

(21)申請案號：098115945

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 13 日

(51)Int. Cl. :

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/13 美國 61/052,949

2008/09/11	美國	12/208,883
------------	----	------------

2008/12/09 美國 12/316,130

(71)申請人：建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：艾特華 傑斯凡德 ATWAL, JASVINDER (CA)；泰席爾 拉維尼 馬克 TESSIER-LAVIGNE, MARC (US)；吳彥 WU, YAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：19 共 115 頁

(54)名稱

抗 P i r B 抗體

ANTI-PIRB ANTIBODIES

(57)摘要

本發明概言之係關於神經發育及神經病症。本發明具體而言係關於髓磷脂相關抑制系統之新穎調節劑之鑒定及所鑒定之調節劑的各種用途。

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.9	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.12	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R

Kabat 編號	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
----------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Kabat - CDR H1

Chothia - CDR H1

接觸-CDR H1

hum III	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q
YW259.2	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.9	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	N	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.12	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q

圖 17A

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58
											Kabat - CDR H2									
											Chothia - CDR H2									
											接觸-CDR H2									
hum III	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	G	D	G	G	S	T	Y
YW259.2	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	Y	P	S	G	G	N	T	N
YW259.9	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	N	P	T	G	G	Y	T	Y
YW259.12	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	S	P	S	G	G	S	T	Y

Kabat 編號	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
hum III	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
YW259.2	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
YW259.9	Y	A	H	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
YW259.12	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T

圖 17B

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	
											Kabat - CDR H3									
											Chothia - CDR H3									
											接觸-CDR H3									
hum III	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	
YW259.2	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	
YW259.9	A		L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	
YW259.12	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	

Kabat 編號	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	103	104	105	106	107
											Kabat - CDR H3										
											Chothia - CDR H3										
											接觸-CDR H3										
hum III	R	G												F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.2	K	S	A	W	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	F	A	Y	W	G	Q	G	T
YW259.9	R	S	V	W	V	-	-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.12	K	S	V	W	A	-	-	-	-	-	-	-	-	F	A	Y	W	G	Q	G	T

圖 17C

(21)申請案號：098115945

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 13 日

(51)Int. Cl. :

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/13

美國

61/052,949

2008/09/11

美國

12/208,883

2008/12/09

美國

12/316,130

(71)申請人：建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：艾特華 傑斯凡德 ATWAL, JASVINDER (CA)；泰席爾 拉維尼 馬克 TESSIER-LAVIGNE, MARC (US)；吳彥 WU, YAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：19 共 115 頁

(54)名稱

抗 P i r B 抗體

ANTI-PIRB ANTIBODIES

(57)摘要

本發明概言之係關於神經發育及神經病症。本發明具體而言係關於髓磷脂相關抑制系統之新穎調節劑之鑒定及所鑒定之調節劑的各種用途。

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.9	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.12	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R

Kabat 編號 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

Kabat - CDR H1

Chothia - CDR H1

接觸-CDR H1

hum III	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q
YW259.2	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.9	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	N	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.12	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q

圖 17A

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

概言之本發明係關於神經發育及神經病症。本發明具體而言係關於髓磷脂相關抑制系統之新穎調節劑之鑒定及如此鑒定之該等調節劑之各種用途。

【先前技術】

髓磷脂及髓磷脂相關蛋白

已知成年哺乳動物CNS神經元之軸突在受傷後再生之能力極其有限，而周圍神經系統(PNS)中之軸突可快速再生。已知CNS神經元之再生能力有限部分歸因於CNS軸突之內在特性，但亦係由於環境不允許所致。CNS髓磷脂雖然不是神經突生長抑制性信號之唯一來源，且其含有多種可有效阻斷軸突生長之抑制性分子，且因此其構成顯著再生障壁。人們已確定該等髓磷脂相關蛋白(MAP)中之三種：Nogo(亦稱作NogoA)係Reticulon蛋白質家族之成員其具有兩個跨膜結構域；髓磷脂相關糖蛋白(MAG)係Ig超家族之跨膜蛋白；且OMgp係具有糖基化磷脂醯肌醇(GPI)錨之富白胺酸重複(LRR)蛋白。Chen等人，**Nature** 403:434-39 (2000)；GrandPre等人，**Nature** 417:439-444 (2000)；Prinjha等人，**Nature** 403:383-384 (2000)；McKerracher等人，**Neuron** 13:805-11 (1994)；Wang等人，**Nature** 417:941-4 (2002)；Kottis等人，**J. Neurochem** 82:1566-9 (2002)。文獻中已闡述NogoA之一部分Nogo66作為具有66個胺基酸之細胞外多肽存於Nogo之所有三種亞型中。

儘管結構中存在差異，但已顯示所有三種抑制性蛋白(包括 Nogo66)皆可結合相同 GPI 錨定受體(稱之為 Nogo 受體)(NgR；亦稱作 Nogo 受體-1 或 NgR1)，且已有人提出在介導 Nogo、MAG 及 OMgp 之抑制作用時可能需要 NgR。Fournier 等人，*Nature* 409:341-346 (2001)。亦已確定兩種 NgR1 同系物(NgR2 及 NgR3)。於 2005 年 3 月 3 日公開之 US 2005/0048520 A1(Strittmatter 等人)。鑒於 NgR 係 GPI 錨定細胞表面蛋白，其不可能係直接信號轉導體(Zheng 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:1205-1210 (2005))。其他文獻已提出，神經營養因子受體 p75^{NTR} 可用作 NgR 之共受體且可在受體複合物中提供信號轉導部分(Wang 等人，*Nature* 420:74-78 (2002)；Wong 等人，*Nat. Neurosci.* 5:1302-1308 (2002))。

***PirB* 及人類同源體**

I 類主要組織相容性複合物(MHC)最初被鑒定為編碼對免疫系統具有重要意義之分子家族之區段。最新證據表明，I 類 MHC 分子在發育中及成年 CNS 中具有其他功能。Boulanger 及 Shatz，*Nature Rev Neurosci.* 5:521-531 (2004)；US 2003/0170690 (Shatz 及 Syken)，2003 年 9 月 11 日公開。人們已發現在 CNS 神經元中表現多個 I 類 MHC 成員及其結合配偶體。近年來之遺傳及分子研究集中於 CNS I 類 MHC 之生理學功能，且初期結果表明，I 類 MHC 分子可在活性依賴性突觸可塑性中發揮作用，在此過程期間已有突觸連接之強度因應神經元活性而提高或降低，隨後神經

迴路發生長期結構改變。此外，I類MHC編碼區在遺傳上亦與眾多具有神經症狀之病症相關，且據認為I類MHC分子之異常功能有助於破壞正常腦發育及可塑性。

在免疫環境中一種已知I類MHC受體係PirB，其係首先由Kubagawa等人闡述之鼠類多肽，**Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 94:5261-6 (1997)。小鼠PirB具有若干種人類同源體，其係白細胞免疫球蛋白樣受體亞家族B (LILRB)之成員，且亦稱作「免疫球蛋白樣轉錄物」(ILT)。人類同源體表現與鼠類序列之顯著同源性，自最高至最低順序如下：LILRB3/ILT5、LILRB1/ILT2、LILRB5/ILT3、LILRB2/ILT4，且其正如PirB一樣皆為抑制性受體。LILRB3/ILT5 (NP_006855)及LILRB1/ILT2 (NP_006660)首先由Samaridis及Colonna闡述於**Eur. J. Immunol.** 27(3):660-665 (1997)中。LILRB5/ILT3 (NP_006831)已經Borges等人所確定，**J. Immunol.** 159(11):5192-5196 (1997)。LILRB2/ILT4(亦稱作MIR10)係由Colonna等人所確定，**J. Exp. Med.** 186:1809-18 (1997)。PirB及其人類同源體表現很大程度之結構差異性。各種替代性剪接形式之序列可自EMBL/GenBank獲得，包括(例如)以下登錄號之人類ILT4 cDNA：ILT4-c11 AF009634、ILT4-c117 AF11566、ILT4-c126 AF11565。如上所述，PirB/LILRB多肽係I類MHC (MHCI)抑制性受體，且其在調節免疫細胞活化中之作用為業內所熟知(Kubagawa等人，如前所述；Hayami等人，**J. Biol. Chem.** 272:7320 (1997)；Takai等

人，*Immunology* 115:433 (2005)；Takai等人，*Immunol. Rev.* 181:215 (2001)；Nakamura等人*Nat. Immunol.* 5:623 (2004)；Liang等人，*Eur. J. Immunol.* 32:2418 (2002))。

Syken 等人所進行之近期研究 (*Science* 313:1795-800 (2006))報導，在遍佈腦中之神經元亞組中皆表現PirB。在缺少功能性PirB之突變小鼠中，皮質眼優勢柱(OD)可塑性在所有年齡皆得以顯著增強，此表明PirB具有在視皮質中限制活性依賴性可塑性之功能。

【發明內容】

本發明至少部分基於以下發現：使用功能阻斷性抗PirB抗體干擾PirB活性有助於救援由Nogo66及髓磷脂導致之神經突生長抑制，且同時阻斷PirB及NgR活性可導致幾乎完全解除髓磷脂抑制。

在一態樣中，本發明係關於經分離抗PirB/LILRB抗體，其實質上與選自由YW259.2、YW259.9及YW259.12組成之群之抗體結合人類PirB (LILRB)上之相同表位。

在另一態樣中，本發明係關於經分離抗PirB/LILRB抗體，其與選自由YW259.2、YW259.9及YW259.12組成之群之抗體競爭結合人類PirB (LILRB)。

在另一態樣中，本發明係關於經分離抗PirB/LILRB抗體，其包含一、二或三個來自選自由以下組成之群之重鏈的超變區序列：YW259.2重鏈(SEQ ID NO: 4或11)、YW259.9重鏈(SEQ ID NO: 5或12)、及YW259.12重鏈(SEQ ID NO: 6或13)。

在一實施例中，抗體包含YW259.2抗體重鏈(SEQ ID NO: 4或11)之所有超變區序列。

在另一實施例中，抗體包含YW259.9抗體重鏈(SEQ ID NO: 5或12)之所有超變區序列。

在另一實施例中，抗體包含YW259.12抗體重鏈(SEQ ID NO: 6或13)之所有超變區序列。

在另一實施例中，抗體包含輕鏈。

在另一實施例中，抗體包含一、二或三個來自SEQ ID NO: 7多肽序列之輕鏈的超變區序列。

在另一實施例中，抗體包含含有SEQ ID NO: 7或15多肽序列之輕鏈之所有超變區序列。

在一具體實施例中，抗體包含重鏈及輕鏈二者，其中重鏈包含一、二或三個來自選自由以下組成之群之重鏈之超變區序列：YW259.2重鏈(SEQ ID NO: 4)、YW259.9重鏈(SEQ ID NO: 5)及YW259.12重鏈(SEQ ID NO: 6)，及/或輕鏈包含一、二或三個來自SEQ ID NO: 7多肽序列之輕鏈之超變區序列。

在另一實施例中，抗體係選自由以下抗體組成之群：YW259.2、YW259.9、及YW259.12。

在另一態樣中，本發明係關於經分離抗PirB抗體，其中抗體之全長IgG形式以5 nM或更強、或1 nM或更強之結合親和性特異性結合人類PirB。

在一實施例中，抗體促進軸突再生，例如CNS神經元之再生。

在另一實施例中，抗體至少部分地救援由Nogo66及髓磷脂所導致之神經突生長抑制。

在所有態樣中，抗體較佳為單株抗體，其可為(例如)嵌合抗體、人類化抗體、親和性成熟抗體、人類抗體、或雙特異性抗體、抗體片段或免疫接合物。

在另一態樣中，本發明係關於編碼本文所述抗PirB抗體之多核苷酸。

在其他態樣中，本發明係關於包含編碼本文所述抗體之多核苷酸(包括一或多種抗體鏈之編碼序列)之載體及宿主細胞。宿主細胞包括原核、真核及哺乳動物宿主。

在另一態樣中，本發明係關於製備抗PirB抗體之方法，其包含(a)在適宜宿主細胞中表現包含編碼抗體之核酸之載體，及(b)回收該抗體。

在另一態樣中，本發明係關於包含本文所述抗PirB/LILRB抗體及醫藥上可接受賦形劑之組合物。視需要，該組合物包含第二藥物，其中抗PirB/LILRB抗體係第一藥物。例如，第二藥物可為NgR抑制劑，例如抗NgR抗體。

在一不同態樣中，本發明係關於包含本文所述抗-抗PirB/LILRB抗體之套組。

在另一態樣中，本發明係關於促進軸突再生之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述抗PirB/LILRB抗體。較佳地，該個體為人類患者。

在各實施例中，本文所述治療方法可促進神經元之存活

及/或誘導神經元生長。

在另一態樣中，本發明係關於治療神經變性疾病之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述抗 PirB/LILRB 抗體。例如，神經變性疾病之特徵可在於對中樞神經系統造成之物理損傷，且包括(但不限於)與中風相關之腦損傷。

在一特定實施例中，神經變性疾病係選自由以下組成之群：三叉神經痛、舌咽神經痛、貝爾麻痺(Bell's Palsy)、重症肌無力、肌營養不良、肌萎縮側索硬化(ALS)、多發性硬化(MS)、進行性肌萎縮、進行性延髓遺傳性肌萎縮、因物理損傷(例如燒傷、創傷)或諸如糖尿病、腎功能障礙等疾病狀態或因用於治療癌症及 AIDS 之化學治療的毒性效應引發之外周神經損傷、突出性、破裂性、或脫垂性椎間盤症候群、頸椎病、神經叢病症、胸廓出口破壞症候群、周圍神經病(例如由鉛、胺苯碲(dapsone)、蟬引起之彼等)、卟啉症、格林-巴厘症候群(Gullain-Barre syndrome)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、亨庭頓氏症(Huntington's Disease)、及帕金森病(Parkinson's disease)。

本發明另外係關於抗獨特型抗體，其特異性結合本文所述抗 PirB 抗體。

【實施方式】

A. 定義

在本文中術語「配對免疫球蛋白樣受體 B」及「PirB」

可互換使用，其係指天然序列(SEQ ID NO: 1之841個胺基酸之小鼠抑制蛋白(圖1)(NP_035225))及其在大鼠及其他非人哺乳動物中之天然序列同系物，包括所有天然存在之變體(例如替代性剪接及等位基因變體及亞型)，以及其可溶性形式。其他細節參見Kubagawa等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5261 (1997)。

在本文中術語「LILRB」、「ILT」及「MIR」可互換使用，且其係指人類「白細胞免疫球蛋白樣受體亞家族B」之所有成員，包括所有天然存在之變體(例如替代性剪接及等位基因變體及亞型)，以及其可溶性形式。此LILR受體之B型亞家族內之各個成員係藉由縮寫後加數字來命名，例如LILRB3/ILT5、LILRB1/ILT2、LILRB5/ILT3、及ILIRB2/ILT4，其中除非另外說明，否則在提及任一個別成員時，亦包括所有天然存在之變體(例如替代性剪接及等位基因變體及亞型)，以及其可溶性形式。因此，例如，「LILRB2」、「LIR2」及「MIR10」在本文中可互換使用且係指SEQ ID NO:2 (圖1)(NP_005865)之598個胺基酸之多肽，及其天然存在之變體(例如替代性剪接及等位基因變體及亞型)，以及其可溶性形式。其他細節參見Martin等人，*Trends Immunol.* 23, 81 (2002)。

本文所用術語「PirB/LILRB」共同意指相應小鼠及人類蛋白質及在其他非人哺乳動物中之天然序列同系物，包括所有天然存在之變體(例如替代性剪接及等位基因變體及亞型)，以及其可溶性形式。

所用術語「髓磷脂相關蛋白」具有最廣泛含義且包括存於抑制神經元再生之CNS髓磷脂中之所有蛋白質，包括Nogo、MAG及OMgp。

「經分離」在用於描述本文所揭示各種蛋白質時意指已自蛋白質之天然環境之組份中鑒定並分離及/或回收該蛋白質。其天然環境之污染組份係通常會干擾蛋白質之診斷或治療應用之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中，(1)可藉由使用旋杯式序列分析儀將蛋白質純化至足以獲得至少15個殘基之N-末端或內部胺基酸序列之程度，或(2)在非還原性或還原性條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳使用銀染藉由SDS-PAGE將蛋白質純化至同質性，或(3)藉由質譜或肽譜技術將蛋白質純化至同質性。經分離蛋白質包括重組細胞內之原位蛋白，此乃因所述蛋白質之天然環境中之至少一個組份可能不存在。然而，通常經分離蛋白質可藉由至少一個純化步驟來製備。

「經分離」核酸分子係如下核酸分子：其係自至少一種污染核酸分子鑒定並分離，且在所述核酸之天然來源中該核酸通常與該污染核酸分子相結合。經分離核酸分子之形式或所處環境與其在自然界中不同。因此，經分離核酸分子與天然細胞中存在之核酸分子不同。然而，經分離核酸分子包括含於通常表現該核酸之細胞中的核酸分子，其中(例如)該核酸分子位於與天然細胞不同之染色體位置。

本文所用術語「PirB/LILRB拮抗劑」係用於意指能阻

斷、中和、抑制、消除、降低或干擾PirB/LILRB活性之試劑。具體而言，PirB/LILRB拮抗劑干擾髓磷脂相關抑制活性，由此促進神經突生長及/或促進神經元生長、修復及/或再生。在一較佳實施例中，PirB/LILRB拮抗劑藉由與PirB/LILRB結合來抑制PirB/LILRB與Nogo66及/或MAG及/或OMgp之結合。PirB/LILRB拮抗劑包括(例如)針對PirB/LILRB之抗體及其抗原結合片段、能隔絕PirB/LILRB與Nogo 66之間、或PirB/LILRB與MAG之間、或PirB/LILRB與OMgp之間之結合的PirB/LILRB、Nogo 66、MAG或OMgp之截短或可溶性片段、及PirB/LILRB相關抑制途徑之小分子抑制劑。PirB/LILRB拮抗劑亦包括能抑制或降低PirB/LILRB mRNA之表現之短干擾RNA (siRNA)分子。較佳PirB/LILRB拮抗劑係抗PirB/LILRB抗體。

本文所用術語「抗體」具有最廣泛含義且具體而言涵蓋完整抗體、單株抗體、多株抗體、自至少兩種完整抗體形成之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、及抗體片段(只要其表現期望生物活性即可)。

本文所用術語「單株抗體」指自一群實質上同源之抗體獲得的抗體，即構成該群之單個抗體除可以少量存在之可能的天然存在突變外完全相同。單株抗體具有高特異性，其針對單一抗原性位點。而且，與包括針對不同決定子(表位)之不同抗體之多株抗體製劑相反，每一單株抗體皆針對抗原上之單一決定子。除特異性外，單株抗體之優勢在於其在合成時可不受其他抗體污染。修飾詞「單株」表

示抗體之特徵如同自實質上同源之抗體群獲得一般，且不應理解為需要藉助任一特殊方法來產生該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由首先由Kohler等人(*Nature*，256:495(1975))闡述之雜交瘤方法製得或可藉由重組DNA方法製得(例如，參見美國專利第4,816,567號)。舉例而言，「單株抗體」亦可使用Clackson等人(*Nature*，352:624-628 (1991))及Marks等人(*J. Mol. Biol.*，222:581-597 (1991))闡述之技術自噬菌體抗體庫來分離。

抗體尤其包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體的對應序列相同或同源，而鏈中其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體(以及該等抗體之片段，只要其表現期望生物活性即可)的對應序列相同或同源(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，81:6851-6855 (1984))。本文中之目標嵌合抗體包括靈長類化抗體，其包含源自非人靈長類(例如舊大陸猴(Old World Monkey)、猿等)之可變結構域抗原結合序列及人類恆定區序列。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳包含其抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙特異性抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體。

「完整」抗體係包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定結構域(C_L)及重鏈恆定結構域(C_H1、C_H2及C_H3)之抗體。恆定

結構域可為天然序列恆定結構域(例如人類天然序列恆定結構域)或其胺基酸序列變體。較佳地，完整抗體具有一或多種效應子功能。

非人類(例如齧齒動物)抗體之「人類化」形式係含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。人類化抗體大多數係人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者超變區之殘基經來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或非人靈長類)超變區(供體抗體)且具有期望特異性、親和性及能力之殘基取代。在某些情況下，人類免疫球蛋白框架區(FR)殘基經相應非人類殘基取代。此外，人類化抗體可包含接受者抗體或供體抗體中不存在之殘基。實施該等改變以進一步改良抗體性能。一般而言，人類化抗體可包含實質上所有至少一個、且通常兩個可變結構域(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂、Fv)，其中所有或實質上所有超變環皆對應於非人類免疫球蛋白之彼等，且所有或實質上所有FR皆為人類免疫球蛋白序列之彼等。人類化抗體亦可視需要包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。其他細節可參見Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，Nature 332:323-329 (1988)；及 Presta，Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

術語「超變區」在用於本文中時指抗體可變結構域中序列具有超變性及/或可形成結構上經界定之環的區域。超變區包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基

(即輕鏈可變結構域中之殘基24-34、50-56及89-97及重鏈可變結構域中之31-35、50-65及95-102；Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD.(1991))及/或彼等來自「超變環」之殘基(例如輕鏈可變結構域中之殘基26-32、50-52及91-96及重鏈可變結構域中之26-32、53-55及96-101；Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。在該兩種情況下，根據Kabat等人(如前所述)對可變結構域殘基進行編號，如下文所詳述。「框架區」或「FR」殘基係彼等除本文所定義超變區殘基以外之可變結構域殘基。

「親本抗體」或「野生型」抗體係與本文所揭示抗體變體相比所包含胺基酸序列缺少一或多個胺基酸序列變化之抗體。因此，親本抗體一般具有至少一個超變區，其胺基酸序列與本文所揭示抗體變體之對應超變區之胺基酸序列有所不同。親本多肽可包含天然序列(及天然存在之)抗體(包括天然存在之等位基因變體)、或天然存在之序列中存在既有胺基酸序列改變(例如插入、缺失及/或其他變化)之抗體。在整個揭示內容中，「野生型」、「WT」、「wt」及「親本」或「親本的」抗體可互換使用。

本文所用「抗體變體」或「變體抗體」係指所具有胺基酸序列與親本抗體之胺基酸序列不同之抗體。較佳地，抗體變體包含具有自然界中不存在之胺基酸序列之重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域。該等變體與親本抗體之序列一

致性或相似性必然低於100%。在一較佳實施例中，抗體變體之胺基酸序列與親本抗體重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列之胺基酸序列一致性或相似性為約75%至小於100%，更佳為約80%至小於100%，更佳為約85%至小於100%，更佳為約90%至小於100%，且最佳為約95%至小於100%。抗體變體一般係包含一或多個位於其一或多個超變區中或與之相鄰之胺基酸變化者。

「胺基酸變化」係指預定胺基酸序列之胺基酸序列中之變化。實例性變化包括插入、取代及缺失。「胺基酸取代」係指用另一不同胺基酸殘基來替代預定胺基酸序列中之現有胺基酸殘基。

「替代」胺基酸殘基係指在胺基酸序列中替代或取代另一胺基酸殘基之胺基酸殘基。替代殘基可為天然存在或非天然存在之胺基酸殘基。

「胺基酸插入」係指將一或多個胺基酸殘基引入預定胺基酸序列中。胺基酸插入可包含「肽插入」，在此情況下將包含兩個或更多個由肽鍵連接之胺基酸殘基之肽引入預定胺基酸序列中。倘若胺基酸插入涉及肽插入，則可藉由隨機誘變來生成所插入肽從而使得其具有自然界中不存在之胺基酸序列。「與超變區相鄰」之胺基酸變化係指在超變區之N-末端及/或C-末端引入或取代一或多個胺基酸殘基，從而使得所插入或替代之胺基酸殘基中之至少一個與所述超變區N-末端或C-末端胺基酸殘基形成肽鍵。

「天然存在之胺基酸殘基」係由遺傳密碼編碼者，其一

般選自由以下組成之群：丙胺酸(Ala)、精胺酸(Arg)、天冬醯胺(Asn)、天冬胺酸(Asp)、半胱胺酸(Cys)、麩胺醯胺(Gln)、麩胺酸(Glu)、甘胺酸(Gly)、組胺酸(His)、異白胺酸(Ile)、白胺酸(Leu)、離胺酸(Lys)、甲硫胺酸(Met)、苯丙胺酸(Phe)、脯胺酸(Pro)、絲胺酸(Ser)、蘇胺酸(Thr)、色胺酸(Trp)、酪胺酸(Tyr)、及纈胺酸(Val)。

在本文中「非天然存在之胺基酸殘基」係除上文所列之彼等天然存在胺基酸殘基以外之胺基酸殘基，其在多肽鏈中能共價鍵結相鄰胺基酸殘基。非天然存在之胺基酸殘基之實例包括正白胺酸、烏胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸及其他胺基酸殘基類似物，例如 Ellman 等人在 Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)中所述之彼等。該等非天然存在之胺基酸殘基可使用 Noren 等人，Science 244:182 (1989)及 Ellman 等人(如前所述)中之程序來生成。簡言之，該等程序涉及以化學方式活化具有非天然存在之胺基酸殘基之抑制型 tRNA，之後在體外對 RNA 實施轉錄及轉譯。

在整個本揭示內容中，參照 Kabat, E. A. 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)及(1991))之編號系統。在該等綱要中，Kabat 列舉了各亞類抗體之多種胺基酸序列，且列舉了在該亞類中各殘基位置處最常見之胺基酸。Kabat 使用為所列序列中之每一胺基酸分配殘基編號之方法，且此分配殘基編號之方法已成為業內標準。在此說明中遵循 Kabat 編號方案。出於本發明目的，為將殘

基編號分配至Kabat綱要中未包括之候選抗體胺基酸序列，可遵循以下步驟。一般而言，對候選序列與Kabat中之任一免疫球蛋白序列或任一共有序列進行比對。比對可以人工方式實施，或藉由使用普遍接受之電腦程式之電腦來實施；此一程式之實例係Align 2程式。比對可藉由使用大多數Fab序列共有之某些胺基酸殘基來輔助。舉例而言，輕鏈及重鏈通常各自具有兩個具有相同殘基編號之半胱胺酸；在 V_L 結構域中該兩個半胱胺酸通常具有殘基編號23及88，且在 V_H 結構域中該兩個半胱胺酸殘基通常編號為22及92。框架殘基一般(但並非總是)具有大致相同之殘基編號，然而CDR之大小可變。舉例而言，倘若來自候選序列之CDR長於與其比對之Kabat序列之CDR，則通常向殘基編號添加後綴以指示額外殘基之插入(例如，參見圖1B中之殘基100abc)。對於(例如)與Kabat序列比對殘基34及36但在該等殘基之間不存在可與殘基35比對之殘基之候選序列而言，不將編號35分配至任一殘基即可。

本文所用具有「高親和性」之抗體係 K_D (或解離常數)為奈莫耳級(nM)或更佳之抗體。「奈莫耳級或更佳」之 K_D 可表示為 X nM，其中 X 係小於約10之數字。

「親和性成熟」抗體係在其一或多個CDR中存在一或多處變化之抗體，該等變化會使抗體與抗原之親和性相對於不具有該等變化之親本抗體有所改良。較佳親和性成熟抗體可對靶抗原具有奈莫耳級或甚至皮莫耳級親和性。親和性成熟抗體係藉由業內已知程序來製備。Marks等人，

Bio/Technology 10:779-783(1992)闡述藉由 V_H 及 V_L 結構域改組來達成親和性成熟。以下文獻闡述 CDR 及 / 或框架殘基之隨機誘變：Barbas 等人，*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994)；Schier 等人，*Gene* 169:147-155(1995)；Yelton 等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004(1995)；Jackson 等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995)；及 Hawkins 等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)。

抗體之「功能性抗原結合位點」係能結合靶抗原之位點。抗原結合位點之抗原結合親和性未必與產生該抗原親核位點之親本抗體一般強，但結合抗原之能力可使用已知可用於評估抗體與抗原之結合之各種方法中的任一種來量測。

具有指定抗體之「生物學特徵」之抗體係具有一或多種抗體生物學特徵者，該等特徵可使該抗體與結合相同抗原之其他抗體相區分。

為篩選可與目標抗體所結合之抗原表位結合之抗體，可實施常規交叉阻斷分析，例如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 及 David Lane 編輯(1988)中所述者。

術語「絲狀噬菌體」係指能在表面展示異源多肽之病毒顆粒，且包括(但不限於) f1、fd、Pf1 及 M13。絲狀噬菌體可含有諸如四環素等可選標記(例如「fd-tet」)。各種絲狀噬菌體展示系統為熟習此項技術者所熟知(例如，參見

Zacher 等人，**Gene** 9: 127-140 (1980)；Smith 等人，**Science** 228: 1315-1317 (1985)；及 Parmley 及 Smith，**Gene** 73: 305-318 (1988))。

所用術語「淘選」係指在對載有諸如抗體等對靶具有高親和性及特異性之化合物之噬菌體進行鑒定及分離時，實施多輪篩選過程。

術語「短干擾RNA (siRNA)」係指干擾基因表現之小雙鏈RNA。siRNA係RNA干擾之中間體，RNA干擾是雙鏈RNA使同源基因沉默的過程。siRNA通常包括兩個長約15-25個核苷酸且形成二倍體之單鏈RNA，其可包括單鏈突出端。藉由酶複合物(例如聚合酶)處理雙鏈RNA可使雙鏈RNA裂解而產生siRNA。使用siRNA之反義鏈藉由RNA干擾(RNAi)沉默複合物來引導mRNA裂解，由此促進mRNA降解。為(例如)在哺乳動物細胞中使用siRNA使特定基因沉默，對鹼基配對區加以選擇以避免與無關mRNA互補之機會。業內已鑒定出RNAi沉默複合物，例如Fire等人，**Nature** 391:806-811 (1998)及McManus等人，**Nat. Rev. Genet.** 3(10):737-47 (2002)。

本文所用術語「干擾RNA (RNAi)」係指可導致特定mRNA催化降解之雙鏈RNA，且由此其可用於抑制/降低特定基因之表現。

本文所用術語「多態」係指基因或其一部分(例如等位基因變體)之多於一種形式。有至少兩種不同形式之基因之部分稱作基因之「多態區」。基因多態區之特定遺傳序

列為「等位基因」。多態區可為單一核苷酸，在不同等位基因中不同，或可為幾個核苷酸長。

概言之，本文所用術語「病症」係指可受益於使用 PirB /LILRB2拮抗劑(例如抗 PirB抗體)治療之任一病況，包括預期可受益於軸突再生治療及/或神經系統中突觸可塑性改良之任一病況。本文中欲治療病症之非限制性實例包括(但不限於)可受益於促進神經突生長、促進神經元生長、修復或再生之疾病及病況，包括神經病症，例如物理損傷神經及神經變性疾病。該等病症特別包括中樞神經系統之物理損傷(例如脊髓損傷及頭部創傷)；與中風相關之腦損傷；及與神經變性相關之神經病症，例如三叉神經痛、舌咽神經痛、貝爾麻痺、重症肌無力、肌營養不良、肌萎縮側索硬化(ALS)、進行性肌萎縮、進行性延髓遺傳性肌萎縮、多發性硬化(MS)，突出性、破裂性、或脫垂性椎間盤症候群，頸椎病、神經叢病症、胸廓出口破壞症候群、因物理損傷或諸如糖尿病等疾病狀態引發之外周神經損傷、周圍神經病(例如由鉛、胺苯碲、蟬引起者)、卟啉症、格林-巴厘症候群、阿茲海默氏症、亨庭頓氏症、或帕金森病。

本文所用術語「治療」係指治療性治療、預防性治療、及預防治療。連續性治療或投藥係指至少每天一次治療且在治療中無一日或多日之間斷。間歇性治療或投藥、或以間歇性方式治療或投藥係指治療不連續，而是週期性。

本文所用術語「阻止神經變性」包括(1)在新近診斷為

患有神經變性疾病或具有發生新神經變性疾病危險之患者中抑制或阻止神經變性之能力，及(2)在已患有神經變性疾病或具有神經變性疾病症狀之患者中抑制或阻止進一步神經變性之能力。

本文所用術語「哺乳動物」係指任何歸類為哺乳動物之哺乳動物，包括人類、高等非人靈長類、齧齒動物、家畜或農畜，例如牛、馬、犬及貓。在本發明一較佳實施例中，哺乳動物為人類。

與一或多種其他治療藥劑「組合」投與包括同時(一起)投與及以任一順序連續投與。

「有效量」係足以達成有益或期望治療性(包括預防性)結果之量。有效量可以一或多次投與來施用。

本文所用措辭「細胞」、「細胞系」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等表述皆包括其子代。因此，詞語「轉化體」及「轉化細胞」包括原代個體細胞及源自其之培養物而不考慮轉移次數。亦應瞭解，所有子代所含DNA可能因特意或無意突變而不精確相同。術語「子代」係指原始轉化細胞或細胞系之後各世代之任一及所有後代。其包括與原始轉化細胞中所篩選者具有相同功能或生物活性之突變子代。倘若意欲使用獨特名稱，則可根據上下文而明瞭。

關於本文所鑒定序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為：在比對各序列及(若需要)引入缺口以達成最大序列一致性百分比後，候選序列中與參照序列中之胺基

酸殘基一致之胺基酸殘基之百分比，且不將任何保守性取代視作序列一致性之一部分。用於確定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可以業內已知可確定量測比對之適宜參數的各種方式來達成，包括指定在所比較全長序列上達成最大比對所需算法。出於本文之目的，可使用序列比較電腦程式ALIGN-2來獲得胺基酸一致性百分比數值，該程式由Genentech公司設計且其原始碼已與用戶文檔一起歸檔於美國版權局(US Copyright Office)(Washington, DC, 20559)中，註冊號為美國版權註冊第TXU510087號。ALIGN-2程式係經由Genentech公司(South San Francisco, CA)以公開方式獲得。所有序列比較參數皆係藉由ALIGN-2程式來設定且不可變。

熟習此項技術者可容易地確定雜交反應之「嚴格性」，且一般係基於探針長度、洗滌溫度、及鹽濃度之經驗計算。一般而言，較長探針需要較高溫度來達成適當退火，而較短探針需要較低溫度。當互補鏈所處環境之溫度低於其解鏈溫度時，雜交一般取決於變性DNA再退火之能力。探針與可雜交序列之間期望一致性程度愈高，可使用之相對溫度愈高。因此可斷定，較高相對溫度傾向於使反應條件更嚴格，而較低溫度所需反應條件嚴格性較低。關於雜交反應嚴格性之其他細節及闡釋參見 Ausubel 等人，**Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

本文所定義之「高嚴格性條件」可藉由以下方式來確

定：(1)洗滌中採用低離子強度及高溫；在50℃下採用0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉；(2)在雜交期間採用變性劑；在42℃下採用50% (v/v)甲醯胺及0.1%牛血清白蛋白/0.1%蔗糖聚糖(Ficoll)/0.1%聚乙炔基吡咯啉酮/含有750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉之50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)；或(3)在42℃下採用50%甲醯胺、5 x SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5×Denhardt's溶液、經超音波處理之鮭魚精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、及10%硫酸葡聚糖，且在42℃下於0.2×SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)中洗滌且在55℃下於50%甲醯胺中洗滌，之後在55℃下於含有EDTA之0.1×SSC中實施高嚴格性洗滌。

「中等嚴格性條件」可根據Sambrook等人，**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989所述來確定，且包括在37℃下於包含以下之溶液中培養過夜：20%甲醯胺、5×SSC (150 mM NaCl、15 mM枸橼酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5×Denhardt's溶液、10%硫酸葡聚糖、及20 mg/ml變性剪切鮭魚精子DNA，之後在1×SSC中於約37-50℃下洗滌濾器。熟習此項技術者可瞭解如何根據需要來調節溫度、離子強度等以調適諸如探針長度及諸如此類等因素。

術語「控制序列」係指在特定宿主有機體內表現可操作連接之編碼序列所需的DNA序列。舉例而言，適用於原核生物之控制序列包括啟動子、(視需要)操縱子序列、及核

糖體結合位點。已知真核細胞可利用啟動子、聚腺苷酸化信號及增強子。

當使核酸與另一核酸序列具有功能性關係時，該核酸係「可操作連接的」。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則該前序列或分泌前導序列之DNA可操作連接至該多肽之DNA上；啟動子或增強子若可影響編碼序列之轉錄，則該啟動子或增強子可操作連接至該編碼序列上；或若核糖體結合位點之定位有助於轉譯，則該核糖體結合位點可操作連接至該編碼序列上。一般而言，「可操作連接」意指所連接DNA序列係鄰接序列且在分泌前導序列情況下係處於閱讀相之鄰接序列。然而，增強子無需鄰接。藉由在便利的限制位點處接合可完成連接。若不存在該等位點，則可根據習知慣例使用合成性寡核苷酸銜接子或連接體。

在本文中將「小分子」定義為分子量低於約1000道爾頓、較佳低於約500道爾頓。

B. 抗 PirB/LILRB 抗體之產生

本發明抗 PirB 抗體可藉由業內已知方法來產生，包括重組 DNA 技術。

(i) 抗原製備

可使用視需要與其他分子接合之溶解性抗原或其片段來作為生成抗體之免疫原。對於諸如受體等跨膜分子而言，可使用其片段(例如受體之細胞外結構域)來作為免疫原。或者，可使用表現跨膜分子之細胞作為免疫原。該等細胞

可源自天然來源(例如癌細胞系)或可為已藉由重組技術轉化而可表現跨膜分子之細胞。熟習此項技術者可瞭解其他抗原及其可用於製備抗體之形式。

(ii) 多株抗體

較佳藉由多次皮下(sc)或腹腔內(ip)注射相關抗原及佐劑而在動物中產生多株抗體。有用的是，在欲免疫物種體內使用雙功能試劑或衍生劑(例如，馬來醯亞胺基苯甲醯基磺基琥珀醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基接合)、N-羥基琥珀醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中R與 R_1 係不同烷基)使相關抗原與免疫原性蛋白質(例如，鎗孔血藍蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑)接合。

藉由以下方式針對抗原、免疫原性接合物或衍生物對動物實施免疫：將(例如)100 μg 或5 μg 蛋白質或接合物(分別用於兔子或小鼠)及3體積弗氏(Freund's)完全佐劑合併，且在多個位點皮下注射該溶液。一個月後，藉由多位點皮下注射用佔初始量1/5至1/10之存於弗氏完全佐劑中之肽或接合物對動物實施加強免疫。7至14天後，抽取動物之血液並對血清進行抗體滴度分析。對動物實施加強免疫直至滴度達到穩定狀態。較佳地，用接合至不同蛋白質及/或經由不同交聯劑接合之相同抗原之接合物對動物實施加強免疫。接合物亦可在重組細胞培養物中作為蛋白質融合物來製備。同樣，諸如明礬等聚集劑適用於增強免疫反應。

(iii) 單株抗體

單株抗體可使用首先由Kohler等人在Nature, 256:495 (1975)中闡述之雜交瘤方法來製備，或可藉由重組DNA方法(美國專利第4,816,567號)來製備。在雜交瘤方法中，根據上文所述對小鼠或其他適宜宿主動物(例如倉鼠或短尾猴)實施免疫以誘發可產生或能產生與免疫所用蛋白質特異性結合之抗體的淋巴細胞。或者，可在體外對淋巴細胞進行免疫。然後利用適宜融合劑(例如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合，從而形成雜交瘤細胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59至103頁(Academic Press, 1986))。

將由此製備之雜交瘤細胞接種於適宜培養基中並使之於其中生長，該培養基較佳含有一或多種可抑制未融合親代骨髓瘤細胞生長或存活之物質。舉例而言，若親代骨髓瘤細胞缺乏次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則雜交瘤之培養基通常含有次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質可阻止HGPRT缺陷型細胞生長。

較佳骨髓瘤細胞係彼等可有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定大量產生抗體、且對諸如HAT培養基等培養基敏感之細胞。該等細胞中，較佳骨髓瘤細胞系係鼠類骨髓瘤系，例如源自可自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA獲得之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤之彼等，及可自American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA獲得之SP-2或X63-Ag8-653細胞。亦已

闡述人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞系可用於產生人類單株抗體(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63頁(Marcel Dekker公司, New York, 1987))。

在生長有雜交瘤細胞之培養基中分析針對抗原之單株抗體之產生。較佳地, 雜交瘤細胞產生之單株抗體之結合特异性係藉由免疫沉澱或體外結合分析(例如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附分析(ELISA))來測定。

在確定可產生具有期望特异性、親和性及/或活性之抗體的雜交瘤細胞後, 可藉由有限稀釋程序對該等純系實施亞選殖並藉由標準方法使其生長(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59至103頁(Academic Press, 1986))。用於此目的之適宜培養基包括(例如)D-MEM或RPMI-1640培養基。另外, 可使雜交瘤細胞在動物體內作為腹水腫瘤生長。

可藉由習用免疫球蛋白純化程序以適當方式將亞純系分泌之單株抗體與培養基、腹水、或血清分離, 例如蛋白質A-瓊脂糖凝膠、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳、透析或親和層析法。

編碼單株抗體之DNA可使用習用程序容易地加以分離及測序(例如藉由使用能特异性結合編碼單株抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針來實施)。雜交瘤細胞可用作此類DNA之較佳來源。分離後, 可將DNA立即置於表現載體

中，隨後將其轉染至原本不產生免疫球蛋白之宿主細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、或骨髓瘤細胞)中以在重組宿主細胞中實現單株抗體之合成。下文中更詳細地闡述抗體之重組產生。

在另一實施例中，可自使用 McCafferty 等人在 *Nature* 348:552-554(1990)中闡述之技術生成之抗體噬菌體文庫分離抗體或抗體片段。

Clackson 等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)及 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)中分別闡述使用噬菌體文庫來分離鼠類及人類抗體。隨後之出版物闡述了藉由鏈改組(Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992))來產生高親和性(nM級)人類抗體，以及作為構造極大噬菌體文庫之策略之組合感染及體內重組(Waterhouse等人，*Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))。因此，該等技術係分離單株抗體之傳統單株抗體雜交瘤技術之可行替代方案。

亦可藉由(例如)用人類重鏈及輕鏈恆定結構域之編碼序列來取代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號；Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 81:6851(1984))或藉由使非免疫球蛋白多肽之全部或部分編碼序列共價接合至免疫球蛋白編碼序列上來對DNA進行修飾。

通常，該等非免疫球蛋白多肽可替代抗體之恆定結構域或其可替代抗體中一個抗原結合位點之可變結構域，從而產生嵌合雙價抗體，其包括一個對抗原具有特異性之抗原結合位點及另一個對不同抗原具有特異性之抗原結合位

點。

(iv) 人類化抗體及人類抗體

人類化抗體中引入一或多個來自非人類來源之胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基經常稱為「輸入性」殘基，其通常取自「輸入性」可變結構域。基本上可根據 Winter 及合作者之方法藉由用齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代人類抗體之對應序列來實施人類化 (Jones 等人, *Nature*, **321**:522-525 (1986); Riechmann 等人, *Nature*, **332**:323-327(1988); Verhoeyen 等人, *Science*, **239**:1534-1536 (1988))。因此，該等「人類化」抗體係嵌合抗體(美國專利第 4,816,567 號)，其中實質上小於完整人類可變結構域之部分已經非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為人類抗體，其中某些 CDR 殘基及可能某些 FR 殘基經齧齒動物抗體中類似位點之殘基取代。

欲用於製備人類化抗體之人類可變結構域之選擇(輕鏈及重鏈二者)對於降低抗原性具有極重要意義。根據所謂「最佳擬合」方法，針對已知人類可變結構域序列之完整文庫篩選齧齒動物抗體可變結構域之序列。然後接受與齧齒動物序列最接近之人類序列作為人類化抗體之人類框架區 (FR) (Sims 等人, *J. Immunol.* **151**: 2296 (1993); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.* **196**: 901 (1987))。另一方法使用源自具有特定輕鏈或重鏈亞組之所有人類抗體之共有序列的特定框架。相同框架可用於若干種不同人類化抗體中 (Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4285 (1992);

Presta等人，J. Immunol. 151: 2623 (1993))。

更重要的是，人類化抗體應保留對抗原之高親和性及其他有利生物學特性。為達成此目標，根據較佳方法可藉由使用親代與人類化序列之三維模型分析親代序列及各種概念性人類化產物之方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可自市場購得且為熟習此項技術者所熟知。可使用電腦程式，該等電腦程式可闡明並展示所選候選免疫球蛋白序列之可能的三維構象結構。觀察該等展示內容使得可分析殘基在候選免疫球蛋白序列功能行使中之可能作用，即分析可影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自接受者及輸入性序列中選擇FR殘基並將其組合以達成期望抗體特徵，例如對靶抗原之高親和性。一般而言，CDR殘基直接且最為實質性地參與影響抗原結合。

或者，現在可產生轉基因動物(例如小鼠)，其在免疫後能在不產生內源免疫球蛋白之情況下產生人類抗體之所有組成部分。舉例而言，文獻中已闡述嵌合及種系突變小鼠中抗體重鏈接合區(J_H)基因之純合缺失會導致完全抑制內源抗體產生。將人類種系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等種系突變小鼠中可在抗原攻擊後引起人類抗體之產生。例如，參見Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature 362:255-258 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immunol. 7:33 (1993)；及Duchosal等人，Nature 355:258 (1992)。人類抗

體亦可源自噬菌體展示文庫(Hoogenboom等人, J. Mol. Biol. 227:381(1991); Marks等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan等人, Nature Biotech 14:309 (1996))。下文中進一步闡述自抗體噬菌體展示文庫生成人類抗體。

(v) 抗體片段

人們已經研發出多種用於製備抗體片段之技術。傳統上, 該等片段係經由對完整抗體實施蛋白水解消化而獲得(參見(例如)Morimoto等人, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 及Brennan等人, Science, 229:81 (1985))。然而, 該等片段如今可藉由重組宿主細胞直接製備。例如, 可自上述抗體噬菌體文庫中分離抗體片段。或者, 可自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段, 且以化學方式偶合以形成F(ab')₂片段(Carter等人, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。在下文實例中所述另一實施例中, F(ab')₂係使用白胺酸拉鏈GCN4來促進F(ab')₂分子組裝而得以形成。根據另一方法, 可直接自重組宿主細胞培養物中分離出F(ab')₂片段。熟習此項技術者應瞭解製備抗體片段之其他方法。在其他實施例中, 所選抗體係單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185。

(vi) 多特異性抗體

多特異性抗體具有針對至少兩種不同表位之結合特異性, 其中該等表位通常來自不同抗原。儘管該等分子通常僅結合兩種不同表位(即雙特異性抗體, BsAb), 但在本文

中使用時此表述亦涵蓋具有額外特異性之抗體，例如三特異性抗體。BsAb之實例包括彼等一臂針對PirB/LILRB2且另一臂針對Nogo或MAG或OMgp者。BsAB之其他實例包括彼等一臂針對PirB/LILRB2且另一臂針對NgR者。

製備雙特異性抗體之方法為業內已知。全長雙特異性抗體之傳統產生方法係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩條鏈具有不同特異性(Millstein等人，*Nature*, 305:537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈之隨機配合，故該等雜交瘤(四源雜交瘤)可產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。正確分子至純化通常係藉由親和層析步驟來實施，該方式較為繁瑣且產物產率較低。類似程序揭示於WO 93/08829及Traunecker等人，*EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991)中。根據一不同方法，可使具有期望結合特異性之抗體可變結構域(抗體-抗原結合位點)與免疫球蛋白恆定結構域序列融合。融合體較佳具有免疫球蛋白重鏈恆定結構域，該結構域包含鉸鏈區、CH2區及CH3區中之至少一部分。較佳使至少一個融合體中存在含有輕鏈結合所需位點之第一重鏈恆定區(CH1)。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及(若需要)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入分開的表現載體中，並將其共轉染至適宜宿主有機體中。當用於構造之3種多肽鏈之不等比率可提供最優產率時，此共轉染可為調整實施例中3種多肽片段之相互比例提供較大靈活性。然而，當以等比率表現至少2種多肽鏈可導致高產率時或當

該等比率並無重要意義時，可將2種或所有3種多肽鏈之編碼序列插入一個表現載體中。

在本方法一較佳實施例中，雙特異性抗體係由一臂中具有第一結合特異性之雜合免疫球蛋白重鏈與另一臂中之雜合免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)構成。人們發現此不對稱結構有助於分離期望雙特異性化合物與不期望免疫球蛋白鏈組合，此乃因僅在一半雙特異性分子中存在免疫球蛋白輕鏈使得易於分離。該方法揭示於WO 94/04690中。關於生成雙特異性抗體之其他細節可參見(例如)Suresh 等人，**Methods in Enzymology**, 121:210 (1986)。

根據WO96/27011中所述之另一方法，可將抗體分子對之間之介面設計為可使自重組細胞培養物回收之異源二聚體之百分比最大化。較佳介面包含抗體恆定結構域之至少一部分CH3結構域。在該方法中，用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替代來自第一抗體分子介面之一或多個小胺基酸側鏈。藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)替代較大胺基酸側鏈從而在第二抗體分子介面上形成大小與大側鏈相同或類似之補償性「空穴」。此提供相對於其他不期望終產物(例如同源二聚體)提高異源二聚體產率之機制。

雙特異性抗體包括交聯或「異源接合」抗體。例如，異源接合物中之一抗體可與抗生物素蛋白偶合，而另一抗體可與生物素偶合。文獻中已提出該等抗體可(例如)使免疫

系統細胞靶向不期望細胞(美國專利第4,676,980號),且可用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373)。異源接合抗體可使用任何簡便的交聯方法來製備。適宜交聯劑為業內所熟知,且與多種交聯技術一起揭示於美國專利第4,676,980號中。

自抗體片段生成雙特異性抗體之技術亦已闡述於文獻中。例如,可使用化學鍵結來製備雙特異性抗體。Brennan等人(*Science*, 229: 81 (1985))闡述以蛋白質水解方式裂解完整抗體以生成 $F(ab')_2$ 片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉之存在下使該等片段還原以穩定相鄰二硫醇且阻止形成分子間二硫鍵。然後將所形成 Fab' 片段轉化為硫代硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。然後藉由用巰基乙胺實施還原來將一種 Fab' -TNB衍生物再轉化為 Fab' -硫醇,且將其與等莫耳量之其他 Fab' -TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。可使用所產生之雙特異性抗體作為選擇性固定酶之試劑。

Fab' -SH片段亦可自大腸桿菌直接回收,且可以化學方式偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人, *J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992)闡述完全人類化雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子之產生。每一 Fab' 片段皆可自大腸桿菌單獨分泌且對其實施體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。

文獻中亦已闡述各種自重組細胞培養物直接製備並分離雙特異性抗體片段之技術。例如,可使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-

1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽連接至2個不同抗體之Fab'部分。在鉸鏈區還原抗體同源二聚體以形成單體，且隨後將其再氧化以形成抗體異源二聚體。此方法亦可用於產生抗體同源二聚體。Hollinger等人，*Proc. Nati. Acad. Sci. USA*，90:6444-6448 (1993)闡述之「雙特異性抗體」技術提供製備雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含經由因過短而不能在相同鏈上兩個結構域之間配對之連接體而連接至輕鏈可變結構域(VL)之重鏈可變結構域(VH)。因此，迫使一片段之VH及VL結構域與另一片段之互補VL及VH結構域配對，由此形成兩個抗原結合位點。亦已報導藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製備雙特異性抗體片段之另一策略。參見Gruber等人，*J. Immunol*, 152:5368 (1994)。

本發明涵蓋二價以上之抗體。例如，可製備三特異性抗體。Tuft等人，*J. Immunol*. 147: 60 (1991)。

(vii) 效應子功能設計

可期望在效應子功能方面修飾本發明抗體以增強抗體之效力。舉例而言，可在Fc區引入半胱胺酸殘基，藉此在該區內形成鏈間二硫鍵。由此生成之同源二聚體抗體可具有經改良之內在化能力及/或增強之補體介導細胞殺傷及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人，*J. Exp Med*. 176:1191-1195(1992)及Shopes，B. *J. Immunol*. 148:2918-2922(1992)。抗腫瘤活性增強之同源二聚體抗體亦可使用異源雙功能交聯劑來製備，如Wolff等人，*Cancer*

Research 53:2560-2565 (1993)中所述。或者，可設計具有雙重Fc區之抗體，該抗體藉此可具有增強之補體裂解及ADCC能力。參見Stevenson等人，*Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

(viii) 抗體-補救受體結合表位融合。

舉例而言，在本發明某些實施例中，可期望使用抗體片段而非完整抗體以增強腫瘤滲透。在此情況下，可期望修飾抗體片段以延長其血清半衰期。例如，此可藉由將補救受體結合表位納入抗體片段中來達成(例如藉由抗體片段中適宜區之突變來納入，或藉由將表位納入肽標籤中、之後藉由(例如)DNA或肽合成使該標記融合抗體片段末端或中部來納入)。

補救受體結合表位較佳構成一區段，其中將任何一或多個來自Fc結構域中一個或兩個環之胺基酸殘基轉移至抗體片段之類似位置處。甚至更佳地，轉移來自Fc結構域中一個或兩個環之三個或更多個殘基。更佳地，該表位係取自(例如IgG之)Fc區之CH₂結構域且將其轉移至抗體之CH₁、CH₃、或V_H區中，或不只一個此類區段中。或者，該表位取自Fc區之CH₂結構域且將其轉移至抗體片段之CL區或VL區或該兩個區中。

(ix) 抗體之其他共價改變

抗體之共價改變包括於本發明範圍內。其可藉由化學合成或藉由抗體之酶促或化學裂解(若適用)來製備。藉由使抗體之靶定胺基酸殘基與能與所選側鏈或N-或C-末端殘基

反應之有機衍生劑反應而將其他類型之抗體共價改變引入分子中。共價改變之實例闡述於美國專利第5,534,615號中，該專利係以引用方式明確併入本文中。較佳類型之抗體共價改變包含以以下文獻中所述之方式將抗體連接至各種非蛋白質聚合物(例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯烴)中之一種：美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號或第4,179,337號。

(x) 自合成抗體噬菌體文庫生成抗體

在一較佳實施例中，本發明提供使用獨特噬菌體展示方法生成及選擇新穎抗體之方法。該方法涉及基於單一框架模板來生成合成抗體噬菌體文庫、在可變結構域內設計充分多樣性、展示具有多樣化可變結構域之多肽、選擇對靶抗原具有高親和性之候選抗體、及分離所選抗體。

噬菌體展示方法之細節可參見(例如)2003年12月11日公開之WO03/102157，其全部揭示內容係以引用方式明確併入本文中。

在一態樣中，本發明中所用抗體文庫可藉由在抗體可變結構域之至少一個CDR中使溶劑可及位置及/或高多樣性位置發生突變來生成。可使用本文所提供方法使某些或所有CDR發生突變。在某些實施例中，較佳藉由以下方法來生成各種抗體文庫：使CDRH1、CDRH2及CDRH3中之位置發生突變以形成單一文庫，或使CDRL3及CDRH3中之位置發生突變以形成單一文庫，或使CDRL3及CDRH1、

CDRH2及CDRH3中之位置發生突變以形成單一文庫。

舉例而言，可生成在CDRH1、CDRH2及CDRH3之溶劑可及位置及/或高多樣性位置中具有突變之抗體可變結構域之文庫。可生成在CDRL1、CDRL2及CDRL3中具有突變之另一文庫。該等文庫亦可彼此結合使用以生成具有期望親和性之結合體。舉例而言，在針對與靶抗原之結合對重鏈文庫實施一或多輪選擇後，可將輕鏈文庫重新置入重鏈結合體群中以供另外實施數輪選擇來增強該等結合體之親和性。

較佳地，在重鏈序列可變區之CDRH3區中藉由用變體胺基酸取代原始胺基酸來創建文庫。所得文庫可含有複數個抗體序列，其中序列多樣性主要存於重鏈序列之CDRH3區中。

在一態樣中，在人類化抗體4D5序列、或人類化抗體4D5序列之框架胺基酸序列之背景下創建文庫。較佳地，藉由用以DVK密碼子組編碼之胺基酸至少取代重鏈中之殘基95-100a來創建文庫，其中DVK密碼子組係用於編碼每一該等位置之變體胺基酸組。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之實例包含序列(DVK)₇。在某些實施例中，文庫係藉由用以DVK及NNK密碼子組二者編碼之胺基酸取代殘基95-100a來創建。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之實例包含序列(DVK)₆ (NNK)。在另一實施例中，文庫係藉由用以DVK及NNK密碼子組二者編碼之胺基酸至少取代殘基95-100a來創建。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之實例包

含序列(*DVK*)₅ (*NNK*)。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之另一實例包含序列(*NNK*)₆。熟習此項技術者可根據本文所述標準來確定適宜寡核苷酸序列之其他實例。

在另一實施例中，採用不同CDRH3設計來分離高親和性結合體及分離針對不同表位之結合體。在此文庫中所生成CDRH3之長度範圍為11至13個胺基酸，但亦可生成長度不同於此範圍者。可藉由使用*NNK*、*DVK*及*NVK*密碼子組來擴大H3多樣性以及在N及/或C末端之限制程度更高之多樣性。

亦可在CDRH1及CDRH2中產生多樣性。CDR-H1及H2多樣性之設計遵循靶向所述模擬天然抗體庫之策略，與先前設計相比該策略之改進集中於與天然多樣性更緊密匹配之多樣性。

對於CDRH3中之多樣性而言，可以不同H3長度分別構造多個文庫，然後將其組合以選擇針對靶抗原之結合體。可將多個文庫匯合且使用先前文獻及下文所述之固體支撐選擇及溶液分選方法來對其實施分選。可採用多重分選策略。舉例而言，一變化形式涉及根據與固體結合之靶來分選，之後針對可能存於融合多肽上之標籤(例如抗gD標籤)來分選，且隨後根據與固體結合之靶再次實施分選。或者，可首先根據與固體表面結合之靶對文庫實施分選，然後使用與低濃度靶抗原結合之溶液相來對經洗脫結合體實施分選。採用不同分選方法之組合可僅使高表現序列之選擇最小化，且提供對多種不同高親和性純系之選擇。

可自文庫中分離針對靶抗原之高親和性結合體。限制H1/H2區中之多樣性可將簡並性降低約 10^4 至 10^5 倍，且容許更大H3多樣性可提供親和性更強之結合體。採用CDRH3中具有不同多樣性類型之文庫(例如採用DVK或NVT)使得可分離可與靶抗原之不同表位結合之結合體。

在自上述匯合文庫分離之結合體中，已發現可藉由提供輕鏈中之有限多樣性來進一步改良親和性。在此實施例中，輕鏈多樣性係根據下文來產生：在CDRL1中：胺基酸位置28係藉由RDT來編碼；胺基酸位置29係藉由RKT來編碼；胺基酸位置30係藉由RVW來編碼；胺基酸位置31係藉由ANW來編碼；胺基酸位置32係藉由THT來編碼；視需要，胺基酸位置33係藉由CTG來編碼；在CDRL2中：胺基酸位置50係藉由KBG來編碼；胺基酸位置53係藉由AVC來編碼；且視需要，胺基酸位置55係藉由GMA來編碼；在CDRL3中：胺基酸位置91係藉由TMT或SRT或二者來編碼；胺基酸位置92係藉由DMC來編碼；胺基酸位置93係藉由RVT來編碼；胺基酸位置94係藉由NHT來編碼；且胺基酸位置96係藉由TWT或YKG或二者來編碼。

在另一實施例中，生成在CDRH1、CDRH2及CDRH3區中具有多樣性之文庫。在此實施例中，使用各種長度之H3區及主要使用XYZ及NNK或NNS密碼子組來在CDRH3中產生多樣性。可使用單獨寡核苷酸來形成文庫且將其匯合，或可匯合寡核苷酸以形成文庫亞組。可針對與固體結合之靶來分選此實施例之文庫。可使用ELISA分析針對特異性

及親和性來篩選自多重分選分離之純系。對於特異性而言，可針對期望靶抗原以及其他非靶抗原來篩選純系。然後可在溶液結合競爭ELISA分析或點競爭分析中針對親和性來篩選彼等靶抗原之結合體。可自上述使用XYZ密碼子組製備之文庫分離高親和性結合體。可在細胞培養中以高產率將該等結合體容易地製備為抗體或抗原結合片段。

在某些實施例中，可期望生成在CDRH3區之長度中具有較大多樣性之文庫。舉例而言，可期望生成CDRH3區介於約7至19個胺基酸之文庫。

自該等實施例之文庫分離之高親和性結合體係在細菌及真核細胞培養中以高產率容易地產生。可將載體設計為易於移除諸如gD標籤、病毒外殼蛋白組份序列等序列，及/或易於添加至恆定區序列中以便以高產率達成全長抗體或抗原結合片段之產生。

可將在CDRH3中具有突變之文庫與含有其他CDR變體形式(例如CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1及/或CDRH2)之文庫組合。因此，舉例而言，在一實施例中，將CDRH3文庫與CDRL3文庫組合，該CDRL3文庫係使用預定密碼子組在位置28、29、30、31、及/或32處具有變體胺基酸之人類化4D5抗體序列背景下創建。在另一實施例中，可使具有CDRH3突變之文庫與包含變體CDRH1及/或CDRH2重鏈可變結構域之文庫組合。在一實施例中，CDRH1文庫係用在位置28、30、31、32及33處具有變體胺基酸之人類化抗體4D5序列來創建。CDRH2文庫可係使用預定密碼子組

以在位置50、52、53、54、56及58處具有變體胺基酸之人類化抗體4D5序列來創建。

(xi) 抗體突變體

噬菌體庫生成之新穎抗體可進一步修飾以產生物理、化學及/或生物學特性較親代抗體改良之抗體突變體。倘若所用分析為生物活性分析，則在所選分析中抗體突變體之生物活性較佳比親代抗體在該分析中之生物活性強至少約10倍，較佳強至少約20倍，更佳強至少約50倍，有時強至少約100倍或200倍。舉例而言，抗PirB/LILRB抗體突變體與PirB/LILRB之結合親和性較佳比親代抗體之結合親和性強至少約10倍，較佳強至少約20倍，更佳強至少約50倍，有時強至少約100倍或200倍。

為生成抗體突變體，將一或多個胺基酸變化(例如取代)引入親代抗體之一或多個超變區中。或者，或另外，可將框架區殘基之一或多個變化(例如取代)引入親代抗體中，其中該等變化導致抗體突變體與第二種哺乳動物之抗原的結合親和性增強。欲修飾之框架區殘基之實例包括直接非共價結合抗原者(Amit等人(1986), *Science* 233: 747-753); 干擾/影響CDR之構象者(Chothia等人(1987), *J. Mol. Biol.* 196:901-917); 及/或參與V_L-V_H介面者(EP 239 400B1)。在某些實施例中，一或多個該等框架區殘基之修飾可導致抗體與第二種哺乳動物之抗原之結合親和性增強。舉例而言，在本發明此實施例中可改變約1至約5個框架殘基。有時，即使無超變區殘基改變，此亦足以產生適

用於臨床前試驗之抗體突變體。然而，抗體突變體通常包含其他超變區變化。

所改變之超變區殘基可隨機改變，尤其在親本抗體之起始結合親和性使得該等隨機產生之抗體突變體可輕易篩選時。

生成該等抗體突變體之一可用程序稱為「丙胺酸掃描誘變」(Cunningham及Wells (1989) *Science* 244:1081-1085)。此處，用丙胺酸或聚丙胺酸殘基替代一或多個超變區殘基以影響胺基酸與來自第二哺乳動物物種之抗原之交互作用。然後藉由在取代位點或針對取代位點引入另外或其他突變來改良彼等對取代顯示功能敏感性之超變區殘基。故儘管引入胺基酸序列變異之位點係預先確定，但突變本身之性質無需預先確定。針對本文所述生物活性對以此方式產生之ala-突變體實施篩選。

通常可以保守取代來起始，例如下文所示以「較佳取代」為標題之彼等。若該等取代會引起生物活性(例如結合親和性)之改變，則可引入更多實質性變化(下表中命名為「實例性取代」或如下文參照胺基酸種類所述者)，且對產物加以篩選。

較佳取代：

原始殘基	實例性取代	較佳取代
Ala (A)	val、leu、ile	val
Arg (R)	lys、gln、asn	lys
Asn (N)	gln、his、lys、arg	gln

Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro、ala	ala
His (H)	asn、gln、lys、arg	arg
Ile (I)	leu、val、met、ala、phe、正白胺酸	leu
Leu (L)	正白胺酸、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	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr、phe	tyr
Tyr (Y)	trp、phe、thr、ser	phe
Val (V)	ile、leu、met、phe、ala、正白胺酸	leu

抗體生物學特性之甚至更多實質性改變係藉由選擇維持以下特徵之效應顯著不同之取代來達成：(a)取代區中多肽主鏈之結構，例如呈薄片或螺旋狀構象，(b)靶位點處分子之電荷或疏水性，或(c)側鏈大小。可根據常見側鏈特性將天然存在之殘基分為以下各類：

- (1) 疏水性胺基酸：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水胺基酸：cys、ser、thr、asn、gln；
- (3) 酸性胺基酸：asp、glu；
- (4) 鹼性胺基酸：his、lys、arg；

(5) 影響鏈取向之殘基：gly、pro；及

(6) 芳香族胺基酸：trp、tyr、phe。

非保守性取代使得需要將該等種類中一類之成員交換為另一種類。

在另一實施例中，使用噬菌體展示使所選改變位點親和性成熟(參見上文)。

編碼胺基酸序列突變體之核酸分子係藉由各種業內已知方法來製備。該等方法包括(但不限於)對親代抗體之提前製備突變體或非變體形式實施寡核苷酸介導(或定點)誘變、PCR誘變及盒式誘變。製備突變體之較佳方法係定點誘變(例如，參見Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488)。

在某些實施例中，抗體突變體中可僅有單一超變區殘基經取代。在其他實施例中，可取代親代抗體之兩個或更多個超變區殘基，例如約2至約10個超變區取代。

具有改良生物學特性之抗體突變體之胺基酸序列與親代抗體重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列通常具有至少75%之胺基酸序列一致性或相似性，更佳至少80%，更佳至少85%，更佳至少90%，且最佳至少95%。在本文中關於此序列之一致性或相似性定義為：在比對序列並(若需要)引入缺口以達成最大序列一致性百分比後，候選序列中與親代抗體殘基相同(即相同殘基)或相似(即根據一般側鏈特性來自相同類別之胺基酸，參見上文)之胺基酸殘基之百分比。不應認為抗體序列中可變結構域以外之N-末

端、C-末端或內部延長、缺失或插入可影響序列一致性或相似性。

在抗體突變體產生後，相對於親代抗體測定該分子之生物活性。如上所述，此可涉及測定抗體之結合親和性及/或其他生物活性。在本發明一較佳實施例中，製備一組抗體突變體且針對與抗原或其片段之結合親和性對其實施篩選。視需要對選自此初始篩選之一或多種抗體突變體實施一或多種其他生物活性分析，以證實結合親和性增強之抗體突變體確實可用於(例如)臨床前研究中。

端視抗體之既定用途，經常可對如此選擇之抗體突變體實施進一步改變。該等改變可涉及胺基酸序列之其他變化、與異源多肽之融合及/或共價改變，例如下文所詳述之彼等。關於胺基酸序列變化，實例性改變詳述於上文中。舉例而言，一般亦可用絲胺酸取代任何不參與維持抗體突變體正確構象之半胱胺酸殘基，以改良分子之氧化穩定性且阻止異常交聯。相反，可將半胱胺酸鍵結添加至抗體中以提高其穩定性(在抗體係諸如Fv片段等抗體片段時尤其如此)。另一類型之胺基酸突變體具有變化糖基化模式。此可藉由刪除一或多個存於抗體中之碳水化合物部分，及/或增加一或多個在抗體中不存在之糖基化位點來達成。抗體之糖基化通常係N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基側鏈之連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X係除脯胺酸外之任何胺基酸)係碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈酶促

連接之識別序列。因此，多肽中存在該等三肽序列中之任一種均可產生潛在糖基化位點。O-連接糖基化係指一種糖(N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖)與羥基胺基酸(最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸)之連接。可藉由改變胺基酸序列而使抗體中含有一或多個上述三肽序列(對於N-連接糖基化位點)來將糖基化位點容易地加入抗體中。亦可藉由向原始抗體序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基(或用一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基實施取代)(對於O-連接糖基化位點)來達成該改變。

(xii) 抗體之重組產生

對於抗體之重組產生，可分離編碼該抗體之核酸並將其插入可複製載體中以供進一步選殖(DNA之擴增)或表現。編碼單株抗體之DNA係使用習用程序容易地加以分離及測序(例如藉由使用能特異性結合編碼該抗體重鏈及輕鏈之基因之寡核苷酸探針來實施)。可使用多種載體。載體組份一般包括(但不限於)以下中之一或多種：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列(例如，如美國專利第5,534,615號中所述，其係以引用方式明確併入本文中)。

在本文中，選殖或表現載體中DNA之適宜宿主細胞係上述原核細胞、酵母細胞或高等真核細胞。用於此目的之適宜原核生物包括諸如革蘭氏(Gram)陰性或革蘭氏陽性有機體等真細菌，例如腸桿菌科(Enterobacteriaceae)，例如埃

希氏菌屬 (*Escherichia*)(例如大腸桿菌)、腸桿菌屬 (*Enterobacter*)、歐文氏菌屬 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬 (*Klebsiella*)、變形桿菌屬 (*Proteus*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella*)(例如鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*))、沙雷菌屬 (*Serratia*)(例如黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*))、及志賀氏菌屬 (*Shigella*)、以及桿菌屬 (*Bacilli*)(例如枯草桿菌 (*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*))(例如於1989年4月12日公開之DD 266,710中所揭示之地衣芽孢桿菌 41P))、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)(例如綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*))、及鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)。一較佳大腸桿菌選殖宿主係大腸桿菌 294 (ATCC 31,446)，但諸如大腸桿菌B、大腸桿菌X1776 (ATCC 31,537)及大腸桿菌W3110 (ATCC 27,325)等其他菌株亦適宜。該等實例係例示性而非限制性。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母等真核微生物亦為抗體編碼載體之適宜選殖或表現宿主。釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、或常見麵包酵母 (baker's yeast)係最常用低等真核宿主微生物。然而，多種其他屬、種、及菌株可以一般方式獲得且可用於本文中，例如裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母屬 (*Kluyveromyces*)宿主，例如乳酸克魯維酵母 (*K. lactis*)、脆壁克魯維酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克海姆克魯維酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、瓦爾特克魯維酵母

(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(*K. thermotolerans*)、及馬科斯克魯維酵母(*K. marxianus*)；子囊菌酵母屬(*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；念珠菌屬(*Candida*)；裏氏木黴菌(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；粗糙鏈孢黴菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，例如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，例如鏈孢黴屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)、及曲黴菌屬(*Aspergillus*)宿主(例如構巢麴黴(*A. nidulans*)及黑麴黴(*A. niger*))。

表現糖基化抗體之適宜宿主細胞得自多細胞有機體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出多種杆狀病毒株及變體及來自諸如以下等宿主之對應許可性昆蟲宿主細胞：草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)、及家蠶(*Bombyx mori*)。多種轉染用病毒株可自公開途徑獲得，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變體及家蠶NPV之Bm-5株，且根據本發明該等病毒可用作本文中之病毒，具體而言用於草地黏蟲細胞之轉染。亦可使用棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及煙草之植物細胞培養物作為宿主。

然而，最令人關注者係脊椎動物細胞，且在培養(組織

培養)中增殖脊椎動物細胞已成為常規程序。可用哺乳動物宿主細胞系之實例係藉由SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)轉染之猴腎CV1細胞系；人類胚腎細胞系(經亞選殖以在懸浮培養中生長之293或293細胞, Graham等人, J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠睪丸支持細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝瘤細胞系(Hep G2)。

用上述用於抗體產生之表現或選殖載體轉化宿主細胞，且在習用營養培養基中加以培養，若適宜修改該等培養基以誘導啟動子、選擇轉化體、或擴增編碼期望序列之基因。

可在多種培養基中培養用於產生本發明抗體之宿主細胞。市售培養基適用於培養宿主細胞，例如Ham's F10 (Sigma)、最小必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's

Modified Eagle's Medium)((DMEM), Sigma)。另外，可使用以下文獻中所述任一培養基來作為宿主細胞培養基：Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem. 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號、或第5,122,469號；WO 90/03430、WO 87/00195；或美國專利第Re. 30,985號。可根據需要向任一該等培養基中補加激素及/或其他生長因子(例如胰島素、鐵傳遞蛋白、或表皮生長因子)、鹽類(例如氯化鈉、鈣、鎂、及磷酸鹽)、緩衝液(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷及胸苷)、抗生素(例如GENTAMYCIN™)、微量元素(定義為通常以微莫耳範圍之最終濃度存在之無機化合物)、及葡萄糖或等效能源。亦可以熟習此項技術者已知之適當濃度引入任何其他所需補加物。諸如溫度、pH及諸如此類等培養條件係先前用於所選表現用宿主細胞之條件，且對熟習此項技術者而言係顯而易見的。

在使用重組技術時，抗體可在細胞內、壁膜間隙中產生，或可直接分泌至培養基中。若抗體係在細胞內產生，則作為第一步驟，藉由(例如)離心或超濾去除微粒碎屑(宿主細胞或溶解細胞)。倘若抗體係分泌至培養基中，則通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)濃縮來自該等表現系統之上清液。在任一前述步驟中皆可加入蛋白酶抑制劑(例如PMSF)以抑制蛋白質水解，且可加入抗生素以阻止外來污染物生

長。

自細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析、及親和層析來純化，其中親和層析係較佳純化技術。蛋白質A作為親和配體之適合性取決於物種及存於抗體中之任一免疫球蛋白Fc結構域之同種型。蛋白質A可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人，J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。蛋白質G被推薦用於所有小鼠同種型及人類 $\gamma 3$ (Guss等人，EMBO J. 5: 1567-1575(1986))。親和配體所附著之基質最經常為瓊脂糖，但亦可利用其他基質。力學穩定基質(例如受控具孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)容許較瓊脂糖更快之流速及更短之處理時間。倘若抗體包含CH3結構域，則可使用 Bakerbond ABXTM 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)來實施純化。端視欲回收抗體，亦可採用其他蛋白質純化技術，例如在離子交換管柱上實施分級分離、乙醇沉澱、反相HPLC、於二氧化矽上實施層析、於肝素SEPHAROSETM上實施層析、於陰離子或陽離子交換樹脂(例如聚天冬胺酸管柱)上實施層析、層析聚焦、SDS-PAGE、及硫酸銨沉澱。

C. 抗PirB/LILRB抗體之用途

據信本發明抗PirB/LILRB抗體可用作有助於神經細胞存活或誘導其生長之試劑。因此其可用於治療神經系統變性病(「神經變性疾病」)，包括(例如)對中樞神經系統造成之物理損傷(脊髓及腦)；與中風相關之腦損傷；及與神

經變性有關之神經病症，例如三叉神經痛、舌咽神經痛、貝爾麻痺、重症肌無力、肌營養不良、肌萎縮側索硬化(ALS)、多發性硬化(MS)、進行性肌萎縮、進行性延髓遺傳性肌萎縮、因物理損傷(例如燒傷、創傷)或諸如糖尿病、腎功能障礙等疾病狀態或因用於治療癌症及AIDS之化學治療的毒性效應引發之外周神經損傷、突出性、破裂性、或脫垂性椎間盤症候群、頸椎病、神經叢病症、胸廓出口破壞症候群、周圍神經病(例如由鉛、胺苯碲、蟬引起之彼等)、卟啉症、格林-巴厘症候群、阿茲海默氏症、亨庭頓氏症、或帕金森病。

本文中之抗PirB/LILRB抗體亦可用作用於在體外培養神經細胞之培養基之組份。

最後，在經放射性碘、酶、螢光團、自旋標記及諸如此類標記時，包含本文抗PirB/LILRB抗體之製劑可在競爭性結合分析中用作標準品。

藉由以下方式製備本文抗PirB/LILRB抗體之治療性調配物以供儲存：混合具有期望純度之經鑒定化合物(例如抗體)與可選生理上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences，如前所述)，該等調配物呈凍乾餅或水性溶液形式。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，例如

聚乙炔吡咯啉酮；胺基酸，例如甘胺酸，麩胺醯胺，天冬醯胺，精胺酸或離胺酸；單糖、二糖，及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖醇，例如甘露醇或山梨糖醇；鹽形成反荷離子，例如鈉；及/或非離子型表面活性劑，例如Tween、Pluronic或PEG。

欲用於體內投與之抗PirB/LILRB抗體必須無菌。此可在凍乾及重構之前或之後藉由用無菌過濾膜過濾容易地完成。

可將治療性組合物置於具有無菌入口孔之容器中，例如具有可被皮下注射針頭刺穿之塞子的靜脈注射溶液袋或小瓶。

本發明抗PirB/LILRB抗體可視需要與包括NGF、NT-3及/或BDNF之神經營養因子組合或一起投與，且可與其他變性神經病症之習用治療藥劑一起使用。此外，本發明抗PirB/LILRB抗體較佳可與可阻斷Nogo-66、MAG及/或OMgp與NgR之結合之NgR抑制劑(例如抗體、小分子或肽)一起投與。

投與途徑與已知方法一致，例如藉由靜脈內、腹膜腔內、大腦內、肌內、眼內、動脈內或病灶內途徑實施注射或輸注、局部投與、或藉由持續釋放系統投與，如下所述。

對於大腦內應用而言，可藉由輸注將化合物連續投與至CNS之流體室中，但亦可接受快速濃注。較佳將化合物投

與至腦室中或以其他方式引入CNS或腦脊液中。投與可使用諸如幫浦等連續投與方式藉由留置導管來實施，或可藉由植入持續釋放媒劑(例如大腦內植入)來投與。更具體而言，可經由長期植入插管來注射化合物或在滲透性微幫浦輔助下長期輸注化合物。可使用皮下幫浦，其經由小輸液管將蛋白質遞送至大腦室中。可經由皮膚對極複雜幫浦實施重填，且可在無外科干預之情況下設定其遞送速率。涉及皮下幫浦裝置或經由總體植入式藥物遞送系統實施連續腦室內輸注之適宜投與方案及遞送系統之實例係彼等用於將多巴胺(dopamine)、多巴胺激動劑及膽鹼能激動劑投與阿茲海默氏症患者及帕金森病動物模型者，如 Harbaugh, **J. Neural Transm. Suppl.**, 24:271 (1987)；及 DeYebenes 等人，**Mov. Disord.** 2:143 (1987)中所述。

持續釋放製劑之適宜實例包括呈成形物件(例如膜或微膠囊)形式之半滲透性聚合物基質。持續釋放基質包括聚酯、水凝膠、多乳酸化合物(美國專利第3,773,919號、EP 58,481)、L-麩胺酸與 γ -L-麩胺酸乙酯之共聚物(Sidman 等人，1983, **Biopolymers** 22:547)、聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等人，1981, **J. Biomed. Mater. Res.** 15:167；Langer, 1982, **Chem. Tech.** 12:98)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer 等人，Id.)或聚-D-(-)-3-羥基丁酸(EP 133,988A)。持續釋放組合物亦包括脂質體包埋之化合物，其可藉由本身已為人所知之方法來製備。(Epstein 等人，**Proc. Natl. Acad. Sci.** 82:3688 (1985)；Hwang 等人，**Proc. Natl.**

Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；美國專利第4,485,045號及第4,544,545號；及EP 102,324A)。脂質體通常為脂質含量大於約30 mol.% 膽固醇之小(約200-800埃)單層型，所選比例可經調整以達成最佳治療。

欲在治療中採用之活性化合物之有效量可取決於(例如)治療目標、投與途徑、及患者之病況。因此，治療師應根據需要對劑量實施滴定量測並改變投藥途徑以獲得最佳療效。端視上述因素，典型每日劑量可在約1 µg/kg至100 µg/kg範圍內或更大。通常，臨床醫師可投與活性化合物直至達到可修復、維持及(最佳)重建神經元功能之劑量。該療法之進度可藉由習用分析容易地加以監測。

以下非限制實例進一步詳述本發明。

實例1

表現選殖LILRB2

為鑒定抑制性髓磷脂蛋白之新穎受體，採用表現選殖方法。作為誘餌，生成使鹼性磷酸酶(AP)與以下定性髓磷脂抑制劑(所用人類cDNA)之N-及/或C-末端融合之構造體：Nogo66、NogoA之兩個額外抑制性結構域(NiRδD2及NiGδ20)(Oertle T, **J Neurosci.** 2003, 23(13): 5393-406)、MAG、及OMgp。將該等構造體轉染至293細胞中以產生含有誘餌蛋白之條件培養基(存於DMEM/2% FBS中)。用於篩選之cDNA文庫包括存於由Origene製造之即用型表達載體中之全長人類cDNA純系。對該等cDNA實施編輯、列陣、及匯合。將約100個cDNA之匯合短暫轉染至COS7

細胞中。

具體而言，在第1天，以85,000細胞/孔之密度將COS7細胞平鋪於12孔板中。在第2天，使用脂基轉染劑FuGENE 6 (Roche)轉染1 mg 匯合cDNA/孔。在第4天，實施篩選。簡言之，自細胞去除培養基且用0.5 ml含有AP-融合誘餌蛋白(20-50 nM)之293細胞-條件培養基來替代。在室溫下將細胞培養90分鐘。然後用磷酸緩衝鹽水(PBS)將細胞洗滌3次，用4%多聚甲醛固定7分鐘，用HEPES緩衝鹽水(HBS)洗滌3次，且在65°C下加熱滅活90分鐘以破壞內源AP活性。在AP緩衝液(100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、100 mM Tris, pH 9.5)中將細胞洗滌一次，且在生色基質(Western Blue, Promega)中培養，且在培養一小時後分析反應產物之存在，並在過夜培養後再次實施此分析。藉由膜表面上深藍色沉澱之存在來鑒定陽性細胞。將陽性匯合物進一步細分以藉由隨後數輪篩選來鑒定各陽性純系。

藉由篩選鑒定出以下陽性命中物：

MAG-AP誘餌獲得4個陽性命中物。一個先前被稱為Nogo受體(Fournier等人，Nature 409, 342-346 (2001))。該等命中物中之二者係糖酵解加工酶，且據信不可能具有關聯性。第四個稱為「來自純系643 (LOC57228), mRNA之智人假定蛋白」。cDNA之更細緻分析揭示與前述蛋白SMAG同源之替代性ORF。

AP-Nogo66誘餌獲得2個陽性命中物。一個先前被稱為Nogo受體。另一個係「智人白細胞免疫球蛋白樣受體亞家

族B(具有TM及ITIM結構域)，2號成員(LILRB2)，mRNA」(SEQ ID NO: 2)。此基因亦具有多個替代性名稱，包括MIG10、ILT4及LIR2(Kubagawa等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5261-6 (1997)；Colonna等人，*J. Exp. Med.* 186:1809-18 (1997))。

實例2

PirB功能阻斷性抗體之製備及測試

PirB功能阻斷性抗體

針對PirB之抗體係藉由針對PirB細胞外結構域淘選合成性噬菌體抗體文庫來生成(W. C. Liang等人，*J Mol Biol* 366, 815 (2007))。然後在體外測試抗體純系(10 $\mu\text{g/ml}$)阻斷AP-Nogo66 (50 nM)與表現PirB之COS7細胞結合之能力。各種YW259抗小鼠PirB(抗mPirB)抗體之重鏈及輕鏈序列之核苷酸及胺基酸序列展示於圖6-16及17及18中。圖17及18亦分別展示YW259.2、YW250.9及YW259.12之重鏈及輕鏈內之超變區序列。

神經突生長分析

用髓磷脂(0.75 $\mu\text{g/ml}$)包覆預塗佈有聚-D-離胺酸(Biocoat, BD)之96孔板過夜或用AP-Nogo66或MAG-Fc(150-300 ng/點)包覆兩小時，且隨後用層黏連蛋白(10 $\mu\text{g/ml}$ 存於F-12中)處理2小時(CGN培養)或4小時(DRG培養)。如前所述培養小鼠P7小腦神經元(B. Zheng等人，*Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1205 (2005))且以約 2×10^4 細胞/孔對其實施平鋪。如前所述培養小鼠P10 DRG神經元

(Zheng 等人, 2005, 如前所述)且以約 5×10^3 細胞/孔對其實施平鋪。在 37°C 及 $5\% \text{CO}_2$ 下使培養物生長 22 小時, 且隨後用 4% 多聚甲醛/ 10% 蔗糖將其固定並用抗 β III-微管蛋白 (TuJ1, Covance) 實施染色。對於每個實驗而言, 所有條件皆係在六個重複孔中實施, 其中量測最大神經突長度並測定六個孔之間之平均值。將每個實驗實施至少三次, 獲得類似結果。使用司徒登氏 t 檢驗 (Student's t test) 來測定 p -值。

生長冠萎縮分析

藉由自 3 週齡小鼠切出 DRG 來分離 DRG 外植體且將其切為三等份。然後在八孔板之塗佈有 PDL ($100 \mu\text{g/ml}$) 及塗佈有層黏連蛋白 ($10 \mu\text{g/ml}$) 之單獨孔中培養各 DRG 外植體。在平鋪後 72 小時, 將外植體與 AP-Nogo66 (100 nM) 或髓磷脂 ($3 \mu\text{g/ml}$) 一起培養 30 分鐘以刺激萎縮。用 4% 多聚甲醛/ 10% 蔗糖固定培養物, 隨後藉由羅丹明-鬼筆環肽 (分子探針) 染色來使生長冠顯像並記錄萎縮。藉由在至少 3 個重複孔中取平均值來測定平均生長冠萎縮。

結果

為闡明 PirB 是否為 Nogo66 之功能性受體, 吾人關注幼年 (P7) 小腦顆粒神經元 (CGN), 其在 AP-Nogo66 上生長時神經突生長受到抑制 (K.C. Wang 等人, *Nature* 420, 74 (2002))。已顯示成年 CGN 可表現 PirB (J. Syken 等人, *Science* 313, 1795 (2006)), 且在藉由 RT-PCR、免疫組織化學及原位雜交分析時吾人發現幼年 CGN 亦係如此 (數據未

顯示)。

首先，在體外測試PirB (PirB-His)之可溶性胞外結構域干擾AP-Nogo66抑制之能力。如圖2A中所示，AP-Nogo66將P7 CGN之神經突生長抑制至未處理對照程度之約66%。在此分析中包含PirB-His可逆轉AP-Nogo66抑制，其中神經突生長基本恢復至對照程度。該等結果與所報道使用NgR之胞外結構域阻斷Nogo66之抑制之結果類似(B Zeng等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1205 (2005)；A. E. Fournier等人，*J. Neurosci.* 22, 8876 (2000)；Z. L. He等人，*Neuron* 38, 177 (2003))，且表明PirB可結合Nogo66之功能性抑制結構域，但並未闡述CGN中之內源PirB是否可介導由AP-Nogo66所致之抑制。

因此，生成能干擾PirB-Nogo66交互作用之針對PirB之抗體(抗PirB)。使用針對PirB細胞外結構域之噬菌體展示平臺(W.C. Liang等人，*J. Mol. Biol.* 366, 815 (2007))根據多個純系阻斷AP-Nogo66與PirB結合之能力來對其實施篩選。對AP-Nogo66-PirB結合干擾最強之純系YW259.2(下文中稱作aPB1)針對PirB之Kd為5 nM(參見圖13-16)。

aPB1對CGN之基線軸突生長無效。然而，在經培養CGN中aPB1顯著降低AP-Nogo66或髓磷脂所致之抑制(圖2B)，救援神經突生長，對於AP-Nogo66自41%至59%，對於髓磷脂自47%至62%。在使用MAG作為抑制性基質或使用不同細胞類型(背根神經節(DRG)神經元)時觀察到類似結果(圖5)。該等結果證明，PirB係介導神經突生長長期抑制之

功能性受體。

為證實此結果，藉由培養來自 PirBTM 小鼠之神經元來測試遺傳移除細胞表面 PirB 是否亦可逆轉由 AP-Nogo66 或髓磷脂所致之抑制，在該等神經元中已移除四個編碼跨膜結構域及部分 PirB 細胞內結構域之外顯子 (J. Syken 等人，*Science* 313,1795 (2006))。在對照基質、AP-Nogo66 或髓磷脂上培養來自 PirBTM 小鼠或野生型 (WT) 同胞仔之 CGN。在對照基質 (PDL/層黏連蛋白) 上，PirBTM 神經元之特徵類似於 WT 神經元 (圖 2C)。然而，在 AP-Nogo66 或髓磷脂上 PirBTM 神經元之神經突生長所受抑制顯著低於 WT 神經元。在 AP-Nogo66 上，WT 神經元之生長被抑制至對照程度之 50%，而 PirBTM 神經元僅被抑制至 66%。與之類似，在髓磷脂上，WT 神經元被抑制至對照程度之 52%，而 PirBTM 神經元僅被抑制至 70%。同樣，吾人觀察到類似部分去抑制作用 PirBTM DRG 神經元之在髓磷脂及 AP-Nogo66 二者上 (圖 5)。該等發現表明，PirB 實際上係 AP-Nogo66 及髓磷脂介導之神經突生長抑制的功能性受體。然而，PirB 活性之損失不能完全救援生長。

由於先前已闡述 NgR 可作為髓磷脂抑制劑之受體，故 PirB 與 NgR 可能一起發揮作用來介導對神經突生長之抑制。為闡明此情形，藉由在抗 PirB 存在下培養來自 NgR 缺陷型小鼠之神經元同時阻斷 PirB 及 NgR 二者在 CGN 中之功能。如先前所報導 (B. Cheng 等人，PNAS 2005，如前所述)，NgR^{-/-} CGN 神經突生長被 AP-Nogo66 或髓磷脂抑制

至與WT神經元中相同之程度(50%及49%；圖3)。對NgR+/-神經元實施aPB1抗體處理可部分逆轉由AP-Nogo66或髓磷脂所致之抑制，如上文對WT神經元實施aPB1處理時所觀察到者一般。與之類似，對NgR-/-神經元實施aPB1處理可部分逆轉由AP-Nogo66所致之抑制，但所提供救援程度不超過對NgR+/-神經元或WT神經元實施aPB1處理時所觀察到者。與之相反，對NgR-/-神經元實施aPB1處理可將髓磷脂上之神經突生長幾乎恢復至對照程度。因此，由存於CGN中之APNogo66所致之基質抑制似乎需要PirB而非NgR，但僅係部分需要。此外，PirB及NgR二者可一起促進由髓磷脂所致之基質抑制。

由於認為因應各種髓磷脂抑制劑之生長冠萎縮需要NgR(J.E. Kim等人，*Neuron* 44, 439 (2004)；O.Chivatakarn等人，*J. Neurosci.* 27, 7117 (2007))，故此更為急性之反應中可能亦涉及PirB。此實驗中使用來自3週齡小鼠背根神經節(DRG)且已證實可表現PirB之感覺神經元。已發現在此培養系統中生長冠具有較高萎縮基線程度(約30%)，其可藉由與APNogo66或髓磷脂一起培養來進一步提高(圖4)。此萎縮在NgR-/-神經元中大部分被消除。此外，用aPB1阻斷PirB功能亦足以逆轉由該等抑制劑所致之生長冠萎縮。一起抑制PirB及NgR途徑二者(使用在來自NgR-/-小鼠之神經元上之aPB1處理)亦可完全逆轉生長冠萎縮，但由於在此分析中單獨實施任一處理亦可導致完全救援，因此此結果並不提供任何信息。

在另一實驗中，C1QTNF5抑制小腦顆粒神經元(CGN)之神經突生長，且此抑制被PirB功能阻斷性抗體YW259.2逆轉。結果展示於圖19中。

該等結果一起支持PirB具有作為由髓磷脂提取物、且更具體而言由髓磷脂相關抑制劑Nogo66及MAG所致之神經突抑制所需受體之新穎作用。實際上，PirB似乎係比NgR更重要之基質抑制介質，此乃因單獨移除PirB功能(以遺傳方式或使用抗體)即可使髓磷脂提取物及髓磷脂抑制劑二者上之生長部分去抑制，而單獨遺傳移除NgR不能在任一該等基質上去抑制。然而，NgR似乎在介導由髓磷脂提取物(而非Nogo66)所致之抑制時發揮附屬作用，此乃因遺傳移除NgR可增強在髓磷脂上(而非在Nogo66上)由抗PirB抗體引發之去抑制。吾人之發現可有助於闡釋以下事實：儘管據報導在輸注NgR胞外結構域之齧齒動物中觀察到再生或生長(S. Li等人，*J. Neurosci.* 24, 10511 (2004))，但令人驚訝地NgR敲除小鼠中CST再生未增強(J.E. Kim等人，如前所述；B. Zheng等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1205 (2005))。因此，可能需要移除PirB及NgR二者以在體內達成顯著再生。此外，由於在Nogo66基質上遺傳移除NgR不能進一步增強PirB移除之部分去抑制效應，因此Nogo66可能存在其他結合受體。

儘管PirB似乎係比NgR更重要之基質抑制受體，但PirB或NgR之單獨失活皆足以阻斷因添加髓磷脂抑制劑所致之急性生長冠萎縮。此觀察結果表明，萎縮係要求更嚴格之

過程，其需要 PirB 及 NgR 二者之活性同時或一起發揮作用。在此背景中，令人關注者係最近已顯示 PirB 及 NgR 受體在限制視皮質中突觸連接可塑性方面具有類似作用：在缺少任一受體之小鼠中，在關鍵發育期間閉眼可過度強化經由睜眼之連接 (J. Syken 等人，2006，如前所述；A.W. McGee 等人，*Science* 309, 2222 (2005)，如前所述)。兩種受體在介導生長冠萎縮中產生效應之機制亦可能是其在眼優勢柱可塑性中起共同作用之基礎。

成年軸突在受損後不能再生係在 CNS 發生創傷性損傷後恢復功能之主要障礙。據推測，再生潛力由於突觸可塑性能力隨年齡增長受限而下降，從而限制過度或過多突觸連接之發育。此推測可自以下發現獲得支持：先前在發育及成年期期間限制突觸可塑性中涉及之 PirB (J. Syken 等人，2006，如前所述) 亦係髓磷脂所致軸突抑制之介質；同時發現：最初在軸突抑制中涉及之 NgR 同樣可調節突觸可塑性 (S. Li 等人，*J. Neurosci.* 24, 10511 (2004))。

吾人之發現亦可將潛在 PirB 配體之範圍擴展至 I 類 MHC 分子之範圍以外而包括神經元再生長抑制劑。反之，由於已知髓磷脂抑制劑 Nogo 或 MAG 之遺傳缺失僅導致由髓磷脂所致之抑制的適度降低-表明存在其他抑制劑-吾人之發現提出以下可能性：通常由少突角質細胞少量表現之 MHCI 分子可在受傷後發生上調並促進中樞髓磷脂中與 Nogo 及 MAG 一致之生長抑制。

PirB 信號因應髓磷脂抑制劑抑制軸突生長之機制尚未明

瞭。然而，已顯示 PirB 可拮抗整合素受體之功能 (S. Pereira 等人, *J. Immunol.* 173:5757 (2004))，且可補充 SHP-1 及 SHP-2 磷酸酶二者；該等事件中之一或二者皆可減弱正常神經突生長。使用本文中之抗 PirB 抗體或藉由其他方式阻斷 PirB 活性可為治療性干預提供重要的新目標以刺激軸突再生。

本揭示內容通篇所引用之所有參考文獻皆係全文以引用方式明確併入本文中。

儘管已參照可視為具體實施例之內容闡述了本發明，但應理解本發明並不限於該等實施例。相反，本發明意欲涵蓋隨附申請專利範圍之精神與範疇內所包括之各種修改及等效內容。

【圖式簡單說明】

圖 1A 及 1B 展示小鼠 PirB 序列 (SEQ ID NO: 1) 及人類 LILRB2 序列 (SEQ ID NO: 2)。

圖 2A 及 2B 阻斷 PirB 可逆轉基於 AP-Nogo66 或髓磷脂之對 CGN 生長之抑制。將經解離小鼠 P7 CGN 平鋪於 PDL/層黏連蛋白 (對照)、AP-Nogo66、或髓磷脂上以測試由該等受質所致之抑制。(A) 代表性顯微照片，(B) 自一代表性實驗量測平均神經突長度 ($\pm$ SE) 之圖表。在存在或不存在針對 PirB 之功能阻斷性抗體 (aPB1; 50 μ g/ml) 之情況下培養於 PDL/層黏連蛋白、AP-Nogo66、或髓磷脂上生長之神經元。aPB1 顯著降低由任一受質所致之抑制。(* p <0.01; 比例尺, 50 μ m)

圖 3A-3D 阻斷 PirB 可逆轉基於 AP-Nogo66 或髓磷脂之對 CGN 生長之抑制。將經解離小鼠 P7 CGN 平鋪於 PDL/層黏連蛋白(對照)、AP-Nogo66、或髓磷脂上以測試由該等受質所致之抑制。代表性顯微照片展示於圖 3A 及 3C 中，且自一代表性實驗量測平均神經突長度($\pm$ SE)之圖表展示於圖 3B 及 3D 中。在存在或不存在針對 PirB 之功能阻斷性抗體(aPB1; 50 μ g/ml)之情況下培養於 PDL/層黏連蛋白、AP-Nogo66、或髓磷脂上生長之神經元。aPB1 顯著降低由任一受質所致之抑制。(* p <0.01; 比例尺, 50 μ m)

圖 4A 及 4B 需要 PirB 及 NgR 二者來介導由髓磷脂抑制劑所致之生長冠萎縮。單獨使用介質(對照)、髓磷脂(3 μ g/ml)、或 AP-Nogo66 (100 nM)將出生後 DRG 軸突之生長冠處理 30 分鐘以刺激萎縮，且用羅丹明-鬼筆環肽(Rhodamine-phalloidin)實施染色以使生長冠顯像。(A)代表性顯微照片，(B)自蓄積性實驗量測生長冠萎縮百分比($\pm$ SEM)之圖表。僅藉由抗 PirB 處理達成之 NgR 之遺傳損失或 PirB 之抑制即足以阻止髓磷脂或 AP-Nogo66 之生長冠萎縮活性。兩條途徑之抑制亦可完全阻斷萎縮。(比例尺, 50 μ m)

圖 5A-5D 阻斷 PirB 可使 DRG 神經元中及受質 MAG 上之神經突生長部分去抑制。代表性顯微照片展示於圖 5A 及 5C 中；顯示來自一代表性實驗之平均神經突長度($\pm$ SE)的圖表展示於圖 5B 及 5D 中。(A)及(B)在存在或不存在抗 PirB 之情形下將經解離 P10 DRG 神經元平鋪於 PDL/層黏連蛋白、

AP-Nogo66、或髓磷脂上。aPB1可顯著降低由AP-Nogo66及髓磷脂所致之抑制。(C)及(D)在存在或不存在aPB1之情形下將經解離P7 CGN平鋪於PDL/層黏連蛋白或MAG-Fc上。針對PirB之抗體降低MAG-Fc對神經突生長之抑制。(* $p < 0.01$; 比例尺, 200 μm A, B ; 50 μm C)。

圖 6 抗 PirB 抗體 YW259.2 重鏈 (SEQ ID NO: 8) 之 DNA 序列。

圖 7 抗 PirB 抗體 YW259.9 重鏈 (SEQ ID NO: 9) 之 DNA 序列。

圖 8 抗 PirB 抗體 YW259.12 重鏈 (SEQ ID NO: 3) 之 DNA 序列。

圖 9 抗 PirB 抗體 YW259.2 重鏈 (SEQ ID NO: 4) 之蛋白質序列。

圖 10 抗 PirB 抗體 YW259.9 重鏈 (SEQ ID NO: 5) 之蛋白質序列。

圖 11 抗 PirB 抗體 YW259.12 重鏈 (SEQ ID NO: 6) 之蛋白質序列。

圖 12 所有 YW259 抗體 (SEQ ID NO: 7) 之輕鏈之蛋白質序列。

圖 13 抗 PirB 抗體 YW259.2(IgG) 抑制經 His 標記之小鼠 PirB 之活性之能力。

圖 14 抗 PirB 抗體 YW259.9 (IgG) 抑制經 His 標記之小鼠 PirB 之活性之能力。

圖 15 抗 PirB 抗體 YW259.12 (IgG) 抑制經 His 標記之小鼠

PirB之活性之能力。

圖 16 包括 YW259.2、YW259.9 及 YW259.12 在內之一組抗 PirB 抗體的相對 AP-Nogo66 結合。

圖 17A-17C 抗 PirB 抗體 YW259.2 (SEQ ID NO: 11)、YW259.9 (SEQ ID NO: 12) 及 YW259.12 (SEQ ID NO 13) 之重鏈序列之比對。對 CDR H1、CDR H2 及 CDR H3 序列以及 Kabat、Chothia 之 CDR H 結構域及接觸 CDR H 結構域實施加框。Hum III 顯示為 SEQ ID NO: 10。

圖 18A-18C 抗 PirB 抗體 YW259.2 (SEQ ID NO: 15)、YW259.9 (SEQ ID NO: 15) 及 YW259.12 (SEQ ID NO: 15) 之輕鏈序列之比對。沿 Kabat、Chothia 及接觸 CDR L 結構域之 CDR L 結構域為 CDR L1、CDR L2 及 CDR L3 序列加框。HuKI 顯示為 SEQ ID NO: 14。

圖 19 C1QTNF5 (CTRP5; NP_05646) 抑制背根神經節神經元之神經突生長，且在藉由 PirB 功能阻斷性抗體 YW259.2 阻斷 PirB 時此抑制降低。

【序列表】

<110>美商建南德克公司

<120>抗PirB抗体

<130> GNE-0324

<140> 098115945

<141> 2009-05-13

<150> US 61/052,949

US 12/208,883

US 12/316,130

<151> 2008-05-13

2008-09-11

2008-12-09

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 841

<212> PRT

<213>小鼠属

<400> 1

Met Ser Cys Thr Phe Thr Ala Leu Leu Arg Leu Gly Leu Thr Leu Ser
1 5 10 15Leu Trp Ile Pro Val Leu Thr Gly Ser Leu Pro Lys Pro Ile Leu Arg
20 25 30Val Gln Pro Asp Ser Val Val Ser Arg Trp Thr Lys Val Thr Phe Phe
35 40 45Cys Glu Glu Thr Ile Gly Ala Asn Glu Tyr Arg Leu Tyr Lys Asp Gly
50 55 60Lys Leu Tyr Lys Thr Val Thr Lys Asn Lys Gln Lys Pro Ala Asn Lys
65 70 75 80Ala Glu Phe Ser Leu Ser Asn Val Asp Leu Arg Asn Ala Gly Gln Tyr
85 90 95Arg Cys Ser Tyr Ser Thr Gln Tyr Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Pro
100 105 110Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Tyr Trp Thr Pro Ser Leu Leu Ala
115 120 125Gln Ala Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Tyr Val Thr Leu Gln Cys
130 135 140Glu Ser Trp His Asn Asp His Lys Phe Ile Leu Thr Val Glu Gly Pro
145 150 155 160Gln Lys Leu Ser Trp Thr Gln Asp Ser Gln Tyr Asn Tyr Ser Thr Arg
165 170 175Lys Tyr His Ala Leu Phe Ser Val Gly Pro Val Thr Pro Asn Gln Arg
180 185 190

Trp Ile Cys Arg Cys Tyr Ser Tyr Asp Arg Asn Arg Pro Tyr Val Trp
 195 200 205
 Ser Pro Pro Ser Glu Ser Val Glu Leu Leu Val Ser Gly Asn Leu Gln
 210 215 220
 Lys Pro Thr Ile Lys Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Ala Ser Lys Arg
 225 230 235 240
 Ala Met Thr Ile Trp Cys Gln Gly Asn Leu Asp Ala Glu Val Tyr Phe
 245 250 255
 Leu His Asn Glu Gly Ser Gln Lys Thr Gln Ser Thr Gln Thr Leu Gln
 260 265 270
 Gln Pro Gly Asn Lys Gly Lys Phe Phe Ile Pro Ser Met Thr Arg Gln
 275 280 285
 His Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Cys Tyr Gly Ser Ala Gly Trp Ser
 290 295 300
 Gln Pro Ser Asp Thr Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ile Tyr Glu His
 305 310 315 320
 Tyr Lys Pro Arg Leu Ser Val Leu Pro Ser Pro Val Val Thr Ala Gly
 325 330 335
 Gly Asn Met Thr Leu His Cys Ala Ser Asp Phe His Tyr Asp Lys Phe
 340 345 350
 Ile Leu Thr Lys Glu Asp Lys Lys Phe Gly Asn Ser Leu Asp Thr Glu
 355 360 365
 His Ile Ser Ser Ser Arg Gln Tyr Arg Ala Leu Phe Ile Ile Gly Pro
 370 375 380
 Thr Thr Pro Thr His Thr Gly Thr Phe Arg Cys Tyr Gly Tyr Phe Lys
 385 390 395 400
 Asn Ala Pro Gln Leu Trp Ser Val Pro Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu
 405 410 415
 Ile Ser Gly Leu Ser Lys Lys Pro Ser Leu Leu Thr His Gln Gly His
 420 425 430
 Ile Leu Asp Pro Gly Met Thr Leu Thr Leu Gln Cys Tyr Ser Asp Ile
 435 440 445
 Asn Tyr Asp Arg Phe Ala Leu His Lys Val Gly Gly Ala Asp Ile Met
 450 455 460
 Gln His Ser Ser Gln Gln Thr Asp Thr Gly Phe Ser Val Ala Asn Phe
 465 470 475 480
 Thr Leu Gly Tyr Val Ser Ser Ser Thr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr
 485 490 495

Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Trp Ser Ala Ser Ser Glu Pro Leu
500 505 510

Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Leu Pro Leu Thr Pro Ser Leu Ser Val
515 520 525

Lys Pro Asn His Thr Val His Ser Gly Glu Thr Val Ser Leu Leu Cys
530 535 540

Trp Ser Met Asp Ser Val Asp Thr Phe Ile Leu Ser Lys Glu Gly Ser
545 550 555 560

Ala Gln Gln Pro Leu Arg Leu Lys Ser Lys Ser His Asp Gln Gln Ser
565 570 575

Gln Ala Glu Phe Ser Met Ser Ala Val Thr Ser His Leu Ser Gly Thr
580 585 590

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Gln Asn Ser Ser Phe Tyr Leu Leu Ser Ser
595 600 605

Ala Ser Ala Pro Val Glu Leu Thr Val Ser Gly Pro Ile Glu Thr Ser
610 615 620

Thr Pro Pro Pro Thr Met Ser Met Pro Leu Gly Gly Leu His Met Tyr
625 630 635 640

Leu Lys Ala Leu Ile Gly Val Ser Val Ala Phe Ile Leu Phe Leu Phe
645 650 655

Ile Leu Ile Phe Ile Leu Leu Arg Arg Arg His Arg Gly Lys Phe Arg
660 665 670

Lys Asp Val Gln Lys Glu Lys Asp Leu Gln Leu Ser Ser Gly Ala Glu
675 680 685

Glu Pro Ile Thr Arg Lys Gly Glu Leu Gln Lys Arg Pro Asn Pro Ala
690 695 700

Ala Ala Thr Gln Glu Glu Ser Leu Tyr Ala Ser Val Glu Asp Met Gln
705 710 715 720

Thr Glu Asp Gly Val Glu Leu Asn Ser Trp Thr Pro Pro Glu Glu Asp
725 730 735

Pro Gln Gly Glu Thr Tyr Ala Gln Val Lys Pro Ser Arg Leu Arg Lys
740 745 750

Ala Gly His Val Ser Pro Ser Val Met Ser Arg Glu Gln Leu Asn Thr
755 760 765

Glu Tyr Glu Gln Ala Glu Glu Gly Gln Gly Ala Asn Asn Gln Ala Ala
770 775 780

Glu Ser Gly Glu Ser Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu Cys Ser Arg
785 790 795 800

Thr Leu Arg Gln Gly Ala Ala Ala Ser Pro Leu Ser Gln Ala Gly Glu
805 810 815

Ala Pro Glu Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ala Ala Arg Pro
820 825 830

Glu Ala Val Pro Lys Asp Val Glu Gln
835 840

<210> 2

<211> 598

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp
20 25 30

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

Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
50 55 60

Lys Ser Ala Ser Trp Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn
65 70 75 80

Gly Gln Phe His Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr
85 90 95

Gly Cys Gln Tyr Tyr Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro
100 105 110

Leu Val Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala
115 120 125

Gln Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys
130 135 140

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

Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser
165 170 175

Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp
180 185 190

Ser His Arg Cys Tyr Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser
195 200 205

Ser Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys
210 215 220

Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser
225 230 235 240

Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro
 260 265 270
 Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg
 275 280 285
 Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Tyr Asn Leu Ser Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln
 305 310 315 320
 Ile His Gly Thr Pro Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala
 325 330 335
 Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His
 340 345 350
 Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu
 355 360 365
 Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser
 370 375 380
 Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu
 385 390 395 400
 Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu
 405 410 415
 Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro
 420 425 430
 Ile Ser Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly
 435 440 445
 Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly
 450 455 460
 Ile Leu Val Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 465 470 475 480
 Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln
 485 490 495
 Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro
 500 505 510
 Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln
 515 520 525
 Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Pro Glu Asp Gly
 530 535 540

Val Glu Met Asp Thr Arg Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val
545 550 555 560

Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr Glu
565 570 575

Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr
580 585 590

Ala Thr Leu Ala Ile His
595

<210> 3
<211> 1419
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 3
atgggatggg catgatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagc gtagctgag 60
gttcagctgg tggagctgg cggtagccctg gtgcagccag ggggtcact cctttgtcc 120
tgtagcctt ctggcttcac ctccactaat tctatatta gctgggtggc tcaggccccg 180
ggtaagggcc tggaaagggt tggtaggatt tctctctcg gcggttctac ttactatgcc 240
gatagcgta agggccgttt cactataage gcagacacat ccaaaaacac agcctacct 300
caaatgaaca gcttaagagc tggagacact gccgtctatt attgtgcaa atcggctcgg 360
gcgttcgtt actggggta aggaacctg gtacctct cctcggcctc caccaggggc 420
ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcact ctgggggac agcggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgigg tgactgtgcc ctctagcagc ttgggcacc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtagc aagaaagtg agcccaaat ttgtgacaaa 720
actcacacat gccaccctg cccagcact gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
gtgtggagc tggccacga agacctgag gcaagtta actggtagt ggacggcgtg 900
gaggtaga atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcag gtagcgggtg 960
gtcagcgctc taccgtctt gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag 1020
gtctccaaa aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag 1080
ccccgagaac cacaggtaga cccccctc ccatcccgag aagagatgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctgggt caaaggcttc tctccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accagcctc cctgtcgtga ctccgacggc 1260
tcttctctc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgt cctgtatgca tgggtctcg cacaaccact acacgcagaa gacgtctctc 1380
ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

<210> 4
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 4
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Ser Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Ala Trp Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 5
<211> 465
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 5
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Gly Gly Ile Asn Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 His Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 6
<211> 465
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 6
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Ser Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Gly Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Val Trp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

145	150	155	160
Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
	165	170	175
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	180	185	190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	195	200	205
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
	210	215	220
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	225	230	235
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	245	250	255
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	260	265	270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	275	280	285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	290	295	300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	305	310	315
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	325	330	335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	340	345	350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	355	360	365
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	370	375	380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	385	390	395
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	405	410	415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	420	425	430
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	435	440	445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			

450

455

460

Lys
465

<210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 7

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 35 40 45

Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80

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

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

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 8
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 8

```

atgggaaggc catgatacat cctttttcta gtagcaactg caactggagc gtagcctgag    60
gttcagctgg tggagctcgg cggggccctg gtagcagccag ggggctcact ccgtttgtcc    120
tgtagcagctt ctggcttcac ctacagtaat tctatatta gcagggtgag tcaggccccg    180
ggtaaggggc tggaaagggt tggggggatt tatcttctg gcggtaatac taactatgcc    240
gatagcgta aggcccggtt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta    300
caaatgaaca gcttaaggag tagggacact gccgtctatt atgttgcaaa aagcgcctgg    360
cagttcgctt actggggta aggaaccctg gtagccgtct cctcggcctc caccaggggc    420
ccatcggtct tccccctggc accctctctc aagagcacct ctgggggac agcggccctg    480
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtagcgg tgcgtggaa ctacggcgcc    540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactcctc    600
agcagcgtag tgcctgtgct ccttagcagc tgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg    660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtagc aagaaagttg agcccaatc ttgtgacaaa    720
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc    780
tccccccaa aacccaaggc caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg    840
gtgtggagc tggccacga agaccctgag gtaggttca actggtacgt gtagcggcgtg    900
gaggtgcata atgccaagac aaagcccgag gaggagcagt acaacagcac gtagcgggtg    960
gtcagcgtcc taccgtctct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag    1020
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag    1080
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatccccgg aagagatgac caagaaccag    1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtggag    1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc    1260
tcttctctcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc    1320
ttctcatgct ccgtgatgca tagggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc    1380
ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga    1419

```

<210> 9
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 9

```

atgggatggc catgatacat cctttttcta gtagcaactg caactggagc gtagcctgag    60
gttcagctgg tggagctcgg cggggccctg gtagcagccag ggggctcact ccgtttgtcc    120
tgtagcagctt ctggcttcac ctacagtagt aactatatta gcagggtgag tcaggccccg    180
ggtaaggggc tggaaagggt tggggggatt aatcttactg gcggttatac ttactatgcc    240
catagcgta agggccggtt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta    300

```

caaatgaaca gcctaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaag aagcgtgigg 360
 ggttctgatt actgggggtca aggaaccctg gtcaccgtct cctcggccct caccaagggc 420
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 480
 ggcctgctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggigacgg tglcgtggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcttacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgigg tgaactgicc ccttagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaaacac caaggtggac aagaangtig agcccaaatc ttgigacaaa 720
 actcacacat gccaccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780
 tcccccca aacccaagga cccctcatg atctcccgga cccctgaggt ccatgctg 840
 ggggtggacg tgagccacga agacctgag gicaagtca actggtacgt ggacggcgig 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggig 960
 gtcagcgtec tcaccgtctt gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagla caagtgcag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggigla cccctgccc ccatcccggt aagagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgagg 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tctttcttc tctacagcaa gctaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgt cctgatgca tgaagctctg cacaaccact acagcagaa gagctcttc 1380
 ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105

<210> 11
 <211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Ala Trp Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Val Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列描述：合成多肽

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ser
20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Val Trp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98115945

※ 申請日：98.5.13

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K^{39/393 (2006.01)}
C07K^{16/28 (2006.01)}
A61P^{25/00 (2006.01)}

一、發明名稱：(中文/英文)

抗PirB抗體

ANTI-PirB ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明概言之係關於神經發育及神經病症。本發明具體而言係關於髓磷脂相關抑制系統之新穎調節劑之鑒定及所鑒定之調節劑的各種用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates generally to neural development and neurological disorders. The invention specifically concerns identification of novel modulators of the myelin-associated inhibitory system and various uses of the modulators so identified.

七、申請專利範圍：

1. 一種分離之抗 PirB/LILRB 抗體，其與選自由 YW259.2、YW259.9 及 YW259.12 組成之群之抗體結合人類 PirB (LILRB) 上之相同表位(epitope)。
2. 一種分離之抗 PirB/LILRB 抗體，其與選自由 YW259.2、YW259.9 及 YW259.12 組成之群之抗體競爭結合人類 PirB (LILRB)。
3. 一種分離之抗 PirB/LILRB 抗體，其包含一、二或三個來自選自由以下組成之群之重鏈之超變區序列：YW259.2 重鏈(SEQ ID NO: 4 或 11)、YW259.9 重鏈(SEQ ID NO: 5 或 12)、及 YW259.12 重鏈(SEQ ID NO: 6 或 13)。
4. 如請求項 3 之抗體，其中該抗體包含 YW259.2 抗體重鏈(SEQ ID NO: 4 或 11)之所有超變區序列。
5. 如請求項 3 之抗體，其中該抗體包含 YW259.9 抗體重鏈(SEQ ID NO: 5 或 12)之所有超變區序列。
6. 如請求項 3 之抗體，其中該抗體包含 YW259.12 抗體重鏈(SEQ ID NO: 6 或 13)之所有超變區序列。
7. 如請求項 3 至 6 中任一項之抗體，其另外包含輕鏈。
8. 如請求項 7 之抗體，其中該輕鏈包含一個、兩個或三個 SEQ ID NO: 15 多肽序列之超變序列。
9. 如請求項 7 之抗體，其中該輕鏈包含 SEQ ID NO: 7 或 15 多肽序列之所有超變區序列。
10. 如請求項 3 之抗體，其選自由抗體 YW259.2、YW259.9、及 YW259.12 組成之群。

11. 一種分離之抗 PirB/LILRB 抗體，其中該抗體之全長 IgG 形式以 5 nM 或更強之結合親和性特異性結合人類 PirB (LILRB)。
12. 一種分離之抗 PirB/LILRB 抗體，其中該抗體之全長 IgG 形式以 1 nM 或更強之結合親和性特異性結合人類 PirB (LILRB)。
13. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其可促進軸突再生。
14. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其可促進 CNS 神經元之再生。
15. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其至少部分救援 Nogo66 及髓磷脂所致之神經突生長抑制。
16. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其中該抗體係單株抗體。
17. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其中該抗體係選自由以下組成之群：嵌合抗體、人類化抗體、親和性成熟抗體、人類抗體、及雙特異性抗體。
18. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其中該抗體係抗體片段。
19. 如請求項 1 至 6 及 9 至 12 中任一項之抗體，其中該抗體係免疫接合物。
20. 一種多核苷酸，其編碼如請求項 1-12 中任一項之抗體或其重鏈或輕鏈。
21. 一種載體，其包含如請求項 20 之多核苷酸。

22. 如請求項21之載體，其中該載體係表現載體。
23. 一種宿主細胞，其包含如請求項21之載體。
24. 如請求項23之宿主細胞，其中該宿主細胞係原核細胞。
25. 如請求項23之宿主細胞，其中該宿主細胞係真核細胞。
26. 如請求項25之宿主細胞，其中該宿主細胞係哺乳動物細胞。
27. 一種製造抗PirB/LILRB抗體之方法，該方法包含(a)如請求項22之載體在適宜宿主細胞中表現，及(b)回收該抗體。
28. 如請求項27之方法，其中該宿主細胞係原核細胞。
29. 如請求項27之方法，其中該宿主細胞係真核細胞。
30. 一種組合物，其包含如請求項1至12中任一項之抗PirB/LILRB抗體及醫藥上可接受之賦形劑。
31. 如請求項30之組合物，其中該組合物另外包含第二藥物，其中該抗PirB/LILRB抗體係第一藥物。
32. 如請求項31之組合物，其中該第二藥物係NgR抑制劑。
33. 如請求項32之組合物，其中該NgR抑制劑係抗NgR抗體。
34. 一種套組，其包含抗如請求項1-12中任一項之抗PirB/LILRB抗體。
35. 一種如請求項1-12中任一項之抗PirB/LILRB抗體之用途，其用於製造在有需要之個體中促進軸突再生之藥物。
36. 如請求項35之用途，其中該個體係人類患者。

37. 如請求項36之用途，其中促進神經元之存活。
38. 如請求項36之用途，其中誘發神經元之生長。
39. 一種如請求項1-12中任一項之抗PirB/LILRB抗體之用途，其用於製造在有需要之個體中治療神經變性疾病之藥物。
40. 如請求項39之用途，其中該神經變性疾病之特徵在於中樞神經系統之物理損傷。
41. 如請求項40之用途，其中該神經變性疾病係與中風相關之腦損傷。
42. 如請求項39之用途，其中該神經變性疾病係選自由以下組成之群：三叉神經痛、舌咽神經痛、貝爾(Bell's)麻痺、重症肌無力、肌營養不良、肌萎縮側索硬化(ALS)、多發性硬化(MS)、進行性肌萎縮、進行性延髓遺傳性肌萎縮，因物理損傷(例如燒傷、創傷)或諸如糖尿病、腎功能障礙等疾病狀態或因用於治療癌症及AIDS之化學治療的毒性效應引發之外周神經損傷，突出性、破裂性、或脫垂性椎間盤症候群，頸椎病、神經叢病症、胸廓出口破壞症候群、周圍神經病(例如由鉛、胺苯砒(dapsone)、蜱(ticks)引起者)、卟啉症、格林-巴厘症候群(Gullain-Barre syndrome)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、亨庭頓氏症(Huntington's Disease)、及帕金森病(Parkinson's disease)。
43. 一種抗獨特型(idiotype)抗體，其特異性結合如請求項1-12中任一項之抗PirB/LILRB抗體。

八、圖式：

PirB (小鼠) 序列(SEQ ID NO: 1)

```

1  msctftallr  lgltlslwip  vltgslpkpi  lrvqpdsvvs  rwtkvtfce  etiganeyrl
61 ykdgklyktv  tknkqkpank  aefslsnvdl  rnaggyrcsy  stqykssgys  dplelvvtgd
121 ywtpsllaqa  spvvtsggyv  tlqcesshnd  hkfiltvegp  qklswtqdsq  ynnystrkyna
181 lfsvgpvtpn  qrwicrcysy  drnrpyvwsp  psessvllvs  gnlqkptika  epgpviaskr
241 amtiwcqgnl  daevyflhne  gsqktqstqt  lqqpgnkqkf  fipsmtrqna  ggyrcycygs
301 agwsqpsdtl  elvvtgiyeh  ykprlsvlps  pvvtaggnmt  lhcasdfhyd  kfiltkedkk
361 fgnsldtehi  sssrqyralf  iigpttptht  gtfrcygyfk  napqlwsvps  dlqqilisgl
421 skkpsllthq  ghildpgmtl  tlqcysdiny  drfalhkvvg  adimqhssqg  tdtgfsvanf
481 tlgyvssstg  ggyrcygahn  lssewsasse  pldilitgql  pltpslsvkp  nhtvhsgetv
541 sllcwsmdsv  dtfilskegs  aqqplrlkks  shdqqsqaef  smsavtshls  gtyrcygaqn
601 ssfyllssas  spveltvsqp  ietstppptm  smplggilhmy  lkalgsva  filflfilif
661 illrrrrhrgk  frkdvqkekd  lqlssgaeep  itrkgelqkr  pnpaaatgee  slyasvedmq
721 tedgvelnsw  tppeedpqge  tyavkpsrl  rkaghvpsv  msreqlntey  eqaeegqgan
781 nqaesgesg  dvtyaqlcsr  tlrqgaasp  lsqageapee  psvyatlaaa  rpeavpkdve
841 q

```

圖 1A

LILRB2 (人類) 序列(SEQ ID NO: 2)

```

1  mtpivtvlic  lglslgprth  vqtgtipkpt  lwaepdsvit  qgsptlscq  gsleaqeyrl
61 yrekksaswi  trirpelvkn  qqfhipsitw  ehtgrygcqy  ysrrawsels  dplvlvmtga
121 ypkptlsaqp  spvvtsggrv  tlqcesqvaf  ggfilckege  dehpqclnsq  phargssrai
181 fsvgpvspnr  rwsrhcyyd  lnsyvwssp  sdlllvpq  vskkpslsq  pgpvvapgcs
241 ltlqcvsdvg  ydrfvlykeg  erdlrlpgr  qpqaglsqan  ftlgpvsrsy  ggyrcygay
301 nlssewsaps  dpldilitgq  ihgtpfisvq  pgptvasgen  vtllcqswrq  fhtfltkag
361 aadaplrirs  iheypkyqae  fpmspvtsah  agtyrcygs  nsdpyllshp  seplelvvsg
421 psmgsspppt  gpistpagpe  dqpltpgtd  psgqlgrhlq  vvigilvavv  lllllllllf
481 lilrrhrrgk  hwtstqrkad  fqhpagavgp  eptdrglqwr  sspaadaqee  nlyavkdtq
541 pedgvemdtr  aaaseapqdv  tyaghlsltl  rrkateppps  gereppaeps  iyatlaih

```

圖 1B

YW259.2 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCTTCAGTAATTCCT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGT
GGGATTTATCCTTCTGGCGGTAATACTAACTATGCCGATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAAAGCGCCT
GGCAGTTCGCTTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

圖 6

YW259.9 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCTTCAGTAGTAACT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGT
GGGATTAATCCTACTGGCGGTTATACTTACTATGCCCATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAAGCGTGT
GGGTGTTTCGATTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

圖 7

YW259.12 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTACAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCTTCACTAATTCCT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCCGGGTAAAGGGCCTGGAATGGGTGGT
GGGATTTCTCCTTCTGGCGGTCTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAATCGGTCTG
GGCGTTCGCTTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCTC
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCTGA

圖 8

YW259.2 蛋白：

MGWSCIIILFLVATATGAYAIEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGIYPSGGNTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKSAWQFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

圖 9

YW259.9 蛋白：

MGWSCIIILFLVATATGAYAIEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYIS
WVRQAPGKGLEWVGGINPTGGYTYIAHSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCARSVWVFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

圖 10

YW259.12 蛋白：

MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGISPSGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKSVWAFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

圖 11

蛋白質（針對所有抗體之輕鏈）

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW
YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QSYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

圖 12

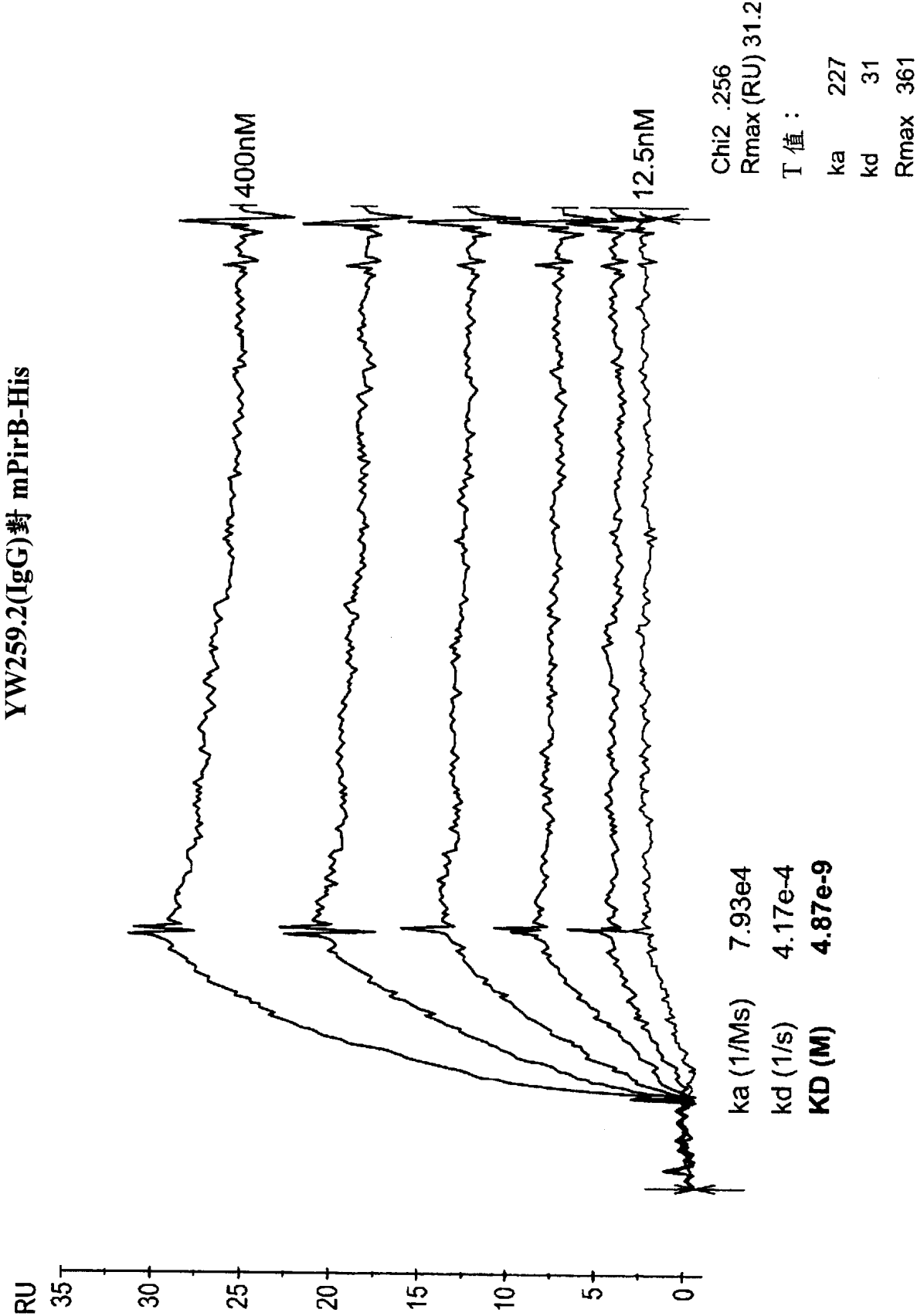


圖 13

YW259.9(IgG)對 mPirB-His

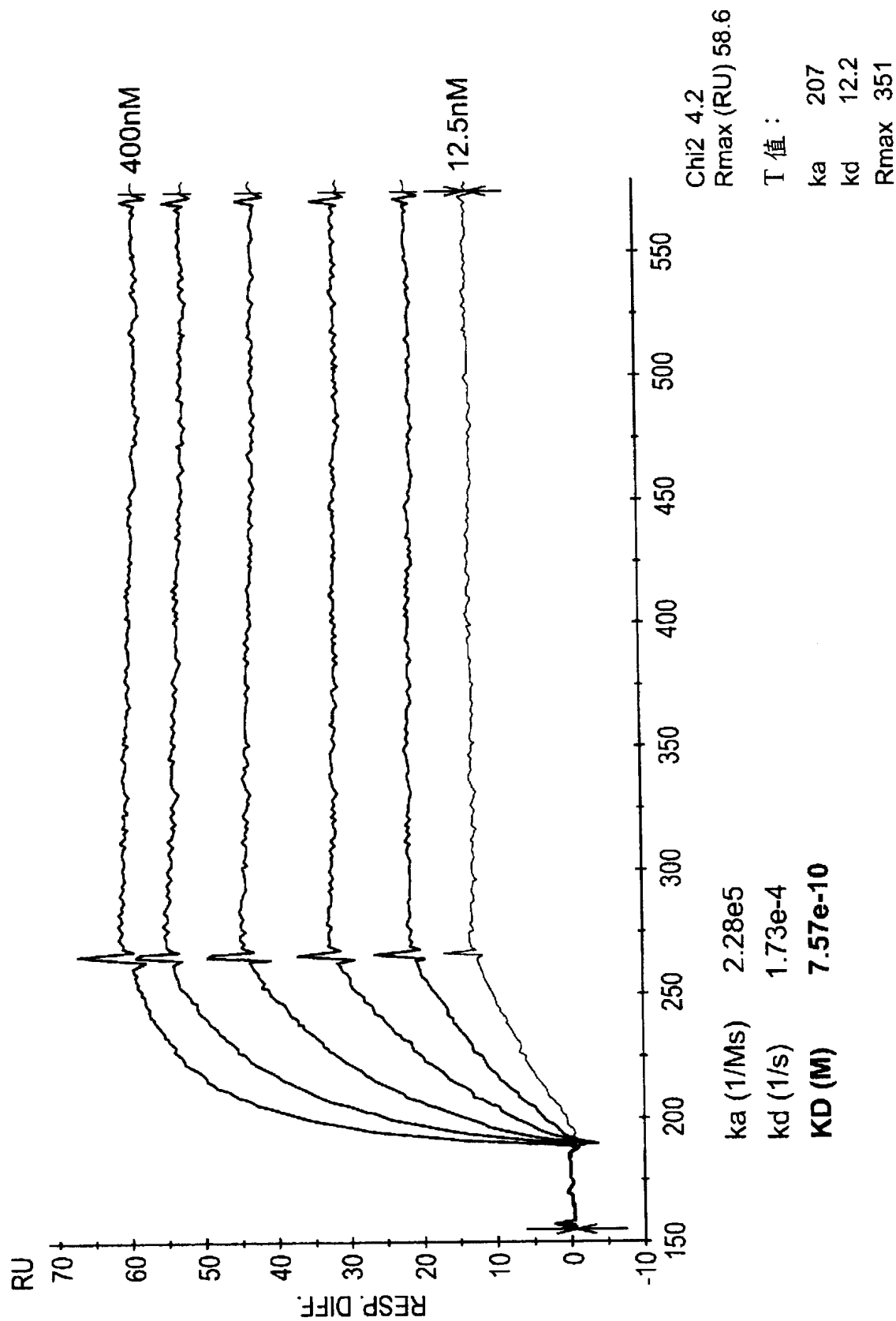


圖 14

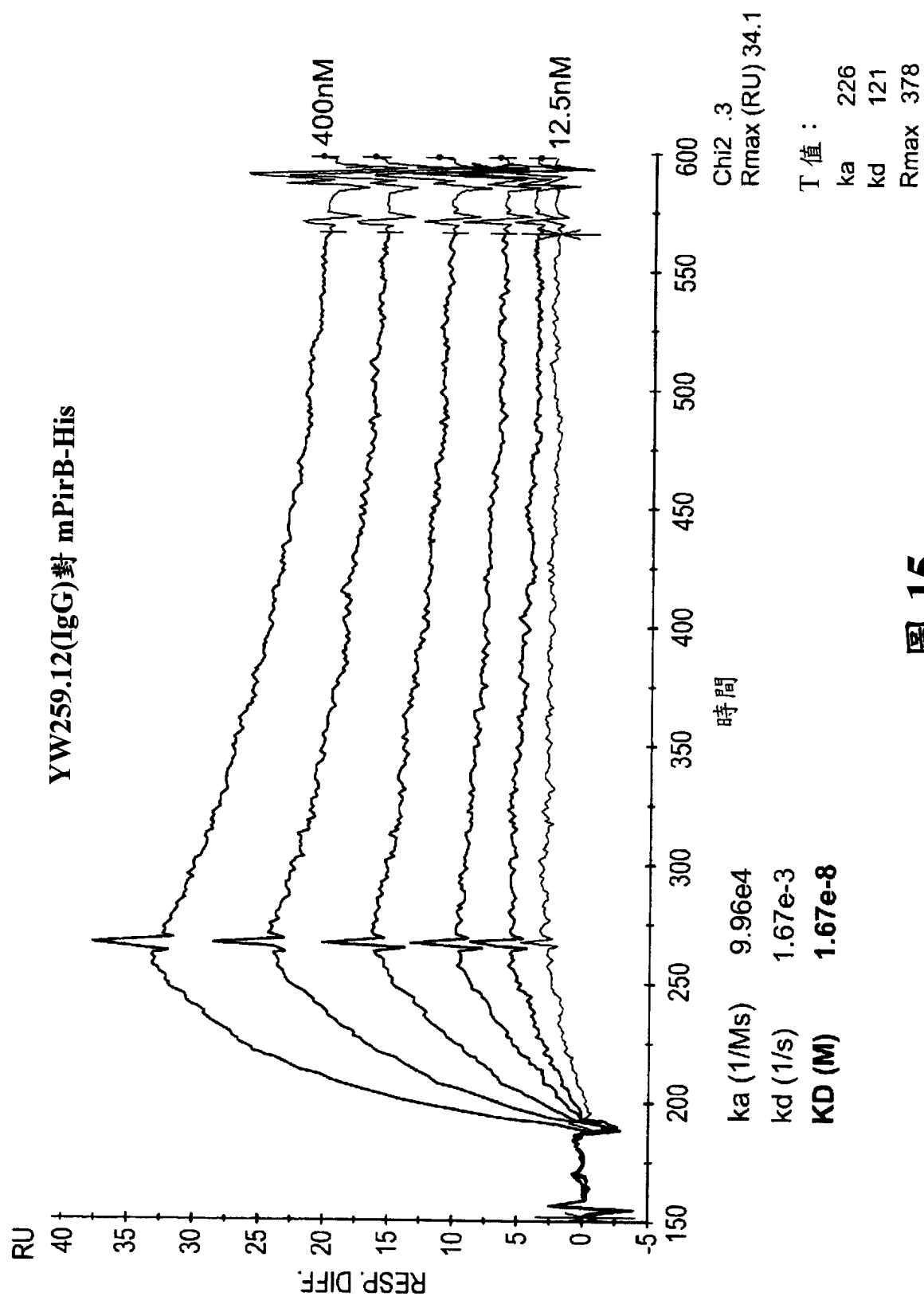


圖 15

相對 AP-Nog066 結合

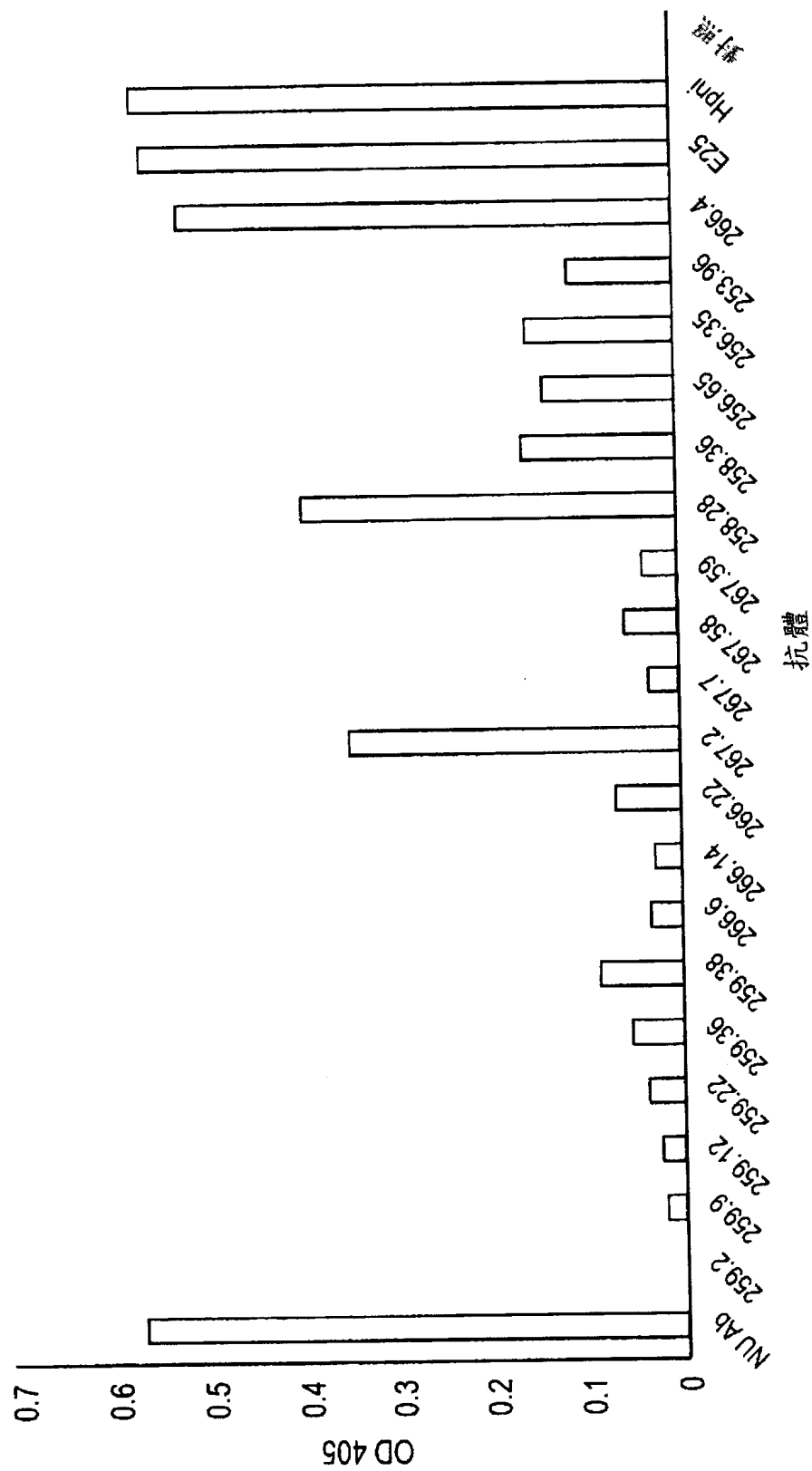


圖 16

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.9	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.12	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R

Kabat 編號	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
hum III	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q
YW259.2	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.9	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	N	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.12	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q

Chothia - CDR H1

Kabat - CDR H1

接觸-CDR H1

圖 17A

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	
	Kabat - CDR H2																			
	Chothia - CDR H2																			
	接觸-CDR H2																			
hum III	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	G	D	G	G	S	T	Y
YW259.2	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	Y	P	S	G	G	N	T	N
YW259.9	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	N	P	T	G	G	Y	T	Y
YW259.12	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	S	P	S	G	G	S	T	Y
Kabat 編號	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	
hum III	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	
YW259.2	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	
YW259.9	Y	A	H	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	
YW259.12	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	

圖 17B

YW259/抗 PirB 重鏈序列比對

Kabat 編號	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.2	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.9	A		L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.12	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A

Kabat 編號	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	103	104	105	106	107
	Kabat - CDR H3																				
	Chothia - CDR H3																				
	接觸-CDR H3																				
hum III	R	G												F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.2	K	S	A	W	Q		-	-	-	-	-	-	-	F	A	Y	W	G	Q	G	T
YW259.9	R	S	V	W	V		-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.12	K	S	V	W	A		-	-	-	-	-	-	-	F	A	Y	W	G	Q	G	T

圖 17C

YW259/抗 PirB 輕鏈序列比對

Kabat 編號 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.9	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T

Kabat 編號 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44

Kabat - CDR L1													
Chothia - CDR L1													
接觸-CDR L1													
C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y
C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y
C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y
C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y

圖 18A

YW259/抗 PirB 輕鏈序列比對

Kabat 編號	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
	Kabat - CDR L2 Chothia - CDR L2 接觸-CDR L2																					
huKI	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
YW259.2	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
YW259.9	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
YW259.12	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G

Kabat 編號	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
----------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

huKI	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y
YW259.2	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y
YW259.9	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y
YW259.12	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y

圖 18B

YW259/抗 PirB 輕鏈序列比對

Kabat 編號	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
	Kabat - CDR L3																				
	Chothia - CDR L3																				
	接觸-CDR L3																				
huKI	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.2	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.9	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.12	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

圖 18C

C1qTNF5抑制背根神經節(DRG)神經元之神經突生長，
且此抑制在PirB被阻斷時減弱

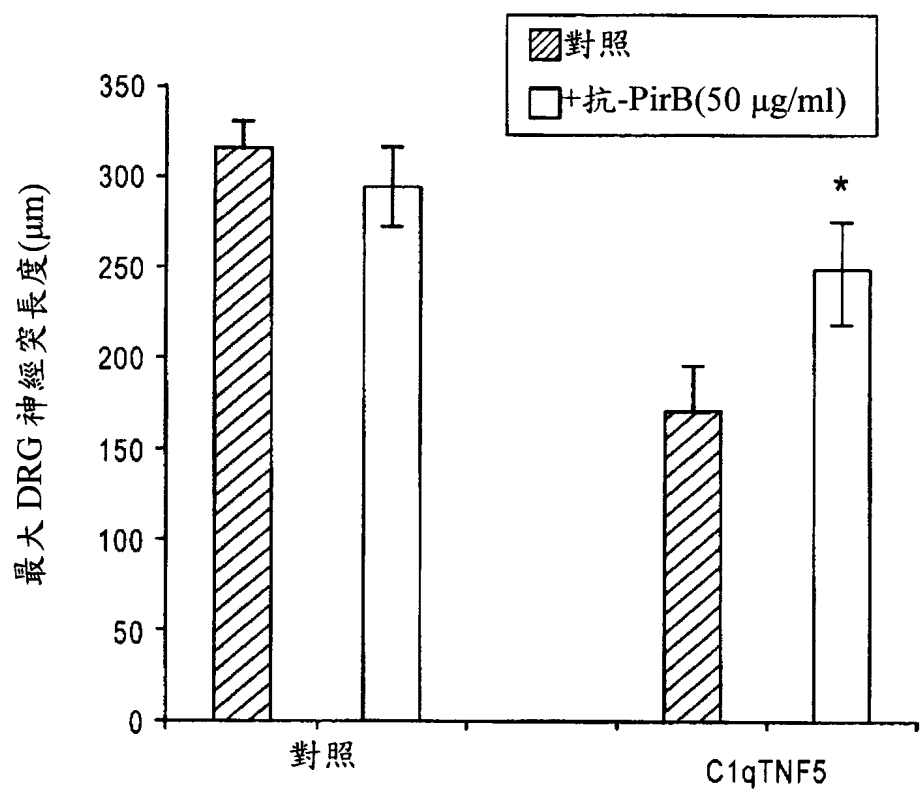


圖19

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (17) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)