



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099197
(43) 공개일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) GO1N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
GO1N 33/6863 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7013303
(22) 출원일자(국제) 2022년11월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월22일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/041723
(87) 국제공개번호 WO 2023/085320
국제공개일자 2023년05월19일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-184126 2021년11월11일 일본(JP)

(71) 출원인
에자이 알앤디 매니지먼트 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 분쿄구 코이시가와 4초메 6반 10고
(72) 발명자
가와카츠, 도모미
일본 6500047 효고켄 고베시 추오구 미나토지마미
나미마치 6초메 8반지 2 가부시키가이샤 칸 겐큐
쇼 내
다하라, 가즈히로
일본 3002635 이바라키켄 츠크바시 도코다이 5초
메 1반지 3 에자이 가부시키가이샤 츠크바 겐큐쇼
내
슈타, 가즈요시
일본 3002635 이바라키켄 츠크바시 도코다이 5초
메 1반지 3 에자이 가부시키가이샤 츠크바 겐큐쇼
내
(74) 대리인
장수길, 이유리, 이석재

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 항-EphA4 항체

(57) 요약

[과제] EphA4에 특이적으로 결합하여 높은 검출 감도로 EphA4를 검출할 수 있는 항체, 및 항체를 특징으로 하는 EphA4의 검출 또는 정량화하는 방법 및 이를 위한 키트를 제공하는 것.

[해결 수단] 특정 중쇄 CDR 서열 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체와 이의 항원 결합 단편, 및 이를 특징으로 하는 (뒷면에 계속)

대표도

	hEphA1-His	hEphA2-His	hEphA3-His	hEphA4-His	hEphA5-His	hEphA6-His	hEphA7-His	hEphA8-His	hEphA10-His	hEphB1-His	hEphB2-His	hEphB3-His	hEphB4-His	hEphB6-His
KPEP11_01	0.127	0.123	0.122	0.713	0.163	0.135	0.141	0.138	0.122	0.178	0.161	0.163	0.167	0.149
KPEP11_02	0.138	0.132	0.128	0.784	0.157	0.155	0.138	0.143	0.137	0.174	0.181	0.154	0.164	0.166
KPEP11_04	0.115	0.111	0.112	0.841	0.138	0.128	0.135	0.113	0.112	0.163	0.161	0.142	0.141	0.161
KPEP11_05	0.107	0.090	0.098	0.727	0.127	0.119	0.110	0.113	0.112	0.153	0.140	0.134	0.139	0.148
KPEP11_07	0.109	0.094	0.101	0.765	0.140	0.125	0.125	0.113	0.122	0.156	0.146	0.142	0.148	0.155
KPEP11_08	0.139	0.120	0.122	0.687	0.164	0.154	0.151	0.146	0.162	0.206	0.188	0.195	0.181	0.203
KPEP11_09	0.112	0.117	0.102	0.652	0.162	0.150	0.153	0.129	0.152	0.179	0.176	0.189	0.165	0.191
KPEP11_10	0.145	0.145	0.143	0.696	0.226	0.197	0.207	0.188	0.212	0.272	0.245	0.256	0.233	0.257
KPEP11_12	0.151	0.141	0.141	0.723	0.176	0.183	0.168	0.146	0.167	0.205	0.216	0.196	0.178	0.215
KPEP11_13	0.179	0.186	0.185	0.740	0.233	0.210	0.192	0.210	0.197	0.274	0.249	0.215	0.261	0.262
KPEP11_18	0.111	0.094	0.106	0.894	0.135	0.121	0.105	0.125	0.126	0.161	0.154	0.135	0.164	0.177
KPEP11_20	0.095	0.095	0.092	0.555	0.136	0.128	0.114	0.122	0.140	0.172	0.165	0.149	0.168	0.182

방법 및 키트가 제공된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함한다: (a) SEQ ID NO. 52로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 54로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 SEQ ID NO. 55로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄; (b) SEQ ID NO. 64로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 65로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 66으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 SEQ ID NO. 67로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 68로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 69로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는 (c) SEQ ID NO. 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 42로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 SEQ ID NO. 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/565 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 항체는 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(a) SEQ ID NO. 52에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 53에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 54에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO. 55에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 56에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 57에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄;

(b) SEQ ID NO. 64에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 65에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 66에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO. 67에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 68에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 69에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

(c) SEQ ID NO. 40에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 41에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 42에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO. 43에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 44에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 45에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 52에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 53에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 54에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO. 55에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 56에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 57에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및

SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제2항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및

SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 64에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 65에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 66에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO. 67에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 68에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 69에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제5항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및

SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 40에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 41에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 42에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및

SEQ ID NO. 43에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 44에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 45에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제7항에 있어서, 항체는

SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및

SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 표지된, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 인간 EphA4를 검출하거나 정량화하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 인간 EphA4는 인간 EphA4의 N-말단 단편인, 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 또는 뇌척수액인, 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제9항의 표지된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 인간 EphA4의 검출 또는 정량화용 키트.

청구항 16

제15항에 있어서, 인간 EphA4는 인간 EphA4의 N-말단 단편인, 키트.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 키트.

청구항 18

제15항 또는 제16항에 있어서,

SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 키트.

청구항 19

제15항 또는 제16항에 있어서,

SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 키트.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 EphA4의 N-말단 단편을 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 EphA4에 결합하는 항체, 항체를 인코딩하는 핵산, 핵산을 포함하는 벡터, 벡터를 포함하는 세포, 항체를 생산하는 방법, 뿐만 아니라 항체를 이용한 EphA4 검출 또는 정량화 방법 및 EphA4를 검출 또는 정량화하기 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] EphA4는 수용체-형 티로신 키나제 패밀리의 구성원이며, 이는 가시돌기 상에 존재하는 작은 가시 구조인 가시를

제어하는 분자이다. 에프린 A 형 및 B 형이 EphA4의 리간드로 알려져 있으며, EphA4가 그의 리간드인 에프린에 결합하는 경우, 탈접착 신호가 유도되어, 가시의 움츠림을 유발한다. EphA4는 해마 또는 대뇌 피질에서 고도로 발현되며, 이의 세포외 도메인은 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 또는 ADAM(디스인테그린 및 메탈로프로테이나제)에 의해 절단된다. 이들 절단된 EphA4 단편은 세포외로 방출되고, 혈장에도 또한 존재한다(특허문헌 1).

[0003] EphA4는 지금까지 알츠하이머병(이하 "AD"로도 지칭됨)의 병리에 관여하는 것으로 시사되어 왔다(비특허문헌 1 내지 4). 예를 들어, EphA4는 AD 환자 또는 AD 모델 마우스에서 활성화되는 것으로 알려져 있으며(비특허문헌 2 내지 4), AD에서 가시 밀도가 감소하고 그 정도가 AD의 임상 증상과 관련이 있기 때문에(비특허문헌 5), 비정상적 EphA4 활성화가 AD 병리의 발병 또는 진행의 일 원인일 수 있는 것으로 생각된다(비특허문헌 6). 생체내 EphA4는 AD와 같은 특정 신경계 질병을 검출할 수 있는 마커로서의 잠재성을 갖는 것으로 시사되었으며, 생물학적 샘플에서 EphA4 또는 이의 세포외 단편을 종래 항체보다 더 높은 검출 감도로 검출할 수 있는 항체가 요망된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) WO 2012/147798A1

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Rosenberger AF et al., Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 16; 2:79
 (비특허문헌 0002) Fu AK et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jul 8; 111(27):9959-64
 (비특허문헌 0003) Vargas LM et al., PLoS One. 2014 Mar 21; 9(3)
 (비특허문헌 0004) Huang TY et al., J Exp Med. 2017 Dec 4; 214(12):3669-3685.
 (비특허문헌 0005) Boros et al., Ann Neurol. 2017 Oct; 82(4):602-614
 (비특허문헌 0006) Vargas LM et al., Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Apr; 1864:1148-1159

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 개시내용의 목적은 EphA4에 특이적으로 결합하며, 높은 검출 감도로 EphA4를 검출할 수 있는 항체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 개시내용의 목적은 또한 항체를 이용하여 EphA4를 검출 또는 정량화하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 개시내용의 목적은 추가로 높은 검출 감도로 EphA4를 특이적으로 검출 또는 정량화할 수 있는 항-EphA4 항체를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 토끼 항체 파지 라이브러리를 스크리닝하여 획득한 다수의 scFv로부터 특히 높은 검출 감도로 EphA4에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 형성될 수 있음을 발견하였고, 이에 따라 항-EphA4 항체를 완성하게 되었다.

[0010] 따라서, 본 개시내용은 다음의 특징을 포괄한다.

[0011] [1] 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편

[0012] (a) SEQ ID NO. 52에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 53에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 54에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄; 및

- [0013] SEQ ID NO. 55에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 56에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 57에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄;
- [0014] (b) SEQ ID NO. 64에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 65에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 66에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0015] SEQ ID NO. 67에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 68에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 69에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는
- [0016] (c) SEQ ID NO. 40에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 41에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 42에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0017] SEQ ID NO. 43에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 44에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 45에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.
- [0018] [2] [1]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0019] SEQ ID NO. 52에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 53에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 54에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0020] SEQ ID NO. 55에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 56에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 57에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.
- [0021] [3] [2]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0022] SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및
- [0023] SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역.
- [0024] [4] [2]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0025] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및
- [0026] SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역.
- [0027] [5] [1]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0028] SEQ ID NO. 64에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 65에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 66에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0029] SEQ ID NO. 67에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 68에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 69에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.
- [0030] [6] [5]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0031] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및
- [0032] SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역.
- [0033] [7] [1]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0034] SEQ ID NO. 40에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 41에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 42에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0035] SEQ ID NO. 43에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 44에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 45에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.
- [0036] [8] [7]에 있어서, 항체가 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편
- [0037] SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및
- [0038] SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역.
- [0039] [9] [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 있어서, 항체의 중쇄 불변 영역이 토끼 IgG의 불변 영역인, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [0040] [10] [9]에 있어서, 토끼 IgG의 불변 영역이 SEQ ID NO. 22에 나타난 아미노산 서열을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0041] [11] [1] 내지 [10] 중 어느 하나에 있어서, 항체의 경쇄 불변 영역이 토끼 IgK의 불변 영역인, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0042] [12] [11]에 있어서, 토끼 IgK의 불변 영역이 SEQ ID NO. 23에 나타난 아미노산 서열을 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0043] [13] 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체
- [0044] SEQ ID NO. 24에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및
- [0045] SEQ ID NO. 25에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.
- [0046] [14] 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체
- [0047] SEQ ID NO. 28에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및
- [0048] SEQ ID NO. 29에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.
- [0049] [15] 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체
- [0050] SEQ ID NO. 32에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및
- [0051] SEQ ID NO. 33에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.
- [0052] [16] 다음을 포함하는, 항-EphA4 항체
- [0053] SEQ ID NO. 36에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및
- [0054] SEQ ID NO. 37에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.
- [0055] [17] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 표지된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0056] [18] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산.
- [0057] [19] [18]의 핵산을 포함하는 벡터.
- [0058] [20] [19]의 벡터를 포함하는 숙주세포.
- [0059] [21] [20]의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법.
- [0060] [22] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법.
- [0061] [23] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 인간 EphA4를 검출 또는 정량화하는 방법.
- [0062] [24] [23]에 있어서, 인간 EphA4가 인간 EphA4의 N-말단 단편인, 방법.
- [0063] [25] [23] 또는 [24]에 있어서, 생물학적 샘플이 혈액, 혈청, 혈장, 또는 뇌척수액인, 방법.
- [0064] [26] [23] 내지 [25] 중 어느 하나에 있어서, 방법이 ELISA인, 방법.
- [0065] [27] [23] 내지 [26] 중 어느 하나에 있어서, 방법이 샌드위치 ELISA인, 방법.
- [0066] [28] [23] 내지 [27] 중 어느 하나에 있어서, [17]에 따른 표지된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0067] [29] [1] 내지 [17] 중 어느 하나에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 인간 EphA4 검출 또는 정량화용 키트.
- [0068] [30] [29]에 있어서,

- [0069] 키트가 샌드위치 ELISA 키트이고,
- [0070] 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편 중 적어도 두 개의 유형을 포함하는, 키트.
- [0071] [31] [29] 또는 [30]에 있어서, 다음을 포함하는, 키트
- [0072] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및
- [0073] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0074] [32] [29] 또는 [30]에 있어서, 다음을 포함하는, 키트
- [0075] SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및
- [0076] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0077] [33] [29] 또는 [30]에 있어서, 다음을 포함하는, 키트
- [0078] SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및
- [0079] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0080] [34] [29] 내지 [33] 중 어느 하나에 있어서, 인간 EphA4가 인간 EphA4의 N-말단 단편인, 키트.
- [0081] [35] [29] 내지 [34] 중 어느 하나에 있어서, 키트가 인간 EphA4의 N-말단 단편을 포함하는, 키트.
- [0082] [36] [29] 내지 [35] 중 어느 하나에 있어서, 생물학적 샘플 중 인간 EphA4를 검출 또는 정량화하기 위한, 키트.
- [0083] [37] [36]에 있어서, 생물학적 샘플이 혈액, 혈청, 혈장, 또는 뇌척수액인, 키트.
- [0084] [38] 인간 EphA4의 검출 또는 정량화에서의 사용을 위한 [1] 내지 [17] 중 어느 하나에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0085] [39] 인간 EphA4의 N-말단 단편의 검출 또는 정량화에서의 사용을 위한 [1] 내지 [17] 중 어느 어느 하나에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

발명의 효과

- [0086] 본 개시내용에 따르면, EphA4에 특이적으로 결합하며 높은 검출 감도로 EphA4를 검출할 수 있는 항체가 제공된다.
- [0087] 또한 본 개시내용에 따르면, 높은 검출 감도로 EphA4를 특이적으로 검출할 수 있는 항-EphA4 항체를 포함하는 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0088] 도 1은 실시예 1에서 생산된 각각의 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 각각의 인간 Eph 수용체 패밀리에 대한 결합활성 평가 결과를 나타낸다.
- 도 2는 실시예 1에서 생산된 각각의 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 다양한 EphA4에 대한 결합활성 평가 결과를 나타낸다.
- 도 3은 실시예 1에서 생산된 각각의 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 각각의 인간 EphA4의 도메인에 대한 결합활성 평가 결과를 나타낸다.
- 도 4는 실시예 1에서 생산된 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 조합을 사용하는 샌드위치 ELISA에서 인간 EphA4 세포외 도메인에 대해 인간 EphA4 세포외 도메인 S-N((10 ng/mL의 EphA4 세포외 도메인을 시딩했을 때 획득된

신호) - (0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호))에 대한 평가 결과를 나타낸다.

도 5는 실시예 1에서 생산된 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 조합을 사용하는 샌드위치 ELISA에서 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 인간 EphA4 세포의 도메인 S/N((10 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호) / (0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호))에 대한 평가 결과를 나타낸다.

도 6은 실시예 1에서 생산된 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 조합을 사용하는 샌드위치 ELISA에서 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 인간 EphA4 세포의 도메인 S-N((1 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호) - (0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호))에 대한 평가 결과를 나타낸다.

도 7은 실시예 1에서 생산된 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 조합을 사용하는 샌드위치 ELISA에서 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 인간 EphA4 세포의 도메인 S/N((1 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호) / (0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호))에 대한 평가 결과를 나타낸다.

도 8은 인간 EphA4에 대한 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 항체의 각각의 대표적인 결합 반응 곡선을 나타낸다.

도 9는 각각의 인간 Eph 수용체 패밀리에 대한 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 항체의 각각의 결합 특이성을 나타낸다.

도 10은 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 및 인간 EphA4에 대한 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 항체의 각각의 반응성 결과를 나타낸다.

도 11은 인간 EphA4의 세포의 도메인(ECD), 리간드 결합 도메인(LBD), 피브로넥틴 III-형 도메인 1(FN1) 및 피브로넥틴 III-형 도메인 2(FN2), 및 말토스-결합 단백질(MBP)에 대한 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 항체의 각각의 반응성 결과를 나타낸다.

도 12는 항체 KPEP11_10 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_18을 이용하는 샌드위치 ELISA의 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 13은 항체 KPEP11_10 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_18을 이용하는 샌드위치 ELISA의 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 14는 항체 KPEP11_18 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_10을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 15는 항체 KPEP11_18 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_10을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 16은 항체 KPEP11_10 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_04를 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 17은 항체 KPEP11_10 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_04를 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 18은 항체 KPEP11_18 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_08을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 19는 항체 KPEP11_18 및 HRP-표지된 항체 KPEP11_08을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성 결과를 나타낸다.

도 20은 HRP-표지된 항체 KPEP11_04, HRP-표지된 항체 KPEP11_18, 및 HRP-표지된 EphA4 항체(Sino 또는 R&D)와 함께 항체 KPEP11_10을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과를 나타낸다.

도 21은 HRP-표지된 항체 KPEP11_04, HRP-표지된 항체 KPEP11_18, 및 HRP-표지된 EphA4 항체(Sino 또는 R&D)와 함께 항체 KPEP11_10을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 혈장 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과를 나타낸다.

도 22는 HRP-표지된 항체 KPEP11_04, HRP-표지된 항체 KPEP11_18, 및 HRP-표지된 EphA4 항체(Sino 또는 R&D)와 함께 항체 KPEP11_10을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

을 평가한 결과를 나타낸다.

도 23은 HRP-표지된 항체 KPEP11_08, HRP-표지된 항체 KPEP11_10, 및 HRP-표지된 EphA4 항체(Sino 또는 R&D)와 함께 항체 KPEP11_18을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 EphA4 세포외 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과를 나타낸다.

도 24는 HRP-표지된 항체 KPEP11_08, HRP-표지된 항체 KPEP11_10, 및 HRP-표지된 EphA4 항체(Sino 또는 R&D)와 함께 항체 KPEP11_18을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 혈장 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과를 나타낸다.

도 25는 HRP-표지된 항체 KPEP11_08, HRP-표지된 항체 KPEP11_10, 및 HRP-표지된 EphA4 항체(Sino 또는 R&D)와 함께 항체 KPEP11_18을 이용하여 작제된 샌드위치 ELISA의 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과를 나타낸다.

도 26은 LC-MS에 의해 분석된 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과 및 ELISA 분석 1에 의한 정량화 분석에서 분석한 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과에 기초하여 수행된 상관관계 분석 결과를 나타낸다.

도 27은 LC-MS에 의해 분석된 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과 및 ELISA 분석 2에 의한 정량화 분석에서 분석한 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과에 기초하여 수행된 상관관계 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 본원에서 사용된 SEQ ID NO.에 의해 명시되거나 인코딩되는 영역은 다음과 같다:

SEQ No	서열 영역	SEQ No	서열 영역
1	인간 EphA4 전장(아미노산 서열)	32	KPEP11_10 전장 중쇄(아미노산 서열)
2	인간 EphA4의 세포외 도메인(아미노산 서열)	33	KPEP11_10 전장 경쇄(아미노산 서열)
3	인간 EphA4 세포외 도메인-SEAP-His 단백질(아미노산 서열)	34	KPEP11_10 전장 중쇄(핵산 서열)
4	인간 EphA4 세포외 도메인-His 단백질(아미노산 서열)	35	KPEP11_10 전장 경쇄(핵산 서열)
5	인간 EphA4 세포외 도메인-MBP-His 단백질(아미노산 서열)	36	KPEP11_18 전장 중쇄(아미노산 서열)
6	KPEP11_04 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	37	KPEP11_18 전장 경쇄(아미노산 서열)
7	KPEP11_04 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	38	KPEP11_18 전장 중쇄(핵산 서열)
8	KPEP11_04 중쇄 가변 영역(핵산 서열)	39	KPEP11_18 전장 경쇄(핵산 서열)
9	KPEP11_04 경쇄 가변 영역(핵산 서열)	40	KPEP11_04 중쇄 CDR1(아미노산 서열)

[0090]

10	KPEP11_08 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	41	KPEP11_04 중쇄 CDR2(아미노산 서열)
11	KPEP11_08 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	42	KPEP11_04 중쇄 CDR3(아미노산 서열)
12	KPEP11_08 중쇄 가변 영역(핵산 서열)	43	KPEP11_04 경쇄 CDR2(아미노산 서열)
13	KPEP11_08 경쇄 가변 영역(핵산 서열)	44	KPEP11_04 경쇄 CDR2(아미노산 서열)
14	KPEP11_10 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	45	KPEP11_04 경쇄 CDR3(아미노산 서열)
15	KPEP11_10 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	46	KPEP11_04 중쇄 CDR1(핵산 서열)
16	KPEP11_10 중쇄 가변 영역(핵산 서열)	47	KPEP11_04 중쇄 CDR2(핵산 서열)
17	KPEP11_10 경쇄 가변 영역(핵산 서열)	48	KPEP11_04 중쇄 CDR3(핵산 서열)
18	KPEP11_18 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	49	KPEP11_04 경쇄 CDR2(핵산 서열)
19	KPEP11_18 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	50	KPEP11_04 경쇄 CDR2(핵산 서열)
20	KPEP11_18 중쇄 가변 영역(핵산 서열)	51	KPEP11_04 경쇄 CDR3(핵산 서열)
21	KPEP11_18 경쇄 가변 영역(핵산 서열)	52	KPEP11_08, KPEP11_10 중쇄 CDR1(아미노산 서열)
22	트키 IgG의 불변 영역(아미노산 서열)	53	KPEP11_08, KPEP11_10 중쇄 CDR2(아미노산 서열)
23	트키 IgK의 불변 영역(아미노산 서열)	54	KPEP11_08, KPEP11_10 중쇄 CDR3(아미노산 서열)
24	KPEP11_04 전장 중쇄(아미노산 서열)	55	KPEP11_08, KPEP11_10 경쇄 CDR1(아미노산 서열)
25	KPEP11_04 전장 경쇄(아미노산 서열)	56	KPEP11_08, KPEP11_10 경쇄 CDR2(아미노산 서열)
26	KPEP11_04 전장 중쇄(핵산 서열)	57	KPEP11_08, KPEP11_10 경쇄 CDR3(아미노산 서열)
27	KPEP11_04 전장 경쇄(핵산 서열)	58	KPEP11_08, KPEP11_10 중쇄 CDR1(핵산 서열)
28	KPEP11_08 전장 중쇄(아미노산 서열)	59	KPEP11_08, KPEP11_10 중쇄 CDR2(핵산 서열)
29	KPEP11_08 전장 경쇄(아미노산 서열)	60	KPEP11_08, KPEP11_10 중쇄 CDR3(핵산 서열)
30	KPEP11_08 전장 중쇄(핵산 서열)	61	KPEP11_08, KPEP11_10 경쇄 CDR1(핵산 서열)
31	KPEP11_08 전장 경쇄(핵산 서열)	62	KPEP11_08, KPEP11_10 경쇄 CDR2(핵산 서열)

[0091]

63	KPEP11_08, KPEP11_10 경쇄 CDR3(핵산 서열)	95	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12, 및 KPEP11_13의 경쇄 CDR1(아미노산 서열)
64	KPEP11_18 중쇄 CDR1(아미노산 서열)	96	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12, 및 KPEP11_13의 경쇄 CDR2(아미노산 서열)

[0092]

65	KPEP11_18 중쇄 CDR2(아미노산 서열)	97	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12, 및 KPEP11_13의 경쇄 CDR3(아미노산 서열)
66	KPEP11_18 중쇄 CDR3(아미노산 서열)	98	KPEP11_02, KPEP11_05, 및 KPEP11_07의 중쇄 CDR1(아미노산 서열)
67	KPEP11_18 경쇄 CDR1(아미노산 서열)	99	KPEP11_02 및 KPEP11_05의 중쇄 CDR2(아미노산 서열)
68	KPEP11_18 경쇄 CDR2(아미노산 서열)	100	KPEP11_02 및 KPEP11_05의 중쇄 CDR3(아미노산 서열)
69	KPEP11_18 경쇄 CDR3(아미노산 서열)	101	KPEP11_02, KPEP11_05, 및 KPEP11_07의 경쇄 CDR1(아미노산 서열)
70	KPEP11_18 중쇄 CDR1(핵산 서열)	102	KPEP11_02, KPEP11_05, 및 KPEP11_07의 경쇄 CDR2(아미노산 서열)
71	KPEP11_18 중쇄 CDR2(핵산 서열)	103	KPEP11_02, KPEP11_05, 및 KPEP11_07의 경쇄 CDR3(아미노산 서열)
72	KPEP11_18 중쇄 CDR3(핵산 서열)	104	KPEP11_07의 중쇄 CDR2(아미노산 서열)
73	KPEP11_18 경쇄 CDR1(핵산 서열)	105	KPEP11_07의 중쇄 CDR3(아미노산 서열)
74	KPEP11_18 경쇄 CDR2(핵산 서열)	106	KPEP11_12, KPEP11_13의 중쇄 CDR2(아미노산 서열)
75	KPEP11_18 경쇄 CDR3(핵산 서열)	107	KPEP11_20의 중쇄 CDR1(아미노산 서열)
76	KPEP11_01의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	108	KPEP11_20의 중쇄 CDR2(아미노산 서열)
77	KPEP11_01의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	109	KPEP11_20의 중쇄 CDR3(아미노산 서열)
78	KPEP11_02의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	110	KPEP11_20의 경쇄 CDR1(아미노산 서열)
79	KPEP11_02의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	111	KPEP11_20의 경쇄 CDR2(아미노산 서열)
80	KPEP11_05의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	112	KPEP11_20의 경쇄 CDR3(아미노산 서열)
81	KPEP11_05의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	113	원숭이 EphA4 전장(아미노산 서열)
82	KPEP11_07의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	114	원숭이 EphA4 세포의 도메인(아미노산 서열)
83	KPEP11_07의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	115	토끼 EphA4 전장(아미노산 서열)
84	KPEP11_09의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	116	토끼 EphA4 세포의 도메인(아미노산 서열)
85	KPEP11_09의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	117	랫트 EphA4 전장(아미노산 서열)
86	KPEP11_12의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	118	랫트 EphA4 세포의 도메인(아미노산 서열)
87	KPEP11_12의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	119	마우스 EphA4 전장(아미노산 서열)

[0093]

88	KPEP11_13의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	120	마우스 EphA4 세포의 도메인(아미노산 서열)
89	KPEP11_13의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	121	인간 EphA4 신호 서열(아미노산 서열)
90	KPEP11_20의 중쇄 가변 영역(아미노산 서열)	122	프리프로트림신의 신호 서열(아미노산 서열)
91	KPEP11_20의 경쇄 가변 영역(아미노산 서열)	123	인간 EphA4의 리간드 결합 도메인(아미노산 서열)
92	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12, KPEP11_13의 중쇄 CDR1(아미노산 서열)	124	인간 EphA4의 피브로넥틴 III-형 도메인 1(아미노산 서열)
93	KPEP11_01, KPEP11_09의 중쇄 CDR2(아미노산 서열)	125	인간 EphA4의 피브로넥틴 III-형 도메인 2
94	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12, 및 KPEP11_13의 중쇄 CDR3(아미노산 서열)	126	MBP-His 단백질(아미노산 서열)

[0094]

[0095]

본 개시내용은 EphA4에 결합하는 항-EphA4 항체에 관한 것이다.

[0096]

본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체는 EphA4를 특이적으로 인식하여 결합할 수 있는 항체이다. 항-EphA4 항체는, EphA4와 결합 친화성을 갖는 한, 온전한 항체일 수 있거나, 합성 항체(예컨대, 재조합 항체, 키메라 항체, 및 인간화 항체)일 수 있다. EphA4는 본원에서 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 원숭이-유래 EphA4를 지칭하는 것으로 인식될 수 있다. 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 및 원숭이-유래 EphA4는, 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)에 의해 제공되는 젠뱅크(Genbank)와 같은, 서열 정보가 등록되어 있는 공공 데이터베이스로부터 획득될 수 있거나, 밀접하게 관련된 동물 종의 EphA4 염기 서열 정보를 기초로 프라이머를 설계한 후, 원하는 동물 종에서 추출된 RNA로부터 클로닝함으로써 EphA4 유전자의 서열 정보가 획득될 수 있다. 예를 들어, 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 및 원숭이 EphA4의 염기 서열 정보는 각각 젠뱅크 수탁 번호 NM_004438.5, NM_007936.3, NM_001162411.1, XM_002712496.3, 및 NM_001260870.1로 데이터베이스에

등록되어 있다.

- [0097] 본 개시내용의 일 양태에서, EphA4는 SEQ ID NO. 1에 나타난 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 치환/첨가/결실된 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 "다수"는 원래의 서열과 동등한 기능적 특성을 보유하는 한 제한되지 않으며, 이는 2 내지 100, 예컨대 2 내지 90, 2 내지 80, 2 내지 70, 2 내지 60, 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2이거나, 아미노산 서열의 아미노산 개수의 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하이다.
- [0098] 본 개시내용에서, 용어 "특이적 결합"은 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 용어이며, 항원 또는 에피토프에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 특이적 결합을 결정하는 방법 또한 잘 알려져 있다. 일 구현예에서, "특이적 결합"은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 다른 표적 분자에 보다 더 큰 결합 친화도 및 결합 활성으로, 그리고 더 빠르게 및/또는 더 오랜 시간 동안 면역학적 반응에 의해 EphA4에 결합할 수 있는 것으로 이해된다. 또 다른 구현예에서, "특이적 결합"은 EphA4에 대해 적어도 약 10^{-7} M, 또는 적어도 약 10^{-8} M, 또는 적어도 약 10^{-9} M, 또는 적어도 10^{-10} M, 또는 더 적은 KD를 갖는 항체에 의해 나타날 수 있다. 또한, 추가의 또 다른 구현예에서, "특이적 결합"은 면역학적 반응에 의해 EphA4에 결합하지만 본질적으로 Eph 수용체의 다른 패밀리 분자(예컨대, EphA1, EphA2, EphA3, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, 및 EphB6)에는 결합하지 않는 것으로 이해된다.
- [0099] "항원 결합 단편"은 EphA4에 대한 특이적 결합을 유지하는 항-EphA4 항체의 단편인 한 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 및 scFv를 포함한다.
- [0100] 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 항원에 대한 결합 특성(예컨대, 결합 친화도 및 중-교차 반응성)을 측정하는 방법으로는 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 방법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도는 비아코어(Biacore)TM 바이오센서, 키넥사(KinExA) 바이오센서, 섬광 근접 검정, ELISA, ORIGEN 면역검정(IGEN 제품), 유세포 분석, 형광 쉐딩, 형광 전이, 효모 디스플레이, 및/또는 면역 염색을 사용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0101] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG, IgA, 또는 IgM(또는 이의 서브클래스)과 같은 임의의 클래스를 가질 수 있으며, 특정 클래스에 제한되지 않는다. 면역글로불린은 중쇄(때때로 H-사슬로 지칭됨) 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스로 분류된다. 5 개의 주요 면역글로불린 클래스가 있으며: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 이 중 몇몇은 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, 및 IgA₁ 그리고 IgA₂와 같은 서브클래스(이소타입) 내로 더 세분화될 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄의 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 지칭된다. 또한, 항체의 경쇄(때때로 L-사슬로 지칭됨)의 유형으로는, λ 및 κ 쇄가 있다.
- [0102] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG 항체일 수 있다. 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체는 또한 일부 경우에 단량체, 이량체, 또는 다량체의 형태로 있을 수 있다.
- [0103] 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 가변 영역은 항체 경쇄의 가변 영역 및/또는 항체 중쇄의 가변 영역을 의미할 수 있고, 항체의 불변 영역은 항체 경쇄의 불변 영역 및/또는 항체 중쇄의 불변 영역을 의미할 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각은 상보성 결정 영역으로도 알려진 3 개의 CDR에 의해 연결된 4 개의 프레임워크 영역(FR)으로 이루어진다. 각각의 사슬 내의 CDR은 FR에 의해 가까이 유지되고, 다른 사슬 내의 CDR과 함께, 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 기술에는 예를 들어 (1) 중-교차 서열 가변성에 기초한 접근법(예컨대 문헌[Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정 구조 연구에 기초한 접근법(Al-lazikani et al., 1997 J. Molec. Biol. 273:927-948)이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이들 및 기타 접근법이 조합되어 이용될 수 있다.
- [0104] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편에는, 예를 들어, 이에 제한되지 않고, 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 원숭이-유래 중쇄 서열 및/또는 경쇄 서열이 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 토끼-유래 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 갖는다.
- [0105] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 원하는 대로 변형될 수 있다. 항-EphA4 항체 또

는 이의 항원 결합 단편의 변형은 (a) 시트 또는 나선 형태와 같이 변형 영역에서의 아미노산 서열의 3-차원 구조; (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성 조건; 또는 (c) 측쇄 부피의 유지에 맞서는 변형의 효과를 변화시키는 변형일 수 있거나, 이들 변화가 명백히 관찰되지 않는 변형일 수 있다.

- [0106] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 변형은 구성 아미노산 잔기의 예를 들어 치환, 결실, 및 첨가에 의해 달성될 수 있다.
- [0107] 본 명세서에서, 아미노산은 가장 넓은 의미로 사용되며, 세린(Ser), 아스파라긴(Asn), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 알라닌(Ala), 티로신(Tyr), 글리신(Gly), 리신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu), 글루타민(Gln), 트레오닌(Thr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp), 및 프롤린(Pro)과 같은, 천연 아미노산뿐만 아니라, 아미노산 변이체 및 유도체와 같은 비-천연 아미노산도 포함한다. 당업자는, 이러한 광범위한 정의를 고려하여, 본원의 아미노산에, 예를 들어 L-아미노산; D-아미노산; 아미노산 변이체 및 아미노산 유도체와 같은 화학적으로 변형된 아미노산; 노르류신, β -알라닌, 및 오르니틴과 같은 생체내 단백질의 성분이 아닌 아미노산; 및 당업자에게 잘 알려진 아미노산 특성을 갖는 화학적으로 합성된 화합물이 포함되는 것을 당연하게 인식한다. 비-천연 아미노산의 예는 예를 들어 α -메틸아미노산(예컨대, α -메틸알라닌), D-아미노산(예컨대, D-아스파르트산 및 D-글루탐산), 히스티딘-유사 아미노산(예컨대, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘, 및 α -메틸-히스티딘), 측쇄 상에 과량의 메틸렌을 갖는 아미노산("호모" 아미노산), 및 측쇄의 카복실레이트 작용기 아미노산이 설포네이트 기로 치환된 아미노산(예컨대, 시스테인)을 포함한다.
- [0108] 예를 들어, 천연-발생 아미노산 잔기는 일반적인 측쇄 특성에 기초하여 다음의 그룹으로 분류될 수 있다.
- [0109] (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu 및 Ile;
- [0110] (2) 중성 친수성: Asn, Gln, Cys, Ser, 및 Thr;
- [0111] (3) 산성: Asp 및 Glu;
- [0112] (4) 염기성: His, Lys, 및 Arg;
- [0113] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly 및 Pro; 및
- [0114] (6) 방향족: Trp, Tyr, 및 Phe.
- [0115] 항체를 구성하는 아미노산 서열의 비보존적 치환은 이들 그룹 중 하나에 속하는 아미노산을 또 다른 그룹에 속하는 아미노산과 교환함으로써 수행될 수 있다. 보다 보존적인 치환은 이들 그룹 중 하나에 속하는 아미노산을 동일한 그룹의 또 다른 아미노산과 교환함으로써 수행될 수 있다. 마찬가지로, 아미노산 서열의 결실 또는 치환이 적절하게 수행될 수 있다.
- [0116] 항체를 구성하는 아미노산의 변형의 예는 예를 들어 당 글리코실화 및 번역-후 변형 예컨대 아세틸화 또는 인산 화일 수 있다. 항체는 불변 영역의 보존된 위치에서 글리코실화될 수 있다. 항체의 글리코실화는 대개 N-연결(N-linked) 또는 O-연결(O-linked)된다. N-연결은 아스파라긴 잔기 측쇄 상에의 탄수화물 부분의 결합을 의미한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린, 아스파라긴-X-트레오닌, 및 아스파라긴-X-시스테인(여기서 X는 프롤린 외의 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄 상에 탄수화물 부분을 효소적으로 추가하기 위한 인식 서열이다. 이들 트리펩티드 서열 중 임의의 것이 항체에 존재할 때 잠재적인 글리코실화 부위가 존재한다. O-연결 글리코실화는 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 임의의 것이 하이드록시 아미노산(예컨대, 세린 또는 트레오닌), 그리고 일부 경우에는, 5-하이드록시 프롤린 또는 5-하이드록시 리신에 결합하는 것일 수 있다. 당업자는 목적에 따른 글리코실화 조건(생물학적 방법으로 글리코실화가 수행되는 경우, 예컨대, 숙주 세포 또는 세포 배지의 유형, pH 등)을 적절하게 선택할 수 있다.
- [0117] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 당업자에게 잘 알려진 기술적 상식에 기초하여 다른 변형 방법 단독 또는 이와 조합에 의해 추가로 변형될 수 있다.
- [0118] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산을 발현 벡터 내에 통합시키고, 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하고, 숙주세포를 배양함으로써 생산될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산, 핵산을 포함하는 벡터, 벡터를 포함하는 숙주 세포, 뿐만 아니라 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 항-EphA4

항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법을 포괄한다.

- [0119] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산은 신호 서열을 인코딩하는 DNA를 보유할 수 있고, 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 DNA 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 DNA의 5' 말단에 신호 서열을 인코딩하는 DNA를 보유할 수 있다. 신호 서열은 단백질의 N-말단에 존재하는 아미노산 잔기이며, 이는 분비단백질 또는 내재 막 단백질이 리보솜에서 합성된 후 지질이중층을 통과하는 데 필요하며, 본 개시내용에서, 이는 이러한 기능을 갖는 서열인 한 특별히 제한되지 않는다. 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 포함할 수 있는 신호 서열에는 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 당나귀, 염소, 말, 새, 개, 고양이, 효모 등으로부터 유래된 신호 서열이 포함된다.
- [0120] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라 단리되거나 정제된 것일 수 있다.
- [0121] 본 명세서에서, "단리된" 또는 "정제된"은 자연상태로부터 인위적으로 단리 또는 정제됨을 의미한다. 분자 또는 조성물이 천연 발생할 때, 이의 원래 환경으로부터 변화되거나 제거되거나, 둘 모두라면, 이는 "단리된" 또는 "정제된" 것이다. 단리 또는 정제 방법의 예에는 예를 들어 전기영동, 분자 생물학적, 면역학적, 또는 크로마토그래피 방법, 구체적으로, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 역상 HPLC 크로마토그래피, 등전점 전기영동, 또는 알칼리 추출 방법이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0122] 일 양태에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음 CDR을 포함한다:
- [0123] SEQ ID NO. 40에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 41에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 42에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0124] SEQ ID NO. 43에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 44에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 45에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.
- [0125] 또 다른 양태에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음 CDR을 포함한다:
- [0126] SEQ ID NO. 52에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 53에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 54에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0127] SEQ ID NO. 55에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 56에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 57에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄;
- [0128] 추가의 또 다른 양태에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음 CDR을 포함한다:
- [0129] SEQ ID NO. 64에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1; SEQ ID NO. 65에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 66에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄; 및
- [0130] SEQ ID NO. 67에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1; SEQ ID NO. 68에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및 SEQ ID NO. 69에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄.
- [0131] 일 구현예에서, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0132] 일 구현예에서, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0133] 또 다른 구현예에서, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0134] 추가의 또 다른 구현예에서, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0135] 본 개시내용에서, 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역은 원래의 서열에/로부터 하나 이상의 아미노산이 치환, 첨가, 및/또는 결실된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 본원에서 "다수"는 EphA4에 대한 결합 친화도를 보유하고 EphA4의 절단을 촉진하는 한 제한되지 않으며, 이는 2 내지 15 또는 2 내지 10, 예컨대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2이거나, 아미노산 서열의 아미노산 개수의 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하,

5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하이다.

- [0136] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄는 토끼 IgG의 불변 영역을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 토끼 IgG의 불변 영역은 SEQ ID NO. 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0137] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄는 토끼 IgK의 불변 영역을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 토끼 IgK의 불변 영역은 SEQ ID NO. 23의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0138] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체의 중쇄는 SEQ ID NO. 24에 나타난 아미노산 서열을 포함하고 항-EphA4 항체의 경쇄는 SEQ ID NO. 25에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.
- [0139] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체의 중쇄는 SEQ ID NO. 28에 나타난 아미노산 서열을 포함하고 항-EphA4 항체의 경쇄는 SEQ ID NO. 29에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.
- [0140] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체의 중쇄는 SEQ ID NO. 32에 나타난 아미노산 서열을 포함하고 항-EphA4 항체의 경쇄는 SEQ ID NO. 33에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.
- [0141] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체의 중쇄는 SEQ ID NO. 36에 나타난 아미노산 서열을 포함하고 항-EphA4 항체의 경쇄는 SEQ ID NO. 37에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.
- [0142] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표지된다. 본 개시내용에서, "표지"는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 직접적으로 또는 간접적으로 결합되는 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체로 검출 가능할 수 있거나, 또 다른 특정 결합 쌍과의 조합에 의해 검출 가능할 수 있으며, 예를 들어, 효소 표지의 경우, 기질 화합물 또는 조성물에 작용하거나 이와 반응함으로써 검출 가능한 신호가 생성될 수 있다.
- [0143] 또 다른 구현예에서, 예를 들어 항체-생산 세포에 의해 생산된 항체의 비균질성을 감소시키는 것과 같은 이유를 위해(미국 특허 출원 공개 번호 2010/0297697 또는 문헌[Liu H et al., MAb. 2014 Sep-Oct; 6(5): 1145-1154]), 항-EphA4 항체는 중쇄의 C-말단(카르복시 말단)에 위치한 리신이 결실될 수 있다. 본 개시내용에서, 중쇄의 C-말단 리신이 결실된 항-EphA4 항체에는 유전적 변형에 의해 중쇄의 C-말단 리신이 결실된 항-EphA4 항체, 또는 중쇄의 C-말단 리신이 카르복시펩티다제 등에 의해 번역-후 절단된 항-EphA4 항체 등이 포함된다. 또한, 본 개시내용에서 중쇄의 C-말단 리신이 결실된 항-EphA4 항체에는 두 중쇄 모두에서 C-말단 리신이 결실된 항-EphA4 항체뿐만 아니라, 중쇄 중 하나에서만 C-말단 리신이 결실된 항-EphA4 항체도 포함된다.
- [0144] 일 양태에서, 본 개시내용은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 지칭한다. 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 핵산은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄를 인코딩한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 핵산은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄를 인코딩한다. 추가의 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 핵산은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄를 인코딩한다. 본 개시내용에 따른 핵산에는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄를 인코딩하는 제1 핵산 분자 및 항-EphA4 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄를 인코딩하는 제2 핵산 분자가 포함된다.
- [0145] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 개시내용에 따른 벡터는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터를 지칭한다. 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 벡터는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄를 인코딩하는 핵산 및 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터이다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 벡터는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터이다. 추가의 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 벡터는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 본 개시내용에 따른 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 파지 등일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 바이러스 벡터로서, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 또는 단순 포진 바이러스 벡터 등도 또한 본 개시내용에 따른 벡터에 포함된다.
- [0146] 추가의 또 다른 양태에서, 본 개시내용에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포, 뿐만 아니라 숙주 세포를 배양하는

단계를 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법 또한 본 개시내용에 포함된다. 본 개시내용에 따른 숙주세포는 이.콜라이(E. coli) 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, NS0 세포 등일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법은 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포(또는 숙주 세포의 배양 배지)로부터 분비된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 수집하는 단계를 포함한다.

- [0147] 상기 CDR을 특징으로 하는 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EphA4의 N-말단의 임의의 영역에 결합한다. 본 개시내용에서, EphA4의 "N-말단 도메인"은 EphA4의 세포의 도메인(ECD), 또는 EphA4가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 또는 ADAM(디스인테그린 및 메탈로프로테이나제)에 의해 절단될 경우, N-말단 측 영역을 지칭한다. 인간 EphA4의 ECD는 SEQ ID NO. 2에 나타난 아미노산 서열, 또는 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 치환, 첨가, 및/또는 결실된 아미노산 서열을 갖는 것으로 정의됨에 주목한다. 본원에서 "다수"는 2 내지 15 또는 2 내지 10, 예컨대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2이거나, 아미노산 서열의 아미노산 개수의 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하이다.
- [0148] 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 EphA4에 특이적으로 결합할 수 있고 높은 검출 감도로 EphA4를 검출할 수 있다. 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 생물학적 샘플에서 EphA4를 검출 또는 정량화하는 방법에 관한 것이다(이하 본 개시내용에 따른 방법으로도 지칭됨).
- [0149] 본 개시내용에 따른 방법에서, 측정 표적이 되는 "EphA4"에는 전장 EphA4 뿐만 아니라, EphA4의 N-말단 도메인으로 이루어진 단편(본원에서 간단히 "EphA4 N-말단 단편" 또는 "EphA4의 N-말단 단편"으로도 지칭됨)도 포함된다.
- [0150] 본 개시내용에 따른 방법에서, 생물학적 샘플은 전장 EphA4 또는 EphA4 N-말단 단편을 포함할 수 있는 샘플인 한 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액(CSF), 소변, 타액, 눈물액, 땀 등과 같은 생물학적으로 유래된 액체 성분(체액으로도 지칭됨)을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 또는 뇌척수액이다. 또한, 생물학적 샘플은 인간-유래의 생물학적 샘플에 제한되지 않고, 인간 외의 동물의 생물학적 샘플을 포함한다. 이러한 동물에는 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0151] 본 개시내용에 따른 방법은 생물학적 샘플을 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함한다. EphA4의 검출 또는 정량화는 기술 분야에 잘 알려진 면역검정을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0152] 본 개시내용에 따른 방법은 생물학적 샘플과 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편(제1 항체)을 접촉시킨 다음, 생물학적 샘플을 표지된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편(제2항체)과 추가로 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 방법에서, 상이한 항체가 제1 항체 및 표지된 제2 항체로 사용된다.
- [0153] 면역검정은 검출 가능하게 표지된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 검출 가능하게 표지된 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편(2차 항체)을 사용한다. 항체 표지 방법에 따라, 이들은 효소 면역검정(EIA 또는 ELISA), 방사성면역검정(RIA), 형광 면역검정(FIA), 형광 편광 면역검정(FPIA), 화학발광 면역검정(CLIA), 전기화학발광 면역검정(ECLIA) 등으로 분류되며, 이 중 임의의 것이 본 개시내용에 따른 방법에 사용될 수 있다.
- [0154] ELISA 방법의 경우, 퍼옥시다제 및 알칼리 포스파타제와 같은 효소가 사용될 수 있으며, RIA 방법의 경우, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, 및 ³H와 같은 방사성 재료가 사용될 수 있으며, FPIA 방법의 경우, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 단실 클로라이드, 피아코에리트린, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트, 및 근-적외선 형광재료와 같은 형광물질이 사용될 수 있고, CLIA 방법의 경우, 각각의 효소를 사용하여 발광물질로 변화하는 발광기질을 갖는 루시페라제 및 β 갈락토시다제와 같은 효소뿐만 아니라 루시페린 및 아에쿠오린과 같은 발광 물질로 표지된 항체도 사용될 수 있다. 또한, 금 콜로이드 및 퀴텀 닷과 같은 나노입자로 표지된 항체 또한 검출될 수 있다.
- [0155] 또한, 면역검정에서, 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 비오틴으로 표지되고, 효소 등으로 표지된 아비딘 또는 스트렙타비딘에 결합된 후, EphA4가 검출 및 측정될 수 있다.
- [0156] ELISA 방법에서, 예를 들어 샌드위치 방법이 사용될 수 있다. 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 고체

상 지지체에 고정되고, 적절하게 처리된 생물학적 샘플이 첨가되고 반응하도록 둔 후, 효소로 표지된 또 다른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 추가로 첨가되고 반응하도록 두었다. 세척 후, 이것이 효소 기질과 반응하여, 발색하도록 두고, 흡광도가 측정되어 EphA4 또는 EphA4의 N-말단 단편의 정량화가 가능하게 한다.

- [0157] 효소 기질에 대해, 효소가 피옥시다제인 경우 3,3'-디아미노벤지드네(DAB), 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB 또는 TMBZ), o-페닐렌디아민(OPD) 등이 사용될 수 있고, 효소가 알칼리 포스파타제인 경우 p-니트로페닐 포스페이트(NPP) 등이 사용될 수 있다.
- [0158] 또한, 상기 면역검정 중, 미량의 단백질의 용이한 검출을 가능하게 하는 방법에는 응집 방법이 포함된다. 응집 방법에는 예를 들어 라텍스 입자가 항체에 결합되는 라텍스 응집 방법이 포함된다.
- [0159] 라텍스 입자가 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합되고 생물학적 샘플과 혼합될 때, EphA4가 존재하는 경우, 항체-결합된 라텍스 입자가 응집된다. 그런 다음, 샘플에 근-적외선 광이 조사되고, 흡광도 측정(탁도 측정) 또는 산란광 측정(혼탁 측정)을 통해 응집체가 정량되어 항원 농도를 결정한다.
- [0160] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 방법은 생물학적 샘플 내 인간 EphA4를 검출 또는 정량화하는 방법이다.
- [0161] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 방법은 생물학적 샘플 내 인간 EphA4의 N-말단 단편을 검출 또는 정량화하는 방법이다.
- [0162] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 방법은 인간 EphA4의 검출 또는 정량화를 위해 본 개시내용에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 조합을 사용하는 샌드위치 ELISA를 사용한다.
- [0163] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 EphA4를 검출 또는 정량하기 위한 본 개시내용에 따른 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트(이하 본 개시내용에 따른 키트로도 지칭됨)에 관한 것이다. 본 개시내용에 따른 키트는 EphA4를 검출 또는 정량화할 때 사용될 수 있는 임의의 시약 또는 기기, 또는 키트 사용을 위한 지침을 포괄할 수 있다.
- [0164] 본 개시내용에 따른 키트에서, 측정 표적인 "EphA4"에는 전장 EphA4 뿐만 아니라, EphA4의 N-말단 단편도 포함된다.
- [0165] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 인간 EphA4를 검출 또는 정량화하는 키트에 관한 것이다.
- [0166] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 인간 EphA4의 N-말단 단편을 검출 또는 정량화하는 키트에 관한 것이다.
- [0167] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 인간 EphA4 또는 전장 EphA4의 연속 희석 용액에 대한 표준 곡선을 생성할 때 양성 대조군으로서 사용될 수 있는 인간 전장 EphA4를 포함한다.
- [0168] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 인간 EphA4 또는 단편의 연속 희석 용액에 대한 표준 곡선을 생성할 때 양성 대조군으로서 사용될 수 있는 인간 EphA4의 N-말단 단편을 포함한다.
- [0169] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 뿐만 아니라 SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0170] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 뿐만 아니라 SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0171] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 뿐만 아니라 SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

- [0172] 추가의 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 키트는 SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 뿐만 아니라 SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0173] 본 개시내용에 따른 방법, 구체적으로 샌드위치 ELISA에 사용되거나, 본 개시내용에 따른 키트에 포괄되는 항-EphA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 특정 조합으로서 다음이 예시될 수 있다:
- [0174] (고체 상 항체)
- [0175] SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0176] (표지된 항체)
- [0177] SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0178] (고체 상 항체)
- [0179] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0180] (표지된 항체)
- [0181] SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0182] (고체 상 항체)
- [0183] SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0184] (표지된 항체)
- [0185] SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0186] (고체 상 항체)
- [0187] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0188] (표지된 항체)
- [0189] SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0190] (고체 상 항체)
- [0191] SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0192] (표지된 항체)
- [0193] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0194] (고체 상 항체)
- [0195] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [0196] (표지된 항체)
- [0197] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0198] (고체 상 항체)
- [0199] SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0200] (표지된 항체)
- [0201] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0202] (고체 상 항체)
- [0203] SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0204] (표지된 항체)
- [0205] SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0206] 당업자는 기술적으로 모순되지 않는 한, 본원에 기술된 모든 양태 중 임의의 하나 이상이 적절하게 조합되어 본 개시내용을 수행할 수 있음을 인식할 것이다. 추가로, 당업자는 기술적으로 모순되지 않는 한, 그리고 본원에 모든 바람직하거나 유리한 양태가 적절하게 조합되어 본 개시내용을 수행하는 것이 바람직함을 인식할 것이다.
- [0207] 본원에 인용된 문헌의 개시 내용 모두는 본원에 참조로서 명확하게 인용된 것으로 간주되어야 하며, 당업자는 본 개시내용의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고 이들 문헌의 관련된 개시된 내용을 본원에서의 문맥에 따른 본 명세서의 일부로서 인용 및 인식할 수 있다.
- [0208] 본원에 인용된 문헌은 단지 본 출원의 출원일 전의 관련된 기술을 개시하기 위한 목적으로만 제공되며, 선행 발명 또는 임의의 다른 이유로 인해 본 발명이 개시내용에 앞설 권리를 보유하지 않는다는 것을 본 발명자가 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이들 문헌의 모든 기재는 본 출원인에게 이용가능한 정보에 기초하며, 어떤 방식으로든 이들 기재의 내용이 정확하다는 인정을 구성하지 않는다.
- [0209] 본원에서 사용된 용어는 구체적인 구현예를 기술하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.
- [0210] 본원에 사용된 용어 "포함하다"는, 내용이 달리 이해되도록 명확하게 표시하지 않는 한, 기술된 항목(예컨대 성분, 단계, 요소, 또는 숫자)의 존재를 의도하며, 다른 항목(예컨대 성분, 단계, 요소, 및 숫자)의 존재를 배제하지 않는다. 용어 "이루어지다"는 용어 "이루어지다" 및/또는 "본질적으로 이루어지다"로 기술된 양태를 포괄한다.
- [0211] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 용어(기술적 및 과학적 용어 포함)는 본 개시내용이 속하는 기술의 당업자에 의해 널리 인식되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 사용된 용어는, 명시적으로 달리 정의되지 않는 한, 본원 및 관련 기술 분야에서의 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 이상화되거나 과도하게 형식적인 의미를 갖는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0212] 제1, 제2와 같은 용어는 다양한 요소를 표현하기 위해 사용되며, 이들 요소가 그 자체로 이들 용어에 의해 제한되어서는 안됨이 인식되어야 한다. 이들 용어는 단지 일 요소를 다른 것과 구별하기 위한 목적으로만 사용되며, 예를 들어, 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않으면서 제1 요소를 제2 요소로 기술하는 것, 및 마찬가지로 제2 요소를 제1 요소로 기술하는 것이 가능하다.
- [0213] 본 명세서에서, 성분 함량 또는 수치 범위 등을 표시하기 위해 사용되는 수치는, 명시적으로 표시되지 않는 한, 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, "4℃"는, 명시적으로 표시되지 않는 한, "약 4℃"를 의미하는 것으로 인식되며, 기술 상식 및 본 명세서의 의미에 따라 당업자가 그 정도를 합리적으로 인식할 수 있는 것이 당연하다.

- [0214] 문맥상 달리 의미하도록 명확하게 표시되지 않는 한, 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용되는 경우, 단수형으로 표현된 각각의 양태는 기술적으로 모순되지 않는 한 복수형일 수도 있고, 그 반대의 경우도 마찬가지라는 것이 인식되어야 한다.
- [0215] 이제 본 개시내용이 실시예를 참조하여 더욱 상세히 기술될 것이다. 그러나, 본 개시내용은 다양한 양태에 의해 구현될 수 있으며, 본원에서 기술되는 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 관련 기술 분야의 당업자는 다양한 변형, 추가, 삭제, 치환 등을 이용하여 본 개시내용의 사상 및 범위를 변화시키지 않으면서 본 개시내용을 수행할 수 있다.
- [0216] 실시예
- [0217] 실시예 1: 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체의 생산
- [0218] 인간 EphA4(젠뱅크 수탁번호 NP_004429.1, SEQ ID NO. 1)에 결합하는 단일클론 항체를 생산하기 위해, 분비성 알칼리 포스파타제(SEAP) 및 인간 EphA4의 세포의 영역(위치 20 내지 547)(SEQ ID NO. 2)에 융합된 히스티딘 태그를 갖는 단백질(이하 "인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질"로 지칭됨, SEQ ID NO. 3), 인간 EphA4의 세포의 도메인(위치 20 내지 547)(SEQ ID NO. 2)에 융합된 히스티딘 태그를 갖는 단백질(이하 "인간 EphA4 세포의 도메인-His 단백질"로 지칭됨, SEQ ID NO. 4), 뿐만 아니라 말토스-결합 단백질(MBP) 및 인간 EphA4의 세포의 도메인에 융합된 히스티딘 태그를 갖는 단백질(이하 "인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질"로 지칭됨, SEQ ID NO. 5)을 다음 단계를 통해 제조하였다.
- [0219] 처음에는, pcDNA 3.4-인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터, pcDNA 3.4-인간 EphA4 세포의 도메인-His 발현 벡터, 및 pcDNA 3.4-인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 발현 벡터를 작제하였다. SEAP-His 및 인간 EphA4 세포의 도메인을 인코딩하는 유전자의 합성을 젠스크립트(Genscript)를 사용하여 수행하였다. 먼저, SEAP-His를 인코딩하는 합성된 유전자 단편을 pcDNA 3.4 벡터(Invitrogen/LifeTechnologies) 내로 클로닝했다. 인간 EphA4 세포의 도메인의 합성된 유전자 단편을 작제된 pcDNA 3.4-SEAP-His 발현 벡터 내로 클로닝하여 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터를 작제하였다. pcDNA 3.4-인간 EphA4 세포의 도메인-His 발현 벡터를 히스티딘 태그를 인코딩하는 DNA 서열을 갖는 pcDNA 3.4 벡터(Invitrogen/LifeTechnologies) 내로 인간 EphA4 세포의 도메인의 합성된 유전자 단편을 클로닝함으로써 작제하였다. pcDNA 3.4-인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 발현 벡터를 인간 EphA4의 신호 서열 및 세포의 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 PCR을 통해 증폭시킨 후, 이를 MBP 및 히스티딘 태그를 인코딩하는 DNA 서열을 갖는 pcDNA 3.4 벡터(Invitrogen/LifeTechnologies) 내로 클로닝함으로써 작제하였다. 상기 발현 벡터 각각을 Expi293 발현 시스템(Thermo SCIENTIFIC)을 사용하여 Expi293F 세포(Thermo SCIENTIFIC)에 형질감염시켰다. 배양 배지를 수집하고, 세포를 제거하여 맑게 하였다. 탈론(TALON) 수지(TaKaRa)를 사용하여 정제를 수행하고, 투석 또는 탈염 컬럼(Thermo SCIENTIFIC)을 통해 완충액을 PBS(FUJIFILM Wako)로 교환했다.
- [0220] 종래의 수단에 따라, 제조된 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질을 어주번트와 함께 사용하여 토끼를 면역화시켰다(ABL). 면역화 후, 알엔이지(RNeasy, QIAGEN)를 사용하여 수집된 림프절 세포로부터 총 RNA를 제조하고, 디엔아제(DNase, QIAGEN, 알엔아제(RNease) 없는 디엔아제 세트)로 처리했다. RNA PCR 키트(TAKARA)를 사용하여 역전사 생산물을 상기 총 RNA로부터 제조하였다. 수득한 역전사 생산물을 주형으로 사용하여, 토끼 항체 과지 라이브러리를 작제하였다. 인간 EphA4 단백질, 인간 EphA4 항체, 및 토끼 항체 과지 라이브러리를 사용하여 스크리닝을 수행하고, 인간 EphA4에 특이적으로 결합하는 토끼 항체 단편(scFv)을 수득하였다. 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질 및 인간 EphA4 항체를 다이엔에이비즈(Dynabeads, Thermo SCIENTIFIC) 상에 포획하고, 거기에 토끼 항체 과지 라이브러리를 첨가하고, 1 또는 2 시간 후, 일련의 세척 주기를 통해 PBS-트윈(Tween)(0.1% v/v) 또는 PBS를 사용하여 결합되지 않은 과지를 제거하였다. 결합된 과지 입자를 용출시킨 후, 이.콜라이 TG1 숙주 세포의 감염을 통해 이것을 증폭시켰다. 감염된 TG1 세포를 수집하여, 플레이트 상에 플레이트이팅하고, 이것을 30°C에서 인큐베이션했다. 증폭된 과지를 사용하여 이러한 패닝을 추가로 수행하였다.
- [0221] 제2 패닝 후, 농축된 과지로 감염된 TG1 세포 유래 단일 콜로니를 사용하여 96-웰 플레이트 내 배지에 접종했다. IPTG를 첨가하여 scFv + FLAG 태그의 발현을 유도하고, 이를 30°C에서 밤새 진탕배양하였다. TG1 세포를 스핀다운(spin-down) 시키고, scFv를 포함하는 이.콜라이 배양 상청액을 사용하여 인간 EphA4에 대한 반응성을 갖는 웰을 픽업(pick up)하였다.
- [0222] 인간 EphA4에 대한 반응성을 다음의 단계에 따라 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질을 사용하는 ELISA를 통해 평가하였다. 항-FLAG 항체(SIGMA)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 4°C에서 밤

새 인큐베이션 후, 웰을 2% 탈지유(BD)를 사용하여 실온에서 2 시간 동안 블로킹했다. 0.02% 트윈 20/PBS로 3 회 세척한 후, 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질(최종 농도 20 nM) 및 scFv를 포함하는 이.콜라이 배양 상청액을 각각의 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 항-His 항체(MBL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 5 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 15 내지 20 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독했다. 스크리닝 결과로서, 인간 EphA4-특이적 토끼 항체 단편을 선별하였고, 각각의 단편의 유전자 서열을 결정하기 위해 시퀀싱을 수행하였다.

[0223] 수득한 토끼 항체 단편(scFv)의 가변 영역을 인코딩하는 DNA 서열을 항체 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 발현하는 벡터 내로 각각 서브클로닝하여 클론을 scFv로부터 IgG 형태로 재구성하였다. 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체를 인코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현 벡터(pcDNA 3.4)를 생산하였다. KPEP11_04의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 6에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 7에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_04의 아미노산 서열을 인코딩하는 유전자 서열로서, 중쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 8에 나타난 핵산 서열을 사용하였고, 경쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 9에 나타난 핵산 서열을 사용하였다. KPEP11_08의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 10에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 11에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_08의 아미노산 서열을 인코딩하는 유전자 서열로서, 중쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 12에 나타난 핵산 서열을 사용하였고, 경쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 13에 나타난 핵산 서열을 사용하였다. KPEP11_10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 14에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 15에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_10의 아미노산 서열을 인코딩하는 유전자 서열로서, 중쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 16에 나타난 핵산 서열을 사용하였고, 경쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 17에 나타난 핵산 서열을 사용하였다. KPEP11_18의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 18에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 19에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_18의 아미노산 서열을 인코딩하는 유전자 서열로서, 중쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 20에 나타난 핵산 서열을 사용하였고, 경쇄 가변 영역의 경우 SEQ ID NO. 21에 나타난 핵산 서열을 사용하였다. KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 중쇄 불변 영역으로서, 토끼 IgG의 불변 영역(SEQ ID NO. 22)을 사용하였다. KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 경쇄 불변 영역으로서, 토끼 IgK(SEQ ID NO. 23)을 사용하였다. KPEP11_04의 전장 중쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 24에 나타난 아미노산 서열이고, 전장 경쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 25에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_04의 전장 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 26에 나타난 핵산 서열이고, 전장 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 27에 나타난 핵산 서열이다. KPEP11_08의 전장 중쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 28에 나타난 아미노산 서열이고, 전장 경쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 29에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_08의 전장 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 30에 나타난 핵산 서열이고, 전장 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 31에 나타난 핵산 서열이다. KPEP11_10의 전장 중쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 32에 나타난 아미노산 서열이고, 전장 경쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 33에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_10의 전장 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 34에 나타난 핵산 서열이고, 전장 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 35에 나타난 핵산 서열이다. KPEP11_18의 전장 중쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 36에 나타난 아미노산 서열이고, 전장 경쇄(신호 서열 없음)의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 37에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_18의 전장 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 38에 나타난 핵산 서열이고, 전장 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열은 SEQ ID NO. 39에 나타난 핵산 서열이다. 이들 벡터를 Expi293F 세포(ThermoFisher)에 형질감염시켰다. 상청액을 수집하고, 맵셀렉트(MabSelect)TM(Cytiva), 맵셀렉트슈어(MabSelect SuRe)pcc(Cytiva), 또는 암스피어(Amsphere)A3(JSR)를 사용함으로써 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체를 수득하였다.

[0224] KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 CDR을 CDR 식별을 위한 카바트(Kabat) 정의에 따라 결정하였다. KPEP11_04의 CDR의 아미노산 서열 및 핵산 서열이 각각 표 1 및 표 2에 나타나 있다. KPEP11_08 및 KPEP11_10의 CDR의 아미노산 서열 및 핵산 서열이 각각 표 3 및 표 4에 나타나 있다. KPEP11_18의 CDR의 아미노산 서열 및 핵산 서열이 각각 표 5 및 표 6에 나타나 있다.

[0225] [표 1]

[0226] KPEP11_04의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SYAMS (SEQ ID NO. 40)
중쇄 CDR2	FINMYGTYIASWAKG (SEQ ID NO. 41)
중쇄 CDR3	GGRSPDYDIVSGDI (SEQ ID NO. 42)
경쇄 CDR1	QASQNIYNSLA (SEQ ID NO. 43)
경쇄 CDR2	DASELAS (SEQ ID NO. 44)
경쇄 CDR3	QSSSAGDSYVGG (SEQ ID NO. 45)

[0227]

[0228]

[표 2]

[0229]

KPEP11_04의 CDR의 핵산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	AGCTATGCAATGAGC (SEQ ID NO. 46)
중쇄 CDR2	TTCATTAATATGTATGGTACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGC (SEQ ID NO. 47)
중쇄 CDR3	GGGGGCAGGTCTCCTGATTATGATATTGTTAGTGGGGACATC (SEQ ID NO. 48)
경쇄 CDR1	CAGGCCAGTCAGAACATTTACAACCTTTAGCC (SEQ ID NO. 49)
경쇄 CDR2	GATGCATCGAACTGGCATCTG (SEQ ID NO. 50)
경쇄 CDR3	CAGTCTAGTAGTGCTGGTGATAGTTATGTTGGTGGT (SEQ ID NO. 51)

[0230]

[0231]

[표 3]

[0232]

KPEP11 08 및 KPEP11 10의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SYHMS (SEQ ID NO. 52)
중쇄 CDR2	IYRSNGTYIANWAKG (SEQ ID NO. 53)
중쇄 CDR3	ESSTFYGMDL (SEQ ID NO. 54)
경쇄 CDR1	QASQSVYGNNELA (SEQ ID NO. 55)
경쇄 CDR2	TASSLAS (SEQ ID NO. 56)
경쇄 CDR3	LGYKSDDYT (SEQ ID NO. 57)

[0233]

[0234]

[표 4]

[0235]

KPEP11_08 및 KPEP11_10의 CDR의 핵산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	AGTACCACATGAGC (SEQ ID NO. 58)
중쇄 CDR2	ATTATTATAGGAGTGGTAATACATACTACGCGAACTGGGCGAAAGGC (SEQ ID NO. 59)
중쇄 CDR3	GAAAGTAGTACTTTCTACGGCATGGACCTC (SEQ ID NO. 60)
경쇄 CDR1	CAGGCCAGTCAGAGTGGTTATGGTAACAACGAATTAGCC (SEQ ID NO. 61)
경쇄 CDR2	ACTGCATCCAGTCTGGCATCT (SEQ ID NO. 62)
경쇄 CDR3	CTAGGTTATAAAAGTGATGACTATACT (SEQ ID NO. 63)

[0236]

[0237]

[표 5]

[0238] KPEP11_18의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SFYIN (SEQ ID NO. 64)
중쇄 CDR2	IITYPDIDATDYASWVKG (SEQ ID NO. 65)
중쇄 CDR3	SDVDYYTTRLDL (SEQ ID NO. 66)
경쇄 CDR1	QSNKSVYSNWLS (SEQ ID NO. 67)
경쇄 CDR2	GASTLAS (SEQ ID NO. 68)
경쇄 CDR3	LGGYRDNSDNA (SEQ ID NO. 69)

[0239]

[0240] [표 6]

[0241] KPEP11_18의 CDR의 핵산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	AGCTTCTACATAAAC (SEQ ID NO. 70)
중쇄 CDR2	ATCATTATCCTGATATTGATGCCACAGACTACGCGAGCTGGGTGAAAGGC (SEQ ID NO. 71)
중쇄 CDR3	AGTGATGTTGATTATTATACAACCTCGGTTGGATCTC (SEQ ID NO. 72)
경쇄 CDR1	CAGTCCAATAAGAGTGTTTATAGTAACTGGTTATCC (SEQ ID NO. 73)
경쇄 CDR2	GGTGATCCACTCTGGCATCT (SEQ ID NO. 74)
경쇄 CDR3	CTAGCGGTTATCGTGATAATAGTGATAATGCT (SEQ ID NO. 75)

[0242]

[0243] 상기 생산방법과 동일한 방법으로, 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체 KPEP11_01, KPEP11_02, KPEP11_05, KPEP11_07, KPEP11_09, KPEP11_12, KPEP11_13, 및 KPEP11_20을 생산하였다. KPEP11_01의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 76에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 77에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_02의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 78에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 79에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_05의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 80에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 81에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_07의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 82에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 83에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_09의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 84에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 85에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_12의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 86에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 87에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_13의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 88에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 89에 나타난 아미노산 서열이다. KPEP11_20의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 90에 나타난 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 91에 나타난 아미노산 서열이다. 이들 항체의 중쇄 불변 영역으로 토끼 IgG의 불변 영역(SEQ ID NO. 22)을 사용하였다. 또한, 이들 항체의 경쇄 불변 영역으로 토끼 IgK(SEQ ID NO. 23)을 사용하였다.

[0244] 생산된 각각의 항체의 CDR을 CDR 식별을 위한 카밧 정의에 따라 결정하였다. 각각의 항체의 CDR의 아미노산 서열이 각각 표 7 내지 표 11에 나타나 있다.

[0245] [표 7]

[0246] KPEP11_01 및 KPEP11_09 의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SYHMS (SEQ ID NO. 92)
중쇄 CDR2	I IYRSGNTYSANWAKG (SEQ ID NO. 93)
중쇄 CDR3	ESSTFYGM DL (SEQ ID NO. 94)
경쇄 CDR1	QASQSVYGNNELA (SEQ ID NO. 95)
경쇄 CDR2	RASTLAS (SEQ ID NO. 96)
경쇄 CDR3	LGYKSDDYT (SEQ ID NO. 97)

[0247]

[0248] [표 8]

[0249] KPEP11_02 및 KPEP11_05의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SYAMS (SEQ ID NO. 98)
중쇄 CDR2	FINNYGTYIASWAKG (SEQ ID NO. 99)
중쇄 CDR3	GGRSPNYDIVSGDI (SEQ ID NO. 100)
경쇄 CDR1	QASQNIYN SLA (SEQ ID NO. 101)
경쇄 CDR2	DASELAS (SEQ ID NO. 102)
경쇄 CDR3	QSSSAGDSYVGG (SEQ ID NO. 103)

[0250]

[0251] [표 9]

[0252] KPEP11_07의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SYAMS (SEQ ID NO. 98)
중쇄 CDR2	FINMYGTYIASWAKG (SEQ ID NO. 104)
중쇄 CDR3	GGRSPDYDIVSGDI (SEQ ID NO. 105)
경쇄 CDR1	QASQNIYN SLA (SEQ ID NO. 101)
경쇄 CDR2	DASELAS (SEQ ID NO. 102)
경쇄 CDR3	QSSSAGDSYVGG (SEQ ID NO. 103)

[0253]

[0254] [표 10]

[0255] KPEP11_12 및 KPEP11_13의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	SYHMS (SEQ ID NO. 92)
중쇄 CDR2	I IYRSGNTYYANWAKG (SEQ ID NO. 106)
중쇄 CDR3	ESSTFYGM DL (SEQ ID NO. 94)
경쇄 CDR1	QASQSVYGNNELA (SEQ ID NO. 95)
경쇄 CDR2	RASTLAS (SEQ ID NO. 96)
경쇄 CDR3	LGYKSDDYT (SEQ ID NO. 97)

[0256]

[0257] [표 11]

[0258] KPEP11_20의 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR1	NYVMN (SEQ ID NO. 107)
중쇄 CDR2	I IY P D I D T T D Y A S W V K G (SEQ ID NO. 108)
중쇄 CDR3	S D I D Y Y T T R L D L (SEQ ID NO. 109)
경쇄 CDR1	S S P S V Y N N N W L S (SEQ ID NO. 110)
경쇄 CDR2	G A S T L A S (SEQ ID NO. 111)
경쇄 CDR3	A G G Y D S N S D T A (SEQ ID NO. 112)

[0259]

[0260] 실시예 2: 인간 Eph 수용체에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 선택성

[0261] 실시예 1에서 생산한 항-인간 EphA4 단일클론 항체에 대하여, 인간 Eph 수용체의 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 마우스 항-6-His 항체(R&D)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 웰을 1% 블록 에이스(Block Ace, KAC)로 실온에서 1 시간 동안 블로킹했다. 0.02% 트윈(Tween) 20/PBS로 3 회 세척한 후, 각각의 인간 Eph 수용체 세포의 도메인-His 단백질(Creative biomart, 최종 농도 1 nM)을 각각의 웰에 시딩하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체(10 µg/mL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 4 분 30 초 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0262] KPEP11_01, KPEP11_02, KPEP11_04, KPEP11_05, KPEP11_07, KPEP11_08, KPEP11_09, KPEP11_10, KPEP11_12, KPEP11_13, KPEP11_18, 및 KPEP11_20이 인간 Eph 수용체 패밀리 중 인간 EphA4에 특이적으로 결합하는 것이 밝혀졌다(도 1).

[0263] 실시예 3: 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 및 인간 EphA4에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 반응성

[0264] 실시예 1에서 생산한 항-인간 EphA4 단일클론 항체에 대하여, 다양한 EphA4에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 마우스 항-6-His 항체(R&D)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 웰을 1% 블록 에이스(KAC)로 밤새 4°C에서 블로킹했다. 0.02% 트윈 20/PBS로 3 회 세척한 후, 마우스 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 랫트 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 토끼 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 원숭이 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 또는 SEAP-His 단백질(최종 농도 1 nM)로 웰을 시딩하였고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체(10 µg/mL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 약 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 3 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0265] KPEP11_01, KPEP11_02, KPEP11_04, KPEP11_05, KPEP11_07, KPEP11_08, KPEP11_09, KPEP11_10, KPEP11_12, KPEP11_13, KPEP11_18, 및 KPEP11_20은 원숭이 및 인간 EphA4에 대한 결합 활성을 가졌다(도 2).

[0266] 실시예 4: 인간 EphA4 세포의 도메인, 리간드 결합 도메인, 피브로넥틴 III-형 도메인 1, 및 피브로넥틴 III-형 도메인 2에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 반응성

[0267] 실시예 1에서 생산한 항-인간 EphA4 단일클론 항체에 대하여, 다양한 EphA4에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 마우스 항-6-His 항체(R&D)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 웰을 1% 블록 에이스(KAC)로 실온에서 1 시간 동안 블로킹했다. 0.02% 트윈 20/PBS로 3 회 세척한 후, 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 리간드 결합 도메인-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 1-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 2-MBP-His 단백질을 시딩하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체(10 µg/mL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 3 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

인 2-MBP-His 단백질, 또는 MBP-His 단백질(최종 농도 1 nM)로 웰에 시딩했고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후 항-인간 EphA4 토끼 단일클론 항체(10 µg/mL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 4 분 30 초 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0268] KPEP11_02, KPEP11_04, KPEP11_05, KPEP11_07, KPEP11_18, 및 KPEP11_20은 인간 EphA4 세포의 도메인(ECD) 및 리간드 결합 도메인(LBD)에 대한 결합 활성을 가졌다. KPEP11_01, KPEP11_08, KPEP11_09, KPEP11_10, KPEP11_12, 및 KPEP11_13은 인간 EphA4 세포의 도메인(ECD)에 대해 결합 활성을 가졌다(도 3).

[0269] 실시예 5: 샌드위치 ELISA를 통한 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성

[0270] 실시예 1에서 생산한 항-인간 EphA4 단일클론 항체에 대하여, 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 각각의 항-인간 EphA4 단일클론 항체를 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 각각 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 µL로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 웰을 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 블로킹했다. 검출 항체로서의 각각의 항-인간 EphA4 단일클론 항체를 첨부된 매뉴얼에 따라 퍼옥시다제 표지 키트-NH2(DOJINDO)를 사용하여 HRP(서양고추냉이 퍼옥시다제)로 각각 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))으로 연속 희석한(0, 1, 및 10 ng/mL) 인간 EphA4 세포의 도메인으로 웰에 시딩하고, 이것을 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 3 회 세척 후, 샘플 희석액으로 1500배 희석한 HRP-표지된 항-인간 EphA4 단일클론 항체를 각각 100 µL로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 620 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0271] 각각의 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 조합에 의한 반응성 목록이 각각 도 4, 도 5, 도 6, 및 도 7에 (1) S-N((10 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)-(0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)), (2) S/N((10 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)/(0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)), (3) S-N((1 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)-(0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)), 및 (4) S/N((1 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)/(0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호))로 나타나 있다. EphA4 세포의 도메인에 대해 강한 결합 활성을 나타내는 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 다수 조합을 얻었다.

[0272] 실시예 6: 인간 EphA4에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 결합 친화도

[0273] 인간 EphA4에 대한 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 결합 친화도는 비아코어 T200(Cytiva)을 사용한 표면 플라즈몬 공명 방법(SPR 방법)을 통해 결정하였다. 먼저, 항-His 항체(Cytiva, 28-9950-56)를 고정화 완충액(10 mM 소듐 아세테이트, pH 4.5)을 사용하여 10 µg/mL로 희석하고, 비아코어 T200에 첨부된 프로토펬에 따라 센서칩 CM5 상에 고정화시켰다. 고정화는 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 염(EDC)를 이용한 아민 커플링 방법을 통해 수행하였고, 블로킹을 위해 에탄올아민을 사용하였다(센서 칩 또는 고정화 시약은 모두 업체[Cytiva] 유래). 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 10을 런닝 완충액 HBS-EP+(Cytiva)을 사용하여 희석하고, 120 초 동안 플로우 셀(flow cell) 상으로 펌핑하여 포화하도록 두었다(포화량 약 3 RU). 이어서, KPEP11_04, KPEP11_08, 또는 KPEP11_10을 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 및 0 nM의 범위로 연속 희석하였고, 뿐만 아니라 KPEP11_18을 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 및 0 nM의 범위로 연속 희석하며, HBS-EP+를 120 초 동안 센서 칩 칩에 첨가하고, 첨가 시(결합 단계, 120 초) 및 첨가 완료 후(해리 단계, 300 초)에서의 결합 반응 곡선을 순차적으로 관찰했다. 각각의 관찰이 끝난 후에는, 10 mM 글리신 염산 pH 1.5(60 초) 및 3 M MgCl₂(30 초)를 첨가하여 센서 칩을 재생

했다. 시스템에 부착된 BIA 평가 소프트웨어를 사용한 1:1 결합 모델에 의한 피팅 분석을 획득된 결합 반응 곡선에 대해 수행하여 인간 EphA4에 대한 결합 친화도를 계산했다($KD = kd/ka$). 상기 기술된 실험을 3 회 수행하였으며, 각각의 파라미터에 대해 평균을 계산하였다.

[0274] 인간 EphA4에 대한 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18의 결합 친화도(KD 값)가 각각 표 12, 표 13, 표 14, 및 표 15에 나타나 있다. 또한, 대표적인 결합 반응 곡선이 도 8에 나타나 있다.

[0275] [표 12]

[0276] KPEP11_04의 동역학 파라미터

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
실험 1	2.332E+06	4.002E-03	1.716E-09	2.273	0.0038
실험 2	1.782E+06	3.783E-03	2.124E-09	2.270	0.0050
실험 3	2.078E+06	3.888E-03	1.871E-09	2.285	0.0044
평균	2.06E+06	3.89E-03	1.90E-09	2.28	0.004

[0277]

[0278] [표 13]

[0279] KPEP11_08의 동역학 파라미터

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
실험 1	1.419E+06	2.140E-03	1.508E-09	2.812	0.0029
실험 2	1.336E+06	2.225E-03	1.665E-09	2.578	0.0064
실험 3	1.579E+06	2.144E-03	1.358E-09	2.641	0.0035
평균	1.44E+06	2.17E-03	1.51E-09	2.68	0.004

[0280]

[0281] [표 14]

[0282] KPEP11_10의 동역학 파라미터

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
실험 1	1.440E+06	1.964E-03	1.364E-09	3.153	0.0039
실험 2	1.577E+06	1.936E-03	1.228E-09	2.694	0.0061
실험 3	1.530E+06	1.985E-03	1.298E-09	2.725	0.0043
평균	1.52E+06	1.96E-03	1.30E-09	2.86	0.005

[0283]

[0284] [표 15]

[0285] KPEP11_18의 동역학 파라미터

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
실험 1	3.445E+06	1.275E-03	3.700E-10	3.089	0.0090
실험 2	3.059E+06	1.274E-03	4.164E-10	2.650	0.0048
실험 3	3.318E+06	1.266E-03	3.817E-10	2.861	0.0111
평균	3.27E+06	1.27E-03	3.89E-10	2.87	0.008

[0286]

[0287] 실시예 7: 인간 Eph 수용체에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 선택성

[0288] KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, 및 항-EphA4 다클론 항체(Sino Biological)에 대해, 인간 Eph 수용체의 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 마우스 항-6-His 항체(R&D)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 웰을 1% 블록 에이스(KAC)로 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 블로킹했다. 0.02% 트윈 20/PBS로 3 회 세척한 후, 각각의 인간 Eph 수용체 세포의 도메인-His 단백질(Creative biomart, 최종 농도 1 nM)을 각각의 웰에 시딩하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, 또는 항-EphA4 다클론 항체(1 µg/mL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척

후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 5 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 3 내지 5 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0289] KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18이 인간 Eph 수용체 패밀리에 속하는 인간 EphA4에 특이적으로 결합하는 것으로 밝혀졌다(도 9).

[0290] 실시예 8: 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 및 인간 EphA4에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 반응성

[0291] 마우스 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 랫트 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 토끼 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 원숭이 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 및 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질의 생산을 다음 단계에 따라 수행하였다. SEAP-His 뿐만 아니라 마우스 EphA4 세포의 도메인, 랫트 EphA4 세포의 도메인, 토끼 EphA4 세포의 도메인, 원숭이 EphA4 세포의 도메인, 및 인간 EphA4 세포의 도메인을 인코딩하는 유전자의 합성을 쥘스크립트를 사용하여 수행했다. 먼저, SEAP-His를 인코딩하는 합성된 유전자를 pcDNA 3.4 벡터(Invitrogen/LifeTechnologies) 내로 클로닝하였다. 작제된 pcDNA 3.4-SEAP-His 발현 벡터에, 마우스 EphA4 세포의 도메인, 랫트 EphA4 세포의 도메인, 토끼 EphA4 세포의 도메인, 원숭이 EphA4 세포의 도메인, 및 인간 EphA4 세포의 도메인의 합성된 유전자를 각각 클로닝하여 마우스 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터, 랫트 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터, 토끼 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터, 원숭이 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터, 및 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 발현 벡터를 작제했다. 벡터 작제에 활용된 인간 EphA4의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 1로, 이의 세포의 도메인은 SEQ ID NO. 2로, 원숭이 EphA4의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 113으로, 이의 세포의 도메인은 SEQ ID NO. 114로, 토끼 EphA4의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 115로, 이의 세포의 도메인은 SEQ ID NO. 116으로, 랫트 EphA4의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 117로, 이의 세포의 도메인은 SEQ ID NO. 118로, 마우스 EphA4의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 119로, 및 이의 세포의 도메인은 SEQ ID NO. 120으로 나타나 있다. 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질 발현 벡터, 원숭이 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질 발현 벡터, 토끼 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질 발현 벡터, 랫트 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질 발현 벡터, 및 마우스 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질 발현 벡터를 사용하여 다양한 Eph4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질을 제조하였다. 상기 발현 벡터를 Expi293 발현 시스템(Thermo SCIENTIFIC)을 사용하여 Expi293F 세포(Thermo SCIENTIFIC)에 형질감염시켰다. 4 일 후에 배양 배지를 수집하고, 세포를 제거하고 맑게 하였다. 정제를 위해 탈론 수지(TaKaRa)를 사용하고, 투석을 통해 완충액을 PBS(FUJIFILM Wako)로 교체했다.

[0292] KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, 및 EphA4 다클론 항체(Sino Biological)에 대해, 다양한 EphA4에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 마우스 항-6-His 항체(R&D)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 웰을 1% 블록 에이스(KAC)로 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 블로킹했다. 0.02% 트윈 20/PBS로 3 회 세척한 후, 마우스 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 랫트 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 토끼 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 원숭이 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 인간 EphA4 세포의 도메인-SEAP-His 단백질, 또는 SEAP-His 단백질(최종 농도 1 nM)로 웰에 시딩하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후 KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, 또는 EphA4 다클론 항체(0, 1.024e-6, 0.0000512, 0.0000256, 0.000128, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 및 10 µg/mL)를 첨가하고, 이것을 실온에서 약 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 5 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 3 내지 5 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0293] KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, 및 KPEP11_18은 원숭이 및 인간 EphA4에 대해 동등한 결합 활성을 가졌다(도 10).

[0294] 실시예 9: 인간 EphA4 세포의 도메인, 리간드 결합 도메인, 피브로넥틴 III-형 도메인 1, 및 피브로넥틴 III-형 도메인 2에 대한 항-인간 EphA4 단일클론 항체의 반응성

[0295] 인간 EphA4의 세포의 도메인(ECD), 리간드 결합 도메인(LBD), 피브로넥틴 III-형 도메인 1(FN1), 또는 피브로넥

틴 III-형 도메인 2(FN2)에 융합된 말토스-결합 단백질(MBP) 및 히스티딘 태그를 갖는 단백질(이하 "인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질", "인간 EphA4 리간드 결합 도메인-MBP-His 단백질", "인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 1-MBP-His 단백질", 및 "인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 2-MBP-His 단백질"로 지칭됨)의 생산을 다음 단계에 따라 수행하였다. 처음에는, pcDNA 3.4-인간 EphA4 세포의 도메인, 리간드 결합 도메인, 피브로넥틴 III-형 도메인 1, 또는 피브로넥틴 III-형 도메인 2-MBP-His 발현 벡터를 작제하였다. 먼저, 인간 EphA4의 신호서열(SEQ ID NO. 121) 또는 프리프로트립신의 신호서열(SEQ ID NO. 122)과 인간 EphA4의 각각의 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 PCR로 증폭시키고, AAA 또는 G4S 링커를 갖는 MBP 및 히스티딘 태그를 인코딩하는 DNA 서열을 갖는 pcDNA 3.4 벡터(Invitrogen/LifeTechnologies) 내로 클로닝하여, 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 리간드 결합 도메인-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 1-MBP-His 단백질, 및 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 2-MBP-His 단백질의 발현 벡터를 작제하였다. 벡터 작제에 활용된 인간 EphA4의 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 1로, 이의 세포의 도메인은 SEQ ID NO. 2로, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO. 123으로, 피브로넥틴 III-형 도메인 1은 SEQ ID NO.124로, 피브로넥틴 III-형 도메인 2는 SEQ ID NO. 125로, 및 MBP 및 히스티딘 태그(MBP-His 단백질)는 SEQ ID NO. 126으로 나타나 있다. 상기 발현 벡터를 Expi293 발현 시스템(Thermo SCIENTIFIC)을 사용하여 Expi293F 세포(Thermo SCIENTIFIC)에 형질감염시켰다. 4 일 후에 배양 배지를 수집하고, 세포를 제거하고 맑게 하였다. 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질 또는 인간 EphA4 리간드 결합 도메인-MBP-His 단백질을 탈론 수지(TaKaRa)로 정제하고, 투석을 통해 완충액을 PBS(FUJIFILM Wako)로 교환하였다. 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 1-MBP-His 단백질 및 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 2-MBP-His 단백질은 아밀로스 수지(NEB)로 정제하고, 단량체 분획을 AKTA 익스플로어 10s/수퍼덱스 200 10/300 GL(AKTA Explore 10s/Superdex 200 10/300 GL)(Cytiva)로 정제했다.

[0296] KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, 및 EphA4 다클론 항체(Sino Biological)에 대해, 다양한 EphA4에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행하였다. 마우스 항-6-His 항체(R&D)를 96-웰 플레이트(Thermo SCIENTIFIC)의 웰 상에 코팅했다. 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 웰을 1% 블록 에이스(KAC)로 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 블로킹했다. 0.02% 트윈 20/PBS로 3 회 세척한 후, 인간 EphA4 세포의 도메인-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 리간드 결합 도메인-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 1-MBP-His 단백질, 인간 EphA4 피브로넥틴 III-형 도메인 2-MBP-His 단백질, 또는 MBP-His 단백질(최종 농도 1 nM)로 웰에 시딩하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, KPEP11_04, KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, 또는 EphA4 다클론 항체(10 nM)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제 표지된 염소 항-토끼 IgG 다클론 항체(abcam)를 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 3 내지 5 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0297] KPEP11_04 및 KPEP11_18은 인간 EphA4 세포의 도메인(ECD) 및 리간드 결합 도메인(LBD)에 대한 결합 활성을 가졌다. KPEP11_08 및 KPEP11_10은 인간 EphA4 세포의 도메인(ECD)에 대한 결합 활성을 가졌다(도 11).

[0298] 실시예 10: 샌드위치 ELISA 1을 통한 인간 뇌척수액 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

[0299] KPEP11_10, KPEP11_18, 및 EphA4 항체(R&D)에 대하여, 인간 뇌척수액(CSF) 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_10을 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 µL로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_18 및 EphA4 항체(R&D)는 첨부된 매뉴얼에 따라 퍼옥시다제 표지 키트-NH₂(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 또는 샘플 희석액을 사용하여 100배만큼 희석한 샘플(인간 뇌척수액)로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액을 사용하여 10000배만큼 희석한 HRP-표지된 KPEP11_18 또는 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 각각 100 µL로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후,

TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0300] 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 12에 나타나 있다. KPEP11_10 및 HRP-표지된 KPEP11_18로 작제된 샌드위치 ELISA는 KPEP11_10 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)로 작제된 측정 시스템에 비해 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 매우 높은 반응성을 가졌다. 다음으로, 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 13에 나타나 있다. KPEP11_10 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)로 작제된 측정 시스템으로는 반응 신호가 거의 획득되지 않은 반면, KPEP11_10 및 HRP-표지된 KPEP11_18로 작제된 측정 시스템은 매우 높은 반응성을 나타냈음이 밝혀졌다.

[0301] 실시예 11: 샌드위치 ELISA 2를 통한 인간 뇌척수액 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

[0302] KPEP11_10, KPEP11_18, 및 EphA4 항체(R&D)에 대해, 인간 뇌척수액(CSF) 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_18을 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 µL로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_10 및 EphA4 항체(R&D)는 첨부된 매뉴얼에 따라 피옥시다제 표지 키트-NH₂(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 또는 100배 만큼 희석한 샘플(인간 뇌척수액)로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액으로 10000배 만큼 희석한 HRP-표지된 KPEP11_10 또는 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 각각 100 µL로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0303] 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 14에 나타나 있다. KPEP11_18 및 HRP-표지된 KPEP11_10을 사용하여 작제된 샌드위치 ELISA는 KPEP11_18 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 사용하여 작제된 측정 시스템에 비해 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 매우 높은 반응성을 가졌다. 다음으로, 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 15에 나타나 있다. KPEP11_18 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)로 작제된 측정 시스템에서는 반응 신호가 거의 획득되지 않은 반면, KPEP11_18 및 HRP-표지된 KPEP11_10으로 작제된 측정 시스템은 매우 높은 반응성을 나타냈음을 밝혔다.

[0304] 실시예 12: 샌드위치 ELISA 3을 통한 인간 뇌척수액 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

[0305] KPEP11_10, KPEP11_04, 및 EphA4 항체(R&D)에 대해, 인간 뇌척수액(CSF) 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_10을 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 µL로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_04 및 EphA4 항체(R&D)는 첨부된 매뉴얼에 따라 피옥시다제 표지 키트-NH₂(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 또는 100배 만큼 희석한 샘플(인간 뇌척수액)로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액을 사용하여 10000배 만큼 희석한 HRP-표지된 KPEP11_04 또는 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 각각 100 µL로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘,

KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0306] 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 16에 나타나 있다. KPEP11_10 및 HRP-표지된 KPEP11_04를 사용하여 작제된 샌드위치 ELISA는 KPEP11_10 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 사용하여 작제한 측정 시스템에 비해 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 매우 높은 반응성을 가졌다. 다음으로, 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 17에 나타나 있다. KPEP11_10 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)로 작제된 측정 시스템에서는 반응 신호가 거의 획득되지 않은 반면, KPEP11_10 및 HRP-표지된 KPEP11_04로 작제된 측정 시스템은 매우 높은 반응성을 나타냈음이 밝혀졌다.

[0307] 실시예 13: 샌드위치 ELISA 4를 통한 인간 뇌척수액 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

[0308] KPEP11_08, KPEP11_18, 및 EphA4 항체(R&D)에 대해, 인간 뇌척수액(CSF) 내 인간 EphA4 세포의 도메인 및 EphA4 N-말단 단편에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_18을 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 µL로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_08 및 EphA4 항체(R&D)는 첨부된 매뉴얼에 따라 퍼옥시다제 표지 키트-NH₂(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 또는 100배 만큼 희석한 샘플(인간 뇌척수액)로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액을 사용하여 10000배 만큼 희석한 HRP-표지된 KPEP11_08 또는 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 각각 100 µL로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0309] 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 18에 나타나 있다. KPEP11_18 및 HRP-표지된 KPEP11_08을 사용하여 작제된 샌드위치 ELISA는 KPEP11_18 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)를 사용하여 작제한 측정 시스템에 비해 인간 EphA4 세포의 도메인에 대해 매우 높은 반응성을 가졌다. 다음으로, 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 19에 나타나 있다. KPEP11_18 및 HRP-표지된 EphA4 항체(R&D)로 작제된 측정 시스템에서는 반응 신호가 거의 획득되지 않은 반면, KPEP11_18 및 HRP-표지된 KPEP11_08로 작제된 측정 시스템은 매우 높은 반응성을 나타냈음을 밝혔다.

[0310] 실시예 14: 샌드위치 ELISA 5를 통한 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

[0311] KPEP11_04, KPEP11_10, KPEP11_18, EphA4 항체(Sino Biological, 이하 "EphA4 항체(Sino)"로 나타남), 및 EphA4 항체(R&D)에 대해, 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액(CSF) 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_10을 최종 농도 1 µg/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 µL로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_04, KPEP11_18, EphA4 항체(Sino), 및 EphA4 항체(R&D)는 첨부된 매뉴얼에 따라 퍼옥시다제 표지 키트-NH₂(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인 각각(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 50배 희석된 인간 혈장, 또는 100배 희석된 인간 뇌척수액으로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액을 사용하여 50000배 희석한 HRP-표지된 KPEP11_04,

KPEP11_18, EphA4 항체(Sino), 또는 EphA4 항체(R&D)를 각각 100 μ L로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0312] 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과, 인간 혈장 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가 결과, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 20, 도 21, 및 도 22에 나타나 있다. KPEP11_10 및 HRP-표지된 KPEP11_18을 사용하여 작성된 샌드위치 ELISA는 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편 중 임의의 것에 대해 매우 높은 반응성을 가졌다. KPEP11_10 및 HRP-표지된 KPEP11_04를 사용하여 작성된 샌드위치 ELISA는 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편 중 임의의 것에 대해 반응성을 나타냈다.

[0313] 실시예 15: 샌드위치 ELISA 6을 통한 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성

[0314] KPEP11_08, KPEP11_10, KPEP11_18, EphA4 항체(Sino), 및 EphA4 항체(R&D)에 대해, 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액(CSF) 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 결합 활성 평가를 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_18을 최종 농도 1 μ g/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 μ L로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))를 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_08, KPEP11_10, EphA4 항체(Sino), 및 EphA4 항체(R&D)는 첨부된 매뉴얼에 따라 퍼옥시다제 표지 키트-NH2(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))를 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인 각각(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 50배 희석된 인간 혈장, 또는 100배 희석된 인간 뇌척수액으로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액을 사용하여 50000배 희석한 HRP-표지된 KPEP11_08, KPEP11_10, EphA4 항체(Sino), 또는 EphA4 항체(R&D)를 각각 100 μ L로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0315] 인간 EphA4 세포의 도메인에 대한 반응성을 평가한 결과, 인간 혈장 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가 결과, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 반응성을 평가한 결과가 도 23, 도 24, 및 도 25에 각각 나타나 있다. KPEP11_18 및 HRP-표지된 KPEP11_08을 사용하여 작성된 샌드위치 ELISA 및 KPEP11_18 및 HRP-표지된 KPEP11_10을 사용하여 작성된 샌드위치 ELISA는 인간 혈장 내 인간 EphA4 세포의 도메인, EphA4 N-말단 단편, 및 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편 중 임의의 것에 대해 매우 높은 반응성을 가졌다.

[0316] 실시예 16: ELISA 및 LC-MS를 통한 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량 분석 및 상관관계 분석

[0317] LC-MS 분석을 통한 정량 분석

[0318] 샘플 제조를 다음과 같이 수행하였다. 표준 곡선을 위한 샘플로서, aCSF(Harvard Apparatus)를 사용하여 최종 농도 500 μ g/mL로 희석된 BSA(SIGMA) 용액을 사용하여 연속 희석한 각각 100 μ L의 인간 EphA4 세포의 도메인(0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 및 200 ng/mL)을 사용했다. aCSF(Harvard Apparatus)를 사용하여 최종 농도 500 μ g/mL로 희석된 BSA(SIGMA) 용액 50 μ L와 뇌척수액(CSF) 샘플 50 μ L를 혼합한 후, 다음 작업을 거쳤다. 50 mM TEAB(Thermo Fisher) 150 μ L에 용해된 10 M 우레아 용액 150 μ L, 추가로 100 mM DTT 용액 25 μ L를 순차적으로 첨가했다. 혼합된 용액을 37°C에서 120 분 동안 인큐베이션한 후, 200 mM 요오도아세트아미드(FUJIFILM Wako) 25 μ L를 첨가하고, 그 후 이것을 암소에서, 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, EphA4-NTF-IS 1250 μ L 및 트립신 용액(200 μ g/mL) 10 μ L를 순차적으로 첨가하고, 이것을 37°C에서 18 시간 동안 인큐베이션하였다. 20% TFA 80 μ L를 첨가하여 트립신 분해를 켄칭하였다. 샘플 정제를 오아시스(Oasis) HLB 96-웰 플레이트(Waters)를 사용하여 다음과 같이 수행하였다. 500 μ L의 메탄올(FUJIFILM Wako)로 플레이트

를 세척한 후, 이것을 500 μ L의 0.1% TFA(Thermo Fisher)로 평형화하였다. 상기 제조한 샘플을 인가하고 컬럼 상에 흡착하도록 둔 후, 500 μ L의 0.1% TFA를 사용한 세척을 수행하였다. 이어서, 용출액(0.1% TFA-수 중 80% 아세토니트릴(FUJIFILM Wako)) 200 μ L를 첨가하고, 용출액을 수집했다. 수집된 용출액을 스피드백(SpeedVac) 시스템(Thermo Fisher)으로 건조시키고, 이어서 0.1% TFA-수 중 5% 아세토니트릴 30 μ L를 사용하여 최종 재구성 용액을 획득하고, 이 용액은 LC-MS 분석을 거쳤다.

[0319] ELISA 분석 1을 통한 정량 분석

[0320] 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 정량 분석을 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_10을 1 μ g/mL의 최종 농도로 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 μ L로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_18을 첨부된 매뉴얼에 따라 피옥시다제 표지 키트-NH2(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 각각의 인간 EphA4 세포의 도메인 (0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 또는 100배 희석된 인간 뇌척수액으로 웰에 시딩하고, 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액을 사용하여 50000배 희석한 HRP-표지된 KPEP11_18을 각각 100 μ L로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0321] ELISA 분석 2를 통한 정량 분석

[0322] 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편에 대한 정량 분석을 다음 단계에 따라 수행했다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/0.1% 소듐 아지드를 사용하여 KPEP11_18을 최종 농도 1 μ g/mL가 되도록 제조하고, 96-웰 플레이트(Nunc)의 웰 상에 각각 100 μ L로 코팅했다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 블로킹 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 실온에서 1 시간 이상 동안 또는 4°C에서 밤새 웰을 블로킹했다. KPEP11_10을 첨부된 매뉴얼에 따라 피옥시다제 표지 키트-NH2(DOJINDO)를 사용하여 HRP로 표지하였다. 블로킹된 플레이트를 세척 용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.01% 트윈 20)으로 3 회 세척한 후, 샘플 희석액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/150 mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG 6000/0.01% 트윈 20/0.2% 프로클린 150(Sigma-Aldrich)/5% 탈지유(FUJIFILM Wako))을 사용하여 연속 희석한 인간 EphA4 세포의 도메인 각각(0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 ng/mL, 도면에서 EphA4로 나타남), 또는 100배 희석된 인간 뇌척수액으로 웰에 시딩하고, 이것을 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션했다. 5 회 세척 후, 샘플 희석액으로 40000배 희석한 HRP-표지된 KPEP11_10을 각각 100 μ L로 첨가하고, 이것을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3 회 세척 후, TMBZ(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL) 용액을 웰에 첨가하고, 이것을 실온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 동량의 켄칭 용액(2 N H₂SO₄, FUJIFILM Wako)을 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 판독했다.

[0323] LC-MS에 의해 분석된 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과로 분석된 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과, 뿐만 아니라 ELISA 분석 1에 의한 정량 분석을 기초로 수행한 상관관계 분석 결과도 26에 나타나 있다. LC-MS에 의해 정량된 EphA4 N-말단 단편의 양과 ELISA에 의해 정량된 EphA4 N-말단 단편의 양 사이의 스피어먼(Spearman) 상관관계수(r)를 계산하였고, 그들 사이에 유의한 상관관계가 보였음을 밝혔다(p < 0.0001).

[0324] LC-MS에 의해 분석된 인간 뇌척수액 내 EphA4 N-말단 단편의 정량화 결과, 뿐만 아니라 ELISA 분석 2에 의한 정량 분석을 기초로 수행한 상관 분석 결과가 도 27에 나타나 있다. LC-MS에 의해 정량된 EphA4 N-말단 단편의 양과 ELISA에 의해 정량된 EphA4 N-말단 단편의 양 사이의 스피어먼 상관관계수(r)를 계산하였고, 그들 사이에 유의한 상관관계가 보였음이 밝혀졌다(p < 0.0001).

도면2

	인간	원숭이	토끼	랫트	마우스	SEAP
KPEP11_01	1.207	1.183	0.045	0.042	0.049	0.052
KPEP11_02	1.255	1.199	0.040	0.048	0.048	0.071
KPEP11_04	1.264	1.211	0.039	0.044	0.044	0.050
KPEP11_05	1.226	1.240	0.035	0.043	0.045	0.043
KPEP11_07	1.224	1.180	0.036	0.044	0.045	0.050
KPEP11_08	1.151	1.169	0.057	0.065	0.071	0.072
KPEP11_09	1.135	1.148	0.061	0.064	0.079	0.070
KPEP11_10	1.171	1.109	0.091	0.087	0.108	0.087
KPEP11_12	1.219	1.194	0.055	0.054	0.059	0.067
KPEP11_13	1.176	1.172	0.083	0.086	0.082	0.099
KPEP11_18	1.230	1.179	0.059	0.067	0.064	0.054
KPEP11_20	1.158	1.146	0.046	0.062	0.052	0.067

도면3

	ECD	LBD	FN1	FN2	MBP
KPEP11_01	1.299	0.236	0.228	0.235	0.231
KPEP11_02	1.354	1.321	0.213	0.227	0.268
KPEP11_04	1.413	1.329	0.225	0.227	0.267
KPEP11_05	1.428	1.323	0.213	0.225	0.239
KPEP11_07	1.422	1.389	0.226	0.220	0.240
KPEP11_08	1.310	0.292	0.283	0.265	0.300
KPEP11_09	1.240	0.265	0.240	0.242	0.291
KPEP11_10	1.346	0.340	0.329	0.325	0.334
KPEP11_12	1.290	0.283	0.255	0.258	0.302
KPEP11_13	1.315	0.348	0.318	0.360	0.402
KPEP11_18	1.421	1.428	0.222	0.245	0.281
KPEP11_20	1.265	1.415	0.207	0.238	0.274

도면4

S-N ((10 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시당했을 때 획득된 신호) - (0 ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시당했을 때 획득된 신호))

KPEP ID	HRP 표지된 항체																							
	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20
01	-	1.972	3.236	2.070	3.163	0.045	0.001	0.004	0.018	-0.019	3.025	2.060	-	1.972	3.236	2.070	3.163	0.045	0.001	0.004	0.018	-0.019	3.025	2.060
02	0.477	-	-0.015	-0.035	0.001	0.732	0.565	1.246	0.837	0.837	-0.001	0.008	0.477	-	-0.015	-0.035	0.001	0.732	0.565	1.246	0.837	-0.001	0.008	
04	1.159	-0.032	-	-0.010	-0.013	1.708	1.247	2.146	1.172	1.352	-0.006	-0.005	1.159	-0.032	-	-0.010	-0.013	1.708	1.247	2.146	1.172	1.352	-0.006	-0.005
05	0.742	-0.019	0.002	-	-0.024	0.896	0.691	1.236	0.991	0.578	-0.009	0.000	0.742	-0.019	0.002	-	-0.024	0.896	0.691	1.236	0.991	0.578	-0.009	0.000
07	1.056	-0.031	-0.036	-0.021	-	1.464	0.688	1.701	1.292	1.102	-0.006	-0.007	1.056	-0.031	-0.036	-0.021	-	1.464	0.688	1.701	1.292	1.102	-0.006	-0.007
08	-0.007	2.260	3.252	1.916	3.289	-	0.016	0.030	0.012	0.071	3.357	1.382	-0.007	2.260	3.252	1.916	3.289	-	0.016	0.030	0.012	0.071	3.357	1.382
09	-0.022	1.734	2.739	1.613	2.654	-0.097	-	0.010	-0.027	0.081	2.516	1.502	-0.022	1.734	2.739	1.613	2.654	-0.097	-	0.010	-0.027	0.081	2.516	1.502
10	-0.005	2.437	3.241	2.089	3.193	-0.008	-0.018	-	0.000	0.068	3.263	1.971	-0.005	2.437	3.241	2.089	3.193	-0.008	-0.018	-	0.000	0.068	3.263	1.971
12	-0.063	2.333	3.314	2.099	3.209	-0.077	-0.007	-0.022	-	-0.058	3.030	1.793	-0.063	2.333	3.314	2.099	3.209	-0.077	-0.007	-0.022	-	-0.058	3.030	1.793
13	-0.014	1.997	2.924	1.790	3.066	-0.034	-0.037	-0.079	-0.057	-	2.971	1.277	-0.014	1.997	2.924	1.790	3.066	-0.034	-0.037	-0.079	-0.057	-	2.971	1.277
18	2.861	-0.029	-0.020	-0.018	-0.036	3.014	3.157	2.698	2.847	2.897	-	-0.013	2.861	-0.029	-0.020	-0.018	-0.036	3.014	3.157	2.698	2.847	2.897	-	-0.013
20	0.611	-0.007	-0.013	-0.027	-0.016	0.751	0.605	0.947	0.707	0.802	-0.008	-	0.611	-0.007	-0.013	-0.027	-0.016	0.751	0.605	0.947	0.707	0.802	-0.008	-

도면5

S/N ((10 ng/mL의 EpiA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호) / (0 ng/mL의 EpiA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호))

KPEP11	HRP-표지된 항체											
	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20
01	-	5.752	8.121	7.079	8.354	1.066	1.002	1.007	1.039	0.976	6.047	10.367
02	2.098	-	0.955	0.862	1.003	2.492	2.435	2.699	2.648	2.372	0.997	1.045
04	3.902	0.891	-	0.958	0.957	4.917	4.639	6.618	4.101	4.313	0.969	0.964
05	2.384	0.945	1.005	-	0.939	2.557	2.496	2.412	2.796	1.895	0.966	1.001
07	3.735	0.883	0.885	0.903	-	4.431	3.067	4.013	4.923	3.610	0.965	0.943
08	0.968	9.858	14.001	9.477	14.199	-	1.083	1.092	1.035	1.109	13.088	14.557
09	0.955	4.430	4.690	4.553	4.891	0.897	-	1.011	0.959	1.083	5.890	8.069
10	0.978	8.893	9.037	8.584	8.758	0.990	0.935	-	0.999	1.083	9.064	16.266
12	0.806	6.783	8.260	7.178	8.883	0.896	0.977	0.952	-	0.916	9.170	11.711
13	0.946	7.944	10.650	7.482	10.335	0.950	0.873	0.850	0.848	-	8.677	9.500
18	5.062	0.923	0.943	0.944	0.900	4.804	6.115	3.411	5.134	4.474	-	0.948
20	2.410	0.979	0.968	0.917	0.959	2.338	2.309	2.187	2.349	2.256	0.975	-

도면6

S-N (1 ng/ml)의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호) - (0 ng/ml)의 EphA4 세포의 도메인을 시딩했을 때 획득된 신호)

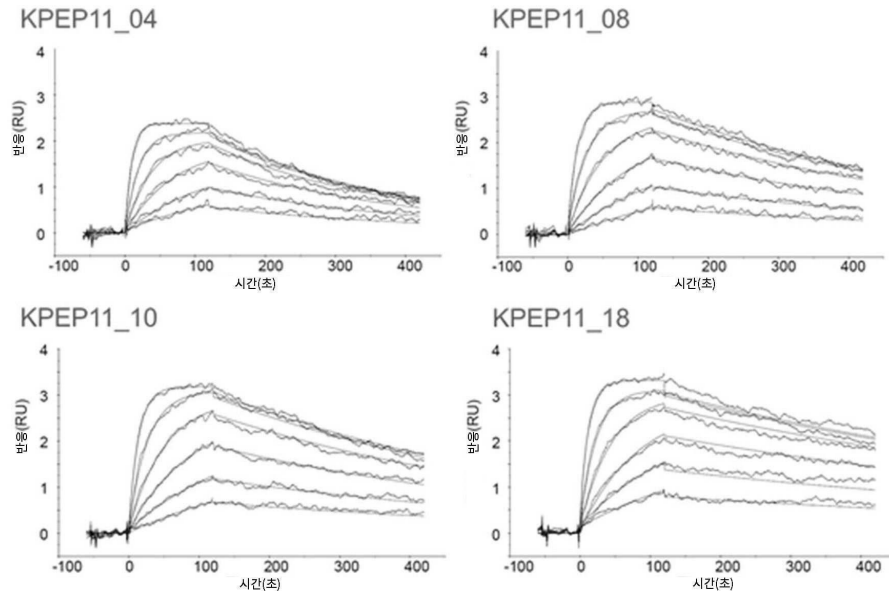
시료 ID	HRP 표지된 항체											
	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20
KPEP11	-	0.067	0.418	0.100	0.381	0.044	0.016	0.021	0.014	0.007	0.748	0.089
01	0.014	-	-0.021	-0.020	0.022	0.051	0.052	0.115	0.029	0.033	-0.009	-0.001
02	0.098	-0.020	-	0.014	-0.009	0.126	0.123	0.585	0.102	0.138	-0.007	-0.014
04	0.026	-0.051	-0.025	-	-0.015	0.097	0.032	0.242	0.080	0.161	-0.013	-0.008
05	0.075	-0.020	-0.001	0.006	-	0.145	0.106	0.175	0.125	0.091	-0.002	-0.011
07	-0.052	0.046	0.347	0.094	0.284	-	0.022	0.027	0.006	0.028	0.555	0.039
08	-0.014	0.064	0.321	0.051	0.262	-0.001	-	-0.016	0.018	0.103	0.374	0.049
09	-0.013	0.118	0.507	0.096	0.354	-0.025	0.018	-	0.018	0.063	0.705	0.088
10	-0.059	0.044	0.360	0.034	0.326	-0.064	-0.037	-0.037	-	0.004	0.478	0.054
12	-0.027	0.099	0.293	0.077	0.310	0.028	-0.014	0.020	0.007	-	0.509	0.081
13	0.664	-0.024	-0.010	0.007	-0.028	1.151	0.349	1.362	0.806	0.935	-	-0.027
18	0.066	-0.017	0.013	-0.026	0.006	0.073	0.041	0.104	0.078	0.079	0.036	-
20												

도면7

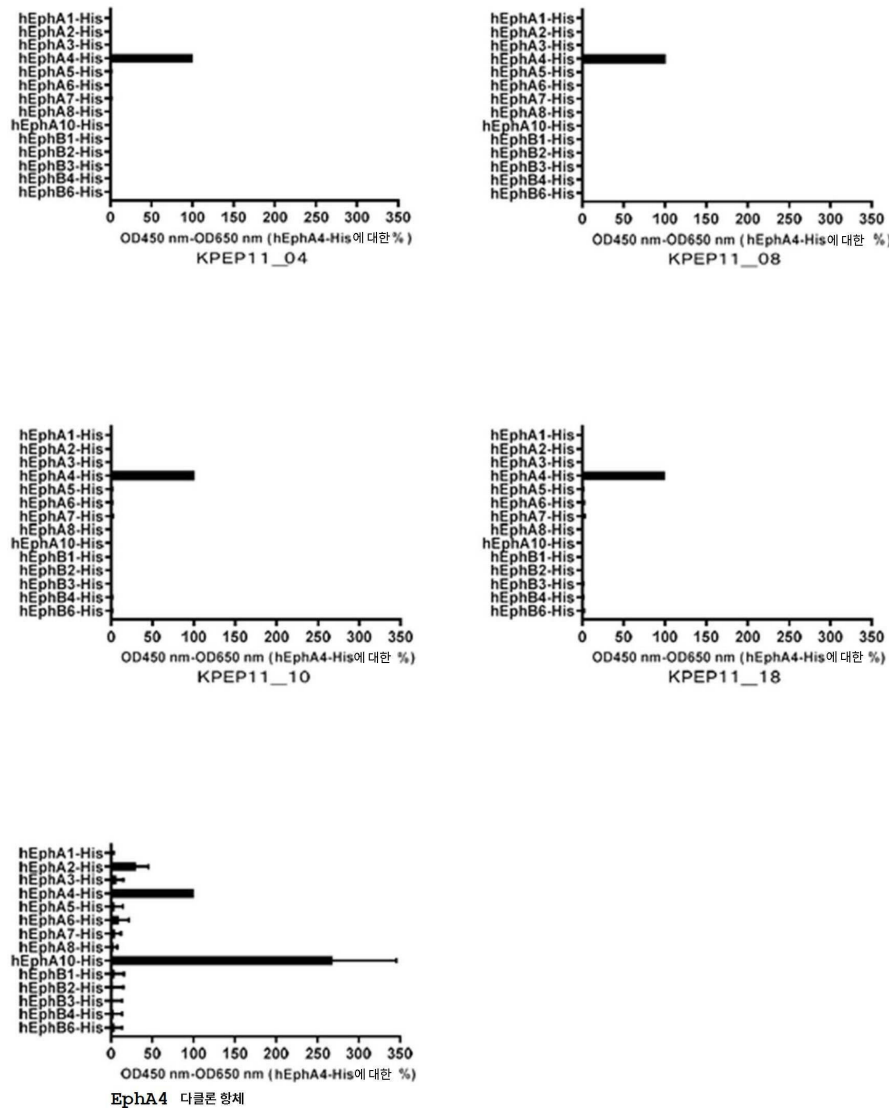
S/N ((1ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시당했을 때 획득된 신호) / (0ng/mL의 EphA4 세포의 도메인을 시당했을 때 획득된 신호))

KPEP11	HRP-표지된 항체											
	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20
01	-	1.162	1.919	1.293	1.886	1.065	1.038	1.037	1.029	1.009	2.247	1.402
02	1.032	-	0.936	0.921	1.072	1.104	1.132	1.157	1.059	1.054	0.969	0.993
04	1.245	0.934	-	1.056	0.971	1.289	1.359	2.531	1.271	1.337	0.961	0.892
05	1.049	0.854	0.938	-	0.961	1.168	1.070	1.276	1.144	1.249	0.950	0.946
07	1.195	0.926	0.997	1.029	-	1.340	1.320	1.311	1.379	1.215	0.988	0.905
08	0.758	1.180	2.386	1.415	2.140	-	1.115	1.083	1.017	1.042	2.998	1.387
09	0.971	1.127	1.432	1.112	1.384	0.999	-	0.982	1.028	1.106	1.727	1.229
10	0.947	1.383	2.257	1.348	1.860	0.968	1.064	-	1.048	1.078	2.741	1.679
12	0.818	1.110	1.788	1.101	1.800	0.914	0.880	0.920	-	1.006	2.289	1.324
13	0.897	1.346	1.968	1.277	1.945	1.041	0.953	1.038	1.019	-	2.315	1.541
18	1.943	0.937	0.971	1.021	0.921	2.452	1.566	2.217	2.170	2.121	-	0.892
20	1.151	0.951	1.033	0.920	1.016	1.129	1.089	1.130	1.148	1.124	1.117	-

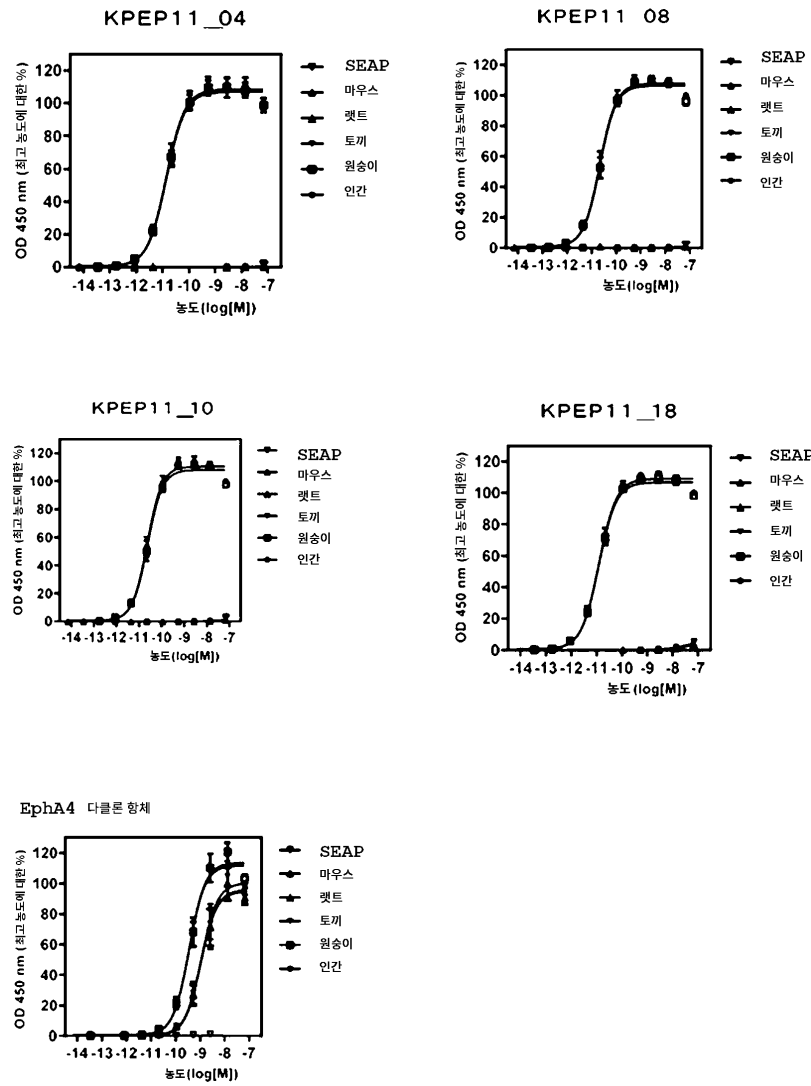
도면8



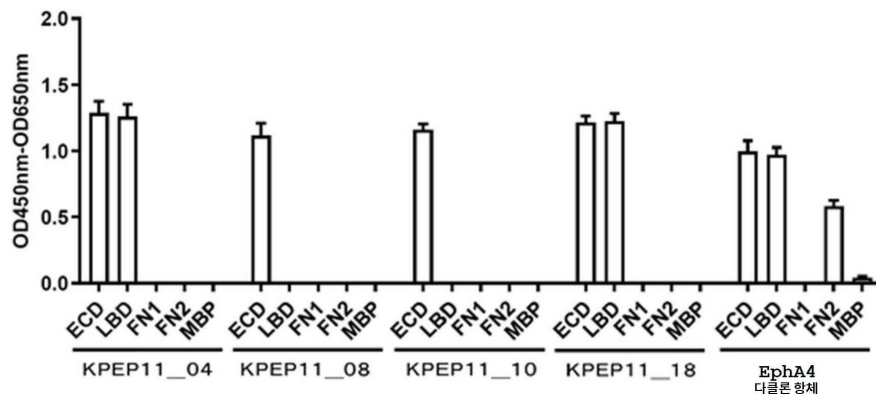
도면9



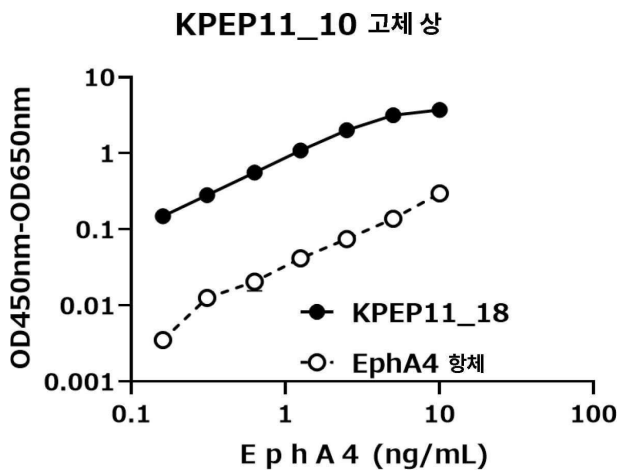
도면10



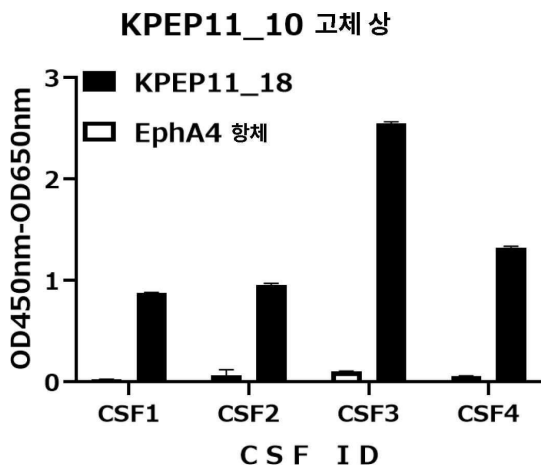
도면11



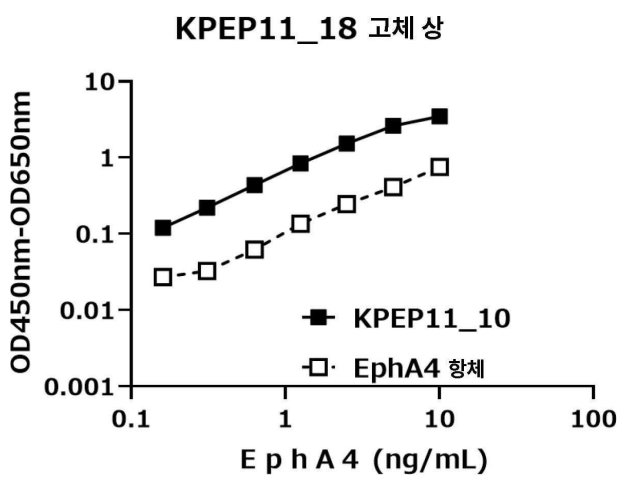
도면12



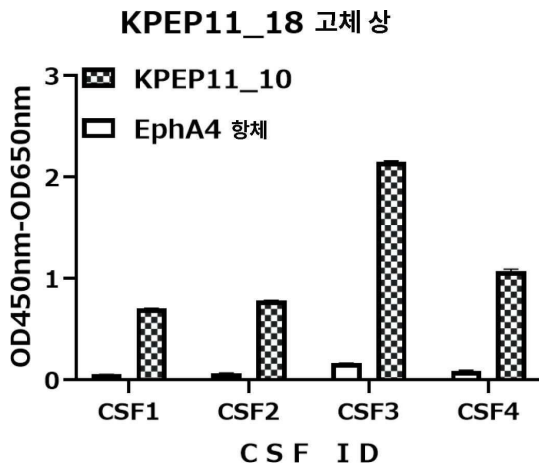
도면13



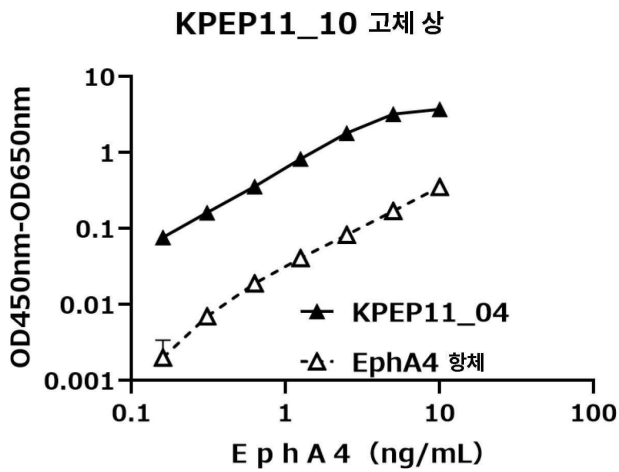
도면14



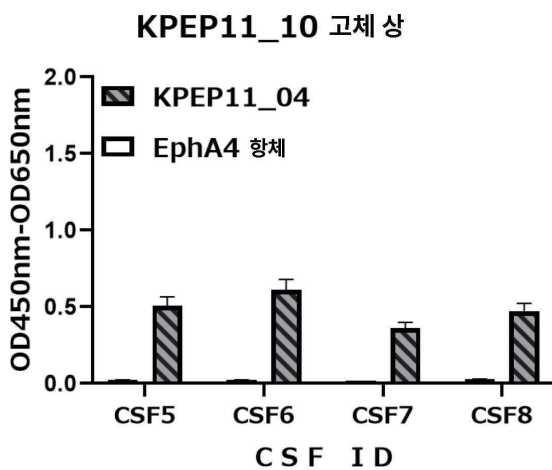
도면15



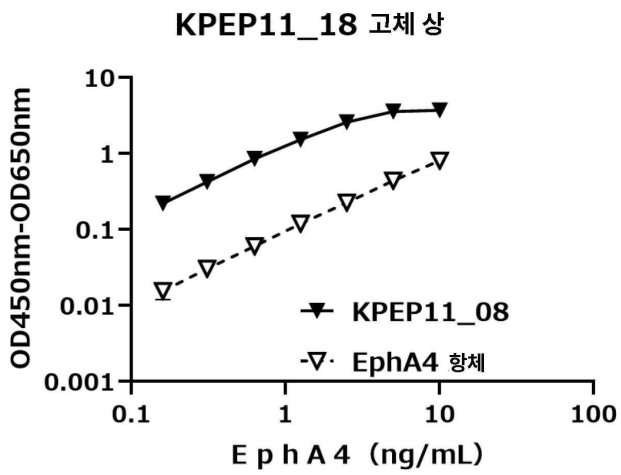
도면16



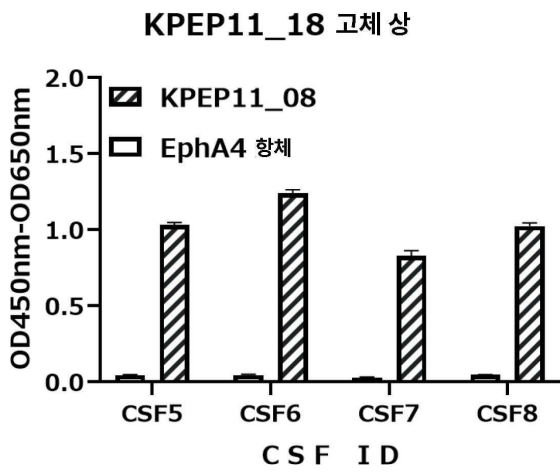
도면17



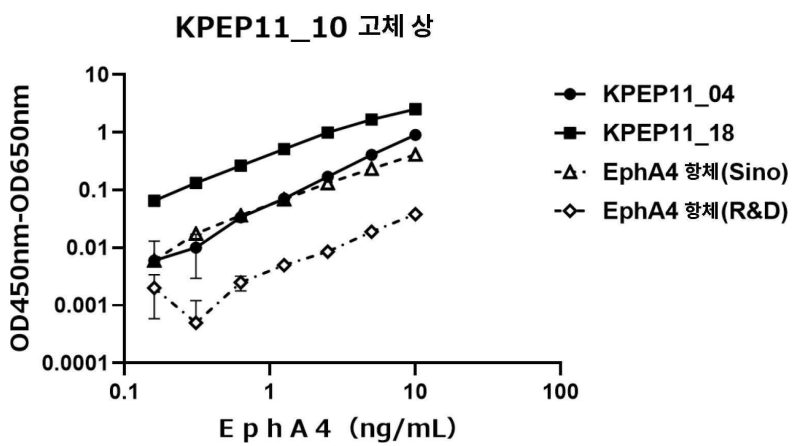
도면18



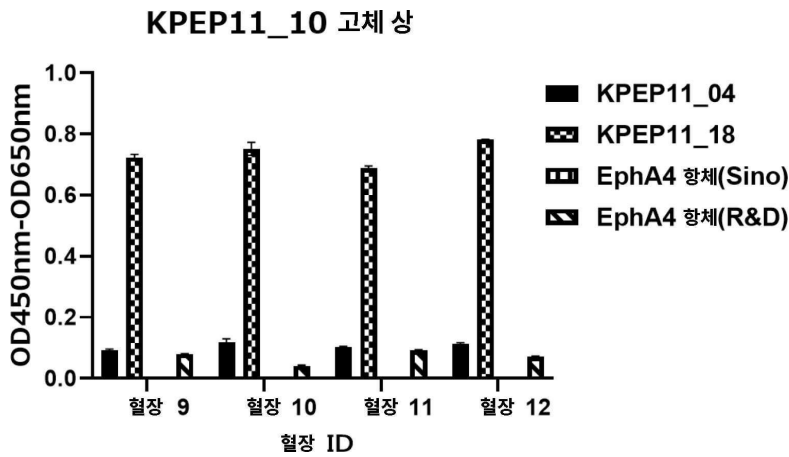
도면19



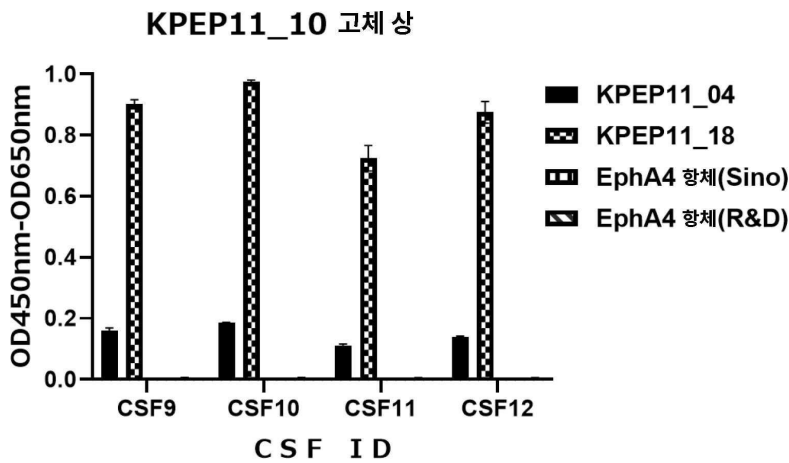
도면20



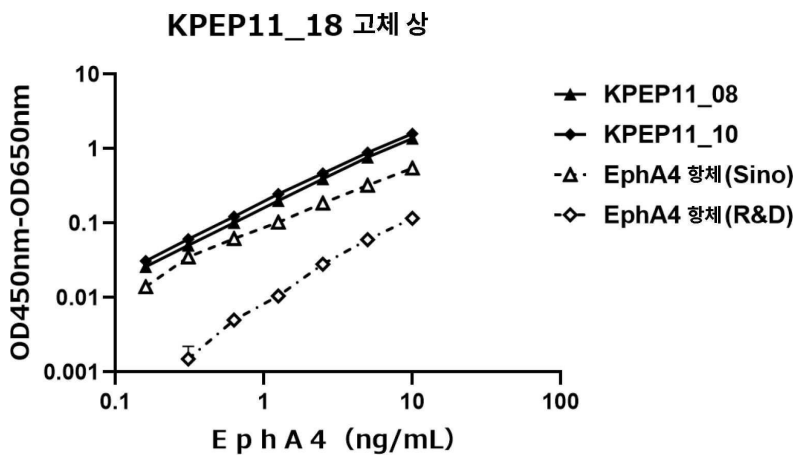
도면21



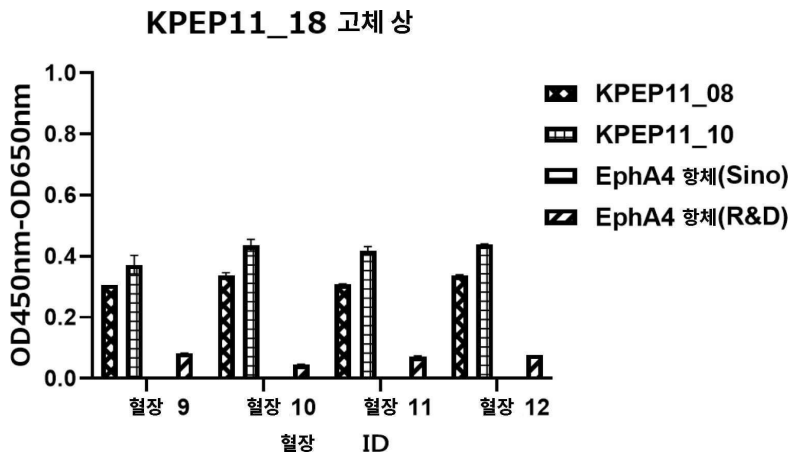
도면22



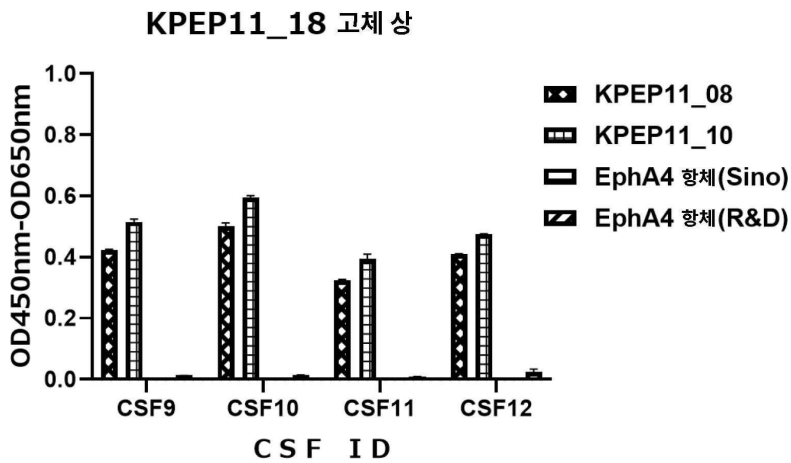
도면23



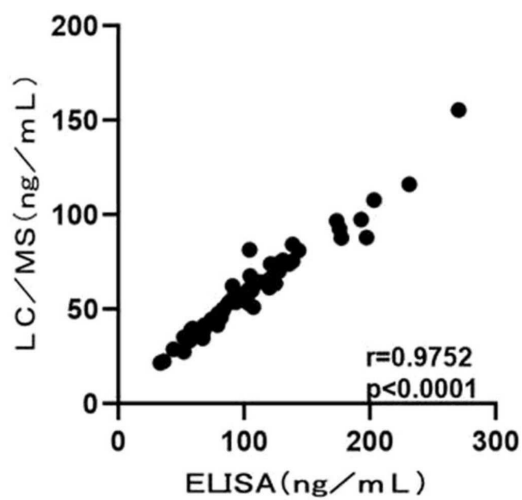
도면24



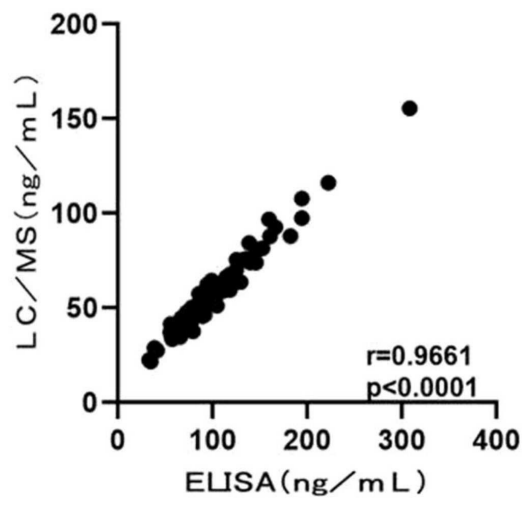
도면25



도면26



도면27



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.