I866304

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I866304 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：112123862 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 06 月 29 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2019/07/01 日本 2019-122982

(71)申請人：日商衛材Ｒ＆Ｄ企管股份有限公司 (日本) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：井上英二 INOUE, EIJI (JP) ；山田章夫 YAMADA, AKIO (JP) ；川勝智生 KAWAKATSU, TOMOMI (JP) ；今井俊夫 IMAI, TOSHIO (JP) ；出口真紀 DEGUCHI, MAKI (JP) ；中谷亜季 NAKATANI, AKI (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201716442A

期刊 Wada N et al, "Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Cell Surface Proteins Regulate Position-Specific Cell Affinity in the Limb Bud" DEVELOPMENTAL BIOLOGY 202, 244- 252 (1998)

期刊 M E Martone et al, " Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system." Brain Res. 1997 Oct 17;771(2): 238-50.

期刊 K Ohta et al, " The receptor tyrosine kinase, Cek8, is transiently expressed on subtypes of motoneurons in the spinal cord during development." Mech Dev . 1996 Jan;54(1): 59-69.

期刊 R Noberini et al, "Small Molecules Can Selectively Inhibit Ephrin Binding to the EphA4 and EphA2 Receptors." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Oct24, 2008 Vol. 283•No.43 , p.29 461-29472.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：23 共 144 頁

(54)名稱

抗 EphA4 抗體

(57)摘要

提供了一種抗 EphA4 抗體，其可以結合 EphA4 並促進 EphA4 切割，以及提供了包含作為活性成分的該抗體之醫藥組合物。獲得了一種對 EphA4 具有結合親和力並可以促進 EphA4 切割的小鼠抗 EphA4 抗體，並且鑑定出該小鼠抗 EphA4 抗體的互補決定區（CDR）之序列。隨後，藉由產生該小鼠抗 EphA4 抗體的人源化抗體獲得了目的抗 EphA4 抗體。

Provided is an anti-EphA4 antibody that can bind to EphA4 and enhance the cleavage of EphA4, as well as a pharmaceutical composition comprising the antibody as the active ingredient. A mouse anti-EphA4

antibody that has binding affinity towards EphA4 and can enhance the cleavage of EphA4 was obtained, and the sequence of the complementarity-determining region (CDR) of the mouse anti-EphA4 antibody was identified. Subsequently, the anti-EphA4 antibody of interest was obtained by producing a humanized antibody of the mouse anti-EphA4 antibody.

專利案號：112123862
原申請案號：111133484
公告本
I866304

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗EphA4抗體

【英文發明名稱】

ANTI-EphA4 ANTIBODY

【中文】

提供了一種抗EphA4抗體，其可以結合EphA4並促進EphA4切割，以及提供了包含作為活性成分的該抗體之醫藥組合物。獲得了一種對EphA4具有結合親和力並可以促進EphA4切割的小鼠抗EphA4抗體，並且鑑定出該小鼠抗EphA4抗體的互補決定區（CDR）之序列。隨後，藉由產生該小鼠抗EphA4抗體的人源化抗體獲得了目的抗EphA4抗體。

【英文】

Provided is an anti-EphA4 antibody that can bind to EphA4 and enhance the cleavage of EphA4, as well as a pharmaceutical composition comprising the antibody as the active ingredient. A mouse anti-EphA4 antibody that has binding affinity towards EphA4 and can enhance the cleavage of EphA4 was obtained, and the sequence of the complementarity-determining region (CDR) of the mouse anti-EphA4 antibody was identified. Subsequently, the anti-EphA4 antibody of interest was obtained by producing a humanized antibody of the mouse anti-EphA4 antibody.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗EphA4抗體

【英文發明名稱】

ANTI-EphA4 ANTIBODY

【技術領域】

【0001】 本發明關於與EphA4結合的抗體、編碼該抗體的核酸、包含該核酸的載體、包含該載體的細胞、該抗體之製作方法以及包含該抗體之醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 EphA4係受體酪胺酸激酶家族之成員。肝配蛋白A型和B型被稱為EphA4之配位基，並且當EphA4與肝配蛋白（肝配蛋白係EphA4的配位基）結合時，誘導去黏附訊號。迄今為止，已經提出EphA4參與阿茲海默氏症（在下文中也稱為「AD」）的病理（非專利文獻1-4），並且據報導抑制EphA4與肝配蛋白之間的結合拯救了澱粉樣β $(Aβ)_{(1-42)}$低聚物介導的神經傳遞功能障礙（專利文獻1）。在AD中，認為過度磷酸化tau形成的聚集體（神經原纖維纏結）參與神經細胞的死亡（非專利文獻5），並且還已經報導，抑制tau磷酸化抑制突觸消失的神經變性（非專利文獻6和非專利文獻7），以及改善記憶缺陷或認知功能障礙（非專利文獻8-11）。有報導表明CDK5的激活係tau磷酸化之原因（非專利文獻12和非專利文獻13）。表現已經在家族性額顳葉失智（rTg4510小鼠）中發現的P301L突變的基因修飾小鼠係AD模型小鼠，與AD相似，tau高度磷酸化和tau在神經元細胞中異常積累在小鼠中發現。在rTg4510小鼠中，神經纖維

纏結（AD的病理特徵）形成並藉由腦萎縮和神經元的缺失引起認知功能障礙（非專利文獻14和非專利文獻5）。

【0003】 EphA4在海馬體或大腦皮層中大量表現，並且其藉由基質金屬蛋白酶（MMP）、ADAM（去整合素和金屬蛋白酶）和γ選擇酶被神經活性依賴性地切割。眾所周知，EphA4的這種切割反應穩定了棘突，其係神經功能的關鍵結構（非專利文獻15）。據報導，棘突的密度在AD中降低（非專利文獻16），並且由於還在AD中在NFT階段V和VI證實了EphA4切割片段的減少，認為EphA4的切割反應參與AD的病理（非專利文獻17）。

【0004】 儘管KYL肽和化合物1等被稱為現有的EphA4抑制藥物（專利文獻2、非專利文獻18和非專利文獻19），但還沒有關於具有促進EphA4切割活性的抗體之報導。

引證文獻清單

【0005】 [專利文獻1] WO 2016/019280 A1

[專利文獻2] WO 2012/156351 A1

【0006】 [非專利文獻1] Vargas LM等人, PLoS One [公共科學圖書館·綜合]. 2014年3月21日; 9 (3)

[非專利文獻2] Fu AK等人, Proc Natl Acad Sci U S A. [美國國家科學院院刊] 2014年7月8日; 111 (27): 9959-64

[非專利文獻3] Rosenberger AF等人, Acta Neuropathol Commun. [神經病理學通訊學報] 2014年7月16日; 2: 79

[非專利文獻4] Huang TY等人, J Exp Med. [實驗醫學雜誌] 2017 Dec 4; 214 (12): 3669-3685。

[非專利文獻5] Santa Cruz等人, Science. [科學] 2005年7月15日; 309 (5733): 476-81

[非專利文獻6] Seo J等人, J Neurosci. [神經科學雜誌] 2017年10月11日; 37 (41): 9917-9924

[非專利文獻7] Patrick GN等人, Nature. [科學] 1999年12月9日; 402 (6762): 615-22。

[非專利文獻8] Onishi T等人, J Neurochem. [神經化學雜誌] 2011年12月; 119 (6): 1330-40

[非專利文獻9] Belfiore R等人, Aging Cell. [老化細胞] 2019年2月; 18 (1): e12873。

[非專利文獻10] Webster SJ等人, Front Genet. [基因學前沿] 2014年4月23日; 5: 88。

[非專利文獻11] Grayson B等人, Behav Brain Res. [行為大腦研究] 2015年5月15日; 285: 176-93。

[非專利文獻12] Cancino GI等人, Neurobiol Aging. [神經生物學老化] 2011年7月; 32 (7): 1249-61。

[非專利文獻13] Vargas LM等人, Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. [生物化學與生物物理學報: 疾病的分子基礎] 2018年4月; 1864: 1148-1159。

[非專利文獻14] Ramsden M等人, J Neurosci. [神經科學雜誌] 2005年11月16日; 25 (46): 10637-47。

[非專利文獻15] Inoue E等人, J Cell Biol.[細胞生物學雜誌] 2009年5月4日; 185 (3): 551-64。

[非專利文獻16] Boros等人, Ann Neurol. [神經病學年鑒] 2017年10月; 82 (4): 602-614

[非專利文獻17] Matsui C等人, Brain Pathol. [腦病理學] 2012年11月; 22 (6): 776-87. doi: 10.1111/j.1750-3639

[非專利文獻18] Goldshmit等人, PLoS one. [公共科學圖書館·綜合] 2011; 6 (9): e24636

[非專利文獻19] Van Hoecke等人, Nature Medicine. [自然醫學] 2012年9月; 18 (9): 1418-22, 2012

【發明內容】

發明欲解決的問題

【0007】 本揭露之目的係提供一種抗EphA4抗體，其可以結合EphA4並促進EphA4切割，以及提供包含作為活性成分的該抗體的醫藥組合物。

解決問題之技術手段

【0008】 作為解決以上問題的廣泛研究之結果，本發明諸位發明人獲得了小鼠抗EphA4單株抗體（其可以結合EphA4並促進EphA4切割），並產生了該抗體的人源化抗體，從而完成完整的目的抗體。

【0009】 本揭露涵蓋以下特徵。

(1) 一種抗EphA4抗體，其中

該抗EphA4抗體包含重鏈和輕鏈，並且包含：

(a) 由在SEQ ID NO. 44中所示的胺基酸序列組成的重鏈CDR1；

(b) 由在SEQ ID NO. 27中所示的胺基酸序列組成的重鏈CDR2；

(c) 由在SEQ ID NO. 28中所示的胺基酸序列組成的重鏈CDR3；

(d) 由在SEQ ID NO. 29中所示的胺基酸序列組成的輕鏈CDR1；

(e) 由在SEQ ID NO. 30中所示的胺基酸序列組成的輕鏈CDR2；以及

(f) 由在SEQ ID NO. 31中所示的胺基酸序列組成的輕鏈CDR3。

【0010】 (2) 根據 (1) 所述之抗EphA4抗體，其中該抗EphA4抗體係人源化的。

【0011】 (3) 根據 (1) 或 (2) 所述之抗EphA4抗體，其中該抗EphA4抗體特異性結合EphA4並促進EphA4的切割。

【0012】 (4) 根據 (1) - (3) 中任一項所述之抗EphA4抗體，其中該抗EphA4抗體特異性結合EphA4並抑制EphA4和肝配蛋白之間的結合。

【0013】 (5) 根據 (1) - (4) 中任一項所述之抗EphA4抗體，其中

該重鏈的可變區由SEQ ID NO. 45中所示的胺基酸序列組成，並且

該輕鏈的可變區由SEQ ID NO. 46中所示的胺基酸序列組成。

【0014】 (6) 根據 (1) - (5) 中任一項所述之抗EphA4抗體，其中

該重鏈的恆定區和該輕鏈的恆定區包含來源於人抗體的胺基酸序列。

【0015】 (7) 根據 (6) 所述之抗EphA4抗體，其中

該重鏈的恆定區係人IgG的恆定區。

【0016】 (8) 根據 (7) 所述之抗EphA4抗體，其中

該人IgG的恆定區係人IgG_2的恆定區。

【0017】 (9) 根據 (8) 所述之抗EphA4抗體，其中

該人IgG_2的恆定區包含SEQ ID NO. 47中所示的胺基酸序列。

【0018】 (10) 根據 (6) - (9) 中任一項所述之抗EphA4抗體，其中

該輕鏈的恆定區係人Igκ的恆定區。

【0019】(11) 根據 (10) 所述之抗EphA4抗體，其中

該人Igκ的恆定區包含SEQ ID NO. 48中所示的胺基酸序列。

【0020】(12) 一種抗EphA4抗體，其中

該抗EphA4抗體包含重鏈和輕鏈，

該重鏈包含SEQ ID NO. 59中所示的胺基酸序列，並且

該輕鏈包含SEQ ID NO. 60中所示的胺基酸序列。

【0021】(13) 根據 (12) 所述之抗EphA4抗體，其中

該重鏈的C末端離胺酸缺失。

【0022】(14) 一種抗EphA4抗體，其中

該抗EphA4抗體包含重鏈和輕鏈，

該重鏈包含SEQ ID NO. 59中所示的胺基酸序列，

該輕鏈包含SEQ ID NO. 60中所示的胺基酸序列，並且

該重鏈的C末端離胺酸缺失。

【0023】(15) 一種分離的核酸，其編碼根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體。

【0024】(16) 一種載體，其包含根據 (15) 所述之核酸。

【0025】(17) 一種宿主細胞，其包含根據 (16) 所述之載體。

【0026】(18) 一種抗EphA4抗體之製作方法，該方法包含培養根據 (17) 所述之宿主細胞之步驟。

【0027】(19) 一種醫藥組合物，其包含根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體。

【0028】(20) 一種根據 (19) 所述之醫藥組合物，其中該醫藥組合

物包含至少一種藥學上可接受的載體。

【0029】 (21) 根據(19) 或 (20) 所述之醫藥組合物，其用於治療阿茲海默氏症。

【0030】 (22) 根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體，其用於在治療阿茲海默氏症中使用。

【0031】 (23) 一種用於治療阿茲海默氏症之方法，該方法包括向有需要的患者施用治療有效量的根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體。

【0032】 (24) 根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體用於製造用於治療阿茲海默氏症的醫藥組合物的用途。

【0033】 (25) 根據 (19) 或 (20) 所述之醫藥組合物，其用於治療tau蛋白病變。

【0034】 (26) 根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體，其用於在治療tau蛋白病變中使用。

【0035】 (27) 一種用於治療tau蛋白病變之方法，該方法包括向有需要的患者施用治療有效量的根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體。

【0036】 (28) 根據 (1) - (14) 中任一項所述之抗EphA4抗體用於製造用於治療tau蛋白病變的醫藥組合物的用途。

【0037】 (29) 根據 (25) - (28) 中任一項所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該tau蛋白病變係阿茲海默氏症或具有tau病理學的額顳葉變性。

【0038】 (30) 根據 (29) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療

方法、或用途，其中該tau蛋白病變係阿茲海默氏症。

【0039】(31) 根據 (29) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該tau蛋白病變係具有tau病理學的額顳葉變性。

【0040】(32) 根據 (31) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該具有tau病理學的額顳葉變性係進行性核上神經麻痺症、皮質基底節變性、嗜銀顆粒失智、神經原纖維纏結型老年失智或匹克症。

【0041】(33) 根據 (32) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該具有tau病理學的額顳葉變性係進行性核上神經麻痺症。

【0042】(34) 根據 (32) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該具有tau病理學的額顳葉變性係皮質基底節變性。

【0043】(35) 根據 (32) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該具有tau病理學的額顳葉變性係嗜銀顆粒失智。

【0044】(36) 根據 (32) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該具有tau病理學的額顳葉變性係神經原纖維纏結型老年失智。

【0045】(37) 根據 (32) 所述之醫藥組合物、抗EphA4抗體、治療方法、或用途，其中該具有tau病理學的額顳葉變性係匹克症。

發明效果

【0046】本揭露提供可以結合EphA4並促進EphA4的切割的抗EphA4抗體、編碼該抗體的核酸、包含該核酸的載體、包含該載體的細胞、該抗體之製作方法以及包含作為活性成分的該抗體之醫藥組合物。

【圖式簡單說明】

【0047】

[圖1]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）針對小鼠和人EphA4之結合親和力。

[圖2]顯示了採用海馬神經元的抗EphA4單株抗體（抗體A）之EphA4切割增強活性。

[圖3]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）之小鼠EphA4-小鼠配位基結合抑制活性。

[圖4]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）之人EphA4-人配位基結合抑制活性。

[圖5]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）針對每個人Eph受體之選擇性。

[圖6]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）針對每個小鼠Eph受體之選擇性。

[圖7]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）針對小鼠、大鼠、猴和人EphA4之反應性。

[圖8]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）針對人EphA4胞外區（ECD）、配位基結合結構域（LBD）、纖網蛋白III型結構域1（FN1）和纖網蛋白III型結構域2（FN2）的反應性。

[圖9]顯示了抗EphA4單株抗體（抗體A）對增加海馬神經元中棘突的數目之作用。

[圖10]顯示了抗EphA4單株抗體在體內抑制tau磷酸化之作用。

[圖11A]顯示了橫軸上EphA4配位基結合結構域（EphA4-LBD）之

胺基酸和縱軸上抗體A-Fab之結構區。黑塊顯示了存在相互作用的組合的交點。

[圖11B]顯示了EphA4配位基結合結構域（EphA4-LBD）之表面結構。在圖11B中，結合區含有的胺基酸名稱和殘基數目顯示在對應位置處，並且結合抗體A-Fab的H鏈和L鏈的CDR顯示在帶狀模型中。

[圖12]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）針對人EphA4之親和性。

[圖13]顯示了海馬神經元中人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）的EphA4切割增強活性。

[圖14]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）的人EphA4-人配位基結合抑制活性。

[圖15]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）之小鼠EphA4-小鼠配位基結合抑制活性。

[圖16]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）針對人Eph受體之選擇性。

[圖17]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）針對小鼠Eph受體之選擇性。

[圖18]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）針對小鼠、大鼠、猴和人EphA4之反應性。

[圖19]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）針對人EphA4胞外區（ECD）、配位基結合結構域（LBD）、纖網蛋白III型結構域1（FN1）和纖網蛋白III型結構域2（FN2）之反應性。

[圖20]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）對增加海馬神經元

中棘突的數目之作用。

[圖21]顯示了海馬神經元中人源化抗人EphA4單株抗體（抗體B）之人EphA4切割增強活性。

[圖22]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體A）經由MMP和ADAM對增加海馬神經元中棘突的數目之作用。

[圖23]顯示了人源化抗EphA4單株抗體（抗體B）在體內抑制tau磷酸化之作用。

【實施方式】

【0048】 本文使用的SEQ ID NO. 說明或編碼的區域如下：

Seq No.	序列區域	SEQ No	序列區域
1	小鼠EphA4（胺基酸序列）	32	猴EphA4（胺基酸序列）
2	小鼠EphA4的胞外區（胺基酸序列）	33	猴EphA4的胞外區（胺基酸序列）
3	小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白（胺基酸序列）	34	人EphA4的訊息序列（胺基酸序列）
4	小鼠EphA4的訊息序列（胺基酸序列）	35	前原胰蛋白酶的訊息序列（胺基酸序列）
5	人EphA4（胺基酸序列）	36	人EphA4的胞外區（胺基酸序列）
6	人EphA4的胞外區（胺基酸序列）	37	人EphA4的配位基結合結構域（胺基酸序列）
7	寡DNA ad29S（核酸序列）	38	人EphA4的纖網蛋白III型結構域1（胺基酸序列）
8	寡DNA ad29AS（核酸序列）	39	人EphA4的纖網蛋白III型結構域2（胺基酸序列）
9	5'正向引物（核酸序列）	40	人抗體的輕鏈FR IGKV1-17*01（胺基酸序列）
10	小鼠IgG重鏈的3'反向引物（核酸序列）	41	人抗體的輕鏈FR JK4（胺基酸序列）
11	小鼠Igκ輕鏈的3'反向引物（核酸序列）	42	人抗體的重鏈FR IGHV3-33*03（胺基酸序列）
12	抗體A的重鏈訊息序列（胺基酸序列）	43	人抗體的重鏈FR JH6（胺基酸序列）
13	抗體A的重鏈可變區（胺基酸序列）	44	抗體B的重鏈CDR1（胺基酸序列）

14	抗體A的輕鏈訊息序列（胺基酸序列）	45	抗體B的重鏈可變區HK2-42（胺基酸序列）
15	抗體A的輕鏈可變區（胺基酸序列）	46	抗體B的輕鏈可變區L1-8（胺基酸序列）
16	抗體A的重鏈訊息序列（核酸序列）	47	抗體B的人IgG_2重鏈恆定區（胺基酸序列）
17	抗體A的重鏈可變區（核酸序列）	48	抗體B的人Igκ輕鏈恆定區（胺基酸序列）
18	抗體A的輕鏈訊息序列（核酸序列）	49	抗體B的重鏈CDR1（核酸序列）
19	抗體A的輕鏈可變區（核酸序列）	50	抗體B的重鏈CDR2（核酸序列）
20	抗體A重鏈的5'正向引物（核酸序列）	51	抗體B的重鏈CDR3（核酸序列）
21	抗體A輕鏈的5'正向引物（核酸序列）	52	抗體B的輕鏈CDR1（核酸序列）
22	抗體A重鏈的3'反向引物（核酸序列）	53	抗體B的輕鏈CDR2（核酸序列）
23	抗體A輕鏈的3'反向引物（核酸序列）	54	抗體B的輕鏈CDR3（核酸序列）
24	抗體A的重鏈恆定區（胺基酸序列）	55	抗體B的重鏈可變區HK2-42（核酸序列）
25	抗體A的輕鏈恆定區（胺基酸序列）	56	抗體B的輕鏈可變區L1-8（核酸序列）
26	抗體A的重鏈CDR1（胺基酸序列）	57	抗體B的人IgG_2重鏈恆定區（核酸序列）
27	抗體A的重鏈CDR2（胺基酸序列）	58	抗體B的人Igκ輕鏈恆定區（核酸序列）
28	抗體A的重鏈CDR3（胺基酸序列）	59	抗體B的重鏈全長序列（胺基酸序列）
29	抗體A的輕鏈CDR1（胺基酸序列）	60	抗體B的輕鏈全長序列（胺基酸序列）
30	抗體A的輕鏈CDR2（胺基酸序列）	61	抗體B的重鏈全長序列（核酸序列）
31	抗體A的輕鏈CDR3（胺基酸序列）	62	抗體B的輕鏈全長序列（核酸序列）

【0049】 本揭露關於結合EphA4的抗EphA4抗體。

根據本揭露所述之抗EphA4抗體係可以識別並結合EphA4的抗體，並且如下所述，該抗體可為完整的抗體，或可為合成抗體（如重組抗體、嵌合抗體、人源化抗體等），只要其具有與EphA4的結合親和性。本文的EphA4可理解為指人源性、小鼠源性、大鼠源性和猴源性EphA4。人源性、小鼠源性、大鼠源性和猴源性EphA4可從登記了序列資訊的公共數據

庫（如美國國家生物技術資訊中心（United States National Center for Biotechnology Information）提供的Genbank）獲得，或者EphA4基因序列資訊可以藉由基於密切相關動物物種的EphA4鹼基序列資訊設計引物並且然後從所需動物物種中提取的RNA進行選殖而獲得。例如，人、小鼠、大鼠和猴EphA4的鹼基序列資訊分別以Genbank登錄號NM_004438.5、NM_007936.3、NM_001162411.1和NM_001260870.1登記在數據庫中。

【0050】在一個方面，抗EphA4抗體係特異性結合EphA4的抗體。「特異性結合」的術語係相關技術領域中的普通技術人員眾所周知的術語，並且用於確定抗體或其抗原結合片段與抗原或表位之間特異性結合之方法也眾所周知。在一個實施方式中，「特異性結合」被理解為當與其他靶分子結合時相比，抗EphA4抗體可藉由具有更高結合親和力和結合活性的免疫反應更迅速和/或持續較長時間段的與EphA4結合。這並不意味著特異性結合EphA4的抗體不與其他靶分子結合。在另一個實施方式中，「特異性結合」可由具有針對EphA4的至少約10^{-7} M、或至少約10^{-8} M、或至少約10^{-9} M或更低的KD的抗體所示。此外，在另一個進一步的實施方式中，「特異性結合」被理解為藉由免疫反應與EphA4結合，但基本上不與Eph受體的其他家族分子結合。

【0051】在一個方面，抗EphA4抗體係結合EphA4的胞外區的抗體。在一個實施方式中，抗EphA4抗體係與EphA4的胞外區的配位基結合結構域（LBD）結合的抗體。

【0052】在一個實施方式中，抗EphA4抗體可以特異性結合EphA4並促進EphA4的切割。在特定實施方式中，抗EphA4抗體可以特異性結合

EphA4並藉由基質金屬蛋白酶（MMP）或ADAM（去整合素和金屬蛋白酶）促進EphA4胞外結構域的切割。

【0053】在一個實施方式中，該抗EphA4抗體可以特異性結合EphA4並抑制EphA4和其配位基肝配蛋白之間的結合。

【0054】在另一實施方式中，抗EphA4抗體可以特異性地結合EphA4並增加海馬神經元中的棘突數目或穩定海馬神經元中的棘突。

【0055】在一個實施方式中，本揭露涵蓋抗EphA4抗體，其可以特異性地結合人EphA4、小鼠EphA4、大鼠EphA4和猴EphA4中的至少一種並抑制與其配位基的結合。在另一個實施方式中，本揭露涵蓋抗EphA4抗體，其可以特異性地結合人EphA4、小鼠EphA4、大鼠EphA4和猴EphA4中的兩種或更多種並抑制與其配位基的結合。在另一個進一步的實施方式中，本揭露涵蓋抗EphA4抗體，其可以特異性地結合人EphA4、小鼠EphA4、大鼠EphA4和猴EphA4中所有並抑制與其配位基的結合。

【0056】對於用於測量抗EphA4抗體的抗原結合特性（如結合親和力和跨物種反應性）之方法，可以採用熟悉該項技術者在相關技術領域中眾所周知之方法。例如結合親和力可使用Biacore™生物感測器、KinExA生物感測器、閃爍接近分析法、ELISA、ORIGEN免疫測定法（IGEN公司）、流式細胞儀、螢光消光、螢光轉移、酵母顯示和/或免疫染色進行測定，但並不限定於該等。抗EphA4抗體針對EphA4和其配位基之間的結合的中和活性可使用Biacore™生物感測器、ELISA和/或流式細胞儀進行測定，但並不限定於該等。

【0057】根據本揭露所述之抗EphA4抗體可為單株抗體，只要其結合EphA4。

【0058】 根據本揭露所述之抗EphA4抗體可以為如IgG、IgA或IgM（或其亞類）等任何類別，並不限於特定類別。根據重鏈（可以稱為H鏈）的恆定區的抗體胺基酸序列，將免疫球蛋白分成不同類別。有五種主要的免疫球蛋白類別：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，並且該等中的一些可以進一步細分為例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2等亞類（同種型）。對應於不同類別的免疫球蛋白的重鏈的恆定區分別稱為α、δ、ε、γ和μ。此外，抗體的輕鏈（可以稱為L鏈）的類型為λ鏈和κ鏈。根據本揭露所述之抗EphA4抗體可為IgG抗體，例如可為IgG_1抗體或IgG_2抗體等。此外，根據本揭露之抗EphA4抗體在某些情況下可以呈單體、二聚體或多聚體的形式。

【0059】 根據本揭露之抗體的可變區可意指抗體輕鏈的可變區和/或抗體重鏈的可變區，並且抗體的恆定區可意指抗體輕鏈的恆定區和/或抗體重鏈的恆定區。重鏈和輕鏈的可變區各自由藉由也稱為互補決定區的三個CDR連接的四個框架區（FR）組成。各鏈中的CDR藉由FR而保持鄰近，並與另一鏈中的CDR一起有助於抗體的抗原結合位點的形成。用於確定CDR的技術包括但不限於，例如 (1) 基於跨物種序列變異性之方法（如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質的序列], 第5版, 1991, National Institutes of Health [國立衛生研究院]，馬里蘭州貝塞斯達）；和 (2) 基於抗原-抗體複合物的結晶結構研究之方法（Al-lazikani等人, 1997 J. Molec. Biol. [分子生物學雜誌] 273: 927-948）。也可將該等方法、或其他方法組合而使用。

【0060】 本文中的單株抗體可以意指從基本上一致的抗體群體獲得的抗體。換句話說，在群體中含有的單獨的抗體係相同的，除了可能以少

量存在的天然的突變之外。單株抗體係針對單一抗原位點，並且極具特異性。此外，與靶向不同抗原或不同表位的典型的多株抗體相反，每種單株抗體靶向抗原的單個表位。修飾語「單株」表示從基本上一致的抗體群體獲得的抗體的特性，並且不應被理解為限於需要藉由特定方法來產生抗體的方式。

【0061】 根據本揭露之抗EphA4抗體可為小鼠抗體、嵌合抗體或人源化抗體。嵌合抗體係例如將非人（如小鼠或大鼠）抗體的可變區與人抗體的恆定區融合的抗體，例如可以指可變區來源於非人抗體且恆定區來源於人抗體的抗體。人源化抗體係例如將非人抗體的互補決定區（CDR（也可以稱為高變區））引入人抗體的抗體，並且例如可以指CDR來源於非人抗體且其餘抗體區來源於人抗體的抗體。請注意，嵌合抗體與人源化抗體的界限並非必須明確，並且抗體可以處於可稱為嵌合抗體或人源化抗體的狀態。此外，在嵌合抗體或人源化抗體中，來源於人抗體的抗體區（FR，恆定區）並非必須全部由來源於人抗體的胺基酸組成，並且可以包含來自非人抗體的一個或多個胺基酸，只要其可以正常用於人類受試者中。人源化抗體的一個實施方式係其中CDR來源於嚙齒動物抗體並且其餘抗體區來源於人抗體的抗體。人源化抗體的一個特定實施方式係其中CDR來源於小鼠抗體並且其餘抗體區來源於人抗體的抗體。在該等實施方式中，CDR可以包含來源於非嚙齒動物抗體的一個或多個胺基酸或來源於非小鼠抗體的一個或多個胺基酸，並且除CDR以外的抗體區可以包含來源於非人抗體的一個或多個胺基酸。此處，「多個」係但不限於2-20個，或2-15個（如14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個或2個）或胺基酸序列中胺基酸數目的10%以內、9%以內、8%

以內、7%以內、6%以內、5%以內、4%以內、3%以內、2%以內或1%以內。人源化可以用CDR移植之方法（Kontermann和Dubel, Antibody Engineering [抗體工程], Springer Lab Manual [施普林格實驗室手冊] (2001) 和Tsurushita等人, Methods [方法] 36: 69-83 (2005)）來進行，並且進一步，還可以藉由用相關技術領域中眾所周知之方法（參見例如Jones等人, Nature [自然] 321: 522-525 (1986)；Riechmann等人, Nature [自然] 332: 323-327 (1988)；和Verhoeyen等人, Science [自然] 239: 1534-1536 (1988)）將CDR序列取代為人抗體中的對應的序列來進行。

【0062】 為了降低抗原性，在製備人源化抗體後，選擇輕鏈和重鏈中的人可變區的使用可能是重要的。根據「最佳適配」法，嚙齒動物抗體的可變區序列針對已知人FR序列的整個文庫而篩選。接下來，接受與嚙齒動物序列最接近的人序列作為人源化抗體的人FR。參見例如Sims等人, J. Immunol. [免疫學雜誌] 151: 2296-2308 (1993) 和Chothia等人, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 196: 901-917 (1987)。在另一種方法中，使用來源於輕鏈或重鏈的特定亞組的所有人抗體中共有的序列的特定框架。幾種不同的人源化抗體可以使用相同的框架。參見例如Carter等人, Proc. Natl. Acad. Set USA [美國國家科學院院刊] 89: 4285-4289 (1992)和Presta等人, J. Immunol. [免疫學雜誌] 151: 2623-2632 (1993)。

【0063】 此外，通常理想的是人源化抗體保留對抗原的高結合親和力以及其他較佳的生物特性。為此，根據一種方法，藉由採用親本序列和人源化序列的三維模型，分析親本序列和多種概念性人源化產物之步驟而製備人源化抗體。通常，三維免疫球蛋白模型可以使用並且是熟悉該項技術者已知的。可以使用說明並展示所選候選免疫球蛋白序列的有前景的三

維構象的電腦程式。對該等展示的研究允許對殘基在候選免疫球蛋白序列功能中的可能作用進行分析，即對影響候選免疫球蛋白結合其抗原的能力的殘基進行分析。使用此方法，可從接受體和輸入序列中選擇FR殘基並組合使用，以實現理想的抗體特性，如增加與單個或多個靶抗原（如EphA4或其片段）的結合親和力。

【0064】 當然，在上文例示的嵌合或人源化抗體中具有適當改變（如抗體的修飾、或抗體的胺基酸序列的部分取代、添加或缺失）同時保持該抗體的功能（或者為了添加或改善該抗體的功能）的抗體也涵蓋在根據本揭露之抗EphA4抗體中。更具體地，為了修飾抗體的效應子功能而改變恆定區的胺基酸序列的抗體也包括在本揭露之範圍內。例如，為了降低抗體依賴性細胞毒性（ADCC）活性和/或抗體依賴性細胞吞噬作用（ADCP）活性等，一種具有將人IgG_2抗體234位（Eu編號）的纈胺酸（Val）取代為丙胺酸（Ala）並且具有將237位的甘胺酸（Gly）取代為丙胺酸（Ala）的抗體也包括在本揭露之範圍內。進而，具有根據本揭露之抗EphA4抗體的CDR序列的抗體結合位點連同與不同抗原結合的抗原結合位點的雙特異性抗體（Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97）也包括在本揭露之範圍中。

【0065】 根據本揭露之抗EphA4抗體可以根據需要進行修飾。抗EphA4抗體的修飾可為以下修飾，該修飾改變 (a) 如片層或螺旋構象等在待修飾區中的胺基酸序列的三維結構；(b) 靶位點的分子的電荷或疏水性狀態；或者 (c) 修飾對側鏈體積維持的影響，或者可為不會明顯觀察到該等變化的修飾。

【0066】 根據本揭露之抗EphA4抗體的修飾可以例如藉由組成胺基

酸殘基的取代、缺失、添加等實現。

【0067】本文中的胺基酸以其最廣泛的含義使用，不僅包括如絲胺酸（Ser）、天冬醯胺（Asn）、纈胺酸（Val）、白胺酸（Leu）、異白胺酸（Ile）、丙胺酸（Ala）、酪胺酸（Tyr）、甘胺酸（Gly）、離胺酸（Lys）、精胺酸（Arg）、組胺酸（His）、天冬胺酸（Asp）、麩胺酸（Glu）、麩醯胺酸（Gln）、蘇胺酸（Thr）、半胱胺酸（Cys）、甲硫胺酸（Met）、苯丙胺酸（Phe）、色胺酸（Trp）和脯胺酸（Pro）等天然胺基酸，也包括如胺基酸變體和衍生物等非天然胺基酸。熟悉該項技術者自然會理解，鑒於此廣泛的定義，例如L-胺基酸；D-胺基酸；如胺基酸變體和胺基酸衍生物等經化學修飾的胺基酸；在體內非蛋白質組分的胺基酸，如正白胺酸、β-丙胺酸和鳥胺酸；以及具有熟悉該項技術者眾所周知的胺基酸特性的經化學合成的化合物等被包括為本說明書的胺基酸。非天然胺基酸的實例可以包括，例如α-甲基胺基酸（如α-甲基丙胺酸）、D-胺基酸（如D-天冬胺酸和D-麩胺酸）、組胺酸樣胺基酸（如2-胺基-組胺酸、β-羥基-組胺酸、高組胺酸、α-氟甲基-組胺酸和α-甲基-組胺酸）、在側鏈具有多餘的亞甲基的胺基酸（「高」胺基酸）以及側鏈中的羧酸官能基胺基酸被磺酸基取代的胺基酸（如磺基丙胺酸）。

【0068】天然存在的胺基酸殘基可以例如基於一般的側鏈特性而分為以下幾組：

(1) 疏水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Asn、Gln、Cys、Ser、Thr；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 鹼性：His、Lys、Arg；

(5) 影響鏈取向的殘基：Gly、Pro；以及

(6) 芳族的：Trp、Tyr、Phe。

【0069】 構成抗體的胺基酸序列的非保守性取代可以藉由將屬於該等組之一的胺基酸與屬於另一組的胺基酸交換來進行。更具保守性的取代可以藉由將屬於該等組之一的胺基酸與同一組中的另一胺基酸交換來進行。類似地，也可以適當地進行胺基酸序列的缺失或取代。

【0070】 構成抗體的胺基酸的修飾可為例如藉由碳水化合物的糖基化或翻譯後修飾，例如乙醯化或磷酸化。抗體可以在其恆定區中的保守位置進行糖基化。抗體的糖基化通常為N-連接的或O-連接的。N-連接的意指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基的側鏈的結合。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸、天冬醯胺-X-蘇胺酸和天冬醯胺-X-半胱胺酸（其中X為除脯胺酸以外的任何胺基酸）為用於將碳水化合物部分酶促地添加到天冬醯胺側鏈的識別序列。當該等三肽序列中的一個存在於抗體中時，存在潛在的糖基化位點。O-連接的糖基化可以為N-乙醯基半乳胺糖、半乳糖或木糖與羥基胺基酸（如絲胺酸或蘇胺酸）的結合，並且在一些情況下可以為與5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸的結合。熟悉該項技術者可以根據目的，適當選擇糖基化條件（如用生物學方法進行糖基化時，宿主細胞或細胞培養基的類型、pH等）。

【0071】 根據本揭露之抗EphA4抗體可進一步基於熟悉該項技術者眾所周知的常見技術知識，藉由其他修飾方法單獨地或組合地進行修飾。

【0072】 根據本揭露之抗EphA4抗體可以藉由熟悉該項技術者眾所周知之方法產生。例如，可以藉由將編碼根據本揭露之抗EphA4抗體的核酸整合到表現載體、將表現載體引入宿主細胞並培養宿主細胞來產生抗

體。因此，本揭露涵蓋編碼抗EphA4抗體的核酸、包含該核酸的載體、包含該載體的宿主細胞以及包含培養宿主細胞之步驟的抗EphA4抗體之製作方法。

【0073】 編碼根據本揭露之抗EphA4抗體的核酸可以具有編碼訊息序列的DNA，或者可以具有在編碼重鏈可變區的DNA和編碼輕鏈可變區的DNA的5'末端編碼訊息序列的DNA。訊息序列係存在於蛋白質的N-末端的胺基酸殘基，該胺基酸殘基係分泌蛋白或整合膜蛋白在核糖體上合成後通過脂質雙層所必需的，並且在本揭露中，只要其係具有此功能的序列，不受特別限制。可以包含在根據本揭露之抗EphA4抗體中的訊息序列可以包括來源於人、小鼠、大鼠、兔、驢、山羊、馬、鳥、狗、貓、酵母等的訊息序列。具體地，在本揭露中，包含由SEQ ID NO. 12或16表示的胺基酸序列的肽可以被包括為與重鏈有關的訊息序列，並且包含由SEQ ID NO. 14或18表示的胺基酸序列的肽可以被包括為與輕鏈有關的訊息序列。此外，只要其在功能上係等同的，訊息序列可以具有由SEQ ID NO. 12或16表示的胺基酸序列和由SEQ ID NO. 14或18表示的胺基酸序列中的一個或多個（如2個、3個、4個或5個）胺基酸的取代、添加和/或缺失。

【0074】 根據本揭露之抗EphA4抗體可以根據熟悉該項技術者眾所周知之方法分離或純化。

【0075】 本文「分離的」或「純化的」意指從天然的狀態人工地進行分離或純化。如果分子或組成物天然存在，當它發生改變或自原來的環境中移除或兩者時為「分離的」或「純化的」。分離或純化方法的實例包括但不限於電泳、分子生物學、免疫學或層析方法等，具體地離子交換層析、疏水層析、反相HPLC層析、等電聚焦或鹼提法等。

【0076】 在一個實施方式中，抗EphA4抗體包含以下CDR：

(a) 由在SEQ ID NO. 44中所示的胺基酸序列組成的重鏈CDR1；

(b) 由在SEQ ID NO. 27中所示的胺基酸序列組成的重鏈CDR2；

(c) 由在SEQ ID NO. 28中所示的胺基酸序列組成的重鏈CDR3；

(d) 由在SEQ ID NO. 29中所示的胺基酸序列組成的輕鏈CDR1；

(e) 由在SEQ ID NO. 30中所示的胺基酸序列組成的輕鏈CDR2；以及

(f) 由在SEQ ID NO. 31中所示的胺基酸序列組成的輕鏈CDR3。

【0077】 在一個實施方式中，抗EphA4抗體係人源化抗體或嵌合抗體，並且在特定實施方式中是人源化抗體。

【0078】 在另一個實施方式中，抗EphA4抗體包含重鏈和輕鏈，該重鏈的可變區包含SEQ ID NO. 45中所示的胺基酸序列，並且該輕鏈的可變區包含SEQ ID NO. 46中所示的胺基酸序列。注意，在本實施方式中，重鏈的可變區和/或輕鏈的可變區可以包含在SEQ ID NO. 45中所示的胺基酸序列中和/或在SEQ ID NO. 46中所示的胺基酸序列中具有一個或多個胺基酸取代、添加和/或缺失的胺基酸序列。此處，「多個」沒有限制，只要其保留對EphA4的親和性並促進EphA4的切割，並且是2-15個或2-10個（如9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個或2個），或胺基酸序列中胺基酸數目的10%以內，如9%以內、8%以內、7%以內、6%以內、5%以內、4%以內、3%以內、2%以內或1%以內。

【0079】 在一個實施方式中，抗EphA4抗體的重鏈包含人IgG_2的恆定區。

【0080】 在特定實施方式中，人IgG_2的恆定區包含SEQ ID NO. 47的胺基酸序列。

【0081】 在一個實施方式中，抗EphA4抗體的輕鏈包含人Igκ的恆定區。

【0082】 在特定實施方式中，人Igκ的恆定區包含SEQ ID NO. 48的胺基酸序列。

【0083】 在一個實施方式中，抗EphA4抗體包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含SEQ ID NO: 59中所示的胺基酸序列並且該輕鏈包含SEQ ID NO: 60中所示的胺基酸序列。

【0084】 例如，在另一個實施方式中，出於減少抗體產生細胞產生的抗體的不均勻性等原因（美國專利申請公開號2010/0297697或Liu H等人, MAbs. 2014年9月-10月; 6 (5): 1145-1154），抗EphA4抗體的重鏈C末端（羧基末端）位置處的離胺酸之缺失。在本揭露中，具有重鏈的C末端離胺酸缺失的抗EphA4抗體還包括藉由遺傳修飾缺失重鏈的C末端離胺酸的抗EphA4抗體或藉由羧肽酶等翻譯後切割重鏈的C末端離胺酸的抗EphA4抗體等。此外，在本揭露中，重鏈的C末端離胺酸缺失的抗EphA4抗體不僅包括具有在兩條重鏈中缺失C末端離胺酸的抗EphA4抗體，而且還包括僅在一條重鏈中缺失C末端離胺酸的抗EphA4抗體。

【0085】 在一個方面，本揭露關於編碼抗EphA4抗體分離之核酸。編碼抗EphA4抗體的分離核酸係指編碼抗EphA4抗體的重鏈和/或輕鏈的一個或多個核酸分子。在一個實施方式中，根據本揭露之核酸編碼抗EphA4抗體之重鏈。在另一個實施方式中，根據本揭露之核酸編碼抗EphA4抗體之輕鏈。在另一個進一步的實施方式中，根據本揭露之核酸編碼抗EphA4抗體之重鏈和輕鏈。根據本揭露之核酸還包括編碼抗EphA4抗體重鏈的第一核酸分子和編碼抗EphA4抗體輕鏈之第二核酸分子。

【0086】 在另一方面，本揭露關於包含編碼抗EphA4抗體的分離核酸之載體。根據本揭露之載體係指包含編碼抗EphA4抗體的分離核酸之一個或多個載體。在一個實施方式中，根據本揭露之載體係包含編碼抗EphA4抗體重鏈的核酸和編碼抗EphA4抗體輕鏈的核酸之載體。在另一實施方式中，根據本揭露之載體係包含編碼抗EphA4抗體的重鏈和輕鏈的核酸之載體。在另一個進一步的實施方式中，根據本揭露之載體包含編碼抗EphA4抗體重鏈的核酸之第一載體和編碼抗EphA4抗體輕鏈的核酸之第二載體。根據本揭露之載體可為但不限於質體、黏粒、病毒、噬菌體等。例如，作為病毒載體，逆轉錄病毒、慢病毒、腺病毒、腺相關病毒或單純疱疹病毒載體等也包括在根據本揭露之載體中。

【0087】 在又另一方面，包含根據本揭露之載體的宿主細胞和包含培養該宿主細胞步驟的抗EphA4抗體之製作方法也包括在本揭露中。根據本揭露之宿主細胞可為但不限於大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢（CHO）細胞、NS0細胞等。在一個實施方式中，抗EphA4抗體之製作方法包括培養宿主細胞之步驟和從宿主細胞（或宿主細胞的培養基）回收分泌的抗EphA4抗體之步驟。

【0088】 在一個方面，本揭露關於包含抗EphA4抗體的醫藥組合物。根據本發明的醫藥組合物可以根據已知方法（如日本藥典（JP）、美國藥典（USP）或歐洲藥典（EP）中描述之方法等）製造。

【0089】 根據本揭露之抗EphA4抗體可用於治療阿茲海默氏症。換句話說，在其他方面，本揭露涵蓋用於治療阿茲海默氏症之方法，該方法包括向患有阿茲海默氏症的受試者施用治療有效量的抗EphA4抗體之步驟。此外，在其他方面，本揭露涵蓋抗EphA4抗體用於製造用於阿茲海默

氏症的治療藥物的用途。在其他方面，本揭露涵蓋用於在治療阿茲海默氏症中使用的抗EphA4抗體。

【0090】 根據本揭露之抗EphA4抗體可用於治療tau蛋白病變。換句話說，在其他方面，本揭露涵蓋用於治療tau蛋白病變之方法，該方法包括向患有tau蛋白病變的受試者施用治療有效量的抗EphA4抗體之步驟。此外，在其他方面，本揭露涵蓋抗EphA4抗體用於製造用於tau蛋白病變的治療藥物的用途。在其他方面，本揭露涵蓋用於在治療tau蛋白病變中使用的抗EphA4抗體。本揭露之tau蛋白病變包括阿茲海默氏症或具有tau病理學的額顳葉變性（FTLD-tau）。此外，具有tau病理學的額顳葉變性包括進行性核上神經麻痺症（PSP）、皮質基底節變性（CBD）、嗜銀顆粒失智（AGD）、神經原纖維纏結型老年失智（SD-NFT）、匹克症（PiD）等。

【0091】 根據本揭露之抗EphA4抗體可以在治療方法中單獨地或與其他藥劑或組成物組合地使用。例如，根據本揭露之抗EphA4抗體可以與另一種藥劑同時或不同時施用。這樣的組合療法包括組合施用（兩種或更多種藥劑包括在相同或不同的配製物中）和分開施用（如同時或順序）。當分開施用兩種或更多種藥劑時，根據本揭露之抗EphA4抗體的施用可以在伴隨治療方法之前或之後進行。

【0092】 施用根據本揭露之醫藥組合物的受試者並無限定，並且可以用於例如人或非人哺乳動物（如猴、小鼠、大鼠、兔、牛、馬和山羊）。

【0093】 向受試者施用根據本揭露之醫藥組合物之方法（如施用途徑、劑量、每天施用次數和施用時間）並無限定，並且可以由熟悉該項技

術者（如醫生）根據受試者的健康狀態、疾病的程度、組合使用的藥劑的類型等適當地決定。

【0094】 熟悉該項技術者應認識到，只要技術上不矛盾，本發明可以在本文中所述之所有方面中的任何一個或多個適當地組合以實施本發明。此外，熟悉該項技術者應當認識到，只要技術上不矛盾，則應該較佳的是將本文中所述之所有較佳或有利的方面適當地組合以實施本發明。

【0095】 本文中所引用的文獻的全部揭露應被認為藉由引用而明確地引用在本文中，並且熟悉該項技術者可以根據本文的上下文在不脫離本發明的精神和範圍情況下藉由引用該等文獻作為本說明書的一部分來理解該等文獻中相關之揭露內容。

【0096】 本文中所引用的文獻僅是為了揭露本申請的申請日前的相關技術而提供，不應解釋為諸位發明人由於先前發明或任何其他理由而承認不具有先行於所述揭露內容之權利。所有該等文獻的全部描述係基於諸位申請人可獲取的資訊，並且不以任何方式構成承認該等描述內容正確。

【0097】 本文所用的術語係用於描述特定實施方式，並非意在限定本發明。

【0098】 除非上下文明確地表明以另外的方式理解，本文所使用的術語「包含（comprise）」意指存在所描述的項目（例如組分、步驟、要素或數字），不排除存在其他項目（例如組分、步驟、要素和數字）。術語「由.....組成（consist of）」涵蓋以術語「由.....組成（consist of）」和/或「基本上由.....組成（consist essentially of）」所描述的方面。

【0099】 如本文所使用的術語「中和活性」意指抑制EphA4與其配

位基之間的結合的活性，和/或抑制人體內由於EphA4與其配位基結合而誘導的細胞的訊息傳遞或分子表現應答或功能改變之活性。

【0100】 除非另外定義，本文所使用的全部術語（包括技術術語及科學術語）具有與本發明所屬的技術領域的普通技術人員廣泛理解的含義相同之含義。除非另有明確定義，本文所使用的術語應解釋為具有與本文和相關技術領域中的含義一致的含義，不應解釋為具有理想化或過於正式的含義。

【0101】 例如第一和第二的術語係用於表現各種要素，並且應該認識到該等要素不受該等術語本身的限定。該等術語僅用於將要素與其他要素區分，例如可於不脫離本發明的範圍的情況下將第一要素記為第二要素，同樣地，將第二要素記為第一要素。

【0102】 除非明確指出，本文中用以表示組分含量或數值範圍等的數值應理解為以術語「約」修飾。例如，「4℃」，除非明確指出，否則理解為意指「約4℃」，並且顯而易見的是，熟悉該項技術者可以依照技術常識和本文段落的含義合理地理解其範圍。

【0103】 除非上下文明確地表示其他含義，當在本文的說明書和申請專利範圍中使用時，應認識到以單數形式表示的各方面只要技術上不矛盾也可為複數形式，反之亦然。

【0104】 現在將參考實例更詳細地描述本發明。然而，本發明可以藉由各種方面來體現，不應解釋為限於本文中所描述的實例。相關技術領域的熟悉該項技術者可於不變更本發明的精神或範圍的情況下伴隨各種修飾、添加、缺失、取代等而實施本發明。

實例

【0105】 參考實例1：抗EphA4單株抗體的製備

(A) 小鼠抗EphA4單株抗體的製備

為了製備與小鼠EphA4（登錄號NP_031962.2，SEQ ID NO. 1）結合的單株抗體，藉由以下步驟製備含有融合至小鼠EphA4的胞外區（位置20-547）（SEQ ID NO. 2）的分泌型鹼性磷酸酶（SEAP）和組胺酸標籤的蛋白（在下文被稱為「小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白，」SEQ ID NO. 3）。

【0106】 首先，使用來源於小鼠的腦總RNA藉由RT-PCR擴增編碼小鼠EphA4的訊息序列（SEQ ID NO. 4）和胞外區（SEQ ID NO. 2）的DNA序列，並選殖到具有編碼SEAP和組胺酸標籤的DNA序列的pENTR1A載體（英傑公司/生命技術公司）的Sal I/Not I位點。然後，將編碼小鼠EphA4的訊息序列和胞外區、SEAP和組胺酸標籤的DNA序列藉由Gateway系統（英傑公司/生命技術公司）的LR反應轉移至pcDNA 3.1_rfcB載體以構建pcDNA 3.1-小鼠EphA4胞外區-SEAP-His表現載體。藉由TransIT-LT1（寶生物公司（TAKARA）），將構建的pcDNA 3.1-小鼠EphA4胞外區-SEAP-His表現載體轉染到HEK293 EBNA細胞（英傑公司/生命技術公司）。孵育（5% CO_2，37℃）6天後，回收培養上清。用Protino柱（MACHEREY-NAGEL）從回收的培養上清中純化小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白（SEQ ID NO. 3）。

【0107】 將二十微克的小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白與同量的TiterMax Gold佐劑（TiterMax USA）或GERBU佐劑（GERBU Biotechnik GmbH）混合，皮下注射至Balb/c小鼠的足墊。然後，在第3天、第7天和第10天，類似地給予小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白。此

處，TiterMax Gold佐劑（TiterMax USA）只在第10天使用，並且GERBU佐劑（GERBU Biotechnik GmbH）在第3天、第7天和第10天使用。在第13天處死小鼠，回收周圍淋巴結以製備淋巴結細胞。將製備的淋巴結細胞和P3U1骨髓瘤細胞（由京都大學捐贈）於GenomeONE-CF（石原產業株式會社）的存在下以5：1的比率融合。將融合細胞在96孔塑膠板中培養。孵育（5% CO_2，37℃）7天後，回收培養上清。

【0108】 採用獲得的培養上清，選取針對小鼠、大鼠和人EphA4具有反應性的孔。

【0109】 用ELISA和蛋白評估針對小鼠、大鼠和人EphA4的反應性（該蛋白具有融合到小鼠EphA4的胞外區、大鼠EphA4的胞外區（位置20-547）（Genbank登錄號NP_001155883.1），或人類EphA4（Genbank登錄號NP_004429.1，SEQ ID NO. 5）的胞外區（位置20-547）（SEQ ID NO.6）的人IgG_1的Fc區域和組胺酸標記（在下文分別被稱為「小鼠EphA4胞外區-Fc-His蛋白」、「大鼠EphA4胞外區-Fc-His蛋白」或「人類EphA4胞外區-Fc-His蛋白」））。

【0110】 小鼠、大鼠或人EphA4胞外區-Fc-His蛋白藉由以下步驟製備。最初，構建pcDNA 3.1-小鼠、大鼠或人EphA4胞外區-Fc-His表現載體。首先，使用來源於小鼠、大鼠或人的腦的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼小鼠、大鼠或人EphA4訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到具有編碼Fc和組胺酸標籤的DNA序列的pENTR1A載體（英傑公司/生命技術公司）的Sal I/Not I位點。然後，將編碼小鼠、大鼠或人EphA4的訊息序列和胞外區、Fc和組胺酸標籤的DNA序列藉由Gateway系統（英傑公司/生命技術公司）的LR反應轉移至pcDNA 3.1_rfcB載體以構建pcDNA 3.1-小

鼠、大鼠、人EphA4胞外區-Fc-His表現載體。用TransIT-LT1（寶生物公司），將該等構建的表現載體轉染到HEK293 EBNA細胞（英傑公司/生命技術公司）。孵育（5% CO_2，37℃）6天後，回收培養上清。

【0111】 ELISA採用小鼠、大鼠或人EphA4胞外區-Fc-His蛋白按照以下步驟進行。將抗人IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室（Jackson Immuno Research Laboratories））塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1 x 封閉ACE（Dainippon Seiyaku）將孔在室溫下封閉一小時。用0.02% Tween 20/PBS洗滌三次後（Nacalai Tesque公司），將包含小鼠、大鼠或人EphA4胞外區-Fc-His蛋白的培養上清添加到每孔中（終濃度1 nM），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將融合細胞的培養上清添加到每孔中。在室溫下孵育一小時並洗滌三次後，添加辣根過氧化物酶標記的抗小鼠IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司（Sigma））溶液添加到每孔中，並將其在室溫下孵育5-20分鐘。將等量的終止溶液（2N H_2SO_4，瓦科純化工公司（Wako Pure Chemical））添加到每孔中，並用酶標儀（珀金埃爾默公司（PerkinElmer））讀取450 nm處的吸光度。

【0112】 藉由有限稀釋法從藉由以上步驟選取出的孔中殖株雜交瘤，並最終獲得表現具有針對小鼠、大鼠和人EphA4的結合活性的小鼠抗EphA4抗體的雜交瘤殖株。

【0113】 培養獲得的雜交瘤殖株，從培養上清中用蛋白A（通用醫療集團（GE Healthcare））純化小鼠抗EphA4單株抗體。

【0114】 (B) EphA4切割增強活性的評價

按照以下步驟進行大鼠海馬神經元的製備。在妊娠的第18天，從大鼠取出胎鼠（日本查理斯河實驗室（Charles River Laboratories Japan）），並切開頭部取出腦。在立體顯微鏡下切出海馬區，放入消化液（137 mM NaCl（瓦科純化工公司）、5 mM KCl（瓦科純化工公司）、7 mM Na_2HPO_4（瓦科純化工公司）、25 mM Hepes（同仁化學研究所（DOJINDO））、0.5 mg/mL DNase（西格瑪公司）和0.25%胰蛋白酶（生命技術公司））中，在37℃下振盪10分鐘。去除溶液，添加20%胎牛血清/Hanks緩衝液（西格瑪公司）。將溶液去除，用Hanks緩衝液洗滌兩次後，將海馬組織移液到Hanks緩衝液中以製備細胞懸液。將細胞接種到96孔培養皿中（福爾肯公司（Falcon）），該培養皿已用包含聚L-離胺酸的培養液（神經元基礎培養基（生命技術公司），1 x B-27補充劑（生命技術公司）和0.5 mM L-麩醯胺酸（生命技術公司））塗佈。

【0115】按照以下步驟，採用海馬神經元進行EphA4切割增強活性的評估。用抗EphA4單株抗體（67 nM）和γ選擇酶抑制藥物化合物E（50 nM，恩佐生命科學公司（Enzo Life Sciences））處理接種到96孔培養皿（福爾肯公司）中的大鼠海馬神經元。十六小時後，用PBS（瓦科純化工公司）洗滌，將SDS樣本緩衝液（利姆裡樣本緩衝液（Laemmli sample buffer）（伯樂公司（Bio-Rad））和5% 2-巰基乙醇（伯樂公司））添加以回收的細胞，並將其煮沸5分鐘。用該樣本進行SDS-PAGE，用抗EphA4單株抗體（亞諾法公司（Abnova））進行蛋白質印跡，定量帶的強度，計算EphA4 C末端片段/EphA4全長的值。

【0116】獲得了具有促進EphA4（抗體A）切割活性的小鼠抗EphA4單株抗體。用單株抗體分型套組（kit）（Serotec公司）測定抗體

A的同種型為：對於重鏈IgG_1，對於輕鏈κ。

【0117】(C) 抗體A的序列分析

藉由5'-RACE（cDNA末端的5'-快速擴增）方法擴增編碼抗體A的訊息序列以及重鏈和輕鏈可變區的DNA序列。使用RNeasy套組（凱傑公司（QIAGEN））由雜交瘤製備總RNA，並利用DNA酶（凱傑公司，無RNA酶的DNA酶組）處理。用cDNA合成套組（寶生物公司）從總RNA製備雙股cDNA。向cDNA上添加藉由寡DNA ad29S（ACATCACTCCGT）（SEQ ID NO. 7）和寡DNA ad29AS（ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT）（SEQ ID NO. 8）的退火獲得的5'銜接子。擴增獲得的cDNA，其中5'正向引物（5'-PCR4引物，AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG（SEQ ID NO. 9））和3'反向引物（GCCAGTGGATAGACTGATGG（SEQ ID NO. 10）用於擴增小鼠IgG重鏈，且GATGGATACAGTTGGTGCAGC（SEQ ID NO. 11）用於擴增小鼠Igκ輕鏈）。將擴增的cDNA插入pCR2.1載體（英傑公司/生命技術公司）中。用ABI 3130XL對抗體A的基因序列進行分析。作為本分析鑑定的抗體A基因序列編碼的胺基酸序列，重鏈訊息序列為SEQ ID NO. 12所示的序列，重鏈可變區為SEQ ID NO. 13所示的序列，輕鏈訊息序列為SEQ ID NO. 14所示的序列，並且輕鏈可變區係SEQ ID NO. 15所示的序列。作為編碼抗體A基因序列的核苷酸序列，重鏈訊息序列為SEQ ID NO. 16所示序列，重鏈可變區為SEQ ID NO. 17所示序列，輕鏈訊息序列為SEQ ID NO. 18所示序列，並且輕鏈可變區係SEQ ID NO. 19所示的序列。

【0118】使用以下步驟獲得抗體A的重鏈和輕鏈的全長序列。使用RNeasy套組（凱傑公司（QIAGEN））由雜交瘤製備總RNA，並利用DNA酶（凱傑公司，無RNA酶的DNA酶組）處理。用RNA-PCR套組（寶生物公司）從總RNA製備逆轉錄產物。採用獲得的逆轉錄產物為模板，用5'正向引物（GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTGTCCTGGTGCTGCTCC（引物ID 7455）（SEQ ID NO. 20）用於重鏈的擴增，GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTTCCTGCTCACG（引物ID 7453）（SEQ ID NO. 21）用於輕鏈的擴增）和3'反向引物（GCGGAATTCATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC（引物ID 7257）（SEQ ID NO. 22）用於重鏈的擴增，CGCGAATTCACTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC（引物ID 7249）（SEQ ID NO. 23）用於輕鏈的擴增）對編碼抗體A重鏈和輕鏈的基因序列用PCR擴增，並分別選殖到pEE6.4和pEE12.4載體（龍沙集團（Lonza））中。使用ABI3130XL對基因序列進行分析。作為本分析鑑定的抗體A基因序列編碼的胺基酸序列，重鏈恆定區序列為SEQ ID NO. 24所示的序列，並且輕鏈恆定區序列為SEQ ID NO. 25所示的序列。

【0119】抗體A的CDR用以下方法測定。根據Kabat編號系統使用Abysis軟體（UCL）對抗體A的胺基酸序列進行編號。基於此編號，根據用於CDR鑑定的Kabat定義來做出決定。抗體A的CDR的胺基酸序列如表1所示。

[表1]

抗體A的CDR的胺基酸序列

名稱	序列
重鏈CDR1	RYGVH（SEQ ID NO. 26）
重鏈CDR2	VIWRGGSTDYNAAFMS（SEQ ID NO. 27）
重鏈CDR3	ESLFGVYYDYGYYSMDY（SEQ ID NO. 28）
輕鏈CDR1	RASQEISGYLS（SEQ ID NO. 29）
輕鏈CDR2	AASTLDS（SEQ ID NO. 30）
輕鏈CDR3	LQYASYPLT（SEQ ID NO. 31）

【0120】 參考實例2：抗EphA4單株抗體針對小鼠和人EphA4的結合親和力

抗體A針對小鼠和人EphA4的結合親和力藉由表面電漿共振（SPR方法）採用Biacore T200（通用醫療集團）測定。首先，將抗His抗體（通用醫療集團，28-9950-56）固定到感測片CM5上。藉由採用N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）和N-乙基-N'-（3-二甲基胺基丙基）碳二亞胺鹽酸鹽（EDC）的胺偶合法固定，採用乙醇胺用於封閉（感測片和固定試劑均來自通用醫療集團）。用固定緩衝液（10 mM乙酸鈉，pH 4.5）將其稀釋至3.5 μg/mL，並根據附於Biacore T200的方案固定在感測片上。用運行緩衝液HBS-EP（通用醫療集團，BR-1001-88）稀釋小鼠或人EphA4細胞外區-SEAP-His10，並將溶液送至流動池中120秒進行捕獲（捕獲量約10 RU）。隨後，用HBS-EP將抗體A連續稀釋至100、50、25、12.5、6.3、3.2、1.6和0 nM範圍，加入至感測片120秒，依次觀察加入時（結合期，120秒）和加入完成後（解離期，600秒）的結合反應曲線。每次觀察完

成後，加入4 M $MgCl_2$（60秒，瓦科純化工公司）以再生感測片。採用系統附帶的BIA評價軟體，藉由1：1結合模型對得到的結合反應曲線進行擬合分析，計算出針對小鼠和人EphA4的結合親和力（KD = kd/ka）。

【0121】 抗體A針對小鼠和人EphA4的結合親和力（KD值）分別為1.32 x 10^{-9} M和1.19 x 10^{-9} M（圖1）。其他針對小鼠和人EphA4的結合參數在程度上幾乎相同。因此，認為抗體A對小鼠和人的EphA4具有相同程度的結合親和力。

【0122】 參考實例3：抗EphA4單株抗體在海馬神經元中的EphA4切割增強活性

對於抗體A，按照以下步驟，採用海馬神經元進行EphA4切割增強活性的評估。用抗體A（2.0，6.7和20 nM）和γ選擇酶抑制藥物化合物E（50 nM，恩佐生命科學公司）處理接種於96孔培養皿（福爾肯公司）的大鼠海馬神經元。二十四小時後，用PBS（瓦科純化工公司）洗滌，將SDS樣本緩衝液（利姆裡樣本緩衝液（伯樂公司）和5% 2-巰基乙醇（伯樂公司））添加以回收的細胞，並將其煮沸5分鐘。用該樣本進行SDS-PAGE，用抗EphA4單株抗體（亞諾法公司）進行蛋白質印跡，定量帶的強度，計算EphA4 C末端片段/EphA4全長的值。

【0123】 抗體A濃度依賴性地增強在海馬神經元中的EphA4切割反應（圖2）。

【0124】 參考實例4：抗-EphA4單株抗體的小鼠EphA4-小鼠配位基結合抑制活性

對於抗體A，按照以下步驟進行小鼠EphA4與小鼠配位基結合的抑制活性的評估。將抗鹼性磷酸酶抗體（賽默科技公司（Thermo

SCIENTIFIC））塗佈在96孔板（Nunc公司）的孔中。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司（DS Pharma Biomedical））將孔在室溫下封閉一小時。用0.02% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將小鼠EphA4細胞外區-SEAP-His蛋白添加到孔中（最終濃度10 nM），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將配位基和抗體A（0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000和3000 nM）添加到孔中。應注意生物素化的小鼠Ephrin A1-Fc嵌合體（R & D系統公司（R & D Systems），終濃度6 nM）和生物素化小鼠Ephrin B2-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度2.5 nM）被用作配位基。在室溫下孵育一小時並洗滌三次後，添加辣根過氧化物酶標記的鏈黴親和素（通用醫療集團），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並將其在室溫下孵育2分鐘。將等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）添加到孔中，並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0125】 抗體A濃度依賴性地抑制小鼠EphA4與小鼠配位基的結合，針對小鼠肝配蛋白A1和肝配蛋白B2結合的IC_{50}值分別為約5.9 nM和3.1 nM（圖3）。因此，表明抗體A強烈抑制小鼠EphA4與配位基的結合。

【0126】 參考實例5：抗-EphA4單株抗體的人EphA4-人配位基結合抑制活性

對於抗體A，按照以下步驟評估人EphA4與人配位基結合的抑制活性。將抗鹼性磷酸酶抗體（賽默科技公司）塗佈在96孔板（Nunc公司）的孔中。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將

孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將人EphA4細胞外區-SEAP-His蛋白添加到孔中（最終濃度10 nM），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將配位基和系列稀釋的抗體A（0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000和3000 nM）添加到孔中。應注意生物素化的人Ephrin A5-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度0.7 nM）和生物素化人Ephrin B3-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度2.3 nM）被用作配位基。在室溫下孵育一小時並洗滌三次後，添加辣根過氧化物酶標記的鏈黴親和素（通用醫療集團），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並將其在室溫下孵育2-5分鐘。將等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）添加到孔中，並用酶標儀（分子器件公司（Molecular Devices）或珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0127】 抗體A濃度依賴性地抑制人EphA4與人配位基的結合，針對人肝配蛋白A5和肝配蛋白B3結合的IC_{50}值分別為約2.8 nM和1.4 nM（圖4）。因此，表明抗體A也強烈抑制人EphA4與人配位基的結合。

【0128】 參考實例6：抗EphA4單株抗體針對人Eph受體的選擇性

按照參考實例1中所述之製備小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白之方法，用來源於組織的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼每個人Eph受體（EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、和EphB6）的訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到含有編碼SEAP和組胺酸標籤的DNA序列的pENTR1A載體（英傑公司/生命技術公司）中。然後，將編碼每個

人Eph受體的訊息序列和胞外區、SEAP和組胺酸標籤的DNA序列藉由Gateway系統（英傑公司/生命技術公司）的LR反應轉移至pcDNA 3.1_rfcB載體，以構建表現具有與每個人Eph受體的胞外區融合的SEAP和His標籤的蛋白（稱為「Eph受體胞外區-SEAP-His蛋白」）的載體（稱為「Eph受體胞外區-SEAP-His蛋白表現載體」）。

【0129】 然後，用Expi293表現系統（吉布科公司（Gibco）/賽默飛世爾公司（ThermoFisher））將每個人-SEAP-His蛋白表現載體的Eph受體胞外區引入Expi293F細胞（吉布科公司/賽默飛世爾公司）。培養（5% CO2，37℃，120 rpm）5天後，回收培養上清，並將其在室溫下以1500 rpm離心5分鐘。將離心上清用0.45 μm濾器過濾（密理博公司（Millipore））。

【0130】 對於抗體A，按照以下步驟評估人Eph受體的結合活性。

將兔抗6-His抗體（貝斯實驗室（Bethyl Laboratories））塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將人-SEAP-His蛋白（終濃度1 nM）的每個Eph受體胞外區接種到每個孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將人IgG溶液（100 μg/mL，三菱藥物公司（Mitsubishi Pharma Corporation））和抗體A（10 μg/mL）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的驢抗小鼠IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中，

並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0131】 在人類Eph受體家族中，抗體A僅對人類EphA4具有特異性結合活性（圖5）。

【0132】 參考實例7：抗EphA4單株抗體針對小鼠Eph受體的選擇性

按照根據參考實例1製備EphA4胞外區-Fc-His蛋白之方法，用來源於組織的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼每個小鼠Eph受體（EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、和EphB6）的訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到具有編碼人IgG_1的Fc區和組胺酸標籤的DNA序列的pENTR1A載體（英傑公司/生命技術公司）中。然後，將編碼每個小鼠Eph受體的訊息序列和胞外區、Fc和組胺酸標籤（EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、和EphB6）的DNA序列藉由Gateway系統（英傑公司/生命技術公司）的LR反應轉移至pcDNA 3.1_rfcB載體，以構建每個小鼠Eph受體的胞外區-Fc-His蛋白表現載體。在小鼠EphA2-Fc-His蛋白胞外區表現載體的構建中，用來源於組織的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼小鼠EphA2的訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到含有編碼Fc和組胺酸標籤的DNA序列的pcDNA 3.1載體中以構建小鼠EphA2胞外區-Fc-His蛋白表現載體。

【0133】 然後，用Expi293表現系統（吉布科公司/賽默飛世爾公司）將每個小鼠Eph受體胞外區-Fc-His蛋白表現載體引入Expi293F細胞（吉布科公司/賽默飛世爾公司）。培養（5% CO2，37℃，120 rpm）5天後，回收培養上清，並將其在室溫下以1500 rpm離心5分鐘。將離心上

清用0.45 μm濾器過濾（密理博公司）。

【0134】 對於抗體A，按照以下步驟評估小鼠Eph受體的結合活性。

將兔抗6-His抗體（貝斯實驗室）塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將每個小鼠Eph受體胞外區-Fc-His蛋白（終濃度1 nM）接種在每個孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將人IgG溶液（100 μg/mL，西格瑪公司）和抗體A（10 μg/mL）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的驢抗小鼠IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中，並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0135】 在小鼠Eph受體家族中，抗體A僅對小鼠EphA4具有特異性結合活性（圖6）。

【0136】 參考實例8：抗EphA4單株抗體針對小鼠、大鼠、猴和人EphA4的反應性

按照以下步驟製備小鼠、大鼠、猴和人EphA4胞外區-Fc-His蛋白。首先，按照根據參考實例1製備EphA4胞外區-Fc-His蛋白之方法，構建猴EphA4胞外區-Fc-His蛋白表現載體。用於載體構建的猴EphA4的胺基酸序列如SEQ ID NO. 32所示，並且其胞外區如SEQ ID NO. 33所示。採用猴EphA4胞外區-Fc-His蛋白表現載體以及參考實例1中所述之小鼠、大鼠

和人EphA4胞外區-Fc-His蛋白表現載體製備各種EphA4胞外區-Fc-His蛋白。

【0137】 對於抗體A，按照以下步驟評估與各種EphA4胞外區的結合活性。

將驢抗人IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室）塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將小鼠、大鼠、猴和人EphA4胞外區-Fc-His蛋白（終濃度1 nM）接種於孔中，並將此在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將人IgG溶液（100 μg/mL，三菱藥物公司）和抗體A（0、0.00013、0.00064、0.0032、0.016、0.08、0.4、2和10 μg/mL）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的驢抗小鼠IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中，並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0138】 抗體A在所有小鼠、大鼠、猴和人EphA4中具有等同的結合活性（圖7）。

【0139】 參考實例9：抗EphA4單株抗體針對人EphA4胞外區、配位基結合結構域、纖網蛋白III型結構域1、纖網蛋白III型結構域2的反應性

按照以下步驟製備具有人EphA4胞外區（ECD）、配位基結合結構域（LBD）、纖網蛋白III型結構域1（FN1）或纖網蛋白III型結構域2

（FN2）與麥芽糖結合蛋白（MBP）和組胺酸標籤融合的蛋白質（在下文被稱為「人EphA4胞外區-MBP-His蛋白、」「人EphA4配位基結合結構域-MBP-His蛋白」、「人EphA4纖網蛋白III型結構域1-MBP-His蛋白」和「人EphA4纖網蛋白III型結構域2-MBP-His蛋白」）。最初，構建了pcDNA 3.4人EphA4胞外區、配位基結合結構域、纖網蛋白III型結構域1或纖網蛋白III型結構域2-MBP-His表現載體。首先，藉由PCR擴增人EphA4的訊息序列（SEQ ID NO. 34）或前原胰蛋白酶的訊息序列（SEQ ID NO. 35）及編碼人EphA4各結構域的DNA序列，並選殖到具有編碼MBP和組胺酸標籤的DNA序列的pcDNA 3.4載體（英傑公司/生命技術公司）中，以構建人EphA4胞外區-MBP-His蛋白、人EphA4配位基結合結構域-MBP-His蛋白、人EphA4纖網蛋白III型結構域1-MBP-His蛋白，以及人EphA4纖網蛋白III型結構域2-MBP-His蛋白表現載體。用於載體構建的人EphA4的胺基酸序列如SEQ ID NO. 5所示，其胞外區如SEQ ID NO. 36所示，配位基結合結構域如SEQ ID NO. 37所示，纖網蛋白III型結構域1如SEQ ID NO. 38所示，並且纖網蛋白III型結構域2如SEQ ID NO. 39所示。以上表現載體用Expi293表現系統（賽默科技公司）轉染到Expi293F細胞（賽默科技公司）中。4天後，回收培養上清，並通過0.45 μm濾器（密理博公司）。用直鏈澱粉樹脂（NEB）進行粗純化，並將緩衝液用Zeba旋轉脫鹽柱（賽默科技公司）取代為PBS（瓦科純化工公司公司）。將單體級分用Superdex 200 10/300（通用醫療集團）進行了差異純化。

【0140】 對於抗體A，按照以下步驟評估與人EphA4中各種結構域的結合活性。

將兔抗6-His抗體（貝斯實驗室）塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔

上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.02% Tween 20/PBS（Nacalai Tesque公司）洗滌兩次後，將人EphA4胞外區-MBP-His蛋白、人EphA4配位基結合結構域-MBP-His蛋白、人EphA4纖網蛋白III型結構域1-MBP-His蛋白和人EphA4纖網蛋白III型結構域2-MBP-His蛋白（終濃度10 nM）接種於孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將抗體A（終濃度10 nM）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的山羊抗小鼠IgG Fcγ片段抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌五次後，將TMB溶液（KPL）添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（2 N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中。用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm和650 nm處的吸光度。

【0141】 抗體A對人EphA4胞外區（ECD）和配位基結合結構域（LBD）具有結合活性（圖8）。對纖網蛋白III型結構域1（FN1）和纖網蛋白III型結構域2（FN2）無反應。因此，發現抗體A特異性結合人EphA4胞外區的配位基結合結構域。

【0142】 參考實例10：抗EphA4單株抗體對增加海馬神經元中棘突的數目的作用

如在以上參考實例1（B）中該製備大鼠海馬神經元。採用核轉染（Nucleofector）（龍沙集團）將EGFP基因引入大鼠海馬神經元，與未引入基因的大鼠海馬神經元混合，並接種於含有塗有聚-L-離胺酸的蓋玻片（松浪玻璃工業（Matsunami Glass Industries））的24孔板（福爾肯公司）中。

【0143】 按照以下步驟採用大鼠海馬神經元進行棘突計數。將接種於24孔板（福爾肯公司）（含有塗有聚-L-離胺酸的蓋玻片（松浪玻璃工業））中的培養第13天的引入EGFP的大鼠海馬神經元用對照抗體（小鼠IgG_1；百進生技公司（BioLegend））或抗體A（6.7和20 nM）處理24小時。然後將蓋玻片轉移至2% PFA（瓦科純化工公司）/4%蔗糖（瓦科純化工公司）/PBS中，並將其靜置20分鐘以固定細胞。在去除固定液並用PBS洗滌細胞三次後，添加0.25% Triton X-100（瓦科純化工公司）/PBS，並進行細胞透化15分鐘。去除溶液，將蓋玻片轉移至2% BSA（西格瑪公司）/0.25% Triton X-100/Opti-MEM（吉布科公司）中，並封閉一小時，然後允許抗GFP抗體（Nacalai Tesque公司）反應1.5小時。去除第一抗體溶液並用PBS洗滌三次後，允許第二抗體反應一小時。去除第二抗體溶液並用PBS洗滌三次後，添加Prolong Gold抗螢光衰減封片劑（antifade reagent）（分子探針公司（Molecular probes））進行封片，並用LSM800（蔡司公司（ZEISS））進行觀察。上述實驗進行三次，並且對於每次實驗，從兩個蓋玻片中提取神經元，用圖像分析軟體Imaris®（Bitplane）計數每個樹突上的棘突，並計算每個神經元每10 μm的棘突數目。

【0144】 抗體A增加了海馬神經元中的棘突數目（圖9）。此結果顯示抗體A具有穩定海馬神經元中棘突的活性。

【0145】 參考實例11：抗EphA4單株抗體對於抑制體內tau磷酸化的作用

按照以下步驟採用tau轉基因小鼠（rTg4510）評估抑制體內tau磷酸化的作用。Tau轉基因小鼠（rTg4510）從20至26週齡每週皮下施用抗體

A或對照抗體兩次，該對照抗體藉由常規方法以每次100 mg/kg（10 mL/kg）的劑量用二硝基苯酚（小鼠抗二硝基苯酚抗體）進行免疫製備。最後一次施用後3.5天，用2%異氟醚（英特威公司（Intervet））和三種類型麻醉藥物（4.0 mg/kg的咪達唑侖（安斯泰來製藥（Astellas Pharma）、0.3 mg/kg的美托咪定（日本全藥工業株式會社）和5.0 mg/kg的Vetorphale（明治制果藥業（Meiji Seika Pharma））的混合進行麻醉，用含有3單位/mL肝素（味之素公司（Ajinomoto））和1%磷酸酶抑制劑混合物（Nacalai Tesque公司）的PBS（瓦科純化工公司）在麻醉下進行灌注，並切除腦半球。在4℃固定收集的腦半球，同時在2%的多聚甲醛（TAAB）/0.1 M磷酸鹽緩衝液（瓦科純化工公司）中振盪過夜。腦半球被20%蔗糖（瓦科純化工公司）/0.1 M磷酸鹽緩衝液（瓦科純化工公司）並且隨後25%蔗糖/0.1 M磷酸鹽緩衝液（瓦科純化工公司）取代，並且然後包埋在組織-Tek O.C.T.化合物（櫻花精密技術日本公司（Sakura Finetek Japan））/25%蔗糖中並用液氮冷凍。切片用恆冷箱CM1860（萊卡公司（Leica））以7 μm的厚度產生，黏附在載玻片（武土純藥公司（Muto Pure Chemicals））上，用冷空氣風乾，並且然後放入密封袋中，並在-80℃下儲存。將用於免疫染色的載玻片解凍，用冷空氣風乾，並且然後用PBS（瓦科純化工公司）洗滌，浸入1% BSA（西格瑪公司）/10%正常驢血清（傑克遜免疫研究實驗室）/0.5% Triton X-100（瓦科純化工公司）/PBS溶液中，並進行一小時的封閉，之後允許抗磷酸化tau抗體AT8（Fujirebio Europe N.V.公司）在常溫下反應過夜。用PBS洗滌三次後，允許第二抗體反應一小時。用PBS洗滌三次後，將Prolong Gold抗螢光衰減封片劑（分子探針公司）置於載玻片上並封片，並用LSM700

（ZEISS）進行觀察。用圖像分析軟體ImageJ測量海馬CA1輻射層AT8陽性訊號面積，並計算AT8陽性訊號面積針對總面積的比例。

【0146】 抗體A降低了海馬CA1區磷酸化tau的訊號（圖10）。此結果顯示抗體A具有抑制tau轉基因小鼠（rTg4510）中tau病理學進展的活性。

【0147】 參考實例12：藉由X射線結晶結構分析對EphA4配位基結合結構域（EphA4-LBD）進行的表位作圖

按照以下步驟製備抗體A-Fab。將101.1 mg的抗體A溶解於0.1 M磷酸鈉緩衝液（pH 7.0）中，該緩衝液包含30 mM L-半胱胺酸和濃度為15 mg/mL的2 mM EDTA。在此抗體溶液中，以1/200的量向抗體中添加木瓜蛋白酶（西格瑪公司），並在37℃下酶消化18小時。將抗體A酶消化液用PBS透析，並藉由離心去除沈澱（產生的沈澱再溶解於PBS中，並與離心上清混合）。然後，為了去除抗體A-Fab以外的雜質，進行以下步驟。

1) 藉由蛋白A柱純化

將酶消化溶液應用於用PBS平衡的2 mL ProSep vA高容量（密理博公司）中，並回收通過級分和PBS洗滌級分。

2) 採用抗人IgG Fcγ抗體的親和純化

根據此瓊脂糖的手冊，製備了具有與NHS激活的Sepharose 4FF（通用醫療集團）共價結合的抗人IgG Fcγ抗體（傑克遜免疫研究實驗室）的親和柱。將以上1) 中回收的溶液充入此親和柱，並回收其通過溶液和PBS洗滌溶液。

3) 凝膠過濾純化

用超濾膜濃縮以上2) 中獲得的通過級分。將Superose 12（通用醫療

集團）用PBS平衡，應用濃縮的樣本並進行分離和純化。用SDS-PAGE分析一部分分離和純化的級分，並回收和合併包含高純度抗體A-Fab的級分。以這種方式純化的樣本被設置為抗體A-Fab。

【0148】為了製備抗體A-Fab與抗原EphA4-LBD的複合物，製備了EphA4-LBD（Qin H. 等人, J. Biol. Chem. [生物化學雜誌], 283: 29473-29484 (2008)）。混合0.68 μmol的EphA4-LBD（200 μM，3.4 mL）和0.45 μmol的抗體A-Fab（300 μM，1.5 mL），使EphA4-LBD具有針對抗體A-Fab約為1.5倍的莫耳比。然後，將混合的溶液應用於HILOAD 26/60 Superdex 75製備級（通用醫療集團），並用層析緩衝液（25 mM Tris/HCl（pH 7.5），100 mM NaCl）洗脫。用SDS-PAGE分析包含複合物的級分，收集具有高純度的級分並濃縮至約40.8 mg/mL，並將其用於結晶。

【0149】複合物的結晶係藉由坐滴蒸氣擴散方法與自動結晶設備Hydra II Plus One System（美捷科技有限公司（Matrix Technologies Corp., Ltd.））進行。將MRC-2（分子尺寸）用作板。儲液的組成物為100 mM HEPES（pH 7.5）、10%聚乙二醇8000和8%乙二醇，並將此儲液與以上複合物溶液混合，使體積比為1：1以生成結晶液滴。將生成的結晶板在20℃下靜置。

【0150】在以上條件下結晶後，得到了具有空間群P212121的晶體，晶格常數a = 71.0 Å，b = 84.5 Å並且c = 116.1 Å。對獲得的晶體進行了輻射光X射線（1.0 Å）入射，得到了1.79 Å的繞射數據。藉由HKL2000（HKL研究公司（HKL Research Inc.））處理繞射數據，並藉由分子取代方法進行相位測定。將包括在CCP4軟體套件（Collaborative

computational project number 4 [協同計算項目編號4], [CCP4] 版本6.5.0, Acta Cryst. [晶體學報] D 67: 235-242 (2011)）中的程式PHASER（版本2.5.0, McCoy A. J. 等人, J. Appl. Cryst. [應用晶體學雜誌] 40: 658-674 (2007)）用於分子取代方法。採用EphA4-LBD的結晶結構（PDBID：3CKH）和IgG的Fab區的結晶結構（PDBID：2VXT（L鏈）和1FGN（H鏈））作為分子取代方法的搜索模型。用COOT程式（Emsley P. 等人, Acta Cryst. [晶體學報] D 60: 2126-2132n (2004)）構建分子模型，以擬合由測定的相獲得的電子密度，並用REFMAC程式（Murshudov G.N., Acta Cryst. [晶體學報] D 53: 240-255 (1997)）進行結構精化。

藉由結構計算（R = 0.212，Rfree = 0.258），獲得了2.0 Å解析度的複合物的結晶結構。

【0151】用計算化學系統MOE 2018.0101（化學計算集團公司（Chemical Computing Group Inc.））中配備的相互作用檢測工具分析獲得的抗體A-Fab/EphA4-LBD複合物的晶體結構，並鑑定EphA4-LBD上與抗體A-Fab直接接觸的胺基酸殘基（圖11A）。鑑定的胺基酸殘基為Glu51、Gly52、Ile59、Gln71、Cys73、Asn74、Val75、Met76、Glu77、Thr104、Arg106、Leu111、Pro112、Met115、Arg162、Met164、Cys191、Ala193和Val195。圖11B顯示了用Maestro（版本11.0，薛定諤股份有限公司（Schrodinger, LLC））生成的EphA4-LBD的表面結構。其結果係，本發明的諸位發明人得出結論，該等胺基酸殘基存在的區域係EphA4-LBD中的抗體A-Fab結合區。

【0152】實例1：抗體A的人源化抗體的製備

人源化抗EphA4抗體的製備

設計人源化抗體的可變區。基於抗體A的框架區（FR）的高同源性，在人抗體的FR中，選擇IGHV3-33*03（SEQ ID NO. 42）和JH6（SEQ ID NO. 43）（對於重鏈）以及IGKV1-17*01（SEQ ID NO. 40）和JK4（SEQ ID NO. 41）（對於輕鏈）作為人源化抗體的FR。然後採用小鼠抗體A的3D結構預測模型預測FR中與CDR胺基酸相互作用的胺基酸，該等胺基酸與重鏈CDR1（SEQ ID NO. 44、27、28和29-31）中具有Y32F突變的抗體A的CDR一起移植，並將HK2-42（SEQ ID NO. 45）設計為人源化抗體重鏈可變區並將L1-8（SEQ ID NO. 46）設計為人源化抗體輕鏈可變區。移植的CDR的胺基酸序列示於表2中，並且核酸序列示於表3中。

【0153】採用人IgG_2的恆定區（SEQ ID NO. 47）作為重鏈恆定區。採用人Igκ（SEQ ID NO. 48）作為輕鏈恆定區。將包含編碼人源化抗體的胺基酸序列的基因序列的表現載體（pcDNA 3.4）用Expi293表現系統（吉布科公司/賽默飛世爾公司）轉染到Expi293F細胞（吉布科公司/賽默飛世爾公司）中。作為編碼人源化抗體的胺基酸序列的基因序列，分別地，採用SEQ ID NO. 55中所示的核酸序列作為重鏈可變區，採用SEQ ID NO. 56中所示的核酸序列作為輕鏈可變區，採用SEQ ID NO. 57中所示的核酸序列作為重鏈恆定區並且採用SEQ ID NO. 58中所示的核酸序列作為輕鏈恆定區。人源化抗體重鏈全長的胺基酸序列（不包括訊息序列）為SEQ ID NO. 59中所示的胺基酸序列，輕鏈全長的胺基酸序列（不包括訊息序列）為SEQ ID NO. 60中所示的胺基酸序列。編碼人源化抗體的重鏈全長的核酸序列為SEQ ID NO. 61中所示的核酸序列，並且編碼輕鏈全

長的核酸序列為SEQ ID NO. 62中所示的核酸序列。回收上清，並用MabSelectSuRe（通用醫療集團）純化抗體A的人源化抗體（抗體B）。

【0154】 [表2]抗體B的CDR的胺基酸序列

名稱	序列
重鏈CDR1	RFGVH（SEQ ID NO. 44）
重鏈CDR2	VIWRGGSTDYNAAFMS（SEQ ID NO. 27）
重鏈CDR3	ESLFGVYYDYGYYSMDY（SEQ ID NO. 28）
輕鏈CDR1	RASQEISGYLS（SEQ ID NO. 29）
輕鏈CDR2	AASTLDS（SEQ ID NO. 30）
輕鏈CDR3	LQYASYPLT（SEQ ID NO. 31）

【0155】 [表3]抗體B的CDR的核酸序列

名稱	序列
重鏈CDR1	AGATTTGGAGTGCAT（SEQ ID NO. 49）
重鏈CDR2	GTGATCTGGAGGGGAGGATCCACCGACTACAACGC TGCTTTTATGAGC（SEQ ID NO. 50）
重鏈CDR3	GAGAGCCTGTTCGGCGTGTACTATGACTACGGCTAC TATTCTATGGATTAT（SEQ ID NO. 51）
輕鏈CDR1	CGCGCCTCCCAGGAGATCTCTGGCTACCTGTCC （SEQ ID NO. 52）
輕鏈CDR2	GCTGCCTCCACCCTGGACTCT（SEQ ID NO. 53）
輕鏈CDR3	CTGCAGTACGCTTCCTATCCACTGACC（SEQ ID NO. 54）

【0156】 實例2：人源化抗EphA4單株抗體針對人EphA4的親和力

實例1中獲得的抗體B針對人EphA4的結合親和力藉由表面電漿共振（SPR方法）採用Biacore T200（通用醫療集團）測定。首先，抗His抗體（通用醫療集團，28-9950-56）被固定在感測片CM5上。藉由採用N-

羥基琥珀醯亞胺（NHS）和N-乙基-N'-（3-二甲基胺基丙基）碳二亞胺鹽酸鹽（EDC）的胺偶合法固定，採用乙醇胺用於封閉（感測片和固定試劑均來自通用醫療集團）。用固定緩衝液（10 mM乙酸鈉，pH 4.5）將其稀釋至3.5 μg/mL，並根據附於Biacore T200的方案固定在感測片上。用運行緩衝液HBS-EP（通用醫療集團，BR-1001-88）稀釋人EphA4細胞外區-SEAP-His10，並將溶液送至流動池中120秒進行捕獲（捕獲量約10 RU）。隨後，用HBS-EP將抗體B連續稀釋至100、50、25、12.5、6.3、3.2、1.6和0 nM範圍，加入至感測片120秒，依次觀察加入時（結合期，120秒）和加入完成後（解離期，600秒）的結合反應曲線。每次觀察完成後，加入4 M $MgCl_2$（60秒，瓦科純化工公司）以再生感測片。採用系統附帶的BIA評價軟體，藉由1：1結合模型對得到的結合反應曲線進行擬合分析，計算出針對人EphA4的親和力（KD = kd/ka）。

【0157】 抗體B針對人EphA4的結合親和力（KD值）為1.34×10^{-9} M（圖12）。這表明，抗體B與抗體A（人源化前的抗體）顯示了幾乎等同的親和力。

【0158】 實例3：人源化抗EphA4單株抗體在海馬神經元中的EphA4切割增強活性

對於在實例1中獲得的抗體B，按照以下步驟，採用海馬神經元進行EphA4切割增強活性的評估。

用抗體B（2.0，6.7和20 nM）和γ選擇酶抑制藥物化合物E（50 nM，恩佐生命科學公司）處理接種於96孔培養皿（福爾肯公司）的大鼠海馬神經元。二十四小時後，用PBS（瓦科純化工公司）洗滌，將SDS樣本緩衝液（利姆裡樣本緩衝液（伯樂公司）和5% 2-巯基乙醇（伯樂公

司））添加以回收的細胞，並將其煮沸5分鐘。用該樣本進行SDS-PAGE，用抗EphA4單株抗體（亞諾法公司）進行蛋白質印跡，定量帶的強度，計算EphA4 C末端片段/EphA4全長的值。

【0159】 抗體B濃度依賴性地增強在海馬神經元中的EphA4切割反應（圖13）

【0160】 實例4：人源化抗EphA4單株抗體的人EphA4-人配位基結合抑制活性

對於實例1中獲得的抗體B，按照以下步驟評估人EphA4與人配位基結合的抑制活性。將抗鹼性磷酸酶抗體（賽默科技公司）塗佈在96孔板（Nunc公司）的孔中。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將人EphA4胞外區-SEAP-His蛋白（終濃度10 nM）接種到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將配位基和系列稀釋的抗體B（0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000和3000 nM）添加到孔中。應注意生物素化的人Ephrin A5-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度0.7 nM）和生物素化人Ephrin B3-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度2.3 nM）被用作配位基。在室溫下孵育一小時並洗滌三次後，添加辣根過氧化物酶標記的鏈黴親和素（通用醫療集團），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並將其在室溫下孵育2-5分鐘。將等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）添加到孔中，並用酶標儀（分子器件公司或珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0161】 抗體B濃度依賴性地抑制人EphA4與人配位基的結合，針對人肝配蛋白A5和肝配蛋白B3結合的IC_{50}值分別為約4.9 nM和1.6 nM。因此，發現抗體B強烈抑制人EphA4與人配位基之間的結合，並且顯示出與抗體A（人源化前的抗體）幾乎等同的抑制活性（圖14）。

【0162】 實例5：人源化抗EphA4單株抗體的小鼠EphA4-小鼠配位基結合抑制活性

對於實例1中獲得的抗體B，按照以下步驟評估小鼠EphA4與小鼠配位基結合的抑制活性。將抗鹼性磷酸酶抗體（賽默科技公司）塗佈在96孔板（Nunc公司）的孔中。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.02% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將小鼠EphA4細胞外區-SEAP-His蛋白添加到孔中（最終濃度10 nM），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將配位基和系列稀釋的抗體B（0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000和3000 nM）添加到孔中。應注意生物素化的小鼠Ephrin A1-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度6 nM）和生物素化小鼠Ephrin B2-Fc嵌合體（R & D系統公司，終濃度2.5 nM）被用作配位基。在室溫下孵育一小時並洗滌三次後，添加辣根過氧化物酶標記的鏈黴親和素（通用醫療集團），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並將其在室溫下孵育2分鐘。將等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）添加到孔中，並用酶標儀（分子器件公司或珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0163】 抗體B濃度依賴性地抑制小鼠EphA4與小鼠配位基的結

合，針對小鼠肝配蛋白A1和肝配蛋白B2結合的IC_{50}值分別為約8.7 nM和4.2 nM。因此，發現抗體B強烈抑制小鼠EphA4與小鼠配位基之間的結合，並且顯示出與抗體A（人源化前的抗體）幾乎等同的抑制活性（圖15）。

【0164】 實例6：人源化抗EphA4單株抗體針對人Eph受體的選擇性

與參考實例1中所述之用於製備小鼠EphA4胞外區-SEAP-His蛋白之方法類似，用來源於組織的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼每個人Eph受體（EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、和EphB6）的訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到含有編碼SEAP蛋白和組胺酸標籤的DNA序列的pENTR1A載體（英傑公司/生命技術公司）中。然後，將編碼每個人Eph受體的訊息序列和胞外區、SEAP蛋白和組胺酸標籤的DNA序列藉由Gateway系統（英傑公司/生命技術公司）的LR反應轉移至pcDNA 3.1_rfcB載體，以構建表現具有與每個人Eph受體的胞外區融合的SEAP蛋白和His標籤的蛋白（稱為「Eph受體胞外區-SEAP-His蛋白」）的載體（稱為「Eph受體胞外區-SEAP-His蛋白表現載體」）。

【0165】 然後，用Expi293表現系統（吉布科公司/賽默飛世爾公司）將每個人Eph受體胞外區-SEAP-His蛋白表現載體中的每一種引入Expi293F細胞（吉布科公司/賽默飛世爾公司）。孵育（5% CO_2，37℃）五天後，回收培養上清，並將其在室溫下以1500 rpm離心5分鐘。將離心上清用0.45 μm濾器過濾（密理博公司）。

【0166】 對於實例1中獲得的抗體B，按照以下步驟評估人Eph受體的結合活性。

將兔抗6-His抗體（貝斯實驗室）塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將人Eph受體胞外區-SEAP-His蛋白（終濃度1 nM）中的每一種接種到每個孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將人IgG溶液（100 μg/mL，三菱藥物公司）和抗體B（10 μg/mL）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的驢抗人IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中，並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0167】 發現抗體B與抗體A（人源化前的抗體）類似，在人Eph受體家族中特異性地與人EphA4結合（圖16）。

【0168】 實例7：人源化抗EphA4單株抗體針對小鼠Eph受體的選擇性

按照根據參考實例1製備EphA4胞外區-Fc-His蛋白之方法，用來源於組織的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼每個小鼠Eph受體（EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、和EphB6）的訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到具有編碼人IgG_1的Fc區和組胺酸標籤的DNA序列的pENTR1A載體（英傑公司/生命技術公司）中。然後，將編碼小鼠的每個Eph受體（EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4和EphB6）的訊息序

列和胞外區、Fc和組胺酸標籤的DNA序列藉由Gateway系統（英傑公司/生命技術公司）的LR反應轉移至pcDNA 3.1_rfcB載體，以構建小鼠Eph受體胞外區-Fc-His蛋白表現載體中的每一種。在小鼠EphA2胞外區-Fc-His蛋白表現載體的構建中，用來源於組織的總RNA藉由RT-PCR擴增編碼小鼠EphA2的訊息序列和胞外區的DNA序列，並選殖到含有編碼Fc和組胺酸標籤的DNA序列的pcDNA 3.1載體中以構建小鼠EphA2胞外區-Fc-His蛋白表現載體。

【0169】 然後，用Expi293表現系統（吉布科公司/賽默飛世爾公司）將小鼠Eph受體胞外區-Fc-His蛋白表現載體中的每一種引入Expi293F細胞（吉布科公司/賽默飛世爾公司）。培養（5% CO2，37℃，120 rpm）5天後，回收培養上清，並將其在室溫下以1500 rpm離心5分鐘。將離心上清用0.45 μm濾器過濾（密理博公司）。

【0170】 對於抗體B，按照以下步驟評估小鼠Eph受體的結合活性。

將兔抗6-His抗體（貝斯實驗室）塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將小鼠Eph受體胞外區-Fc-His蛋白（終濃度1 nM）中的每一種接種到每個孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將人IgG溶液（100 μg/mL，西格瑪公司）和抗體B（10 μg/mL）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的山羊抗人κ輕鏈抗體（IBL），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中，

並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0171】 在小鼠Eph受體家族中，抗體B僅對小鼠EphA4具有特異性結合活性（圖17）。

【0172】 實例8：人源化抗EphA4單株抗體針對小鼠、大鼠、猴和人EphA4的反應性

【0173】 對於抗體B，按照以下步驟評估與各種EphA4的結合活性。

將抗鹼性磷酸酶抗體（賽默科技公司）塗佈在96孔板（Nunc公司）的孔中。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.05% Tween 20/PBS（賽默科技公司）洗滌三次後，將小鼠、大鼠、猴和人EphA4胞外區-SEAP-His蛋白（終濃度1 nM）接種於孔中，並將此在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將人IgG溶液（100 μg/mL，三菱藥物公司）和抗體B（0、0.00013、0.00064、0.0032、0.016、0.08、0.4、2和10 μg/mL）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的驢抗人IgG抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將TMBZ（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，西格瑪公司）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（1N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中，並用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm處的吸光度。

【0174】 抗體B在所有小鼠、大鼠、猴和人EphA4中具有等同的結合活性（圖18）。

【0175】 實例9：人源化抗EphA4單株抗體針對人EphA4胞外區、配位基結合結構域、纖網蛋白III型結構域1、纖網蛋白III型結構域2的反

應性

對於實例1中獲得的抗體B，按照以下步驟評估與人EphA4中各種結構域的結合活性。

將兔抗6-His抗體（貝斯實驗室）塗佈到96孔板（Nunc公司）的孔上。在4℃孵育過夜後，用1%封閉ACE（DS製藥生物醫藥公司）將孔在室溫下封閉一小時。用0.02% Tween 20/PBS（Nacalai Tesque公司）洗滌兩次後，將人EphA4胞外區-MBP-His蛋白、人EphA4配位基結合結構域-MBP-His蛋白、人EphA4纖網蛋白III型結構域1-MBP-His蛋白和人EphA4纖網蛋白III型結構域2-MBP-His蛋白（終濃度10 nM）接種於孔中，並將其在室溫下孵育一小時。洗滌三次後，將抗體B（終濃度10 nM）添加到孔中，並將其在室溫下孵育一小時。添加辣根過氧化物酶標記的兔抗人IgG Fcγ片段抗體（傑克遜免疫研究實驗室），並將其在室溫下孵育一小時。洗滌五次後，將TMB（KPL）溶液添加到孔中，並在確認適量著色後，添加等量的終止溶液（2 N H_2SO_4，瓦科純化工公司）到孔中。用酶標儀（珀金埃爾默公司）讀取450 nm和650 nm處的吸光度。

【0176】 抗體B對人EphA4胞外區（ECD）和配位基結合結構域（LBD）具有結合活性（圖19）。對纖網蛋白III型結構域1（FN1）和纖網蛋白III型結構域2（FN2）無反應。因此，發現抗體B特異性結合人EphA4胞外區的配位基結合結構域。

【0177】 實例10：人源化抗EphA4單株抗體對增加海馬神經元中棘突的數目的作用

如在參考實例1（B）中該製備大鼠海馬神經元。採用核轉染（龍沙集團）將EGFP基因引入大鼠海馬神經元，並接種於含有塗有聚-L-離胺酸

的蓋玻片（松浪玻璃工業）的24孔板（福爾肯公司）中。

【0178】 按照以下步驟採用大鼠海馬神經元進行棘突計數。將接種於24孔板（福爾肯公司）（含有塗有聚-L-離胺酸的蓋玻片（松浪玻璃工業））中的培養第13天的引入EGFP的大鼠海馬神經元用對照抗體（人IgG_2；西格瑪公司）或抗體B（6.7和20 nM）處理24小時。然後將蓋玻片轉移至2% PFA（瓦科純化工公司）/4%蔗糖（瓦科純化工公司）/PBS中，並將其靜置20分鐘以固定細胞。在去除固定液並用PBS洗滌細胞三次後，添加0.25% Triton X-100（瓦科純化工公司）/PBS，並進行細胞透化15分鐘。去除溶液，將蓋玻片轉移至2% BSA（西格瑪公司）/0.25% Triton X-100/OPTI-MEM（吉布科公司）中，並封閉一小時，然後允許抗GFP抗體（Nacalai Tesque公司）反應1.5小時。去除第一抗體溶液並用PBS洗滌三次後，允許第二抗體反應一小時。去除第二抗體溶液並用PBS洗滌三次後，添加Prolong Gold抗螢光衰減封片劑（分子探針公司）進行封片，並用LSM800（蔡司公司）進行觀察。上述實驗進行三次，並且對於每次實驗，從兩個蓋玻片中提取神經元，用圖像分析軟體Imaris®（Bitplane）計數每個樹突上的棘突，並計算每個神經元每10 μm的棘突數目。

【0179】 抗體B增加了海馬神經元中的棘突數目（圖20）。此結果顯示抗體B具有穩定海馬神經元中棘突的活性。

【0180】 實例11：人源化抗EphA4單株抗體的人EphA4切割增強活性

對於實例1中獲得的抗體B，按照以下步驟評估對人EphA4的切割增強活性。

如在參考實例1（B）中該製備大鼠海馬神經元。採用核轉染（龍沙集團）將人EphA4-HA蛋白表現載體引入大鼠海馬神經元，並接種於塗有聚-L-離胺酸的96孔培養皿（福爾肯公司）中。用抗體B（6.7、20和67 nM）和γ選擇酶抑制藥物化合物E（50 nM，恩佐生命科學公司）處理接種的大鼠海馬神經元。大約二十四小時後，用PBS（瓦科純化工公司）洗滌，將SDS樣本緩衝液（利姆裡樣本緩衝液（伯樂公司）和5% 2-巯基乙醇（伯樂公司））添加以回收的細胞，並將其煮沸5分鐘。用該樣本進行SDS-PAGE，用大鼠抗HA單株抗體（羅氏公司（Roche））進行蛋白質印跡，定量帶的強度，計算EphA4 C末端片段/EphA4全長的值。

【0181】 抗體B增強海馬神經元中人EphA4切割反應（圖21）。

【0182】 實例12：針對人源化抗EphA4單株抗體對增加海馬神經元中棘突的數目的作用，MMP和ADAM的參與

如在參考實例1（B）中該製備大鼠海馬神經元。採用核轉染（龍沙集團）將EGFP基因引入一部分大鼠海馬神經元，並接種於含有塗有聚-L-離胺酸的蓋玻片（松浪玻璃工業）的24孔板（福爾肯公司）中。

【0183】 按照以下步驟採用大鼠海馬神經元進行棘突計數。將接種於24孔板（福爾肯公司）（含有塗有聚-L-離胺酸的蓋玻片（松浪玻璃工業））中的培養第13天的引入EGFP的大鼠海馬神經元用對照抗體（人IgG_2；西格瑪公司）或抗體B（20 nM）以及DMSO（西格瑪公司）或MMP和ADAM抑制劑GM6001（2.5 μM，MedChemExpress公司）處理24小時。然後將蓋玻片轉移至2% PFA（瓦科純化工公司）/4%蔗糖（瓦科純化工公司）/PBS中，並將其靜置20分鐘以固定細胞。在去除固定液並用PBS洗滌細胞三次後，添加0.25% Triton X-100（瓦科純化工公司）

/PBS，並進行細胞透化15分鐘。去除0.25% Triton X-100/PBS，將蓋玻片轉移至2% BSA（西格瑪公司）/0.25% Triton X-100/OPTI-MEM（吉布科公司）中，並封閉一小時，然後允許抗GFP抗體（Nacalai Tesque公司）反應1.5小時。去除第一抗體溶液並用PBS洗滌三次後，允許第二抗體反應一小時。去除第二抗體溶液並用PBS洗滌三次後，添加Prolong Gold抗螢光衰減封片劑（分子探針公司）進行封片，並用LSM800（蔡司公司）進行觀察。上述實驗進行三次，並且對於每次實驗，從兩個蓋玻片中提取神經元，用圖像分析軟體Imaris®（Bitplane）計數每個樹突上的棘突，並計算每個神經元每10 μm的棘突數目。

【0184】 藉由用GM6001同時處理，抑制了藉由抗體B對海馬神經元中棘突數目的增加（圖22）。此結果顯示抗體B具有經由MMP和ADAM在海馬神經元中穩定棘突的活性。

【0185】 實例13：人源化抗EphA4單株抗體對於抑制體內tau磷酸化的作用

按照以下步驟採用tau轉基因小鼠（rTg4510）評估抑制體內tau磷酸化的作用。Tau轉基因小鼠（rTg4510）從20至26週齡用抗體B以100 mg/kg（10 mL/kg）的劑量每週皮下施用兩次。將PBS（瓦科純化工公司）以10 mL/kg皮下施用於對照組。最後一次施用後3.5天，用2%-2.5%異氟醚吸入麻醉藥物（英特威公司）和三種類型麻醉藥物（4.0 mg/kg的咪達唑侖（安斯泰來製藥、0.3 mg/kg的美托咪定（日本全藥工業株式會社）和5.0 mg/kg的Vetorphale（明治制果藥業公司））的混合麻醉小鼠，用含有3單位/mL肝素（味之素公司）和1%磷酸酶抑制劑混合物（Nacalai Tesque公司）的PBS（瓦科純化工公司）在麻醉下進行灌注，

並切除小鼠腦半球。在4℃固定收集的腦半球，同時浸入2%的多聚甲醛（TAAB）/0.1 M磷酸鹽緩衝液（瓦科純化工公司）中振盪過夜。腦半球被10%蔗糖（瓦科純化工公司）/0.1 M磷酸鹽緩衝液（瓦科純化工公司）並且隨後20%蔗糖/0.1 M磷酸鹽緩衝液（瓦科純化工公司）取代，並且然後包埋在組織-Tek O.C.T.化合物（櫻花精密技術日本公司）/20%蔗糖中並採用液氮冷卻的鋁塊冷凍。用恆冷箱CM1860（萊卡公司）產生7 μm厚的腦半球切片。將切片黏附在塗有矽烷的載玻片（武土純藥公司）上，用冷空氣風乾，並且然後放入密封袋中，並在-80℃下儲存。將用於免疫染色的載玻片從-80℃取出，用冷空氣風乾，並且然後用PBS（瓦科純化工公司）洗滌，浸入1% BSA（西格瑪公司）/10%正常驢血清（傑克遜免疫研究實驗室）/0.5% Triton X-100（瓦科純化工公司）/PBS溶液中，並進行一小時的封閉，之後允許抗磷酸化tau抗體AT8（Fujirebio Europe N.V.公司）在常溫下反應過夜。用PBS洗滌三次後，允許第二抗體反應一小時。用PBS洗滌三次後，將Prolong Gold抗螢光衰減封片劑（分子探針公司）置於載玻片上並封片，並用LSM700（ZEISS）進行觀察。用圖像分析軟體Metamorph測量海馬CA1輻射層AT8陽性訊號面積，並計算AT8陽性訊號面積針對總面積的比例。

【0186】 抗體B降低了海馬CA1區磷酸化tau的訊號（圖23）。此結果顯示抗體B具有抑制tau轉基因小鼠（rTg4510）中tau病理學進展的活性。

【序列表】

<110> 日商衛材R&D企管股份有限公司（EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.）

<120> 抗EphA4抗體

<130> ESAP1901F

<150> JP2019-122982
<151> 2019-07-01

<160> 62

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 986
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 1

```
Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ile Leu Phe Ser Phe Leu Phe Gly Ile
1               5                  10                  15


Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
            20                  25                  30


Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
        35                  40                  45


Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
    50                  55                  60


Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln
65                  70                  75                  80


Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
                85                  90                  95


Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
            100                 105                 110
```

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys
130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser
210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu
260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
275 280 285

Ser Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala

305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile
325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln
340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile
385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
450 455 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu
465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
530 535 540

Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val
545 550 555 560

Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr
565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly
580 585 590

Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala
595 600 605

Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu
610 615 620

Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu
625 630 635 640

Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys
645 650 655

Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser
660 665 670

Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val
675 680 685

Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn
690 695 700

Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val

705 710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr
725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
740 745 750

Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser
755 760 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly
770 775 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys
785 790 795 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu
805 810 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp
820 825 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp
835 840 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu
850 855 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys
865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Ser Glu Ser Ser
885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala
900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr
915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val
930 935 940

His Met Ser Gln Asp Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr
945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met
965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val
980 985

<210> 2
<211> 528
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

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

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

<210> 3
<211> 1030
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 3

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

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

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

Ala Ala Ala Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
530 535 540

Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala
545 550 555 560

Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly
565 570 575

Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp
580 585 590

Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val
595 600 605

Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly
610 615 620

Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr
625 630 635 640

Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg
645 650 655

Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys
660 665 670

Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala
675 680 685

Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp
690 695 700

Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln
705 710 715 720

Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys
725 730 735

Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr
740 745 750

Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp
755 760 765

Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu
770 775 780

Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe
785 790 795 800

Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp
805 810 815

Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg
820 825 830

Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His
835 840 845

Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met
850 855 860

Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp
865 870 875 880

Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly
885 890 895

Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys
900 905 910

Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro
915 920 925

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu
930 935 940

Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu
945 950 955 960

Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln
965 970 975

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val
980 985 990

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala
995 1000 1005

Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly His His His
1010 1015 1020

His His His His His His His His
1025 1030

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ile Leu Phe Ser Phe Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala

<210> 5
<211> 986
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys
130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser
210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu
260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala
305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile
325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln
340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile
385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
450 455 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu
465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
530 535 540

Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val
545 550 555 560

Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr
565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly
580 585 590

Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala
595 600 605

Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu
610 615 620

Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu
625 630 635 640

Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys
645 650 655

Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser
660 665 670

Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val
675 680 685

Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn
690 695 700

Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val
705 710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr
725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
740 745 750

Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser
755 760 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly
770 775 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys
785 790 795 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu
805 810 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp
820 825 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp
835 840 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu
850 855 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys
865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Thr Glu Ser Ser
885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala
900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr
915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val
930 935 940

His Val Asn Gln Glu Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr
945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met
965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val
980 985

<210> 6
<211> 528
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

```
Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1               5                  10                  15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
            20                  25                  30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
        35                  40                  45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
    50                  55                  60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65                  70                  75                  80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
                85                  90                  95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
            100                 105                 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
        115                 120                 125

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

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145                 150                 155                 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
                165                 170                 175
```

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
355 360 365

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

370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

<210> 7
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ad29S

<400> 7
acatcactcc gt 12

<210> 8
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ad29AS

<400> 8
acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct 50

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 9
agctacgctg aagtatcaac gcagag 26

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 10
gccagtggat agactgatgg 20

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 11
gatggataca gttggtgcag c 21

<210> 12

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 12

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 13
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 13

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 14

Met Asp Met Arg Val Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Thr Arg Cys
20

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 15

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 16
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 16
atggctgtcc tggtgctgct cctctgcctg gtgacattcc caagctgtgt cctgtcc 57

<210> 17
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 17
caggtgcagc tgaagcagtc aggacctagc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccata 60

acctgcacag tctctggttt ctcattaact aggtatggtg tacactgggt tcgccagtct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atttggagag gtggaagcac agactacaat 180

gcagctttca tgtccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240

aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacact gccatatact actgtgccaa agaaagccta 300

tttggggtct actatgatta cgggtactat tctatggact actggggtca aggaacctca 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 18
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 18
atggacatga gggttcctgc tcacgttttt ggcttcttgt tgctctggtt tccaggtacc 60

agatgt 66

<210> 19
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 19
gacatccaaa tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag ccttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatgctagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 20
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 20
gcgaagcttg ccgccaccat ggctgtcctg gtgctgctcc 40

<210> 21

<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 21
gcgaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gttcctgctc acg 43

<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 22
gcggaattca tcatttacca ggagagtggg agaggc 36

<210> 23
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 23
cgcgaattca ctaacactca ttcctgttga agctcttgac 40

<210> 24
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 24

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
100 105 110

Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 25

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 26

Arg Tyr Gly Val His
1 5

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 27

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 28

Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 30

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 31

Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 32
<211> 986
<212> PRT
<213> 獼猴

<400> 32

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys
130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser
210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu
260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala
305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile
325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln
340 345 350

```
Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
        355                 360                 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
    370                 375                 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile
385                 390                 395                 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
                405                 410                 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
            420                 425                 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
        435                 440                 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
    450                 455                 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu
465                 470                 475                 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
                485                 490                 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
            500                 505                 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
        515                 520                 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
    530                 535                 540

Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val
545                 550                 555                 560
```

Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr
565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly
580 585 590

Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala
595 600 605

Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu
610 615 620

Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu
625 630 635 640

Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys
645 650 655

Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser
660 665 670

Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val
675 680 685

Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn
690 695 700

Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val
705 710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr
725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
740 745 750

```
Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser
        755                 760                 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly
    770                 775                 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys
785                 790                 795                 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu
                805                 810                 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp
            820                 825                 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp
        835                 840                 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu
    850                 855                 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys
865                 870                 875                 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Thr Glu Ser Ser
                885                 890                 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala
            900                 905                 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr
        915                 920                 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val
    930                 935                 940

His Val Asn Gln Glu Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr
945                 950                 955                 960
```

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met
965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val
980 985

<210> 33
<211> 528
<212> PRT
<213> 獼猴

<400> 33

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile

130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu
370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

<210> 34

<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala
1 5 10 15

<210> 36
<211> 547
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys
130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser
210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu
260 265 270

```
Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
        275                 280                 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
    290                 295                 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala
305                 310                 315                 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile
                325                 330                 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln
            340                 345                 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
        355                 360                 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
    370                 375                 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile
385                 390                 395                 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
                405                 410                 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
            420                 425                 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
        435                 440                 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
    450                 455                 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu
465                 470                 475                 480
```

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
530 535 540

Asn Ser Thr
545

<210> 37
<211> 328
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg

85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys
130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser
210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu
260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala
305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro
325

<210> 38
<211> 236
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn
20 25 30

Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu
35 40 45

Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu
50 55 60

Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu
65 70 75 80

Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val
85 90 95

Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala
100 105 110

Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro
115 120 125

Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp
130 135 140

Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val
145 150 155 160

Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys
165 170 175

Gly Ser Gly Val His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr
180 185 190

Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu
195 200 205

Ile Trp Ala Val Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln
210 215 220

Ser Val Ser Val Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala
225 230 235

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

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

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
20 25 30

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
35 40 45

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp

50 55 60

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
65 70 75 80

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

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
100 105 110

<210> 40
<211> 96
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 40

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 Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

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

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

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

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

<210> 41

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 41

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 42
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 42

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

<210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 43

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
1 5 10 15

Val Ser

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 44

Arg Phe Gly Val His
1 5

<210> 45
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 45

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

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

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

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 46

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 Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 47
<211> 326
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 49
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 49
agatttggag tgcat 15

<210> 50
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 50
gtgatctgga ggggaggatc caccgactac aacgctgctt ttatgagc 48

<210> 51
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 51
gagagcctgt tcggcgtgta ctatgactac ggctactatt ctatggatta t 51

<210> 52
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 52
cgcgcctccc aggagatctc tggctacctg tcc 33

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 53
gctgcctcca ccctggactc t 21

<210> 54

<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 54
ctgcagtacg cttcctatcc actgacc 27

<210> 55
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 55
caggtgcagc tggtggagag cggaggagga gtggtgcagc ctggcaggtc cctgaggctg 60

agctgtgccg tgtccggctt cagcctgaca agatttggag tgcattgggt gcgccaggct 120

ccaggcaagg gactggagtg ggtggccgtg atctggaggg gaggatccac cgactacaac 180

gctgctttta tgagccggct gacaatctct aaggataact ccaagaatac cgtgtatctg 240

cagatgaact ccctgagggc tgaggacacc gccgtgtact attgcgccaa ggagagcctg 300

ttcggcgtgt actatgacta cggctactat tctatggatt attggggcca gggcaccaca 360

gtgacagtgt cctcc 375

<210> 56
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 56
gatatccaga tgacacagtc cccttccagc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgtc gcgcctccca ggagatctct ggctacctgt cctggctgca gcagaagcca 120

ggcaaggctc ccaagcgcct gatctatgct gcctccaccc tggactctgg agtgccttcc 180

aggttcagcg gctctcggtc cggcacagag tacaccctga caatctcttc cctgcagcct 240

gaggatttcg ccacctacta ttgcctgcag tacgcttcct atccactgac ctttggcggc 300

ggcacaaagg tggagatcaa g 321

<210> 57
<211> 978
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 57
gcctccacca agggaccatc cgtgttccca ctggccccat cttcccggag cacatctgag 60

tccaccgccg ctctgggctg tctggtgaag gattacttcc ctgagccagt gacagtgtct 120

tggaactccg gcgctctgac atccggcgtg cacacctttc ctgccgtgct gcagagctct 180

ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtgacc gtgccctctt ccaatttcgg cacccagaca 240

tatacctgca acgtggacca taagccttcc aatacaaagg tggataagac cgtggagaga 300

aagagctgcg tggagtgtcc accttgccca gctccaccag ccgctgcccc tagcgtgttc 360

ctgtttcctc caaagccaaa ggacacactg atgatctctc gcacacccga ggtgacctgc 420

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgcagt ttaactggta cgtggatggc 480

gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagccc agggaggagc agttcaactc cacatttcgg 540

gtggtgagcg tgctgaccgt ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtataagtgt 600

aaggtgagca ataagggcct gcccgccccc atcgagaaga caatctctaa gaccaagggc 660

cagcctagag agccacaggt gtacaccctg ccccctctc gcgaggagat gacaaagaac 720

caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctatccta gcgacatcgc tgtggagtgg 780

gagtctaatg gccagccaga gaacaattac aagaccacac cacccatgct ggacagcgat 840

ggctctttct ttctgtattc taagctgaca gtggataagt ccaggtggca gcagggcaac 900

gtgtttagct gctctgtgat gcatgaggcc ctgcacaatc attacaccca gaagtccctg 960

agcctgtctc caggcaag 978

<210> 58
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 58
aggacagtgg ccgctccatc cgtgttcatc tttcccccta gcgacgagca gctgaagagc 60

ggcaccgcct ctgtggtgtg cctgctgaac aatttctacc ccagggaggc caaggtgcag 120

tggaaggtgg ataacgctct gcagagcggc aattctcagg agtccgtgac cgagcaggac 180

agcaaggatt ctacatattc cctgagctct accctgacac tgagcaaggc cgattacgag 240

aagcacaagg tgtatgcttg cgaggtgacc catcagggcc tgtccagccc agtgacaaag 300

tcttttaaca ggggcgagtg t 321

<210> 59
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 59

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

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

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

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
210 215 220

Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala
225 230 235 240

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 60

<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<400> 60

```
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 Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 61
<211> 1353
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 61
caggtgcagc tggtggagag cggaggagga gtggtgcagc ctggcaggtc cctgaggctg 60

agctgtgccg tgtccggctt cagcctgaca agatttggag tgcattgggt gcgccaggct 120

ccaggcaagg gactggagtg ggtggccgtg atctggaggg gaggatccac cgactacaac 180

gctgctttta tgagccggct gacaatctct aaggataact ccaagaatac cgtgtatctg 240

cagatgaact ccctgagggc tgaggacacc gccgtgtact attgcgccaa ggagagcctg 300

ttcggcgtgt actatgacta cggctactat tctatggatt attggggcca gggcaccaca 360

gtgacagtgt cctccgcctc caccaaggga ccatccgtgt tcccactggc cccatcttcc 420

cggagcacat ctgagtccac cgccgctctg ggctgtctgg tgaaggatta cttccctgag 480

ccagtgacag tgtcttggaa ctccggcgct ctgacatccg gcgtgcacac ctttcctgcc 540

gtgctgcaga gctctggcct gtacagcctg tccagcgtgg tgaccgtgcc ctcttccaat 600

ttcggcaccc agacatatac ctgcaacgtg gaccataagc cttccaatac aaaggtggat 660

aagaccgtgg agagaaagag ctgcgtggag tgtccacctt gcccagctcc accagccgct 720

gcccctagcg tgttcctgtt tcctccaaag ccaaaggaca cactgatgat ctctcgcaca 780

cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg atccagaggt gcagtttaac 840

tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcataat gctaagacca agcccaggga ggagcagttc 900

aactccacat ttcgggtggt gagcgtgctg accgtggtgc accaggactg gctgaacggc 960

aaggagtata agtgtaaggt gagcaataag ggcctgcccg cccctatcga gaagacaatc 1020

tctaagacca agggccagcc tagagagcca caggtgtaca ccctgccccc ttctcgcgag 1080

gagatgacaa agaaccaggt gtccctgacc tgcctggtga agggcttcta tcctagcgac 1140

atcgctgtgg agtgggagtc taatggccag ccagagaaca attacaagac cacaccaccc 1200

atgctggaca gcgatggctc tttctttctg tattctaagc tgacagtgga taagtccagg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt tagctgctct gtgatgcatg aggccctgca caatcattac 1320

acccagaagt ccctgagcct gtctccaggc aag 1353

<210> 62
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 62
gatatccaga tgacacagtc cccttccagc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgtc gcgcctccca ggagatctct ggctacctgt cctggctgca gcagaagcca 120

ggcaaggctc ccaagcgcct gatctatgct gcctccaccc tggactctgg agtgccttcc 180

aggttcagcg gctctcggtc cggcacagag tacaccctga caatctcttc cctgcagcct 240

gaggatttcg ccacctacta ttgcctgcag tacgcttcct atccactgac ctttggcggc 300

ggcacaaagg tggagatcaa gaggacagtg gccgctccat ccgtgttcat ctttcccccc 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tctgtggtgt gcctgctgaa caatttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gataacgctc tgcagagcgg caattctcag 480

gagtccgtga ccgagcagga cagcaaggat tctacatatt ccctgagctc taccctgaca 540

ctgagcaagg ccgattacga gaagcacaag gtgtatgctt gcgaggtgac ccatcagggc 600

ctgtccagcc cagtgacaaa gtcttttaac aggggcgagt gt 642

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種醫藥組合物，其包含抗EphA4抗體，其中

上述抗EphA4抗體包含重鏈和輕鏈，且

上述重鏈之可變區由SEQ ID NO. 45中所示之胺基酸序列組成，以及

上述輕鏈之可變區由SEQ ID NO. 46中所示之胺基酸序列組成。

【請求項2】

如請求項1之醫藥組合物，其中上述抗EphA4抗體特異性結合EphA4並促進EphA4的切割。

【請求項3】

如請求項1之醫藥組合物，其中上述抗EphA4抗體特異性結合EphA4並抑制EphA4和肝配蛋白之間的結合。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之醫藥組合物，其中

上述重鏈的恆定區和上述輕鏈的恆定區包含來源於人抗體的胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項4之醫藥組合物，其中

上述重鏈的恆定區係人IgG的恆定區。

【請求項6】

如請求項5之醫藥組合物，其中

上述人IgG的恆定區係人IgG_2的恆定區。

【請求項7】

如請求項6之醫藥組合物，其中

上述人IgG_2的恆定區包含SEQ ID NO. 47中所示的胺基酸序列。

【請求項8】

如請求項4之醫藥組合物，其中

上述輕鏈的恆定區係人Ig κ 的恆定區。

【請求項9】

如請求項8之醫藥組合物，其中

上述人Igκ的恆定區包含SEQ ID NO. 48中所示的胺基酸序列。

【請求項10】

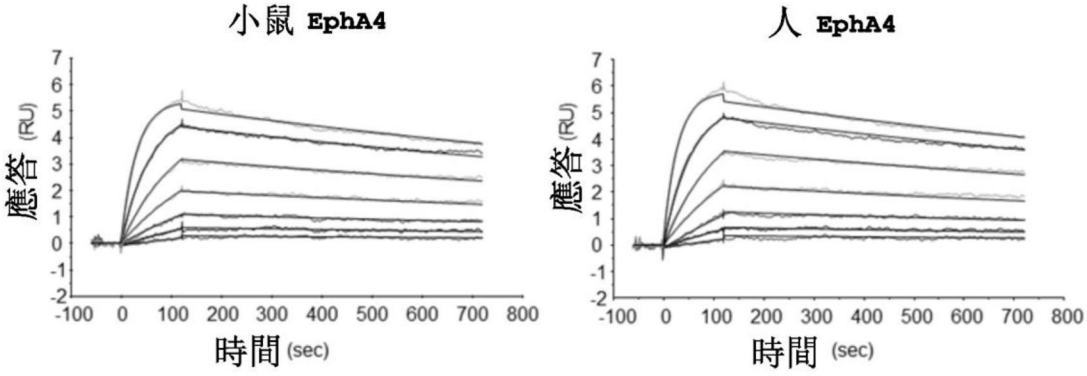
如請求項1至3中任一項之醫藥組合物，上述醫藥組合物包含至少一種藥學上可接受之載體。

【請求項11】

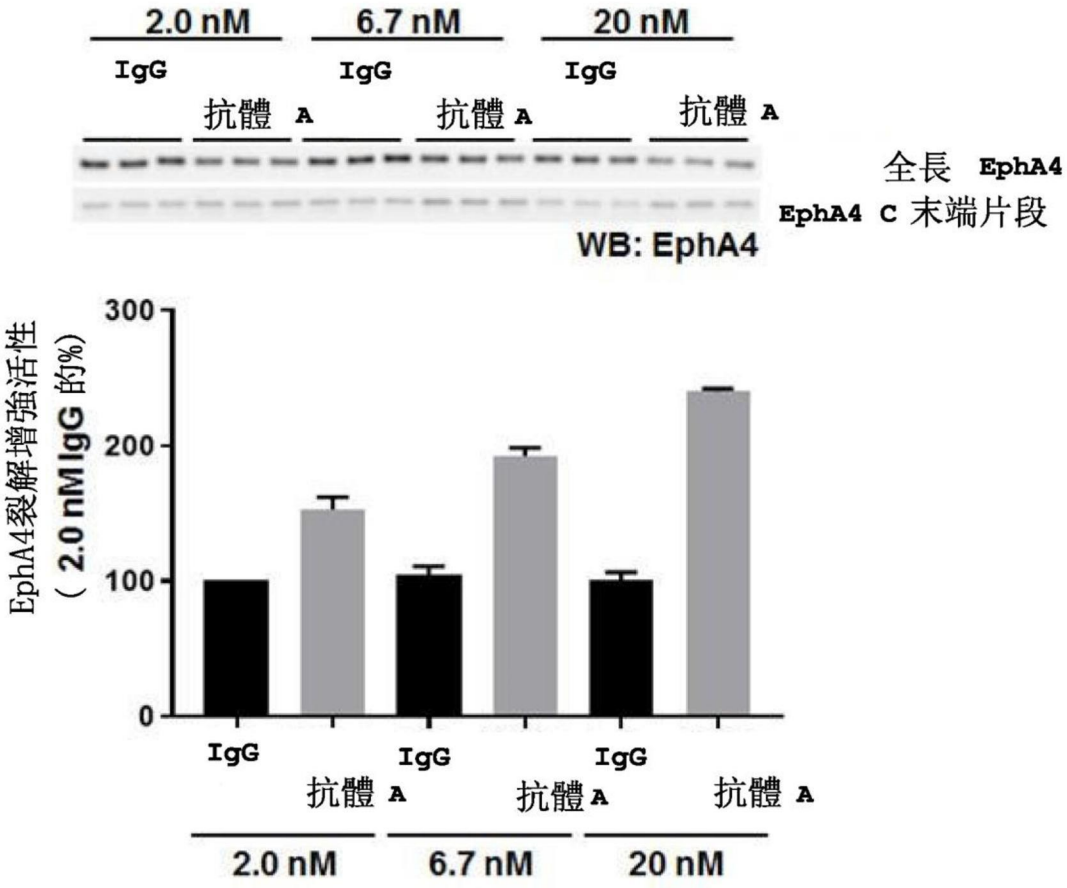
如請求項10之醫藥組合物，其用於治療阿茲海默氏症。

【發明圖式】

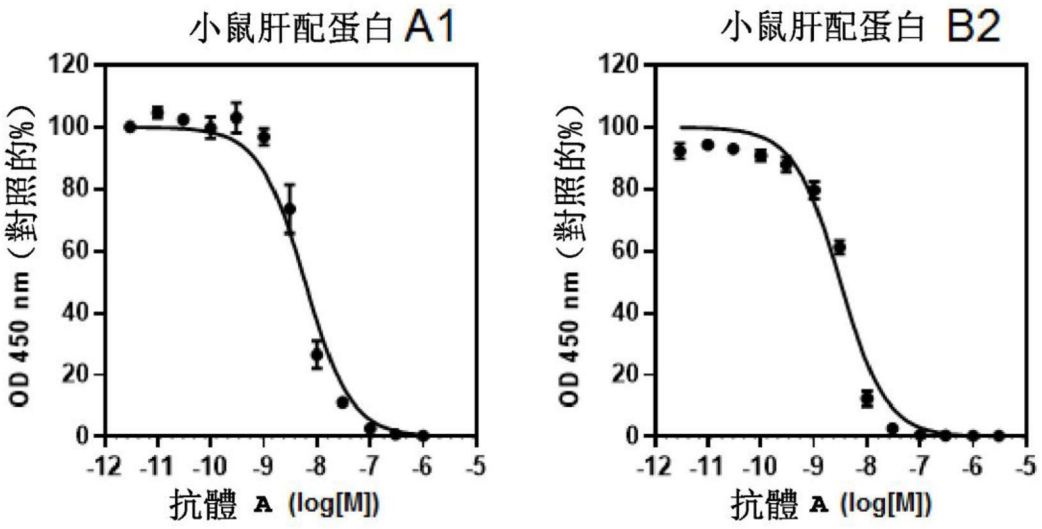
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)
小鼠 **EphA4**	3.28.E+05	4.33.E-04	1.32.E-09	5.48	0.006
人 **EphA4**	3.79.E+05	4.48.E-04	1.19.E-09	5.40	0.012



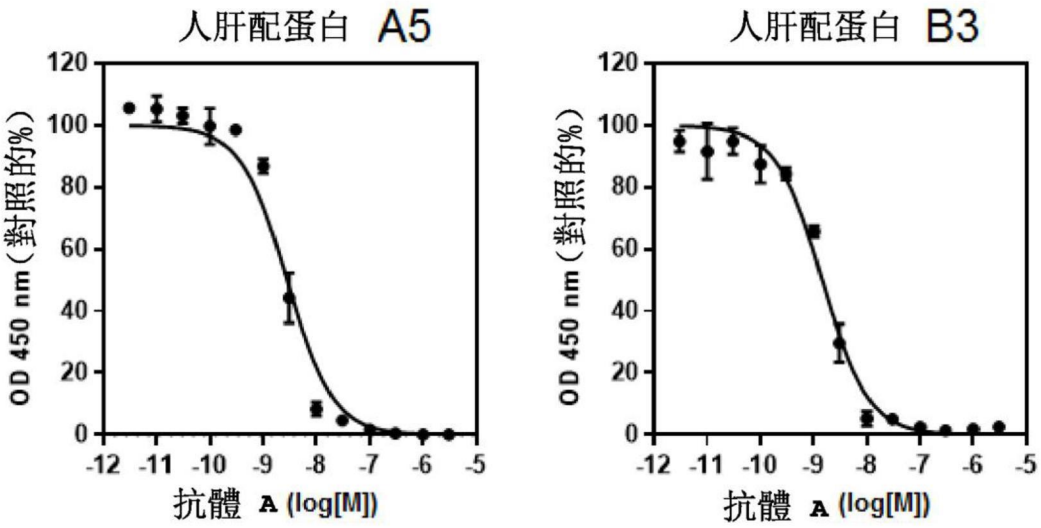
【圖1】


2.0 nM
6.7 nM
20 nM
IgG
IgG
IgG
抗體 A
抗體 A
抗體 A
全長 EphA4
EphA4 C 末端片段
WB: EphA4
EphA4裂解增強活性
（2.0 nM IgG 的%）
300
200
100
0
IgG
IgG
IgG
抗體 A
抗體 A
抗體 A
2.0 nM
6.7 nM
20 nM

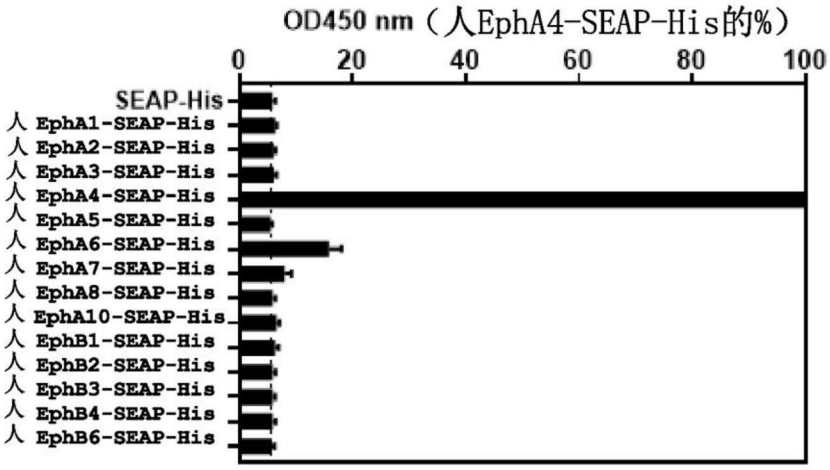
【圖2】


小鼠肝配蛋白 A1
小鼠肝配蛋白 B2
OD 450 nm（對照的%）
120
100
80
60
40
20
0
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
抗體 A (log[M])

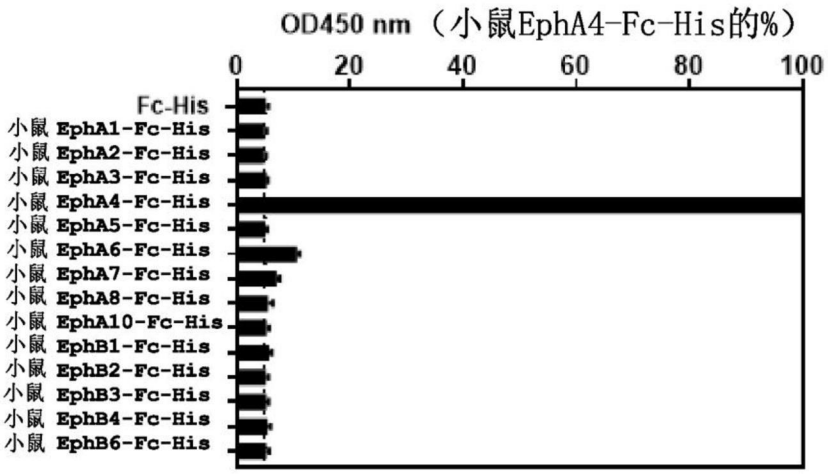
【圖3】


人肝配蛋白 A5
人肝配蛋白 B3
OD 450 nm（對照的%）
抗體 A (log[M])
120
100
80
60
40
20
0
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5

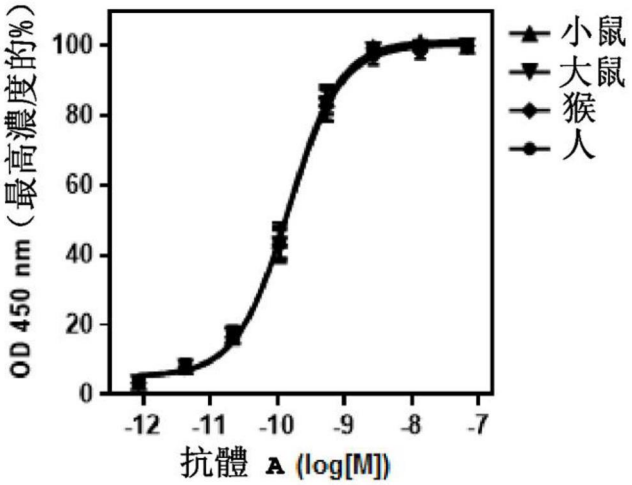
【圖4】


OD450 nm（人EphA4-SEAP-His的%）
0 20 40 60 80 100
SEAP-His
人 EphA1-SEAP-His
人 EphA2-SEAP-His
人 EphA3-SEAP-His
人 EphA4-SEAP-His
人 EphA5-SEAP-His
人 EphA6-SEAP-His
人 EphA7-SEAP-His
人 EphA8-SEAP-His
人 EphA10-SEAP-His
人 EphB1-SEAP-His
人 EphB2-SEAP-His
人 EphB3-SEAP-His
人 EphB4-SEAP-His
人 EphB6-SEAP-His

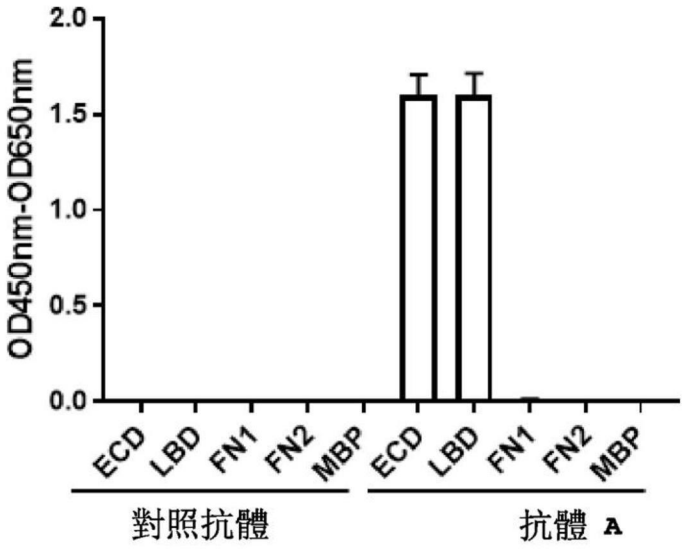
【圖5】


OD450 nm（小鼠EphA4-Fc-His的%）
0
20
40
60
80
100
Fc-His
小鼠 EphA1-Fc-His
小鼠 EphA2-Fc-His
小鼠 EphA3-Fc-His
小鼠 EphA4-Fc-His
小鼠 EphA5-Fc-His
小鼠 EphA6-Fc-His
小鼠 EphA7-Fc-His
小鼠 EphA8-Fc-His
小鼠 EphA10-Fc-His
小鼠 EphB1-Fc-His
小鼠 EphB2-Fc-His
小鼠 EphB3-Fc-His
小鼠 EphB4-Fc-His
小鼠 EphB6-Fc-His

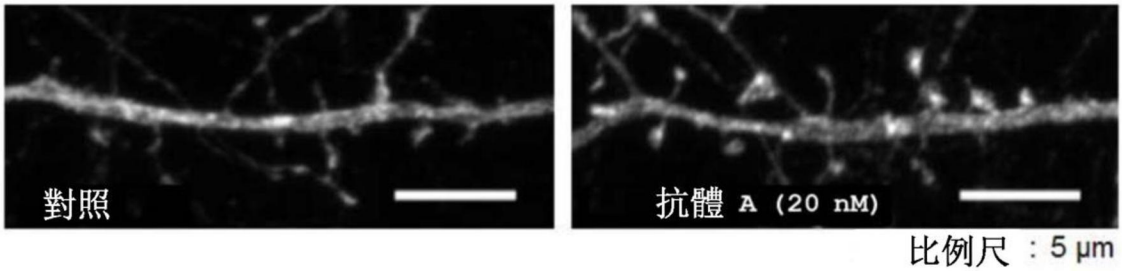
【圖6】

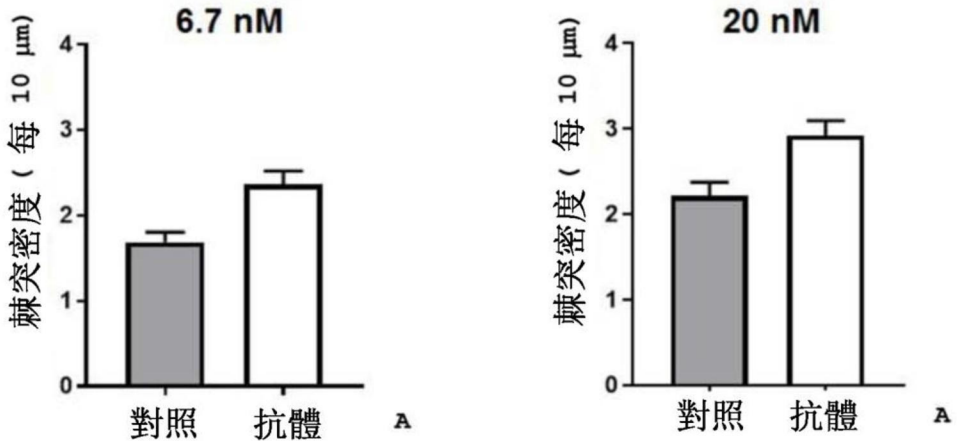

OD 450 nm（最高濃度的%）
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
抗體 A (log[M])
小鼠
大鼠
猴
人

【圖7】

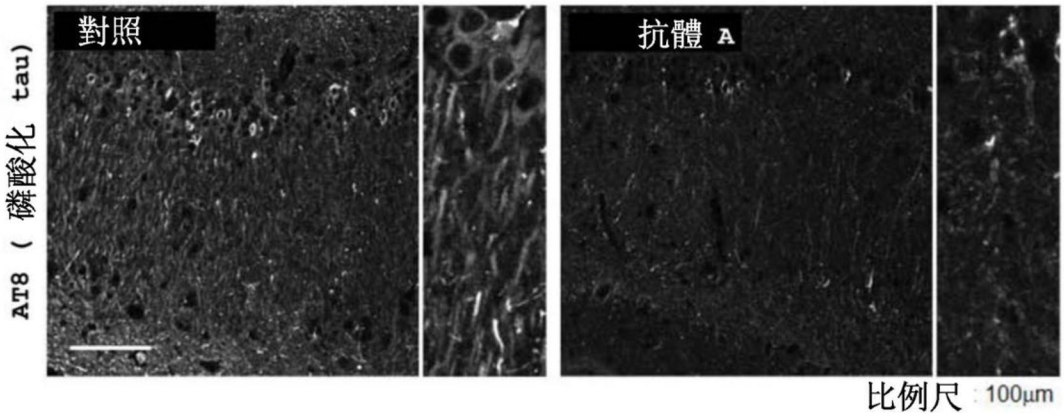

OD450nm-OD650nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ECD
LBD
FN1
FN2
MBP
ECD
LBD
FN1
FN2
MBP
對照抗體
抗體 A

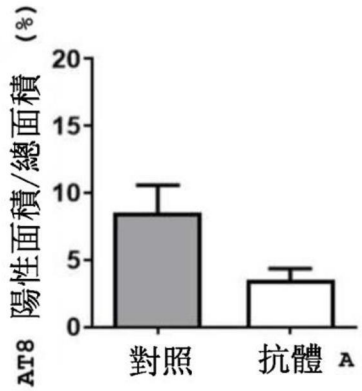
【圖8】


對照
抗體 A (20 nM)
比例尺 : 5 μm

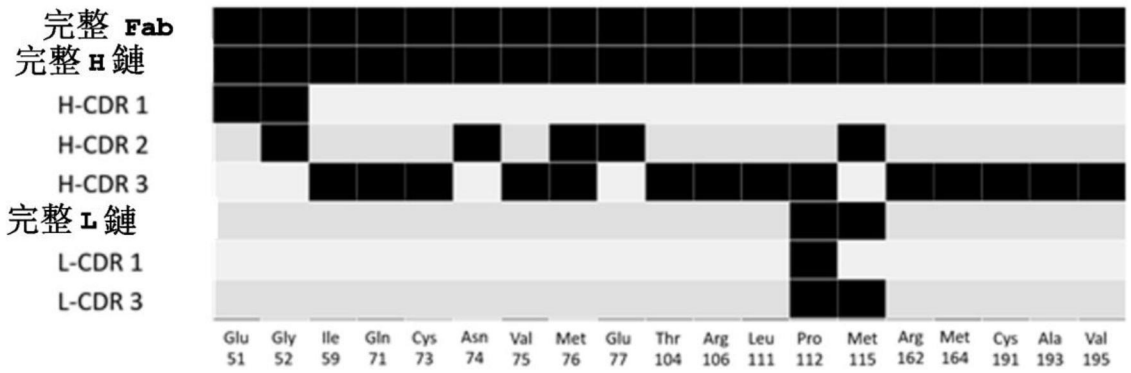

6.7 nM
棘突密度 (每 10 μm)
0
1
2
3
4
對照
抗體
A
20 nM
棘突密度 (每 10 μm)
0
1
2
3
4
對照
抗體
A

【圖9】

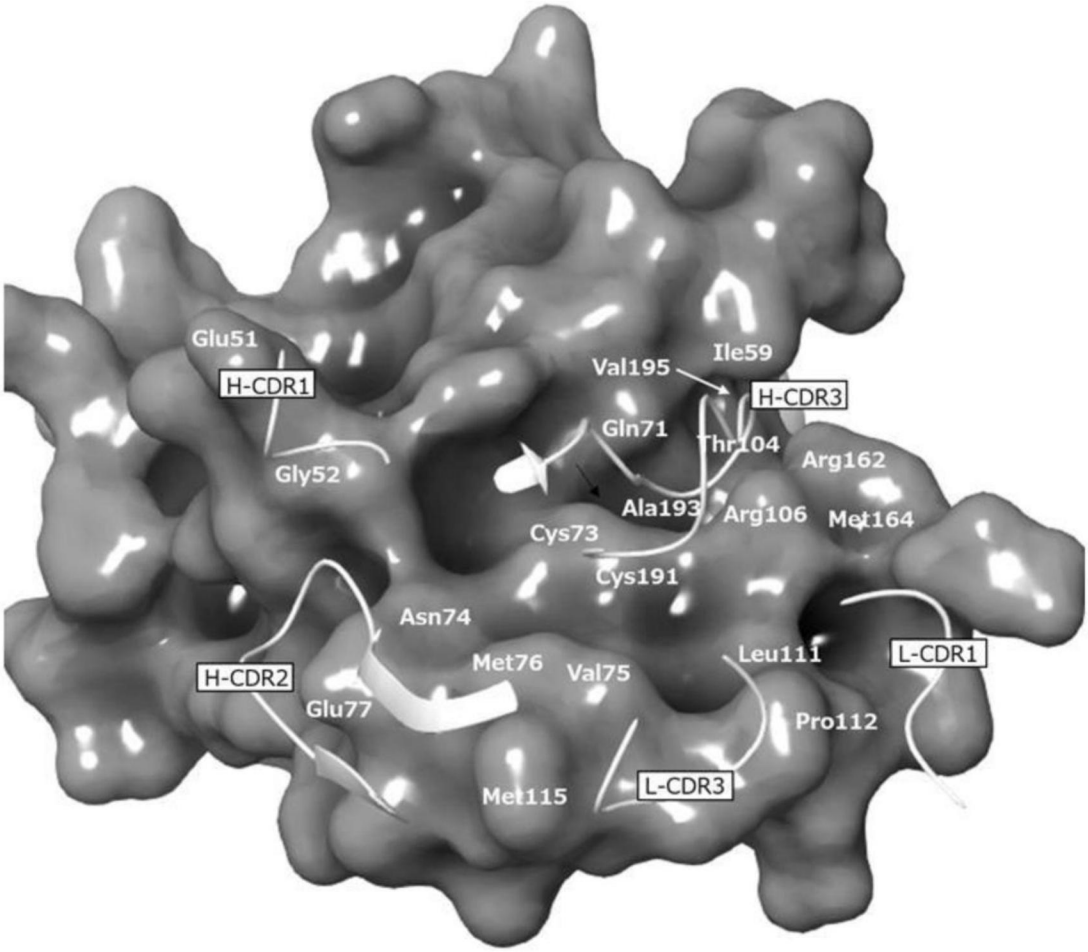

對照
抗體 A
AT8 (磷酸化 tau)
比例尺 : 100μm


AT8 陽性面積/總面積 (%)
0
5
10
15
20
對照
抗體 A

【圖10】

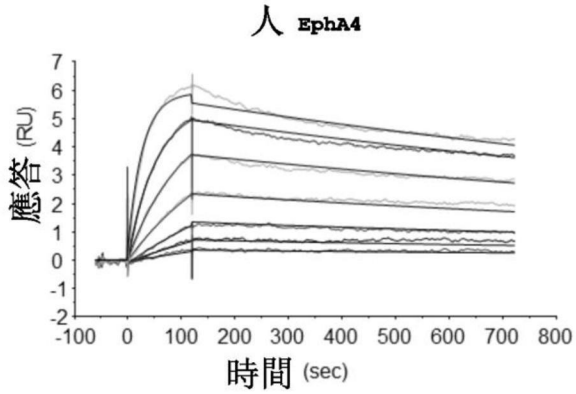

完整 Fab
完整 H 鏈
H-CDR 1
H-CDR 2
H-CDR 3
完整 L 鏈
L-CDR 1
L-CDR 3
Glu 51
Gly 52
Ile 59
Gln 71
Cys 73
Asn 74
Val 75
Met 76
Glu 77
Thr 104
Arg 106
Leu 111
Pro 112
Met 115
Arg 162
Met 164
Cys 191
Ala 193
Val 195

【圖11A】

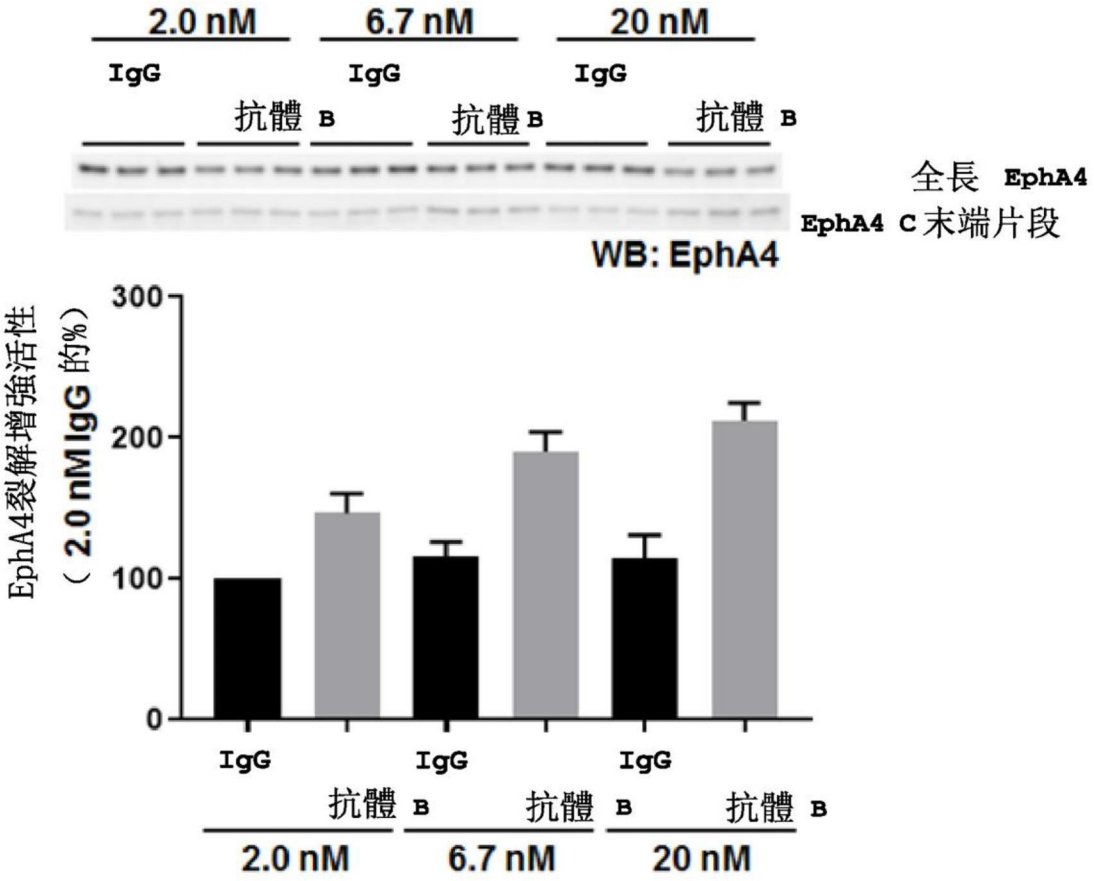

Glu51
H-CDR1
Gly52
Val195
Ile59
H-CDR3
Gln71
Thr104
Arg162
Ala193
Arg106
Met164
Cys73
Cys191
Asn74
H-CDR2
Met76
Val75
Glu77
Leu111
L-CDR1
Pro112
Met115
L-CDR3

【圖11B】

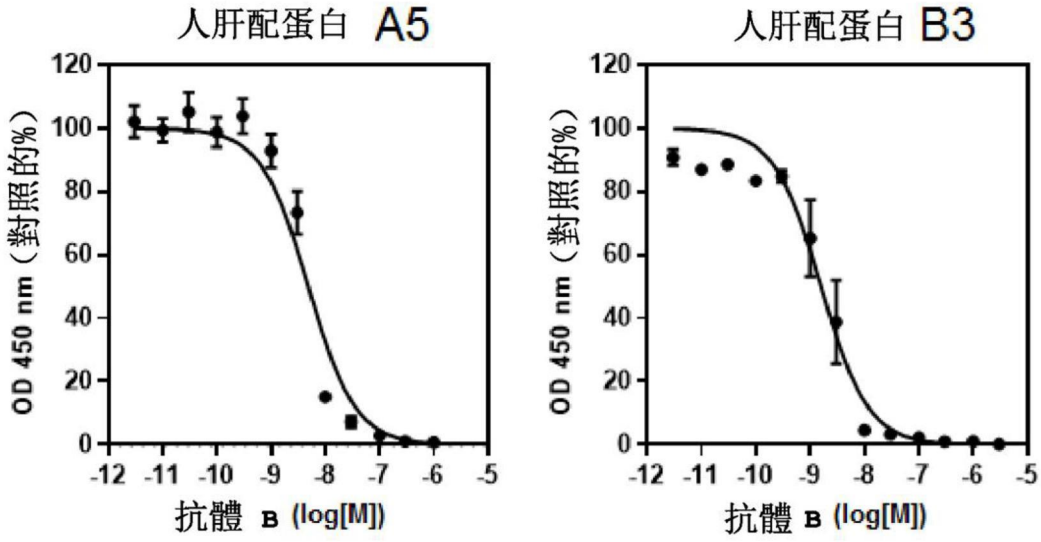
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)
人 EphA4	3.70.E+05	4.94.E-04	1.34.E-09	5.66	0.015



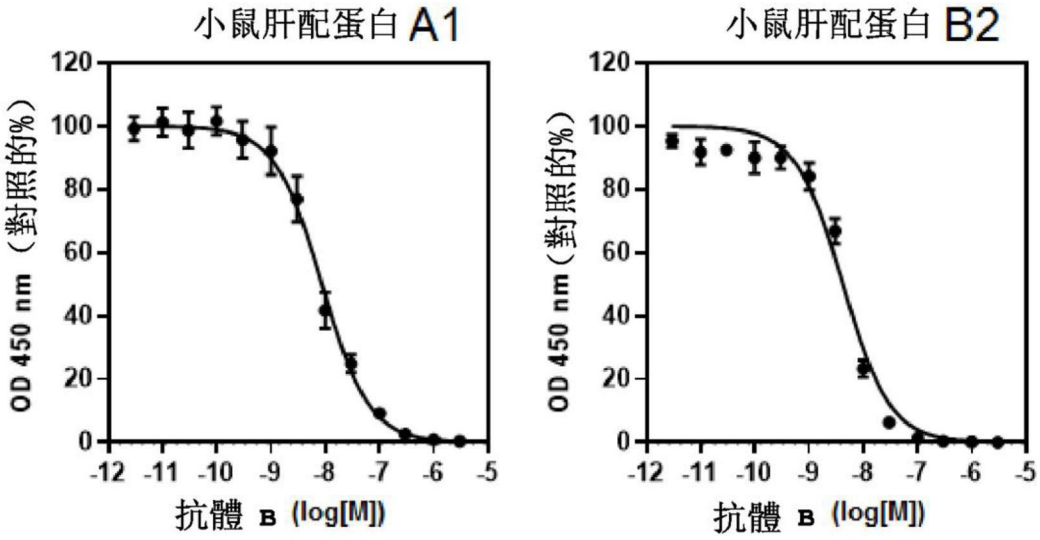
【圖12】



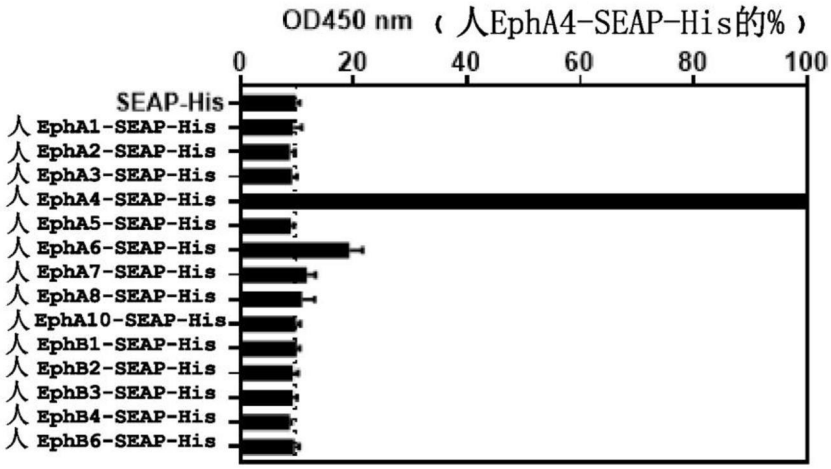
【圖13】


人肝配蛋白 A5
人肝配蛋白 B3
OD 450 nm（對照的%）
抗體 B (log[M])
120
100
80
60
40
20
0
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5

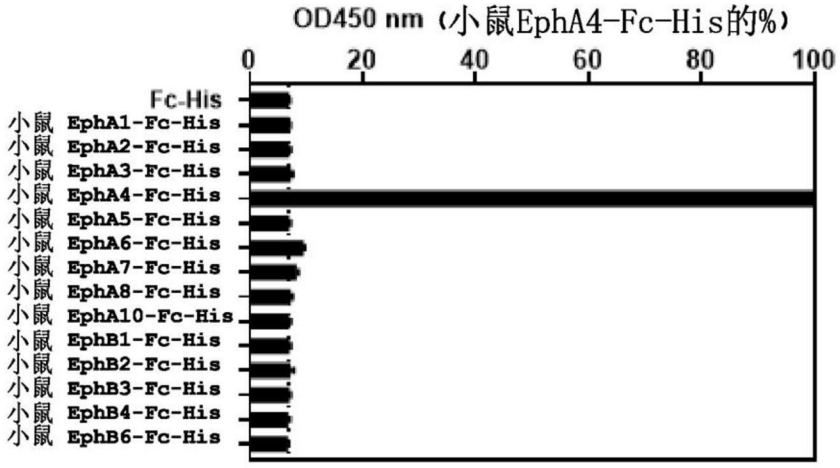
【圖14】


小鼠肝配蛋白 A1
小鼠肝配蛋白 B2
OD 450 nm（對照的%）
抗體 B (log[M])
120
100
80
60
40
20
0
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5

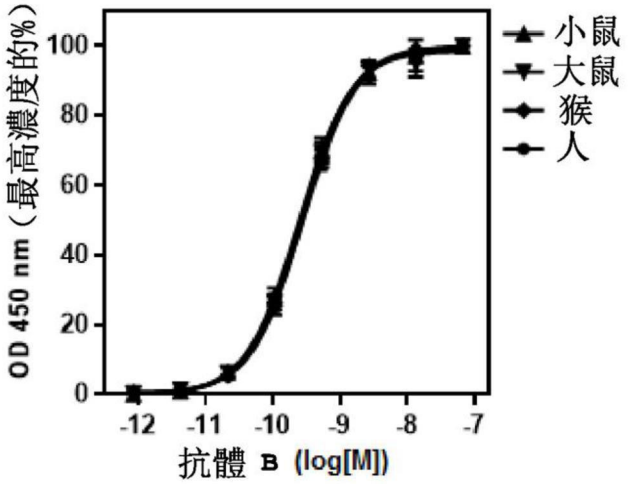
【圖15】


OD450 nm （人EphA4-SEAP-His的%）
0
20
40
60
80
100
SEAP-His
人 EphA1-SEAP-His
人 EphA2-SEAP-His
人 EphA3-SEAP-His
人 EphA4-SEAP-His
人 EphA5-SEAP-His
人 EphA6-SEAP-His
人 EphA7-SEAP-His
人 EphA8-SEAP-His
人 EphA10-SEAP-His
人 EphB1-SEAP-His
人 EphB2-SEAP-His
人 EphB3-SEAP-His
人 EphB4-SEAP-His
人 EphB6-SEAP-His

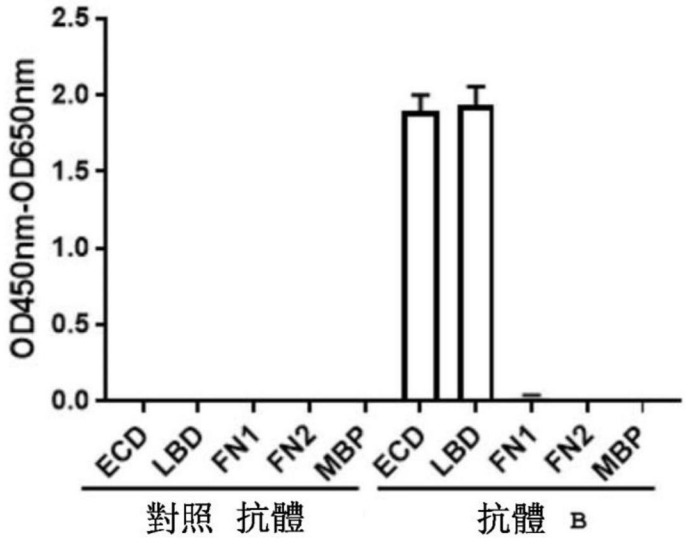
【圖16】


OD450 nm（小鼠EphA4-Fc-His的%）
0
20
40
60
80
100
Fc-His
小鼠 EphA1-Fc-His
小鼠 EphA2-Fc-His
小鼠 EphA3-Fc-His
小鼠 EphA4-Fc-His
小鼠 EphA5-Fc-His
小鼠 EphA6-Fc-His
小鼠 EphA7-Fc-His
小鼠 EphA8-Fc-His
小鼠 EphA10-Fc-His
小鼠 EphB1-Fc-His
小鼠 EphB2-Fc-His
小鼠 EphB3-Fc-His
小鼠 EphB4-Fc-His
小鼠 EphB6-Fc-His

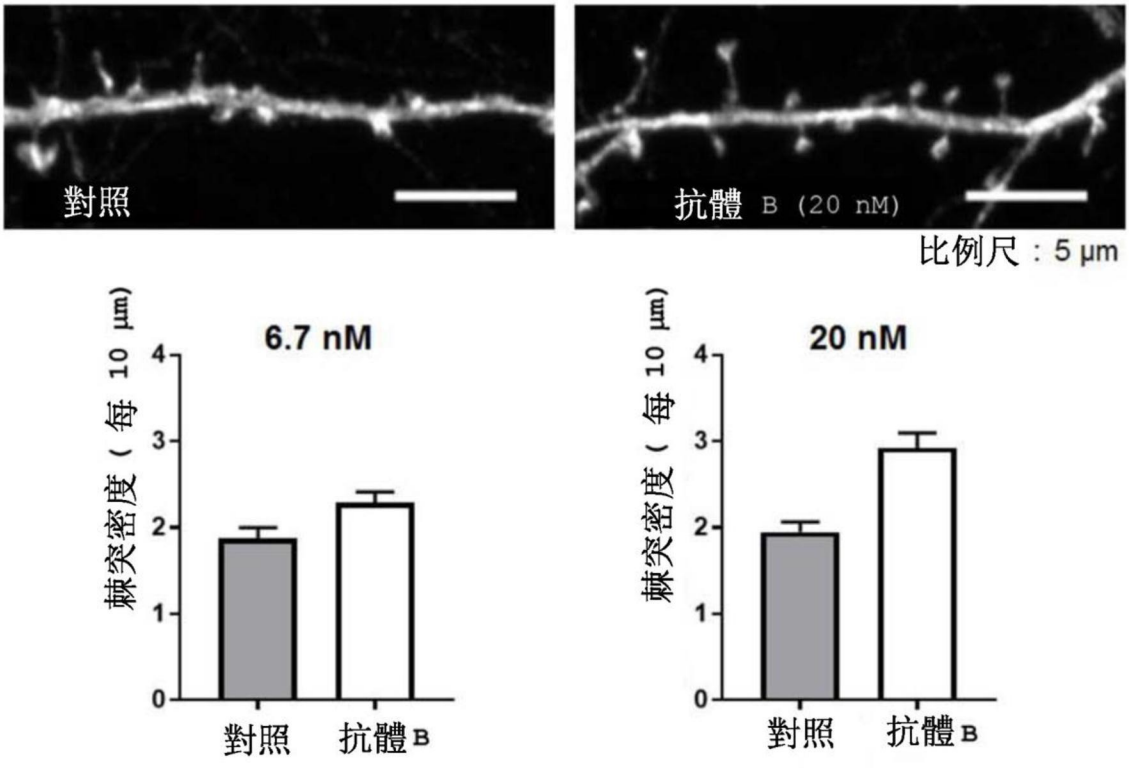
【圖17】


OD 450 nm（最高濃度的%）
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
抗體 B (log[M])
小鼠
大鼠
猴
人

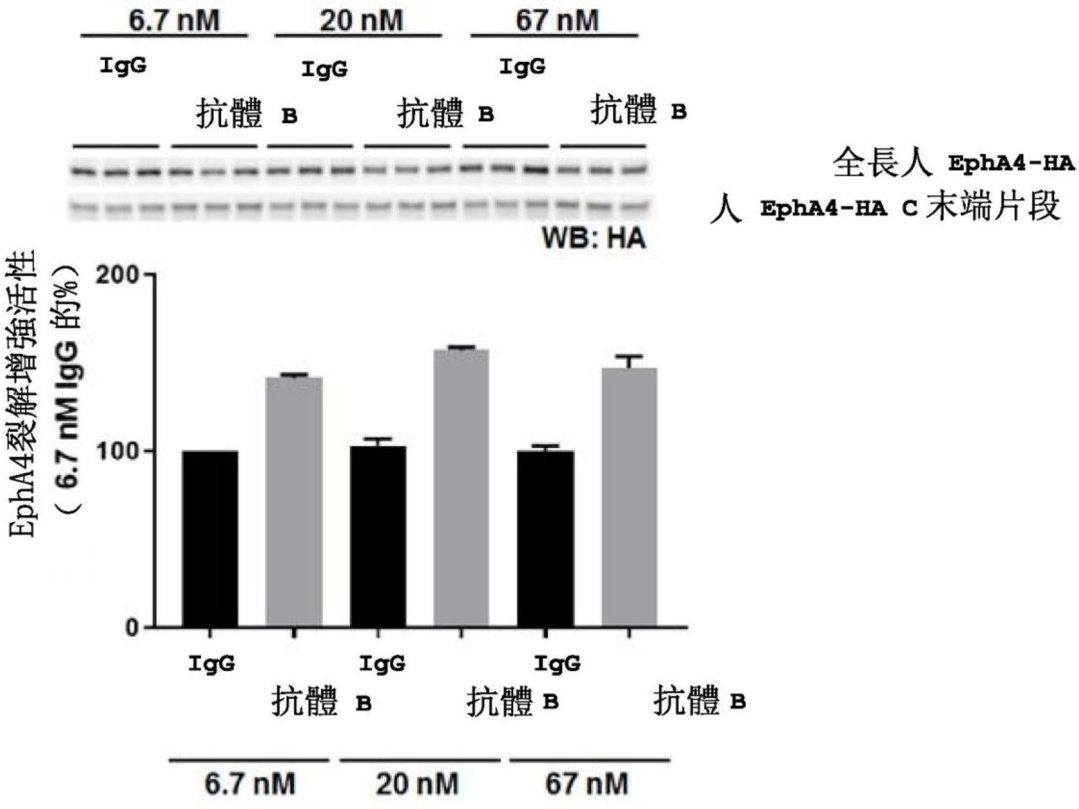
【圖18】


OD450nm-OD650nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ECD
LBD
FN1
FN2
MBP
ECD
LBD
FN1
FN2
MBP
對照 抗體
抗體 B

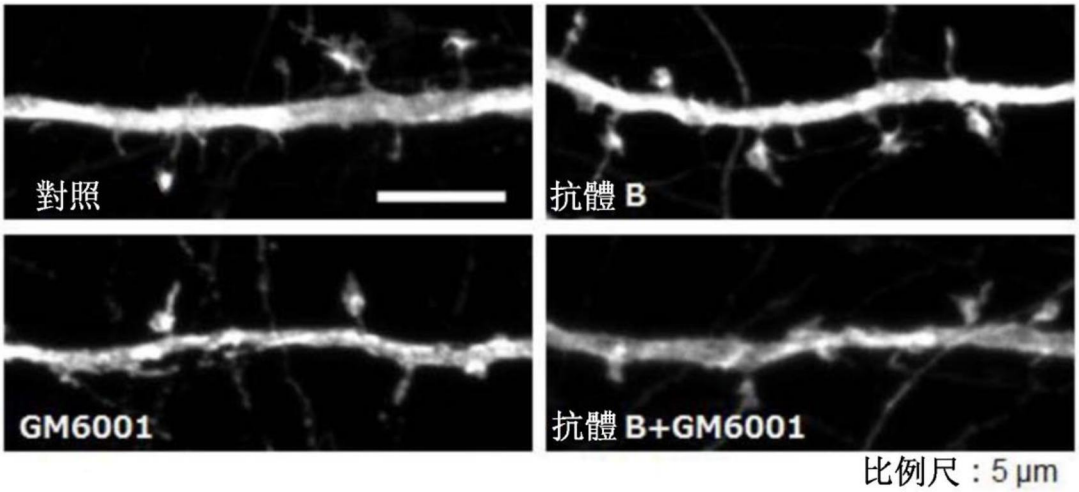
【圖19】

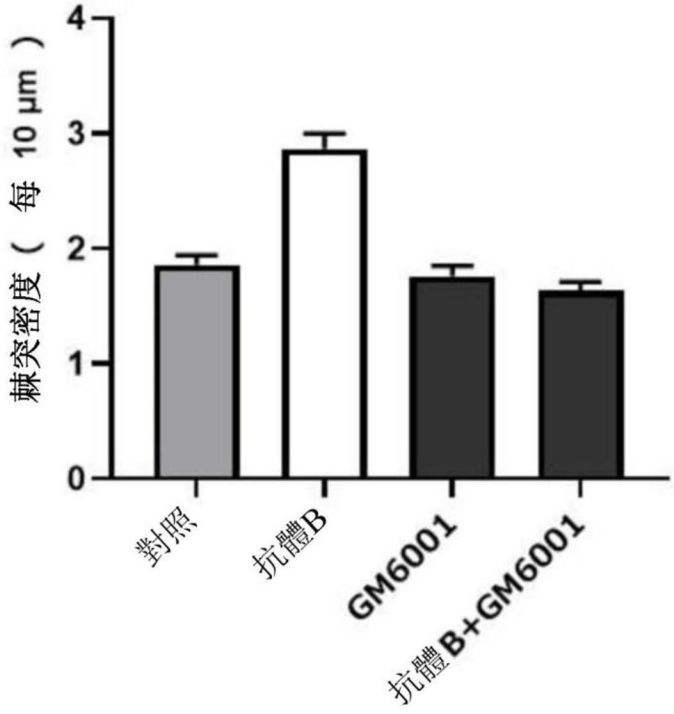

對照
抗體 B (20 nM)
比例尺：5 μm
6.7 nM
20 nM
棘突密度（每 10 μm）
4
3
2
1
0
對照
抗體B
棘突密度（每 10 μm）
4
3
2
1
0
對照
抗體B

【圖20】

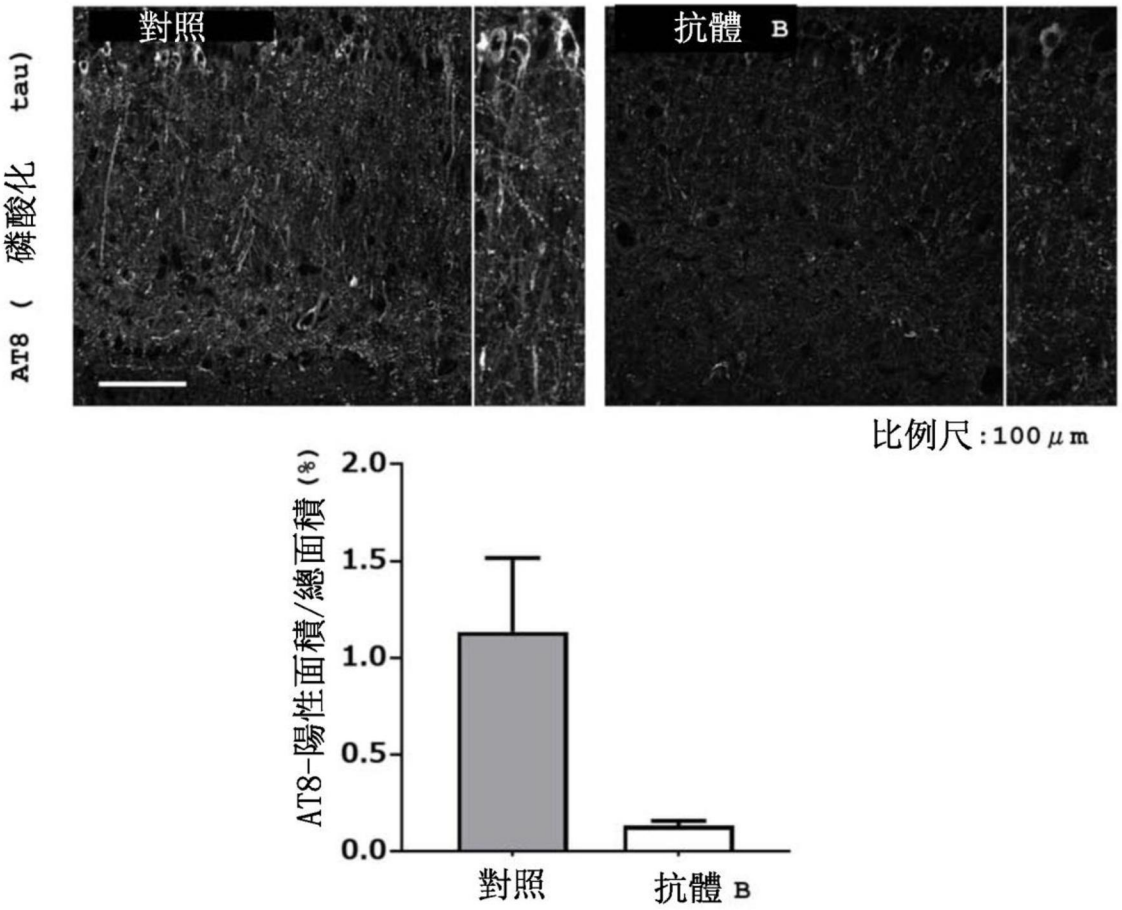

6.7 nM
20 nM
67 nM
IgG
IgG
IgG
抗體 B
抗體 B
抗體 B
全長人 EphA4-HA
人 EphA4-HA C末端片段
WB: HA
EphA4裂解增強活性
（6.7 nM IgG 的%）
200
100
0
IgG
IgG
IgG
抗體 B
抗體 B
抗體 B
6.7 nM
20 nM
67 nM

【圖21】


對照
抗體 B
GM6001
抗體 B+GM6001
比例尺：5 μm


棘突密度（每 10 μm）
0
1
2
3
4
對照
抗體B
GM6001
抗體B+GM6001

【圖22】



【圖23】