aaa acg tca aat cct ttc ctt 1488
 Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu
 485 490 495

gta gca gta cag gat tct gag gca gat tat gtt aca aca gat acc tta 1536

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

500 505 510

tca aag gtg act gag gca gca gtg tca aac atg cct gaa ggt ctg acg 1584

Ser Lys Val Thr Glu Ala Ala Val Ser Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr

515 520 525

cca gat tta gtt cag gaa gca tgt gaa agt gaa ctg aat gaa gcc aca 1632

Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala Thr

530 535 540

ggt aca aag att gct tat gaa aca aaa gtg gac ttg gtc caa aca tca 1680

Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr Ser

545 550 555 560

gaa gct ata caa gaa tca ctt tac ccc aca gca cag ctt tgc cca tca 1728

Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro Ser

565 570 575

ttt gag gaa gct gaa gca act ccg tca cca gtt ttg cct gat att gtt 1776

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

580 585 590

atg gaa gca cca tta aat tct ctc ctt cca agc gct ggt gct tct gta 1824

Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val

595 600 605

gtg cag ccc agt gta tcc cca ctg gaa gca cct cct cca gtt agt tat 1872

Val Gln Pro Ser Val Ser Pro Leu Glu Ala Pro Pro Pro Val Ser Tyr

610 615 620

gac agt ata aag ctt gag cct gaa aac ccc cca cca tat gaa gaa gcc 1920

Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala

625 630 635 640

atg aat gta gca cta aaa gct ttg gga aca aag gaa gga ata aaa gag 1968

Met Asn Val Ala Leu Lys Ala Leu Gly Thr Lys Glu Gly Ile Lys Glu

645 650 655

cct gaa agt ttt aat gca gct gtt cag gaa aca gaa gct cct tat ata 2016

Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Val Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile

660 665 670

tcc att gcg tgt gat tta att aaa gaa aca aag ctc tcc act gag cca 2064

Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu Pro

675 680 685

agt cca gat ttc tct aat tat tca gaa ata gca aaa ttc gag aag tcg 2112

Ser Pro Asp Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys Ser

690 695 700

gtg ccc gaa cac gct gag cta gtg gag gat tcc tca cct gaa tct gaa 2160

Val Pro Glu His Ala Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Glu Ser Glu

705 710 715 720

cca gtt gac tta ttt agt gat gat tcg att cct gaa gtc cca caa aca 2208
 Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln Thr

725 730 735

caa gag gag gct gtg atg ctc atg aag gag agt ctc act gaa gtg tct 2256
 Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val Ser

740 745 750

gag aca gta gcc cag cac aaa gag gag aga ctt agt gcc tca cct cag 2304
 Glu Thr Val Ala Gln His Lys Glu Glu Arg Leu Ser Ala Ser Pro Gln

755 760 765

gag cta gga aag cca tat tta gag tct ttt cag ccc aat tta cat agt 2352
 Glu Leu Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu His Ser

770 775 780

aca aaa gat gct gca tct aat gac att cca aca ttg acc aaa aag gag 2400
 Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Asp Ile Pro Thr Leu Thr Lys Lys Glu

785 790 795 800

aaa att tct ttg caa atg gaa gag ttt aat act gca att tat tca aat 2448
 Lys Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr Ser Asn

805 810 815

gat gac tta ctt tct tct aag gaa gac aaa ata aaa gaa agt gaa aca 2496
 Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Ile Lys Glu Ser Glu Thr

820 825 830

ttt tca gat tca tct ccg att gag ata ata gat gaa ttt ccc acg ttt 2544
 Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Phe
 835 840 845

gtc agt gct aaa gat gat tct cct aaa tta gcc aag gag tac act gat 2592
 Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Leu Ala Lys Glu Tyr Thr Asp
 850 855 860

cta gaa gta tcc gac aaa agt gaa att gct aat atc caa agc ggg gca 2640
 Leu Glu Val Ser Asp Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ile Gln Ser Gly Ala
 865 870 875 880

gat tca ttg cct tgc tta gaa ttg ccc tgt gac ctt tct ttc aag aat 2688
 Asp Ser Leu Pro Cys Leu Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn
 885 890 895

ata tat cct aaa gat gaa gta cat gtt tca gat gaa ttc tcc gaa aat 2736
 Ile Tyr Pro Lys Asp Glu Val His Val Ser Asp Glu Phe Ser Glu Asn
 900 905 910

agg tcc agt gta tct aag gca tcc ata tcg cct tca aat gtc tct gct 2784
 Arg Ser Ser Val Ser Lys Ala Ser Ile Ser Pro Ser Asn Val Ser Ala
 915 920 925

ttg gaa cct cag aca gaa atg ggc agc ata gtt aaa tcc aaa tca ctt 2832
 Leu Glu Pro Gln Thr Glu Met Gly Ser Ile Val Lys Ser Lys Ser Leu
 930 935 940

acg aaa gaa gca gag aaa aaa ctt cct tot gac aca gag aaa gag gac 2880
 Thr Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp

945 950 955 960

aga tcc ctg tca gct gta ttg tca gca gag ctg agt aaa act tca gtt 2928
 Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val

965 970 975

gtt gac ctc ctc tac tgg aga gac att aag aag act gga gtg gtg ttt 2976
 Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe

980 985 990

ggc gcc agc tta ttc ctg ctg ctg tct ctg aca gtg ttc agc att gtc 3024
 Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val

995 1000 1005

agt gta acg gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc tcg gtg act atc 3069
 Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile

1010 1015 1020

agc ttt agg ata tat aag ggc gtg atc cag gct atc cag aaa tca 3114
 Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser

1025 1030 1035

gat gaa ggc cac cca ttc agg gca tat tta gaa tct gaa gtt gct 3159
 Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala

1040 1045 1050

ata tca gag gaa ttg gtt cag aaa tac agt aat tct gct ctt ggt	3204
Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly	
1055 1060 1065	
cat gtg aac agc aca ata aaa gaa ctg agg cgg ctt ttc tta gtt	3249
His Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val	
1070 1075 1080	
gat gat tta gtt gat tcc ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gtg	3294
Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val	
1085 1090 1095	
ttt act tat gtt ggt gcc ttg ttc aat ggt ctg aca cta ctg att	3339
Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile	
1100 1105 1110	
tta gct ctg atc tca ctc ttc agt att cct gtt att tat gaa cgg	3384
Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Ile Pro Val Ile Tyr Glu Arg	
1115 1120 1125	
cat cag gtg cag ata gat cat tat cta gga ctt gca aac aag agt	3429
His Gln Val Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Ser	
1130 1135 1140	
gtt aag gat gcc atg gcc aaa atc caa gca aaa atc cct gga ttg	3474
Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu	
1145 1150 1155	

aag cgc aaa gca gat tga

3492

Lys Arg Lys Ala Asp

1160

<210> 26

<211> 1163

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 26

Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Thr Asp Ser

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp
 65 70 75 80

Phe Ser Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
 85 90 95

Ala Pro Pro Ala Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro
 100 105 110

Ala Ala Pro Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser
 115 120 125

Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Pro Pro Pro
 130 135 140

Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr
 145 150 155 160

Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu
 165 170 175

Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu

180 185 190

Lys Ile Met Asp Leu Met Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly

195 200 205

Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro

210 215 220

Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu

225 230 235 240

Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr

245 250 255

Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe

260 265 270

Val Asn Arg Asp Leu Ala Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met

275 280 285

Gly Ser Ser Phe Lys Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala Ile Leu Val

290 295 300

Glu Asn Thr Lys Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp Lys Glu Asp

305 310 315 320

Leu Val Cys Ser Ala Ala Leu His Ser Pro Gln Glu Ser Pro Val Gly

325 330 335

Lys Glu Asp Arg Val Val Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp Ile Phe Asn

340 345 350

Glu Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala Asp

355 360 365

Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr Tyr Glu Gly

370 375 380

Ser Arg Asp Val Leu Ala Ala Arg Ala Asn Val Glu Ser Lys Val Asp

385 390 395 400

Arg Lys Cys Leu Glu Asp Ser Leu Glu Gln Lys Ser Leu Gly Lys Asp

405 410 415

Ser Glu Gly Arg Asn Glu Asp Ala Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Pro

420 425 430

Val Lys Asp Ser Ser Arg Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Ser Phe Thr Ser

435 440 445

Ala Thr Glu Ser Thr Thr Ala Asn Thr Phe Pro Leu Leu Glu Asp His

450 455 460

Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys Ala

465 470 475 480

Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu

485 490 495

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

500 505 510

Ser Lys Val Thr Glu Ala Ala Val Ser Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr

515 520 525

Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala Thr

530 535 540

Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr Ser

545 550 555 560

Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro Ser

565 570 575

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

580 585 590

Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val

595 600 605

Val Gln Pro Ser Val Ser Pro Leu Glu Ala Pro Pro Pro Val Ser Tyr

610 615 620

Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala

625 630 635 640

Met Asn Val Ala Leu Lys Ala Leu Gly Thr Lys Glu Gly Ile Lys Glu

645 650 655

Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Val Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile

660

665

670

Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu Pro

675

680

685

Ser Pro Asp Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys Ser

690

695

700

Val Pro Glu His Ala Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Glu Ser Glu

705

710

715

720

Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln Thr

725

730

735

Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val Ser

740

745

750

Glu Thr Val Ala Gln His Lys Glu Glu Arg Leu Ser Ala Ser Pro Gln

755

760

765

Glu Leu Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu His Ser

770

775

780

Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Asp Ile Pro Thr Leu Thr Lys Lys Glu

785

790

795

800

Lys Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr Ser Asn

805

810

815

Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Ile Lys Glu Ser Glu Thr

820

825

830

Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Phe

835

840

845

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

850

855

860

Leu Glu Val Ser Asp Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ile Gln Ser Gly Ala

865

870

875

880

Asp Ser Leu Pro Cys Leu Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn

885

890

895

Ile Tyr Pro Lys Asp Glu Val His Val Ser Asp Glu Phe Ser Glu Asn

900

905

910

Arg Ser Ser Val Ser Lys Ala Ser Ile Ser Pro Ser Asn Val Ser Ala

915

920

925

Leu Glu Pro Gln Thr Glu Met Gly Ser Ile Val Lys Ser Lys Ser Leu

930

935

940

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

945

950

955

960

Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val

965

970

975

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

980

985

990

Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val

995

1000

1005

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

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

His Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

His Gln Val Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Ser

1130 1135 1140

Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu

1145 1150 1155

Lys Arg Lys Ala Asp

1160

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(25)

<223> 大鼠PEP4

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu

 20 25

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含PRO/SER的肽

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(17)

<223> 合成肽

<400> 28

Pro Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Pro Pro Pro

1 5 10 15

Ser

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CA-NA-2F

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223> CA-NA-2F 引物

<400> 29

aagcaccatt gaattctgca gttcc

25

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CA-NA-3R

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 30

aactgcagta ctgagctcct ccatctgc

28

<210> 31

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' 正向

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223> 正向引物

<400> 31

gtcgcggatc catggagacc ctttttgctc ttc

33

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'反向

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223> 反向引物

<400> 32

gttctcgagt tatgaagttt tactcag

27

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'正向-1

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(29)

<223> 引物

<400> 33

gtgcggatcc atggatttga aggagcagc

29

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' 反向-1

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223> 引物

<400> 34

gtttctcgag tgaagtttta ttcagctc

28

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' 引物

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> 引物

<400> 35

tccacccccg ccgcgccaa

20

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' 引物 2

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (22)

<223> 引物

<400> 36

aatgatgggc aaagctgtgc tg

22

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3' 引物

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223> 引物

<400> 37

ggtacaaaga ttgcttatga aaca

24

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3' 引物 2

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223> 引物

<400> 38

agcagggcca aggcaatgta gg

22

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'-VL 前导序列

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223> 引物

<400> 39

aatatgagtc ctgcccagtt cctgtttc

28

<210> 40

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3'-Ck

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223> 引物

<400> 40

ttaggaattc ctaacactct ccctgttga ag

32

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'-VH 前导序列

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(31)

<223> 引物

<400> 41

aatatggatt ttgggctgat tttttttatt g

31

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3'-CH 铰链

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223> 引物

<400> 42

aattgggcaa cgttgcaggt gacg

24

<210> 43

<211> 663

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(663)

<223> 3A6的重链的DNA可变部分

<400> 43

```

atggattttg ggctgatttt ttttattggt ggtcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg    60
aagcttctcg agtctggagg tggcctgggt cagcctggag gatccctgaa actctcctgt    120
gtagtctcag gattcgattt tagaagaaat tggatgagtt gggtcggca ggctcctggg    180
aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtaagataaa ctatacgcca    240
tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaatgcc aagaatcgct gtacctgcaa    300
gtgagcacag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgtgagacc ggtctggatg    360
tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc caaaacgaca    420
ccccatctg tctatccact ggcccctgga tctgctgccc aaactaactc catggtgacc    480
ctgggatgcc tggccaaggg ctatttccct gagccagtga cagtgacctg gaactctgga    540
tcctgtcca gcgggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg    600

```

agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt 660

gcc 663

<210> 44

<211> 717

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(717)

<223> 3A6的轻链的可变部分

<400> 44

atgagtcctg cccagttcct gtttctgtta gtgctctgga ttcgggaaac cagcgggtgat 60

gttctgttga cccagactcc tctcactttg tcgataacca ttggacaacc agcctccatc 120

tcttgcaagt caagtcagag cctcttgcac agtgatggaa agacatattt gaattgggtg	180
ttacagaggc caggccagtc tccaaagcgc ctaatctatc tgggtgtctaa actggactct	240
ggagtccctg acaggttcac tggcagtgga tcagggacgg atttcacact gaaaatcagc	300
agagtggagg ctgaggattt gggactttat tattgctggc aaggtacaca ttttcctcag	360
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	420
atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg	480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa	540
aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc	600
agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc	660
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggggaga gtggttag	717