



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I873576 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：112111250

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 04 月 28 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P37/02 (2006.01)

(30)優先權：2015/04/28 日本

2015-091095

(71)申請人：日商田邊三菱製藥股份有限公司 (日本) MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION (JP)

日本

國立大學法人大阪大學 (日本) OSAKA UNIVERSITY (JP)

日本

國立大學法人千葉大學 (日本) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY (JP)

日本

(72)發明人：橋本元範 HASHIMOTO, MOTONORI (JP)；山下俊英 YAMASHITA, TOSHIHIDE (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 101778864A

CN 102656190A

CN 102811739A

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：6 共 116 頁

(54)名稱

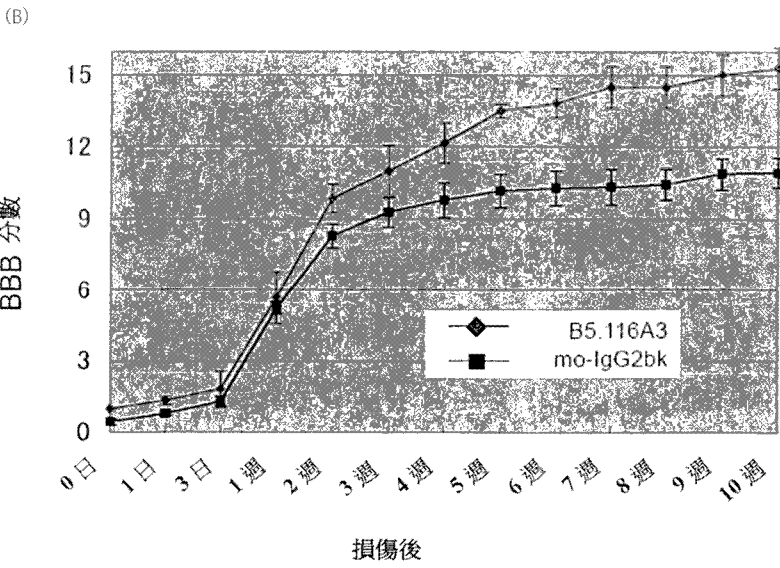
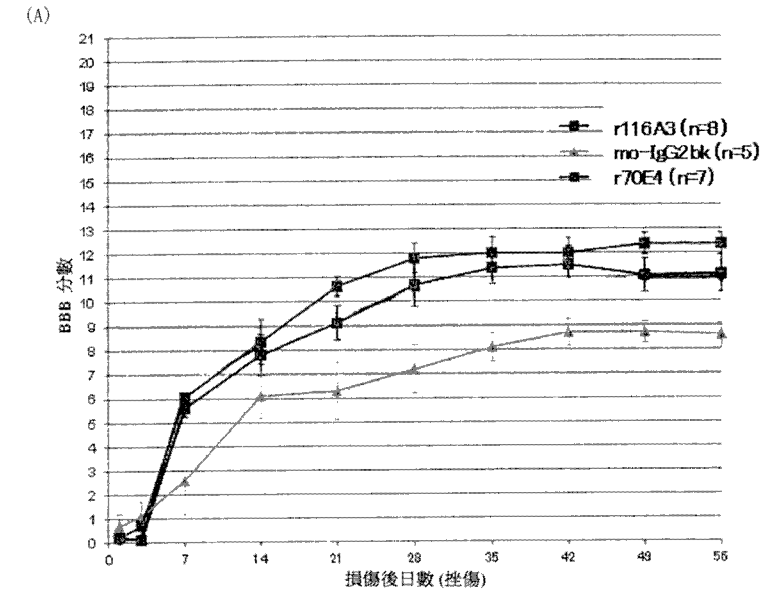
RGMa 結合蛋白質及其使用

(57)摘要

本發明之課題為得到可使用作為神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防用之醫藥的結合活性高、且副作用少之抗 Repulsive Guidance Molecule a(RGMa)抗體，藉由提供不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的經單離之 RGMa 結合蛋白質，較佳為，互補性決定區域之胺基酸序列為序列表之序列編號 30~35 或序列表之序列編號 36~40 及 SFG 的抗 RGMa 抗體，而解決其課題。

指定代表圖：

圖 5



I873576

【發明摘要】**【中文發明名稱】**

RGMa 結合蛋白質及其使用

【中文】

本發明之課題為得到可使用作為神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防用之醫藥的結合活性高、且副作用少之抗 Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) 抗體，藉由提供不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的經單離之 RGMa 結合蛋白質，較佳為，互補性決定區域之胺基酸序列為序列表之序列編號 30~35 或序列表之序列編號 36~40 及 SFG 的抗 RGMa 抗體，而解決其課題。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 5

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

RGMa 結合蛋白質及其使用

【技術領域】

[0001] 本發明係關於 RGMa 結合蛋白質及其使用。

【先前技術】

[0002] RGM (repulsive guidance molecule)，為分子量約 33kDa 之 GPI 錨定型膜蛋白質，當初，係作為視覺系統之軸索誘導分子而被鑑定到的膜蛋白質（參照非專利文獻 1）。RGM 家族係包含稱為 RGMa、RGMb 及 RGMc 之 3 種成員，其中尤以 RGMa，由於除了發育階段以外，亦於成人人類及大鼠之中樞神經系統損傷後再表現，及於大鼠中之 RGMa 阻礙，會使脊髓損傷後之神經突成長亢進，促進功能回復（參照非專利文獻 2 參照），故 RGMa 被認為是中樞神經系統損傷後之神經突阻礙物質。

[0003] RGMa 亦有報告於免疫系統的作用。RGMa 係於樹狀細胞上表現，藉由對 T 細胞作用而提高 T 細胞對 ICAM-1·纖維接合素（fibronectin）之接著性、或誘導細胞激素之產生（專利文獻 4）。於多發性硬化症模式小鼠中，若投與抗 RGMa 抗體時，腦脊髓炎之症狀會被抑制，亦顯示抑制發病、復發的效果。抗 RGMa 抗體，被認為藉由與於樹狀細胞表現之 RGMa 結合，抑制 T 細胞之活性

化，對多發性硬化症顯示效果。

[0004] RGMa 之訊息傳導機構亦逐漸被解明，作為 RGMa 之受體，報告有 Neogenin 蛋白質（專利文獻 3）。Neogenin 為單次跨膜型之蛋白質，於神經細胞或 T 細胞上表現。

RGMa 係藉由與細胞膜上之 Neogenin 結合，誘導細胞內之 RhoA 之活性化、Ras 之不活性化，帶來神經突成長阻礙效果。另一方面，已知於發育途中之雞腦中，未結合 RGMa 時，Neogenin 會引起細胞凋亡（Matsunaga 等、Dev.Growth Differ.46, 481, 2004）。亦即，RGMa/Neogenin 路徑，可認為具有促進神經細胞之生存的對神經再生而言較佳的作用、及阻礙神經突成長之負的作用的二個相反作用。

[0005] 作為以 RGM 為標的之醫藥，於專利文獻 1 中揭示含有抗 RGM 中和抗體作為有效成分的軸索再生促進劑。又，專利文獻 2 及 3 中，揭示調節 RGM 對 Neogenin 受體之結合的抗 RGM 抗體之對腦及脊髓的機械損傷之治療劑。又，專利文獻 4 中，揭示抗 RGM 抗體之多發性硬化症等的醫藥用途。又，專利文獻 5 中，揭示抗 RGM 抗體對包含多發性硬化症、哺乳動物之腦外傷、脊髓損傷、中風、神經退化疾病及思覺失調症之疾病的治療用途。進一步地，專利文獻 6 中，揭示抗 RGM 抗體等之 RGM 調節子對脊髓損傷或多發性硬化症之治療用途，非專利文獻 3 中揭示對漸進型多發性硬化症之治療用途。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[0006]

[專利文獻 1] 國際公開 WO2005/087268 號小冊

[專利文獻 2] 日本特表 2010-537655 號公報

[專利文獻 3] 日本特表 2009-510002 號公報

[專利文獻 4] 國際公開 WO2011/071059 號小冊

[專利文獻 5] 日本特表 2011-512806 號公報

[專利文獻 6] 日本特表 2004-525875 號公報

[非專利文獻]

[0007]

[非專利文獻 1] Neuron 5, 735-743 (1990)

[非專利文獻 2] J. Cell Biol. 173, 47-58 (2006)

[非專利文獻 3] Cell Reports 10, 1-12 (2015)

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

[0008] 如上所述，抗 RGMa 抗體對神經學疾病或免疫學疾病之治療用途雖被揭示，但以往的抗體係有活性不充分、或有亦損及 RGMa 本來的功能之虞、副作用之問題等。特別是以往的抗體，因為阻礙 RGMa 與 Neogenin 間之結合，係有亦會阻礙與 RGMa 結合之 Neogenin 所具有的細胞凋亡抑制等之較佳作用之虞。

因而，本發明之課題為提供不阻礙 RGMa/Neogenin

之相互作用，且會中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的 RGMa 結合蛋白質。

[用以解決課題之手段]

[0009] 本發明者等人為了解決上述課題進行了努力探討。其結果，成功得到不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且會中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的 RGMa 結合蛋白質，發現其可作為對神經學疾病或免疫學疾病之醫藥來使用，而完成了本發明。

[0010] 本發明係如以下所示。

[1]一種經單離之 RGMa 結合蛋白質，其係不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性。

[2]如[1]之 RGMa 結合蛋白質，其係與人類 RGMa、大鼠 RGMa 及/或小鼠 RGMa 結合。

[3]如[1]或[2]之 RGMa 結合蛋白質，其係結合於 EEVVNAVEDWDSQG（序列表之序列編號 26）、NQQIDFQAFHTNAE（序列表之序列編號 27）、PTAPETFPYET（序列表之序列編號 28）、及/或 KLPVEDLYYQA（序列表之序列編號 29）之胜肽。

[4]如[1]至[3]中任一項之 RGMa 結合蛋白質，其係結合於序列表之序列編號 26 及序列編號 27 之胜肽。

[5]如[1]至[4]中任一項之 RGMa 結合蛋白質，其係結合於序列表之序列編號 26、序列表之序列編號 27 及序列

表之序列編號 28 之胜肽。

[6]如[1]至[4]中任一項之 RGMa 結合蛋白質，其係結合於序列表之序列編號 26、序列表之序列編號 27 及序列表之序列編號 29 之胜肽。

[7]如[1]至[6]中任一項之 RGMa 結合蛋白質，其中 RGMa 結合蛋白質為人類抗體、人類化抗體或嵌合體抗體、或此等之抗原結合片段。

[8]一種核酸分子，其係編碼如[1]至[7]中任一項之 RGMa 結合蛋白質的蛋白質部分。

[9]一種重組載體，其係包含如[8]之核酸分子。

[10]一種宿主細胞，其係包含如[9]之重組載體。

[11]一種方法，其係如[1]至[7]中任一項之 RGMa 結合蛋白質之製造方法，其包含培養如[10]之宿主細胞之步驟。

[12]一種醫藥組成物，其包含如[1]至[7]中任一項之 RGMa 結合蛋白質。

[13]如[12]之醫藥組成物，其係神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防用。

[14]如[13]之醫藥組成物，其中神經學疾病，係由包含肌萎縮性側索硬化症、上臂神經叢損傷、腦損傷（包含外傷性腦損傷）、腦性麻痺、格林-巴利症候群（Guillain-Barre syndrome）、大腦白質萎縮症、多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）、視神經脊髓炎、小兒麻痺後

症候群、脊柱裂、脊髓損傷、脊髓性肌肉萎縮症、脊椎腫瘤、橫貫性脊髓炎、失智症（包含老年性失智症、輕度認知功能障礙、阿茲海默症、阿茲海默相關失智症）、杭丁頓氏舞蹈症、遲發性運動障礙、躁症、巴金森氏症、史蒂爾-理查症候群（Steele-Richard syndrome）、唐氏症、重症肌無力症、神經外傷（包含視神經外傷）、血管類澱粉症、類澱粉症所伴隨之大腦出血、腦梗塞、腦炎、急性混亂障礙、青光眼、思覺失調症及視網膜神經纖維層病變（包含藉由糖尿病性視網膜病、缺血性視神經病變、X 染色體連結性視網膜分裂症、藥物誘發性視神經病變、視網膜營養性萎縮、老年性黃斑部病變、視神經乳頭玻璃疣而賦予特徵之眼病；藉由光受器病變之遺傳性決定因子而賦予特徵之眼病、體染色體隱性錐狀細胞-桿狀細胞失養症、視神經病變所伴隨之粒線體受損）之群中選擇。

[15]如[13]之醫藥組成物，其中免疫學疾病，係由包含多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）、視神經脊髓炎、乾癬、關節炎（包含風濕性關節炎、變形性關節病、乾癬性關節炎）、格林-巴利症候群（Guillain-Barre syndrome）、神經貝賽特氏症、惡性貧血、I 型（胰島素依賴型）糖尿病、全身紅斑性狼瘡（SLE）、發炎性腸疾病（IBD）、休格倫氏症候群、古巴士德氏症候群（Goodpasture's syndrome）、葛瑞夫茲氏症（Graves'disease）、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫

性血小板減少性紫斑病、氣喘、花粉症、異位性皮膚炎、絲球體腎炎、重症肌無力症、橋本氏病、及肉狀瘤病之群中選擇。

[16]如[13]之醫藥組成物，其中神經學疾病或免疫學疾病，係由包含脊髓損傷、神經外傷（包含視神經外傷）及多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）之群中選擇。

[17]一種經單離之抗 RGMa 抗體、或其抗原結合片段，其輕鏈之互補性決定區域 1（LCDR1）、輕鏈之互補性決定區域 2（LCDR2）、輕鏈之互補性決定區域 3（LCDR3）、重鏈之互補性決定區域 1（HCDR1）、重鏈之互補性決定區域 2（HCDR2）及重鏈之互補性決定區域 3（HCDR3）之各自的胺基酸序列，係包含

LCDR1：RASQDISSYLN（序列表之序列編號 30）

LCDR2：YTSRLHS（序列表之序列編號 31）

LCDR3：QQLNTP（序列表之序列編號 32）

HCDR1：DAWMD（序列表之序列編號 33）

HCDR2：EIRSKANNHATYYAESVKG（序列表之序列編號 34）及

HCDR3：RDGAY（序列表之序列編號 35）；

或包含

LCDR1：RSSQSLVHSNGNTYLH（序列表之序列編號 36）

LCDR2 : KVSNRFS (序列表之序列編號 37)

LCDR3 : SQSTHVP (序列表之序列編號 38)

HCDR1 : TSYYWN (序列表之序列編號 39)

HCDR2 : YISYDGTNNYNPSLKN (序列表之序列編號 40) 及

HCDR3 : SFG , 且

各 CDR 序列中 , 1 或數個胺基酸亦可經取代、缺失、及/或附加。

[18]如[17]之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段 , 其中重鏈可變區域 (VH) 係包含

VH : EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDW
VRQAPGKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDD
SKSIVYLLQMNSLRTEDTALYYCTRRDGAYWGKGTTVTVS
S (序列表之序列編號 41) 或與該胺基酸序列具有至少 90% 之同一性的胺基酸序列 , 且

輕鏈可變區域 (VL) 係包含

VL : DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISSYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFASYFCQQLNTLPWTFGGGGTKVEME (序列表之序列
編號 42) 或與該胺基酸序列具有至少 90% 之同一性的胺
基酸序列。

[19]如[17]或[18]之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段 , 其中抗 RGMa 抗體為人類化抗體。

[20]如[17]至[19]中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原

結合片段，其中抗 RGMa 抗體具有人類 IgG 之恆定區域。

[21]一種 RGMa 結合蛋白質，其中與 RGMa 之結合係與如 [17]或 [18]之抗 RGMa 抗體競爭。

[22]一種核酸分子，其係編碼如 [17]至 [20]中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段的蛋白質部分。

[23]如 [22]之核酸分子，其中編碼 VH 及 VL 之胺基酸序列的核酸序列，為包含

VH: gaagtgcagctgggtggaatctggcggcggactggtgcagcctggcagatc
cctgagactgtcctgtaccgcctccggcttcaccttctccgacgcctggatggattgg
gtgcgacaggctcctggcaagggcctggaatgggtggccgagatccgggtccaagg
ccaacaaccacgccacctactacgccgagttctgtgaagggccggttcaccatctcc
cgggacgactccaagtcctcgtgtacctgcagatgaactccctgcggaccgagga
caccgccctgtactactgcaccagaagggacggcgcctactggggcaagggcacc
acagtgcagtgctctcc (序列表之序列編號 43)、及

VL: gacatccagatgaccagtcctccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgaca
gagtgaccatcacctgtcgggcctcccaggacatctctcctacctgaactggtatc
agcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctactacacctcccggtgca
ctccggcgtgccctctagattttccggctctggctccggcaccgactttacctgacc
atctccagcctgcagcccaggacttcgcctcctacttctgtcagcagctgaacacc
ctgccctggacctttggcggaggcaccaaggtggaaatggaa (序列表之序
列編號 44) 之核酸序列。

[24]一種重組載體，其係包含如 [22]或 [23]之核酸分子。

[25]一種宿主細胞，其係包含如 [24]之重組載體。

[26]一種方法，其係如[17]至[20]中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段之製造方法，其包含培養如[25]之宿主細胞之步驟。

[27]一種醫藥組成物，其係包含如[17]至[20]中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段。

[28]如[27]之醫藥組成物，其係神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防用。

[29]如[28]之醫藥組成物，其中神經學疾病，係由包含肌萎縮性側索硬化症、上臂神經叢損傷、腦損傷（包含外傷性腦損傷）、腦性麻痺、格林-巴利症候群、大腦白質萎縮症、多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）、視神經脊髓炎、小兒麻痺後症候群、脊柱裂、脊髓損傷、脊髓性肌肉萎縮症、脊椎腫瘤、橫貫性脊髓炎、失智症（包含老年性失智症、輕度認知功能障礙、阿茲海默症、阿茲海默相關失智症）、杭丁頓氏舞蹈症、遲發性運動障礙、躁症、巴金森氏症、史蒂爾-理查症候群、唐氏症、重症肌無力症、神經外傷（包含視神經外傷）、血管類澱粉症、類澱粉症所伴隨之大腦出血、腦梗塞、腦炎、急性混亂障礙、青光眼、思覺失調症及視網膜神經纖維層病變（包含藉由糖尿病性視網膜病、缺血性視神經病變、X 染色體連結性視網膜分裂症、藥物誘發性視神經病變、視網膜營養性萎縮、老年性黃斑部病變、視神經乳頭玻璃疣而賦予特徵之眼病；藉由光受器病變之遺傳性決定因子

而賦予特徵之眼病、體染色體隱性錐狀細胞-桿狀細胞失養症、視神經病變所伴隨之粒線體受損）之群中選擇。

[30]如[28]之醫藥組成物，其中免疫學疾病，係由包含多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）、視神經脊髓炎、乾癬、關節炎（包含風濕性關節炎、變形性關節病、乾癬性關節炎）、格林-巴利症候群、神經貝賽特氏症、惡性貧血、I型（胰島素依賴型）糖尿病、全身紅斑性狼瘡（SLE）、發炎性腸疾病（IBD）、休格倫氏症候群、古巴士德氏症候群、葛瑞夫茲氏症、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性血小板減少性紫斑病、氣喘、花粉症、異位性皮膚炎、絲球體腎炎、重症肌無力症、橋本氏病、及肉狀瘤病之群中選擇。

[31]如[28]之醫藥組成物，其中神經學疾病或免疫學疾病，係由包含脊髓損傷、神經外傷（包含視神經外傷）及多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）之群中選擇。

[32]一種神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防方法，其係包含將如[1]至[7]中任一項之 RGMa 結合蛋白質，投與有效量至以其為必要的對象之步驟。

[33]一種神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防方法，其係包含將如[17]至[20]中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，投與有效量至以其為必要

的對象之步驟。

[發明之效果]

[0011] 本發明之 RGMa 結合蛋白質，藉由不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之相互作用，可維持與 RGMa 結合之 Neogenin 所具有的對神經細胞等之 Apoptosis 的阻礙等之作用，因此神經細胞之保護效果強，神經細胞減少所伴隨之副作用的顧慮少。又，本發明之人類化抗 RGMa 抗體，相較於以往的抗體而言，與人類 RGMa 之結合性及熱安定性等的特性優良。因此，可使用作為藥效優良、副作用少之對神經學疾病或免疫學疾病之醫藥。

【圖式簡單說明】

[0012]

[圖 1]顯示使用 RGMa 多株抗體（AF2459）、比較例抗體（r5F9）、及本發明之抗體（r70E4、116A3）之 RGMa-Neogenin 結合阻礙試驗的結果之圖。

[圖 2]顯示使用控制組小鼠 IgG、及本發明之抗體（B5.70E4、B5.116A3）之 RGMa-BMP2 結合阻礙試驗的結果之圖。

[圖 3]顯示使用比較例抗體（rH5F9）、本發明之嵌合體抗體（r116A3C）及本發明之人類化抗體（HE/KA、HA/KC）之抗體之熱安定性試驗的結果之圖。

[圖 4]顯示使用本發明之抗體（B5.70E4（左）、

B5.116A3（右））之神經突成長試驗的結果之圖。

[圖 5]顯示使用控制組小鼠 IgG（mo-IgG2bk）、及本發明之抗體（r70E4、r116A3）之使用脊髓損傷模式大鼠之效力試驗的結果之圖。其顯示於（A）脊髓壓碎模式、（B）脊髓半側切斷模式之效力試驗的結果。

[圖 6]顯示使用以 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 胜肽所誘發之多發性硬化症模式小鼠的本發明之抗體（B5.116A3）之效力試驗的結果之圖。左側表示 EAE 分數、右側表示體重之變化，上段表示 7 日及 10 日後投與被驗抗體的情況、下段表示 18 日及 21 日後投與被驗抗體的情況之結果。

【實施方式】

[0013] 為了容易理解本發明，故以下說明本發明所用之用語。

[0014]

[RGMa]

RGMa 為中樞神經系統中之神經突成長阻礙蛋白質，人類 RGMa 蛋白質，係如序列表之序列編號 1 所示般，係作為由 450 個胺基酸所成之前驅蛋白質而被生合成。存在於 N 末端之訊息胜肽 Met1~Pro47（係指由 N 末端側起第 1 號之甲硫胺酸殘基至 47 號之脯胺酸殘基為止之胜肽，以後係同樣之記載）被去除，Asp168 與 Pro169 之間的胜肽鍵被切斷，且 C 末端胜肽 Arg423~Cys450 被去除，而且於作為 C 末端 Gly422 之 C 末端羧基上附加 GPI 錨定。

人類 RGMa 蛋白質，係作為 N 末側結構域（Cys48~Asp168）與 C 末側結構域（Pro169~Ala424）係被雙硫鍵連結的成熟蛋白質，而透過 GPI 錨定於細胞膜上表現。小鼠之 RGMa 的前驅蛋白質係由序列表之序列編號 2 所示之胺基酸序列、大鼠之 RGMa 的前驅蛋白質係由序列表之序列編號 3 所示之胺基酸序列所成，但因 C 末端胜肽被去除，故作為成熟蛋白質而言係成為相同之胺基酸序列。本發明中，RGMa 只要係結合於後述之 Neogenin 而進行作用者，則可指前驅蛋白質、成熟蛋白質或其活性型片段之任一者、亦可為該等之衍生物或突變體。又，可為人類 RGMa 亦可為來自其他生物之 RGMa，但較佳為人類 RGMa。

[0015]

[Neogenin]

Neogenin 係於中樞神經之神經細胞等表現，作為 RGMa 之受體之一而發揮功能。人類 Neogenin 蛋白質係如序列表之序列編號 10 所示般，由 1461 個胺基酸所成，去除訊息胜肽 Met1~Ala33 而作為成熟的膜蛋白質表現。本發明中，Neogenin 只要係結合於 RGMa 者，則可指前驅蛋白質、成熟蛋白質或其 RGMa 結合片段之任一者、亦可為該等之衍生物或突變體。又，可為人類 Neogenin 亦可為來自其他生物之 Neogenin，但較佳為人類 Neogenin。

[0016]

[中和]

本文中，「中和」係指可與目標之標的結合，且阻礙該標的之任一功能的作用。亦即，「中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性」，係指藉由 RGMa 結合蛋白質結合於 RGMa，來阻礙 RGMa 之神經突成長阻礙活性。神經突成長阻礙活性，可藉由本領域中已知之數個 *in vitro* 或 *in vivo* 分析之 1 者或其以上來評估，例如，可藉由本案說明書記載之神經突成長阻礙試驗來評估。

[0017]

[經單離]

經單離之 RGMa 結合蛋白質等之「經單離」，意指經鑑定、且經分離、及/或由自然狀態之成分回收的意義。自然狀態之雜質，為可妨礙該抗體之診斷或治療上的使用之物質，可列舉酵素、激素及其他之蛋白質性或非蛋白質性之溶質。一般而言，欲將 RGMa 結合蛋白質等單離，只要藉由至少 1 個純化步驟來純化即可，藉由至少 1 個純化步驟而純化之 RGMa 結合蛋白質，可稱為「經單離之 RGMa 結合蛋白質」。

[0018]

[RGMa 結合蛋白質]

本文中，「RGMa 結合蛋白質」係指包含結合於 RGMa 之蛋白質的分子。RGMa 結合蛋白質，可列舉抗 RGMa 抗體及其抗原結合片段、以及 RGMa 結合支架蛋白質（scaffold protein）、以及 Neogenin 之細胞外結構域等

的可溶性 RGMa 受體蛋白質、以及此等之融合蛋白質。RGMa 結合支架蛋白質，係指藉由對絲胺酸蛋白酶阻礙劑之 Kunitz 結構域或人類之纖維黏附蛋白（fibronectin）之細胞外結構域、錨蛋白、脂質載運蛋白（lipocalin）等導入變異，而實現與 RGMa 之結合功能的蛋白質。融合蛋白質，係指對 RGMa 結合蛋白質予以化學地或基因工程地結合了聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長因子（TGF- β 、NGF、Neurotrophin 等）、白蛋白、酵素、其他抗體等之本案之 RGMa 結合蛋白質以外的功能分子而得之 RGMa 結合蛋白質。

[0019]

[人類抗體]

人類抗體，係指輕鏈、重鏈均為來自人類免疫球蛋白之抗體。人類抗體，依重鏈恆定區域之不同，而包含具有 γ 鏈之重鏈的 IgG（包含 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4）、具有 μ 鏈之重鏈的 IgM、具有 α 鏈之重鏈的 IgA（包含 IgA1、IgA2）、具有 δ 鏈之重鏈的 IgD、或具有 ϵ 鏈之重鏈的 IgE。又，原則上，輕鏈係包含 κ 鏈與 λ 鏈之任一者。

[0020]

[人類化抗體]

人類化抗體，係指由：由來自非人類動物之抗體之互補性決定區域、與來自人類抗體之框架（framework）區

域所構成的可變區域、及來自人類抗體之恆定區域所構成的抗體。

[0021]

[嵌合體抗體]

嵌合體抗體，係指輕鏈、重鏈、或其兩者，係由來自非人類之可變區域、與來自人類之恆定區域所構成之抗體。

[0022]

[抗 RGMa 抗體]

本案中，抗 RGMa 抗體係指結合於 RGMa 之免疫球蛋白分子或其改變分子。改變分子為包含多特異性抗體、嵌合體抗體、人類化抗體、功能改變抗體、及連結抗體（conjugated antibody）者。

[0023]

[多特異性抗體]

多特異性抗體，係指具備具有 2 個以上之不同的抗原特異性之 2 個以上之獨立的抗原認識部位之非對稱抗體，可列舉具有 2 個抗原特異性之雙特異性抗體、具有 3 個抗原特異性之三特異性抗體等。

[0024]

[功能改變抗體]

本案中，功能改變抗體，係指藉由主要改變抗體之 Fc 區域之胺基酸或糖鏈，而改變抗體所具有之抗原結合功能以外的功能，例如改變了細胞殺傷功能、補體活性化

功能或血中半衰期延長功能之抗體。

[0025]

[連結抗體]

本案例中，連結抗體，係指對抗體予以化學地或基因工程地結合了聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長因子（TGF- β 、NGF、Neurotrophin 等）、白蛋白、酵素等之抗體以外的功能分子而得之抗體。

[0026]

[抗原結合片段]

本案例中，抗原結合片段，係指包含抗體之一部分的蛋白質，且可結合於抗原者。抗原結合片段之例子，可列舉 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv（variable fragment of antibody）、雙硫鍵 Fv、單鏈抗體（scFv）、及此等之聚合物等。進一步地，抗原結合片段，係包含化學地或基因工程地結合了聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長因子（TGF- β 、NGF、Neurotrophin 等）、白蛋白、酵素、其他抗體等之本案例之抗 RGMa 抗體以外的功能分子而得之連結抗原結合片段（conjugated antigen binding fragment）者。

[0027]

[互補性決定區域]

互補性決定區域（CDR），係指免疫球蛋白分子之可變區域當中，形成抗原結合部位之區域，亦稱為超可變區

域，係指每個免疫球蛋白分子胺基酸序列之變化特別大的部分。CDR 中，輕鏈及重鏈係各有 3 個 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3、及 HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本案中，免疫球蛋白分子之 CDR 係遵照 Kabat 之編號系統 (Kabat 等、1987、Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Department of Health and Human Services、NIH、USA) 來決定。

[0028]

[胺基酸序列之百分率 (%) 同一性]

此處，可變區域等之關於經鑑定之參照聚胜肽序列的「百分率 (%) 同一性」，係將序列予以排比 (align)，為了得到最大之 % 同一性，依需要導入間隙，任何的保存性取代 (conservative substitution) 均設定成不考慮為序列同一性之一部分之後，作為與特定之參照聚胜肽序列的胺基酸殘基相同之候補序列中的胺基酸殘基之百分率來進行定義。以測定 % 同一性為目的之排比 (alignment)，可藉由使用所屬技術領域中具有通常知識者之技術範圍內的各種方法，例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、或 Megalign (DNASTAR) 軟體般可為公眾獲得之電腦軟體來達成。所屬技術領域中具有通常知識者，為了對所比較之序列的全長達成最大之排比，可決定包含必要之任意演算法的用以排比序列之適切的參數。但是，為了達成此處之目的，% 同一性值，可於一對一序列排比 (pairwise alignment) 中，藉由使用序列比較電腦程式 BLAST 而得

到。

於胺基酸序列比較中使用 BLAST 的狀況中，所給定的胺基酸序列 A 之與給定之胺基酸序列 B 的 % 同一性，係如下述般計算：

分率 X/Y 之 100 倍

此處，X 為依序列排比程式 BLAST 之 A 及 B 的程式排比，符合為相同之分數的胺基酸殘基之數目，Y 為 B 之全部胺基酸殘基數目。胺基酸序列 A 之長度與胺基酸序列 B 之長度相異時，A 對 B 之 % 同一性，應可理解為與 B 對 A 之 % 同一性不同。若無特別指明，此處之全部的 % 同一性值，係如前一段所示般使用 BLAST 電腦程式而得到。

[0029]

[競爭]

本案中，與本發明之抗 RGMa 抗體「競爭」，係指藉由本說明書記載之表面電漿共振 (SPR) 法來測定時，藉由該抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段的存在，具備顯著差地使本發明之抗 RGMa 抗體與 RGMa 之結合降低。

[0030] 以下，詳細說明本發明。

<RGMa 結合蛋白質>

本發明之 RGMa 結合蛋白質，為不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的經單離之 RGMa 結合蛋白質。

[0031] 作為 RGMa 蛋白質，較佳為來自哺乳類之 RGMa 蛋白質，例如，作為人類之 RGMa 蛋白質，可列舉

具有序列表之序列編號 1 之胺基酸序列的蛋白質，作為小鼠之 RGMa 蛋白質，可列舉具有序列表之序列編號 2 之胺基酸序列的蛋白質，作為大鼠之 RGMa 蛋白質，可列舉具有序列表之序列編號 3 之胺基酸序列的蛋白質。又，亦可為含有此等之序列中，包含 1 或數個（較佳為 1~20 個、更佳為 1~10 個、又更佳為 1~5 個）之胺基酸經取代、缺失、插入、及/或附加的胺基酸序列而成，且具有與 RGMa 蛋白質實質相同之活性，對聚胜肽或前述胺基酸序列具有 90%以上（較佳為 95%以上）之同一性的胺基酸序列之聚胜肽。

[0032] 此處，「具有與 RGMa 蛋白質實質相同之活性」，只要該聚胜肽為具有神經突成長阻礙作用者，則任意者均包含其中。

[0033] 上述胺基酸之取代較佳為保存性取代。此處「保存性取代」意指以實質上不改變胜肽活性的方式，將胺基酸殘基以其他化學上類似之胺基酸殘基取代。例如，可列舉將某個疏水性殘基以其他疏水性殘基取代的情況、將某個極性殘基以具有相同電荷之其他極性殘基取代的情況等。作為可進行如此取代之功能上類似的胺基酸之例子，就非極性（疏水性）胺基酸而言，可列舉丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、脯胺酸、色胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸等。就極性（中性）胺基酸而言，可列舉甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、麩醯胺、天門冬醯胺、半胱胺酸等。就具備正電荷（鹼性）之胺基酸而言，可列舉

精胺酸、組胺酸、離胺酸等。又，就具備負電荷（酸性）之胺基酸而言，可列舉天門冬胺酸、麩胺酸等。

[0034] 本發明之 RGMa 結合蛋白質結合於 RGMa，意指 RGMa 特異性的結合，更佳為對人類 RGMa 之解離常數（Kd）低者，上限值例如為 10^{-8}M 以下、更佳為 10^{-9}M 以下、又更佳為 10^{-10}M 以下；下限值並無特殊限定，例如可列舉 10^{-14}M 以上、更佳為 10^{-13} 以上之 RGMa 結合蛋白質。

[0035] RGMa 蛋白質，作為成熟蛋白質而言，係由 N 末側結構域與 C 末側結構域所成，但僅以 C 末側結構域單獨亦具有神經突成長阻礙活性。本發明之 RGMa 結合蛋白質，較佳為亦僅結合於 RGMa 之 C 末側結構域而中和神經突成長阻礙活性。更佳為對人類 RGMa 之 C 末側結構域的解離常數（Kd）低者，上限值例如為 10^{-8}M 以下、更佳為 10^{-9}M 以下、又更佳為 10^{-10}M 以下；下限值並無特殊限定，例如可列舉 10^{-14}M 以上、更佳為 10^{-13} 以上之 RGMa 結合蛋白質。

[0036] 本發明之 RGMa 結合蛋白質，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合。此處，「不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合」，意指於後述實施例所示之 RGMa 與 Neogenin 之結合系統中，即使增加 RGMa 結合蛋白質之濃度，RGMa 與 Neogenin 之結合實質上亦不減少。例如，於 RGMa 與 Neogenin 之結合系統中添加 RGMa 結合蛋白質，且增加其濃度的情況時，表示 IC50 之 RGMa 結合蛋

白質濃度若為 10 μ g/mL 以上、更佳為 50 μ g/mL 以上、最佳為 100 μ g/mL 以上，則可說該 RGMa 結合蛋白質不會阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合。

[0037] 於與 RGMa 之結合試驗中使用的 Neogenin，較佳為與 RGMa 同種之 Neogenin。亦即，對於小鼠之 RGMa 較佳為使用小鼠之 Neogenin、對於人類之 RGMa 較佳為使用人類之 Neogenin。人類 Neogenin 之一例，可例示具有序列表之序列編號 10 之胺基酸序列的蛋白質，但只要可與 RGMa 結合者，亦可為具有與序列表之序列編號 10 具有 90%以上（較佳為 95%以上）之同一性的胺基酸序列者。

[0038] 本發明之 RGMa 結合蛋白質，會中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性。神經突成長阻礙活性，可藉由後述實施例所示之神經突成長試驗來評估。添加 RGMa 時，會抑制神經突之成長，藉由於其中添加 RGMa 結合蛋白質，使 RGMa 所致之神經突成長抑制變得不發生。本發明之 RGMa 結合蛋白質，可中和 RGMa 添加所致之神經突成長抑制 50%以上、更佳為 80%以上、最佳為 90%以上。

[0039] RGMa 蛋白質之胺基酸序列係依動物種類而異，因此於序列表之序列編號 1 表示之人類 RGMa 與序列表之序列編號 2 表示之小鼠 RGMa、序列表之序列編號 3 表示之大鼠 RGMa，胺基酸序列亦有不同。一般而言，於抗體醫藥等之蛋白質製劑之藥理試驗或安全性試驗中，係使用小鼠或大鼠等之嚙齒類作為實驗材料，因此本發明之

RGMa 結合蛋白質，較佳為結合於小鼠或大鼠之 RGMa，更佳為對小鼠或大鼠之 RGMa 的 K_d 為低者。 K_d 之上限值例如為 $5 \times 10^{-7} M$ 以下、更佳為 $10^{-8} M$ 以下、又更佳為 $10^{-9} M$ 以下，下限值並無特殊限定，例如可列舉 $10^{-12} M$ 以上、更佳為 10^{-11} 以上之 RGMa 結合蛋白質。

[0040] 本發明之 RGMa 結合蛋白質較佳為熱安定性優良。熱安定性可藉由加熱處理所致之與 RGMa 結合的降低來評估，較佳為經 $60^\circ C$ 以上之熱處理亦為安定、更佳為經 $65^\circ C$ 以上之熱處理亦為安定、最佳為經 $70^\circ C$ 以上之熱處理亦為安定。

[0041] 本發明之 RGMa 結合蛋白質結合於 RGMa 時的結合部位並無特殊限定，例如，為人類 RGMa 時，較佳為結合於 EEVVNAVEDWDSQG（序列表之序列編號 26）（序列表之序列編號 1 之胺基酸編號 298-311）、NQQIDFQAFHTNAE（序列表之序列編號 27）（序列表之序列編號 1 之胺基酸編號 322-335）、PTAPETFPYET（序列表之序列編號 28）（序列表之序列編號 1 之胺基酸編號 349-359）、KLPVEDLYYQA（序列表之序列編號 29）（序列表之序列編號 1 之胺基酸編號 367-377）之 1 者以上之胜肽。更佳為結合於序列表之序列編號 26 與 27、又更佳為結合於序列表之序列編號 26 與 27、且結合於序列表之序列編號 28 或 29。

[0042] RGMa 結合蛋白質，具體而言可列舉抗 RGMa 抗體、RGMa 結合支架蛋白質、及此等之融合蛋白質。

[0043]

<抗 RGMa 抗體>

本發明之抗 RGMa 抗體，係包含以 RGMa 蛋白質或其部分片段（例如包含上述序列表之序列編號 26~29 之一者以上的片段）為抗原，且將該抗原對小鼠等之哺乳動物誘發免疫所得之多株抗體或單株抗體、使用基因重組技術所製造之嵌合體抗體及人類化抗體、以及使用人類抗體產生基因轉殖動物等所製造之人類抗體等。將本發明之抗體作為醫藥對人類投與時，由副作用之觀點，期望為人類化抗體或人類抗體。

[0044] 抗原可直接使用於誘發免疫、亦可作為與攜載蛋白質（carrier protein）之複合體來使用。抗原與攜載蛋白質之複合體的配製，可使用戊二醛、碳二醯亞胺、馬來醯亞胺活性酯等之縮合劑。攜載蛋白質可例示牛血清白蛋白、甲狀腺球蛋白、血氫蛋白、KLH 等。

[0045] 被誘發免疫之哺乳動物，可列舉小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠、兔子、貓、狗、豬、山羊、馬或牛，接種方法可列舉皮下、肌肉或腹腔內之投與。投與時可與完全弗氏佐劑或不完全弗氏佐劑混合來投與，投與係通常每 2~5 週各 1 次來進行。由被誘發免疫之動物的脾臟或淋巴結中得到之抗體產生細胞係與骨髓瘤細胞進行細胞融合，作為融合瘤被單離。骨髓瘤細胞係使用來自哺乳動物，例如來自小鼠、大鼠、人類等者。

[0046]

<多株抗體>

多株抗體可藉由既存之一般的製造方法取得。亦即，例如，將如前述之抗原，依需要與弗氏佐劑（Freund's Adjuvant）一起，對如上述之哺乳動物誘發免疫，藉此可由自該免疫致敏動物得到之血清中取得。

[0047]

<單株抗體>

單株抗體，具體而言係可如下述般取得。亦即，以如前述之抗原為免疫原，將該免疫原依需要與弗氏佐劑（Freund's Adjuvant）一起，對如上述之哺乳動物的皮下、肌肉內、靜脈內、足墊內或腹腔內注射 1~數次或移植，藉以實施免疫致敏。通常，自初次免疫起約每 1~14 日進行 1~4 次免疫，自最終免疫起約 1~5 日後由經免疫致敏之該哺乳動物中取得抗體產生細胞。

[0048] 單株抗體可使用所屬技術領域中具有通常知識者周知之方法而得到（例如、『Current Protocols in Molecular Biology』（John Wiley & Sons (1987)）、Antibodies: A Laboratory Manual, Ed.Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)）。

[0049] 分泌單株抗體之「融合瘤」之配製，可遵照 Koehler 及 Milstein 等之方法（自然（Nature），256,495, 1975）及根據其之修飾方法來進行。亦即，藉由使由經免疫致敏之哺乳動物中取得的脾臟等中含有的抗體產生細胞，與來自哺乳動物，較佳為小鼠、大鼠或人類之無自我

抗體產生能力的骨髓瘤細胞進行細胞融合而配製。

[0050] 細胞融合所用之骨髓瘤細胞，例如可使用來自小鼠之骨髓瘤 P3/X63-AG8.653 (653)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/O、Sp2)、PAI、F0 或 BW5147、來自大鼠之骨髓瘤 210RCY3-Ag.2.3.、來自人類之骨髓瘤 U-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11 或 CEM-T15 等。

[0051] 融合促進劑可列舉聚乙二醇等，通常可藉由使用 20~50% 左右之濃度的聚乙二醇（平均分子量 1000~4000），於 20~40℃、較佳為 30~37℃ 之溫度下，使抗體產生細胞數與骨髓瘤細胞數之比通常為 1：1~10：1 左右，反應約 1~10 分鐘左右，來實施細胞融合。

[0052] 產生單株抗體之融合瘤植株的篩選，可藉由將融合瘤於例如微量滴定盤中培養，以 ELISA 等之免疫化學方法測定孔之培養上清液對免疫抗原之反應性來進行。

[0053] 抗體產生融合瘤之篩選時，除了與 RGMa 蛋白質之結合分析以外，亦進行該抗體是否不阻礙 RGMa 蛋白質與 Neogenin 之結合的評估、與該抗體是否中和 RGMa 蛋白質之功能（神經突成長阻礙活性）的評估。藉由此等篩選方法，可選擇本發明之抗 RGMa 抗體。

[0054] 由含有產生目標抗體之融合瘤的孔中，可進一步藉由極限稀釋法進行選殖，得到植株。融合瘤之篩

選、育種，通常係以添加 HAT（次黃嘌呤、胺嘌呤、胸苷），含有 10~20%胎牛血清之動物細胞用培養基來進行。

[0055] 由融合瘤製造單株抗體，可藉由將融合瘤於體外培養；或於小鼠、大鼠等之哺乳動物之腹水中等進行體內增殖，且自所得之培養上清液、或哺乳動物之腹水中單離來進行。

[0056] 於體外培養時，可配合所培養之細胞種類的特性及培養方法等之各種條件，將融合瘤增殖、維持及保存，並使用適合於在培養上清液中產生單株抗體的營養培養基。

[0057] 基本培養基可列舉例如 Ham'F12 培養基、MCDB153 培養基或低鈣 MEM 培養基等之低鈣培養基及 MCDB104 培養基、MEM 培養基、D-MEM 培養基、RPMI1640 培養基、ASF104 培養基或 RD 培養基等之高鈣培養基等，該基本培養基，可依目的，含有例如血清、激素、細胞激素及/或各種無機或有機物質等。

[0058] 單株抗體之單離、純化，可藉由將上述培養上清液或腹水，進行飽和硫酸銨、真球蛋白沈澱法、己酸法、辛酸法、離子交換層析（DEAE 或 DE52 等）、抗免疫球蛋白管柱或蛋白質 A 管柱等之親和性管柱層析等來進行。具體而言，單株抗體之純化，只要使用已知作為免疫球蛋白之純化法的方法即可，例如，可藉由硫酸銨分部法（ammonium sulfate fractionation）、PEG 分部法、乙醇

分部法、陰離子交換體之利用、進而使用 RGMa 蛋白質之親和性層析等之手段而容易地達成。

[0059] 單株抗體亦可藉由噬菌體展現法來取得。噬菌體展現法中，係使用目標的免疫原，將由任意噬菌體抗體基因庫中選出的噬菌體來進行篩選，來選擇對免疫原具有所期望之結合性的噬菌體。接著，對噬菌體內所含之抗體對應序列予以單離或決定序列，基於經單離之序列或經決定之序列資訊，來構築包含編碼抗體或抗原結合結構域之核酸分子的表現載體。然後藉由培養轉染有該表現載體之細胞株，可產生單株抗體。作為噬菌體抗體基因庫，藉由使用人類抗體基因庫，可生成具有所期望之結合性的人類抗體。

[0060] 作為支架蛋白質，係利用人類之絲胺酸蛋白酶阻礙劑之 Kunitz 結構域或人類之纖維黏附蛋白之細胞外結構域等，若改變支架上之標的結合部位的序列，則可生成結合於 RGMa 之支架蛋白質（Clifford Mintz et.al BioProcess International, 2013, Vol.11(2), pp40-48）。

[0061] 作為融合蛋白質，可列舉對 RGMa 結合蛋白質予以化學或基因工程地結合有聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長因子（TGF- β 、NGF、Neurotrophin 等）、白蛋白、酵素、其他抗體等之本案之 RGMa 結合蛋白質以外的功能分子之 RGMa 結合蛋白質。

[0062] 結合 PEG 作為功能分子時，PEG 係非限定地

可使用分子量 2000 至 100000Da、更佳為 10000 至 50000Da 者，可為直鏈型、亦可為分支型者。PEG，例如藉由使用 NHS 活性基，可結合於 RGMa 結合蛋白質之胺基酸的 N 末端胺基等。

[0063] 使用放射性物質作為功能分子時，可使用 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 或 ^{211}At 等。放射性物質，可藉由氯胺 T 法等而直接結合於 RGMa 結合蛋白質。

[0064] 使用毒素作為功能分子時，可使用細菌毒素（例如白喉毒素）、植物毒素（例如蓖麻毒素）、低分子毒素（例如 geldanamycin）、美坦素（maytansinoid）、及卡奇黴素（calicheamicin）等。

[0065] 使用低分子化合物作為功能分子時，可列舉道諾黴素（daunomycin）、阿黴素（doxorubicin）、胺甲葉酸（methotrexate）、絲裂黴素、新抑癌素（neocarzinostatin）、長春地辛（vindesine）及 FITC 等之螢光色素等。

[0066] 使用酵素作為功能分子時，可使用螢光酵素（例如螢火蟲螢光酵素及細菌螢光酵素；美國專利第 4737456 號）、蘋果酸脫氫酶、尿素酶、過氧化酶（例如辣根過氧化酶（HRPO））、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、醣類氧化酶（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、及葡萄糖-6-磷酸去氫酶）、雜環式氧化酶（例如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶等）、乳過氧化酶、微過氧化酶等。

[0067] 將毒素、低分子化合物或酵素予以化學性結合時所使用的連結子 (linker)，可列舉二價自由基 (例如伸烷基、伸芳基、伸雜芳基)、以 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (R 為任意取代基、 n 為正整數) 表示之連結子或烷氧基之重複單位 (例如聚伸乙基氧、PEG、聚亞甲基氧等) 及烷基胺基 (例如聚伸乙基胺基、JeffamineTM)、以及二酸酯及醯胺 (可列舉琥珀酸酯、琥珀二醯胺、氧代戊二酸酯、丙二酸酯及己醯胺等)。使功能分子結合之化學的修飾方法於本領域中係已確立 (D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152: 127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93: 8681)。

[0068] 本發明之 RGMa 結合蛋白質的較佳態樣可列舉嵌合體抗體。「嵌合體抗體」，可例示可變區域為來自非人類動物 (小鼠、大鼠、倉鼠、雞等) 之免疫球蛋白的可變區域，且恆定區域為來自人類免疫球蛋白之恆定區域的嵌合體抗體。例如，可使抗原對小鼠誘發免疫，由該小鼠單株抗體之基因切出與抗原結合之可變區域，與來自人類骨髓之抗體恆定區域結合而製作。來自人類免疫球蛋白之恆定區域，係依 IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1、IgA2)、IgD 及 IgE 等之同型而各具有固有之胺基酸序列，本發明中之重組嵌合體抗體之恆定區

域係可為屬任意之同型的人類免疫球蛋白之恆定區域。較佳為人類 IgG 之恆定區域。可使用如此方式所製作之嵌合體抗體之基因來製作表現載體。藉由以該表現載體對宿主細胞轉形 (transform) 而得到產生嵌合體抗體之轉形細胞，藉由培養該轉形細胞，由培養上清液中得到目標之嵌合體化抗體。

[0069] 本發明之 RGMa 結合蛋白質之其他較佳態樣，可列舉人類化抗體。本發明中之「人類化抗體」，為僅將小鼠等之非人類動物抗體之抗原結合部位 (CDR；互補性決定區域) 的 DNA 序列移植至人類抗體基因 (CDR 移植) 的抗體。例如，可參照日本特表平 4-506458 號公報及日本專利 2912618 號說明書等記載之方法來製作。具體而言，意指一種人類化抗體，其特徵為，其 CDR 之一部分或全部為來自非人類哺乳動物 (小鼠、大鼠、倉鼠等) 之單株抗體的 CDR，其可變區域之框架區域為來自人類免疫球蛋白的可變區域之框架區域，且其恆定區域為來自人類免疫球蛋白之恆定區域。

[0070] 本發明中之人類化抗體，例如可由以下方式製造。但是，當然不限定於如此的製造方法。

[0071] 例如，來自小鼠單株抗體之重組人類化抗體，可參照日本特表平 4-506458 號公報及日本特開昭 62-296890 號公報等，予以基因工程性地製作。亦即，由產生小鼠單株抗體之融合瘤中，單離小鼠重鏈 CDR 部分之 DNA 與小鼠輕鏈 CDR 部分之 DNA，且由人類免疫球蛋白

基因中單離人類重鏈 CDR 以外之全部區域的人類重鏈基因、與人類輕鏈 CDR 以外之全部區域的人類輕鏈基因。

[0072] 將經移植單離之小鼠重鏈 CDR 部分的 DNA 後的人類重鏈基因，導入於適當的表現載體，使其能夠表現，同樣地，將經移植小鼠輕鏈 CDR 部分之 DNA 後的人類輕鏈基因，導入於適當的另一表現載體，使其能夠表現。或者，亦可將移植小鼠 CDR 後的人類之重鏈及輕鏈基因導入於同一表現載體，使其能夠表現。藉由以如此方式製作之表現載體對宿主細胞轉形，得到人類化抗體產生轉形細胞，藉由培養該轉形細胞，由培養上清液中得到目標之人類化抗體。

[0073] 本發明之 RGMa 結合蛋白質之其他較佳態樣，可列舉人類抗體。人類抗體係指包含構成免疫球蛋白之重鏈可變區域及重鏈恆定區域以及輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域的全部區域均為來自編碼人類免疫球蛋白之基因的免疫球蛋白之抗體，可將人類抗體基因導入於小鼠來製作。具體而言，例如，藉由至少將人類免疫球蛋白基因接入於小鼠等之人類以外之哺乳動物的基因座中，並將所製作之基因轉殖動物以抗原免疫致敏，藉此可與前述之多株抗體或單株抗體之製作法同樣地進行製造。

[0074] 例如，產生人類抗體之基因轉殖小鼠，可遵照 Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994 ; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997 ; 日本特表平 4-504365 號公報 ; 日本特表平 7-509137 號公報 ; 國際公開

WO94/25585 號小冊；Nature, Vol.368,p.856-859, 1994；及日本特表平 6-500233 號公報等記載之方法來製作。更具體而言，可列舉 HuMab（註冊商標）小鼠（Medarex, Princeton NJ）、KMTM 小鼠（Kirin Pharma Company, Japan）、KM（FC γ RIIb-KO）小鼠等。

[0075] 本發明之單株抗體，具體而言，可列舉重鏈可變區域之 CDR 包含序列表之序列編號 33（HCDR1）、34（HCDR2）及 35（HCDR3）之胺基酸序列、輕鏈可變區域之 CDR 包含序列表之序列編號 30（LCDR1）、31（LCDR2）及 32（LCDR3）之胺基酸序列者。

再者，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的本發明之抗體的特性，於此等 CDR 之 1 者以上，1~數個之胺基酸亦可被取代。此處，1~數個係指例如 1 個或 2 個。再者，為了維持本發明之特性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。維持抗體之特性，係指此等特性相較於 CDR 之胺基酸序列改變前，為相同程度，例如維持為 80%以上、較佳為維持為 90%以上、更佳為維持為 95%以上。再者，維持亦包含提高。

[0076] CDR 以外之區域，只要係維持作為抗體之構造，可發揮功能之序列，則無特殊限制，可為來自小鼠之序列、來自人類之序列、來自其他哺乳動物之序列、該等之嵌合體序列、人工序列的任意者。包含恆定區域的情況時，重鏈及輕鏈之恆定區域之胺基酸序列，可例示

Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986、The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 及 Cell vol.22, p197, 1980 所記載者。

[0077] 具有此等之 CDR 的小鼠抗體，可例示輕鏈具有序列表之序列編號 4 之胺基酸序列、重鏈具有序列表之序列編號 5 之胺基酸序列的抗體。再者，此等之胺基酸序列中，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的特性，則亦可具有 1 或數個胺基酸（1~20 個、1~10 個或 1~5 個）的取代、缺失、附加或插入。如此之取代、缺失、附加亦可導入於 CDR 中，但較佳為導入於 CDR 以外之區域。又，為了維持本發明之特性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。

[0078] 又，上述小鼠抗體中，亦可例示恆定區域為來自人類之小鼠/人類嵌合體抗體。如此之小鼠/人類嵌合體抗體，可例示輕鏈具有序列表之序列編號 8 之胺基酸序列（可變區域為 1~107）、重鏈具有序列表之序列編號 9 之胺基酸序列（可變區域為 1~116）的抗體。再者，此等之胺基酸序列中，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的特性，則亦可具有 1 或數個胺基酸（1~20 個、1~10 個或 1~5 個）的取代、缺失、附加或插入。如此之取代、缺失、附加亦可導入於 CDR 中，但較佳為導入於 CDR 以外之區域。又，為了維持本發明之特

性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。

[0079] 進一步地，亦可例示 CDR 以外為來自人類之人類化抗體。如此之人類化抗體，可例示重鏈具有序列表之序列編號 11~18（可變區域為至 N 末端側 116 殘基為止）之任一者的胺基酸序列、輕鏈具有序列表之序列編號 19~25（可變區域為至 N 末端側 1~107 殘基為止）之任一者的胺基酸序列之抗體。

再者，於人類化抗體之胺基酸序列（重鏈：序列表之序列編號 11~18、輕鏈：序列表之序列編號 19~25）中，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的特性，則亦可具有 1 或數個胺基酸（1~20 個、1~10 個或 1~5 個）的取代、缺失、附加或插入。如此之取代、缺失、附加亦可導入於 CDR 中，但較佳為導入於 CDR 以外之區域。又，為了維持本發明之特性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。

[0080] 重鏈胺基酸序列與輕鏈胺基酸序列可為此等之任意的組合，但特佳者為重鏈具有序列表之序列編號 15 之胺基酸序列、輕鏈具有序列表之序列編號 19 之胺基酸序列的抗體。序列表之序列編號 15 之胺基酸序列當中，相當於重鏈可變區域之胺基酸序列係如序列表之序列編號 41 所示，相當於輕鏈可變區域之胺基酸序列係如序列表之序列編號 42 所示。亦即，本發明之特佳之抗體，為重鏈可變區域具有序列表之序列編號 41 之胺基酸序

列，且輕鏈可變區域具有序列表之序列編號 42 之胺基酸序列的抗體。

再者，此等之胺基酸序列中，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的特性，則亦可具有 1 或數個胺基酸（1~20 個、1~10 個或 1~5 個）的取代、缺失、附加或插入。如此之取代、缺失、附加亦可導入於 CDR 中，但較佳為導入於 CDR 以外之區域。又，為了維持本發明之特性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。

如此之序列表之序列編號 41 及/或序列表之序列編號 42 之胺基酸序列中包含取代、缺失等的本發明之抗體之胺基酸序列，為重鏈可變區域具有與序列表之序列編號 41 之 90%以上（更佳為 95%、96%、97%、98%、99%以上）之同一性的胺基酸序列，輕鏈可變區域具有與序列表之序列編號 42 之 90%以上（更佳為 95%、96%、97%、98%、99%以上）之同一性的胺基酸序列。

[0081] 本發明之單株抗體的其他具體例，可列舉重鏈可變區域之 CDR 包含序列表之序列編號 39（HCDR1）、40（HCDR2）及 SFG（HCDR3）之胺基酸序列，且輕鏈可變區域之 CDR 包含序列表之序列編號 36（LCDR1）、37（LCDR2）及 38（LCDR3）之胺基酸序列者。再者，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性之本發明之抗體的特性，於此等 CDR 之 1 者

以上，1~數個之胺基酸亦可被取代。

此處，1~數個係指例如 1 個或 2 個。再者，為了維持本發明之特性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。

CDR 以外之區域，只要係維持作為抗體之構造，可發揮功能之序列，則無特殊限制，可為來自小鼠之序列、來自人類之序列、來自其他哺乳動物之序列、該等之嵌合體序列、人工序列的任意者。包含恆定區域的情況時，重鏈及輕鏈之恆定區域之胺基酸序列，可例示 *Nucleic Acids Research* vol.14, p1779, 1986、*The Journal of Biological Chemistry* vol.257, p1516, 1982 及 *Cell* vol.22, p197, 1980 記載者。

[0082] 具有此等之 CDR 的小鼠抗體，可例示輕鏈具有序列表之序列編號 6 之胺基酸序列、重鏈具有序列表之序列編號 7 之胺基酸序列的抗體。再者，此等之胺基酸序列中，只要會維持具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的特性，則亦可具有 1 或數個胺基酸（1~20 個、1~10 個或 1~5 個）的取代、缺失、附加或插入。如此之取代、缺失、附加亦可導入於 CDR 中，但較佳為導入於 CDR 以外之區域。又，為了維持本發明之特性，該胺基酸取代較佳為保存性取代。

[0083] 又，上述小鼠抗體中，亦可例示恆定區域為來自人類之嵌合體抗體。進一步地，亦可例示 CDR 以外為來自人類之人類化抗體。

[0084] 本發明之抗 RGMa 抗體，係包含具有由特定之胺基酸序列所成之 CDR（例如作為 LCDR1 之序列表之序列編號 30、作為 LCDR2 之序列表之序列編號 31、作為 LCDR3 之序列表之序列編號 32、作為 HCDR1 之序列表之序列編號 33、作為 HCDR2 之序列表之序列編號 34、作為 HCDR3 之序列表之序列編號 35 之胺基酸序列）、或由特定之胺基酸序列所成之可變區域（例如作為重鏈可變區域之序列表之序列編號 41、作為輕鏈可變區域之 42 之胺基酸序列）的多特異性抗體、功能改變抗體、連結抗體。

[0085] 本發明之抗 RGMa 抗體，藉由使其本身與具有 RGMa 以外之別的抗原結合特異性之抗體以基因工程的手法結合，可製作雙特異性抗體等之多特異性抗體。該基因工程的手法，於本領域已被確立。例如，藉由改變將可變區域直列連結的 DVD-Ig（Wu 等、Nature Biotechnology 25(11), 1290(2007)）、或抗體之 Fc 區域，利用組合結合於不同抗原之 2 種抗體的重鏈之 ART-Ig 技術（Kitazawa 等、Nature Medicine 18(10), 1570(2012)），可取得所期望之雙特異性抗體。作為 RGMa 以外之其他抗原，可非限定地列舉 Nogo、MAG、Omgp、CSPG、Sema3A、Lingo-1 等之阻礙神經突成長之因子，或 TNF- α 、IL-6 受體、CD3、CD20、 α 4 整聯蛋白、BLys、Thymic Stromal Lymphopoietin、IgE、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IL-17、IL-23、IL-25 等之免疫相關分子。

[0086] 本發明之抗 RGMa 抗體之改變分子，可列舉

功能改變抗體。功能改變抗體，意指主要藉由改變 Fc 區域等，而改變細胞殺傷功能或補體活性化功能、血中半衰期延長功能等之功能的抗體（設樂研也、藥學雜誌、2009、Vol.129(1), p3；石井明子等、日本藥理學雜誌、2010、Vol.136(5), p280；橋口周平等、生化學、2010、Vol.82(8),p710）。

[0087] 抗 RGMa 抗體之功能改變抗體，係由如以下之方法配製。例如，使用經破壞了 $\alpha 1,6$ -岩藻糖轉移酵素（FUT8）基因的 CHO 細胞作為宿主細胞來製造本案抗 RGMa 抗體時，可得到糖鏈之岩藻糖含量降低，細胞殺傷功能提高之抗體，以導入了 FUT8 基因之 CHO 細胞為宿主細胞來製造時，可得到細胞殺傷功能低之抗體（國際公開第 2005/035586 號、國際公開第 2002/31140 號、國際公開第 00/61739 號）。又，藉由改變 Fc 區域之胺基酸殘基，可調節補體活性化功能（美國專利第 6737056 號、美國專利第 7297775 號、美國專利第 7317091 號）。進一步地，藉由使用提高了對 Fc 受體之一的 FcRn 之結合的 Fc 區域突變體，可實現血中半衰期之延長（橋口周平等、生化學、2010、Vol.82(8), p710）。此等之功能改變抗體，能夠以基因工程來製造。

[0088] 本發明之抗 RGMa 抗體之改變分子，可列舉連結抗體。連結抗體，可列舉對抗 RGMa 抗體予以化學地或基因工程地結合了聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長

因子（TGF- β 、NGF、Neurotrophin 等）、白蛋白、酵素、其他抗體等之本案抗 RGMa 抗體以外之功能分子而得的連結抗體。

[0089] 結合 PEG 作為功能分子時，PEG 可非限定地使用分子量 2000 至 100000Da、更佳為 10000 至 50000Da 者，可為直鏈型、亦可為分支型者。PEG 例如藉由使用 NHS 活性基，可結合於抗體之胺基酸的 N 末端胺基等。

[0090] 使用放射性物質作為功能分子時，可使用 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 或 ^{211}At 等。放射性物質，可藉由氯胺 T 法等而直接結合於抗體。

[0091] 使用毒素作為功能分子時，可使用細菌毒素（例如白喉毒素）、植物毒素（例如蓖麻毒素）、低分子毒素（例如 geldanamycin）、美坦素、及卡奇黴素等。

[0092] 使用低分子化合物作為功能分子時，可列舉道諾黴素、阿黴素、胺甲葉酸、絲裂黴素、新抑癌素、長春地辛及 FITC 等之螢光色素等。

[0093] 使用酵素作為功能分子時，可使用螢光酵素（例如螢火蟲螢光酵素及細菌螢光酵素；美國專利第 4737456 號）、蘋果酸脫氫酶、尿素酶、過氧化酶（例如辣根過氧化酶（HRPO））、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、醣類氧化酶（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、及葡萄糖-6-磷酸去氫酶）、雜環式氧化酶（例如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶等）、乳過氧化酶、微過氧化酶等。

[0094] 將毒素、低分子化合物或酵素予以化學性結合時所使用的連結子，可列舉二價自由基（例如伸烷基、伸芳基、伸雜芳基）、以 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ （R 為任意取代基、n 為正整數）表示之連結子或烷氧基之重複單位（例如聚伸乙基氧、PEG、聚亞甲基氧等）及烷基胺基（例如聚伸乙基胺基、JeffamineTM）、以及二酸酯及醯胺（可列舉琥珀酸酯、琥珀二醯胺、氧代戊二酸酯、丙二酸酯及己醯胺等）。使功能分子結合之化學的修飾方法於本領域中係已確立（D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152: 127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93: 8681）。

[0095] 本發明中之抗體的「抗原結合片段」，意指如前述之抗體的具有抗原結合性之一部分的區域，具體而言可列舉 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv （variable fragment of antibody）、雙硫鍵 Fv 、單鏈抗體（ $scFv$ ）、及此等之聚合物等，進一步地，抗原結合片段，係包含化學地或基因工程地結合了聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長因子（ $TGF-\beta$ 、 NGF 、 $Neurotrophin$ 等）、白蛋白、酵素、其他抗體等之本案之抗 RGMa 抗體以外的功能分子而得的連結抗原結合片段。

[0096] 此處，「 $F(ab')_2$ 」及「Fab」，意指藉由將免疫球蛋白以蛋白分解酵素胃蛋白酶或木瓜酶等進行處理而製造，於絞鏈區域中之 2 條重鏈間所存在之雙硫鍵前後被消化所生成的抗體片段。例如，將 IgG 以木瓜酶處理時，絞鏈區域中之 2 條重鏈間所存在的雙硫鍵之上游被切斷，可製造由 VL（輕鏈可變區域）與 CL（輕鏈恆定區域）所成之輕鏈、及由 VH（重鏈可變區域）與 $CH\gamma 1$ （重鏈恆定區域中之 $\gamma 1$ 區域）所成之重鏈片段於 C 末端區域以雙硫鍵鍵結的相同之 2 個抗體片段。此等 2 個相同之抗體片段各稱為 Fab。又，將 IgG 以胃蛋白酶處理時，絞鏈區域中之 2 條重鏈間所存在之雙硫鍵之下游被切斷，可製造比前述 2 個 Fab 以絞鏈區域連結者稍大之抗體片段。該抗體片段稱為 $F(ab')_2$ 。

[0097] 本發明之抗 RGMa 抗體之抗原結合片段的改變分子，可列舉連結抗原結合片段。連結抗原結合片段，可列舉於抗 RGMa 抗體之具有抗原結合性的一部分區域上化學地或基因工程地結合了聚乙二醇（PEG）等之非胜肽性聚合物、放射性物質、毒素、低分子化合物、細胞激素、成長因子（ $TGF-\beta$ 、NGF、Neurotrophin 等）、白蛋白、酵素、其他抗體等之本案之抗 RGMa 抗體以外的功能分子而得的連結抗原結合片段。

[0098] 結合 PEG 作為功能分子時，PEG 可非限定地使用分子量 2000 至 100000Da、更佳為 10000 至 50000Da 者，可為直鏈型、亦可為分支型者。PEG 例如藉由使用

NHS 活性基，可結合於抗 RGMa 抗體之具有抗原結合性的一部分區域之 N 末端胺基等。

[0099] 使用放射性物質作為功能分子時，可使用¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、⁶⁴Cu、⁹⁹Tc、⁷⁷Lu 或 ²¹¹At 等。放射性物質，可藉由氯胺 T 法等而直接結合於抗 RGMa 抗體之具有抗原結合性的一部分區域。

[0100] 使用毒素作為功能分子時，可使用細菌毒素（例如白喉毒素）、植物毒素（例如蓖麻毒素）、低分子毒素（例如 geldanamycin）、美坦素、及卡奇黴素等。

[0101] 使用低分子化合物作為功能分子時，可列舉道諾黴素、阿黴素、胺甲葉酸、絲裂黴素、新抑癌素、長春地辛及 FITC 等之螢光色素等。

[0102] 使用酵素作為功能分子時，可使用螢光酵素（例如螢火蟲螢光酵素及細菌螢光酵素；美國專利第 4737456 號）、蘋果酸脫氫酶、尿素酶、過氧化酶（例如辣根過氧化酶（HRPO））、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、醣類氧化酶（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、及葡萄糖-6-磷酸去氫酶）、雜環式氧化酶（例如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶等）、乳過氧化酶、微過氧化酶等。

[0103] 將毒素、低分子化合物或酵素予以化學性結合時所使用的連結子，可列舉二價自由基（例如伸烷基、伸芳基、伸雜芳基）、以 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ （R 為任意取代基、n 為正整數）表示之連結子或烷氧基之重複單位（例

如聚伸乙基氧、PEG、聚亞甲基氧等）及烷基胺基（例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™）、以及二酸酯及醯胺（可列舉琥珀酸酯、琥珀二醯胺、氧代戊二酸酯、丙二酸酯及己醯胺等）。使功能分子結合之化學的修飾方法於本領域中係已確立（D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc ; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152 : 127 ; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93 : 8681）。

[0104] 本發明之包含具有特定胺基酸序列之 CDR 或可變區域的抗 RGMa 抗體，由欲維持長的血中半衰期而言，該恆定區域較佳為人類 IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）之恆定區域。

[0105] 本發明中，亦包含於具有如上述特定的 CDR 之胺基酸序列的抗體、與 RGMa 蛋白質之結合上進行競爭之抗 RGMa 抗體、及其抗原結合片段。

作為於具有如上述特定的 CDR 之胺基酸序列的抗體與 RGMa 之結合上進行競爭的抗體，可例示作為抗原決定位為於選自 Glu298~Gly311、Asn322~Glu335、Lys367~Ala377、及 Pro349~Thr359 之區域中具有抗原決定位的抗體。

該抗體藉由於具有如上述之 CDR 序列的抗體與 RGMa 蛋白質之結合系統中共存，來進行取得（篩選）、

或評估。例如，可藉由以如下之表面電漿共振（SPR）法進行篩選而取得。

[0106] 對固定有卵白素之感測晶片，加入經生物素化之人類 RGMa 蛋白質（ $4\mu\text{g/mL}$ ）作為配位子，藉以固定相當 1300 至 1600RU 之人類 RGMa 蛋白質。接著加入任意之抗 RGMa 抗體（ $15\mu\text{g/mL}$ ）作為分析物，結合於固定在感測晶片上之人類 RGMa 蛋白質。藉由重複其複數次，作成感測晶片上之人類 RGMa 蛋白質的全部分子上結合有任意之抗 RGMa 抗體的狀態（飽和狀態），求得於飽和狀態之結合量（飽和結合量 1）。

同樣的實驗亦於包含本發明之特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體上實施，求得於飽和狀態之結合量（飽和結合量 2）。

接著，將感測晶片上之人類 RGMa 蛋白質以包含本發明之特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體予以飽和後，加入任意之抗 RGMa 抗體（ $15\mu\text{g/mL}$ ）作為分析物，調查是否可對經包含本發明之特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體進行飽和過的人類 RGMa 蛋白質以追加的形態進行結合。

任意之抗 RGMa 抗體，若可對經包含本發明之特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體進行飽和過的人類 RGMa 蛋白質以追加的形態，在顯示上述所算出之任意之抗 RGMa 抗體的飽和結合量 1 的情況下結合時，判斷該抗體「不進行競爭」。另一方面，任意之抗 RGMa 抗體，若

無法對經包含本發明之特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體進行飽和過的人類 RGMa 蛋白質以追加的形態進行結合時，則判斷該抗體「進行競爭」。又，即使任意之抗 RGMa 抗體可對經包含本發明之特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體進行飽和過的人類 RGMa 蛋白質以追加的形態進行結合，但追加之結合量未以顯著差達到飽和結合量 1 時，則該抗體判斷為「進行競爭」。顯著差係以一般的檢定方法（例如 Student 之 t 檢定）進行調查，顯著水準為 5%以下。

[0107] 對包含上述特定 CDR 之胺基酸序列的抗 RGMa 抗體競爭與 RGMa 之結合的抗 RGMa 抗體，可為小鼠抗體、人類抗體、大鼠抗體、兔子抗體、山羊抗體、駱駝抗體等來自任意動物之抗體，亦可為此等抗體之組合的嵌合體抗體或人類化抗體，但較佳為嵌合體抗體、人類化抗體、或人類抗體。

[0108]

<本發明之核酸分子>

本發明之核酸分子為編碼本發明之單株抗體的多核苷酸，作為例子，可列舉編碼重鏈可變區域之區域分別包含編碼序列表之序列編號 33、34、及 35 之胺基酸序列（1 或數個胺基酸可經取代、缺失、插入或附加）的鹼基序列，且編碼輕鏈可變區域之區域分別包含編碼序列表之序列編號 30、31、及 32 之胺基酸序列（1 或數個胺基酸可經取代、缺失、插入或附加）的鹼基序列之多核苷酸；或

編碼重鏈可變區域之區域分別包含編碼序列表之序列編號 39、40、及 SFG 之胺基酸序列（1 或數個胺基酸可經取代、缺失、插入或附加）的鹼基序列，且編碼輕鏈可變區域之區域分別包含編碼序列表之序列編號 36、37、及 38 之胺基酸序列（1 或數個胺基酸可經取代、缺失、插入或附加）的鹼基序列之多核苷酸。

[0109] 本發明之核酸分子之其他例子，可列舉編碼重鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 5 之胺基酸序列的鹼基序列，且編碼輕鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 4 之胺基酸序列的鹼基序列之多核苷酸；或編碼重鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 7 之胺基酸序列的鹼基序列，且編碼輕鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 6 之胺基酸序列的鹼基序列之多核苷酸。

[0110] 本發明之核酸分子之其他例子，可列舉編碼重鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 9 之胺基酸序列的鹼基序列，且編碼輕鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 8 之胺基酸序列的鹼基序列之多核苷酸。

[0111] 本發明之核酸分子之其他例子，可例示編碼重鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 11~18 中任一者之胺基酸序列的鹼基序列，且編碼輕鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 19~25 中任一者之胺基酸序列的鹼基序列之多核苷酸。

[0112] 本發明之核酸分子的特佳之例子，可例示編碼重鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 15 之胺基酸序

列的鹼基序列，且編碼輕鏈之區域包含編碼序列表之序列編號 19 之胺基酸序列的鹼基序列之多核苷酸。

[0113] 本發明之核酸分子之其他例子，可例示編碼重鏈可變區域之區域包含編碼序列表之序列編號 41 之胺基酸序列的鹼基序列，且編碼輕鏈可變區域之區域包含編碼序列表之序列編號 42 之胺基酸序列的鹼基序列之多核苷酸。

[0114] 本發明之核酸分子之具體例子，可列舉編碼重鏈可變區域之區域包含序列表之序列編號 43 之鹼基序列，且編碼輕鏈可變區域之區域包含序列表之序列編號 44 之鹼基序列的多核苷酸。

[0115] 再者，本發明之核酸分子，只要係編碼具有與 RGMa 之結合能力，不阻礙 RGMa 與 Neogenin 之結合，且中和 RGMa 之神經突成長阻礙活性的單株抗體，則可為包含與序列表之序列編號 43 之鹼基序列的互補鏈 DNA 於嚴苛（stringent）條件下雜交之多核苷酸及與序列表之序列編號 44 之鹼基序列的互補鏈 DNA 於嚴苛條件下雜交之多核苷酸者。此處，嚴苛條件可列舉例如南方氏雜交之後，於 68℃、0.1×SSC、相當於 0.1%SDS 的鹽濃度下進行洗淨之條件。

[0116] 本發明之核酸分子可為編碼重鏈與輕鏈之恆定區域與可變區域全部者，亦可為僅編碼重鏈與輕鏈之可變區域者。編碼恆定區域與可變區域全部時的重鏈及輕鏈之恆定區域的鹼基序列，較佳為 Nucleic Acids Research

vol.14, p1779, 1986、The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 及 Cell vol.22, p197, 1980 所記載者。

[0117] 本發明之核酸分子，例如可藉由以下方法得到。首先，由融合瘤等之細胞中，使用市售 RNA 萃取套組配製全 RNA，使用隨機引子等，藉由反轉錄酵素合成 cDNA。接著，於已知之人類抗體重鏈基因、輕鏈基因之可變區域，藉由使用各自被保存之序列的寡核苷酸作為引子之 PCR 法，放大編碼抗體之 cDNA。關於編碼恆定區域之序列，可藉由將已知之序列以 PCR 法放大而得到。DNA 之鹼基序列，可接入序列決定用質體等，依一般方法來決定。

或者，亦可藉由化學合成可變區域或其一部分的序列，並結合於包含恆定區域之序列，來得到編碼本發明之單株抗體的 DNA。

[0118] 又，本發明提供包含本發明之核酸分子的重組載體及包含該重組載體的轉形體（宿主細胞）。作為重組載體，可為能夠於如大腸菌（*Escherichia coli*）之原核細胞中表現的載體（例如 pBR322、pUC119 或此等之衍生物），但較佳為可於真核細胞中表現的載體、更佳為可於來自哺乳動物之細胞中表現的載體。可於來自哺乳動物之細胞中表現的載體，可列舉例如 pcDNA3.1（Invitrogen 公司製）、pConPlus、pcDM8、pcDNA I/Amp、pcDNA3.1、pREP4 般的質體載體、pDON-AI DNA（TAKARA BIO 公

司製)等之病毒載體。可為包含重鏈編碼序列與輕鏈編碼序列之 1 個載體、亦可為包含重鏈編碼序列之載體與包含輕鏈編碼序列之載體的 2 個載體。

[0119] 導入本發明之重組載體的轉形體，可為如大腸菌、枯草菌之原核細胞，但較佳為真核細胞、更佳為來自哺乳動物之細胞。來自哺乳動物之細胞，可列舉例如中國倉鼠卵巢細胞 (CHO 細胞)、COS、骨髓瘤、BHK、HeLa、Vero、293、NS0、Namalwa、YB2/0 等。

[0120] 所得到之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，可純化至成為均勻。抗體等之分離、純化，只要使用通常之蛋白質中所使用的分離、純化方法即可。例如，若適當選擇、組合親和性層析等之層析管柱、過濾器、超微過濾、鹽析、透析、SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電點電泳等，則可分離、純化抗體 (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)，但不限定於此等。親和性層析所用之管柱，可列舉蛋白質 A 管柱、蛋白質 G 管柱、抗免疫球蛋白抗體結合管柱、抗原結合管柱等。例如，作為蛋白質 A 管柱，可列舉 Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Amersham Biosciences) 等。

[0121]

<免疫學疾病及神經學疾病之預防或治療藥>

本發明之 RGMa 結合蛋白質，特別是抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，係藉由中和 RGMa 之神經突成長阻礙活

性來促進神經功能之修復，因而可使用作為神經學疾病之預防、治療或復發預防藥。

又，本發明之 RGMa 結合蛋白質，特別是抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，會中和 RGMa 所致的 T 細胞活性化，因而可使用作為免疫學疾病之預防、治療或復發預防藥。

[0122] 神經學疾病，可例示肌萎縮性側索硬化症、上臂神經叢損傷、腦損傷（包含外傷性腦損傷）、腦性麻痺、格林-巴利症候群、大腦白質萎縮症、多發性硬化症（包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症）、視神經脊髓炎、小兒麻痺後症候群、脊柱裂、脊髓損傷、脊髓性肌肉萎縮症、脊椎腫瘤、橫貫性脊髓炎、失智症（包含老年性失智症、輕度認知功能障礙、阿茲海默症、阿茲海默相關失智症）、杭丁頓氏舞蹈症、遲發性運動障礙、躁症、巴金森氏症、史蒂爾-理查症候群、唐氏症、重症肌無力症、神經外傷（包含視神經外傷）、血管類澱粉症、類澱粉症所伴隨之大腦出血、腦梗塞、腦炎、急性混亂障礙、青光眼、思覺失調症及視網膜神經纖維層病變（包含藉由糖尿病性視網膜病、缺血性視神經病變、X 染色體連結性視網膜分裂症、藥物誘發性視神經病變、視網膜營養性萎縮、老年性黃斑部病變、視神經乳頭玻璃疣而賦予特徵之眼病；藉由光受器病變之遺傳性決定因子而賦予特徵之眼病、體染色體隱性錐狀細胞-桿狀細胞失養症、視神經病變所伴隨之

粒線體受損)。較佳為脊髓損傷、神經外傷(包含視神經外傷)。

[0123] 免疫學疾病，可例示多發性硬化症(包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症)、視神經脊髓炎、乾癬、關節炎(包含風濕性關節炎、變形性關節病、乾癬性關節炎)、格林-巴利症候群、神經貝賽特氏症、惡性貧血、I型(胰島素依賴型)糖尿病、全身紅斑性狼瘡(SLE)、發炎性腸疾病(IBD)、休格倫氏症候群、古巴士德氏症候群、葛瑞夫茲氏症、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性血小板減少性紫斑病、氣喘、花粉症、異位性皮膚炎、絲球體腎炎、重症肌無力症、橋本氏病、及肉狀瘤病。較佳為多發性硬化症。

[0124] 本發明之 RGMa 結合蛋白質，特別是抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，可使用作為神經學疾病/免疫學疾病之預防、治療或復發預防藥，較佳之神經學疾病/免疫學疾病，可列舉脊髓損傷、神經外傷(包含視神經外傷)、多發性硬化症(包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症)。

[0125] 此處，「治療」，係包含哺乳動物、特別是人類之疾病的任意治療，其包含阻礙疾病症狀，亦即阻止其進行或消滅疾病或症狀、及減輕疾病症狀，亦即引發疾病或症狀之後退、或症狀之進行延遲。

[0126] 又，「預防」，係包含於哺乳動物、特別是

人類中，防止上述疾病之發病。

[0127] 又，「復發預防」，係包含於哺乳動物、特別是人類中，防止重複緩解、復發之上述疾病的復發。

[0128] 本發明之 RGMa 結合蛋白質（抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段），可作為用於預防或治療神經學疾病或免疫學疾病的醫藥組成物。

[0129] 本發明之 RGMa 結合蛋白質（抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段）之投與形態並無特殊限制，可由經口投與、非經口投與（例如靜脈注射、肌肉注射、皮下投與、直腸投與、經皮投與、腦內投與、脊髓內投與、其他局部投與）之任一投與路徑對包含人類的哺乳類投與。

[0130] 用於經口投與及非經口投與之劑型及其配製方法係所屬技術領域中具有通常知識者所周知，可藉由將本發明之抗體，與藥學上容許之藥載體等摻合，來製造醫藥組成物。

用於非經口投與之劑型，可列舉注射用製劑（例如點滴注射劑、靜脈注射劑、肌肉注射劑、皮下注射劑、皮內注射劑、腦內投與製劑、脊髓內投與製劑）、外用劑（例如、軟膏劑、泥罨劑、洗劑）、栓劑吸入劑、眼劑、眼軟膏劑、點鼻劑、點耳劑、微脂體劑等。特別是欲直接作用於中樞神經組織的情況時，可利用滲透壓泵之醫療用微型泵持續地注入、亦可與纖維蛋白膠等混合來作為緩釋製劑後，留置於患部組織。

[0131] 例如，注射用製劑通常可將抗體溶解於注射

用蒸餾水來配製，但可依需要添加溶解輔助劑、緩衝劑、pH 調整劑、等張劑、無痛劑、保存劑、安定劑等。又，亦可作為使用時配製用的冷凍乾燥製劑。

[0132] 用於經口投與之劑型，可列舉固體或液體之劑型，具體而言可列舉錠劑、被覆錠劑、丸劑、細粒劑、顆粒劑、散劑、膠囊劑、糖漿劑、乳劑、懸浮劑、注射劑、片劑等。

[0133] 本發明之醫藥組成物，亦可進一步含有治療上有效的其他藥劑，又，亦可依需要摻合殺菌劑、消炎劑、維生素類、胺基酸等之成分。

[0134] 藥理學上容許之藥載體，可列舉例如固形製劑中之賦形劑、潤滑劑、結合劑及崩解劑；或液狀製劑中之溶劑、溶解輔助劑、懸浮劑、等張劑、緩衝劑及無痛劑等。亦可進一步依需要適當、適量使用通常之防腐劑、抗氧化劑、著色劑、甘味劑、吸附劑、濕潤劑等之添加物。

[0135] 本發明之抗體之投與量，係基於例如投與路徑、疾病之種類、症狀之程度、患者之年齡、性別、體重、疾病之嚴重度、藥物動態及毒物學的特徵等之藥理學上的見解、有無利用藥物傳遞系統、以及是否以與其他藥物之組合的一部分的形式投與等各種因子，而由醫師決定，但通常每個成人（體重 60kg），於經口投與可為 1~5000 μ g/日、較佳為 10~2000 μ g/日、更佳為 50~2000 μ g/日；於注射投與可為 1~5000 μ g/日、較佳為 5~2000 μ g/日、更佳為 50~2000 μ g/日，予以 1 次或分為數次投與。對

全身之非經口投與，可為將每單位體重 $10\sim 100000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、更佳為 $100\sim 50000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又更佳為 $500\sim 20000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以 1 日、1 週、1 月 1 次、或 1 年 1~7 次之間隔投與。利用了滲透壓泵等之局部投與，通常可為每個成人（體重 60kg ），以 $10\sim 100000\mu\text{g}/\text{日}$ 、更佳為 $100\sim 10000\mu\text{g}/\text{日}$ 、又更佳為 $500\sim 5000\mu\text{g}/\text{日}$ 之速度持續注入。

[實施例]

[0136] 以下，列舉實施例以具體說明本發明，但本發明不限定為以下實施例之態樣。

[0137]

實施例 1：人類 RGMa 蛋白質（C 末側結構域）之配製

建立會表現於人類 RGMa 蛋白質（序列表之序列編號 1）之 Pro169~Gly422（意指由 N 末端側起第 169 號之脯胺酸殘基至第 422 號之甘胺酸殘基，以後係同樣記載）之 C 末端融合有組胺酸標籤的重組人類 RGMa 蛋白質之 CHO 細胞。

使 CHO 細胞之培養上清液中所含有的人類 RGMa 蛋白質 C 末側結構域，吸附於鎳管柱（GE Healthcare 公司製、17-5247-01）後，以 100mM 咪唑溶液溶出。藉由透析，由咪唑溶出區分取代為 Phosphate bufferd saline（PBS），使用作為免疫原。

[0138]

實施例 2：小鼠抗人類 RGMa 單株抗體之製作

將實施例 1 中配製之重組人類 RGMa 蛋白質 10 μ g，與完全弗氏佐劑（Sigma 公司製）混合，製作乳化液，對 BALB/c 小鼠（日本 Charles River 股份有限公司）之背部皮下數個部位誘發免疫。之後每隔 1~2 週將以不完全弗氏佐劑（Sigma 公司製）製作乳化液之重組人類 RGMa 蛋白質 10 μ g 同樣地誘發免疫，數次誘發免疫後進行採血。以將後述之人類或小鼠 RGMa 蛋白質固相化的 ELISA 法測定抗體價。對於觀察到抗體價之上昇的個體，將人類 RGMa 蛋白質 10 μ g 予以靜脈內投與，進行增幅（boost），2~3 日後回收脾細胞。

細胞融合係將前述脾細胞與其半數之小鼠骨髓瘤細胞（SP2/0、大日本住友製藥）混合，對離心所得之沈澱區分添加聚乙二醇（Roche Diagnostics 公司製）使其細胞融合。接著將經離心之細胞以 D-MEM（Invitrogen 公司製）洗淨 2 次。將細胞於含有 10%胎牛血清（Invitrogen 公司製）、1% BM condimed（Roche Diagnostics 公司製）及 HAT（Sigma-Aldrich 公司製）之 GIT 培養基（日本製藥製）中再懸浮，以各孔 5×10^4 骨髓瘤細胞/well 播種於 96 孔盤。回收培養上清液，藉由實施例 3 之人類 RGMa 蛋白質固相化 ELISA 法，進行抗體產生細胞之篩選。

將於篩選所得之抗體產生細胞藉由極限稀釋法選殖，選定產生 2 種單株抗體（B5.116A3 及 B5.70E4）之融合瘤細胞。

使用同型套組（Mouse MonoAB ID/SP KIT、ZYMED

公司製、93-6550) 所判定之兩單株抗體的同型，均為重鏈為小鼠 IgG2b、輕鏈為 κ 。

單株抗體之純化，係由融合瘤之培養上清液，藉由使用固定有抗小鼠 IgG 抗體之洋菜糖 (Sigma 公司製 Anti-Mouse IgG -Agarose) 的親和性層析來進行。使抗體結合於管柱後，以 PBS 洗淨管柱，接著以 10mM 甘胺酸鹽酸鹽 (pH2.7) 溶出，迅速中和。之後，將溶出中和液藉由超微過濾膜取代為 PBS。

[0139]

實施例 3：將人類或小鼠 RGMa 蛋白質固相化之 ELISA

將以 PBS 配製為 2 μ g/mL 之人類 RGMa 蛋白質 (R&D systems 公司製、2459-RM) 或小鼠 RGMa 蛋白質 (R&D systems 公司製、2458-RG) 各分注 50 μ L/well 於 96 孔盤，於室溫靜置 1 小時。去除液體後，將以 PBS 稀釋 5 倍之 ApplieBlock (Seikagaku Biobusiness 公司製、200150) 各分注 200 μ L/well，於室溫靜置 1 小時，阻斷非特異結合。以 PBST (含有 0.05% Tween20 之 PBS) 洗淨 3 次後，將以 PBS 階段稀釋之檢體 (小鼠血清、融合瘤培養上清液、後述之重組抗體表現培養上清液、或純化抗體等)，各添加 50 μ L/well，於室溫靜置 1 小時。之後以 PBST 洗淨 3 次，接著將以 PBS 稀釋之過氧化酶標識羊抗小鼠 IgG 抗體 (GE Healthcare 公司製、NA9310V) 各分注 50 μ L/well，於室溫靜置 1 小時。洗淨 3 次後，添加過氧化酶顯色套組 (住友 Bakelite 公司製、ML-1130O) 顯

色一定時間，以微量盤分析儀測定 492nm 之吸光度。

[0140]

實施例 4：抗體之抗原決定位解析

抗體所結合之抗原決定位，係以胜肽掃描法決定。合成於人類 RGMa 蛋白質（序列表之序列編號 1）之 Arg172~Ala424 中所包含之由各偏移 3 殘基之連續的 11 殘基所成之胺基酸序列的 N 末端側，融合有 N 末端生物素化之間隙序列（SGSG）（序列表之序列編號 46）的合計 83 種類之胜肽。將胜肽固定於卵白素微量盤後，使被驗抗體（B5.116A3、B5.70E4）進行反應。接著，使過氧化酶標識兔子抗小鼠 Ig 抗體（Dako 公司、P026002）進行反應，添加基質溶液顯色一定時間後，以微量盤分析儀測定吸光度。

其結果，B5.116A3 係結合於 Glu298~Gly311（Glu298~Asp308、Val301~Gly311 之 2 種類之胜肽）、Asn322~Glu335（Asn322~Thr332、Ile325~Glu335 之 2 種類之胜肽）、及 Lys367~Ala377 之來自人類 RGMa 之胜肽，B5.70E4 係結合於 Glu298~Gly311（Glu298~Asp308、Val301~Gly311 之 2 種類之胜肽）、Asn322~Glu335（Asn322~Thr332、Ile325~Glu335 之 2 種類之胜肽）、及 Pro349~Thr359 之來自人類 RGMa 之胜肽。

[0141]

實施例 5：小鼠抗體基因之序列解析與選殖

由產生小鼠單株抗體（B5.116A3、B5.70E4）之融合

瘤細胞中萃取 total RNA。以 Total RNA 為模板，藉由反轉錄反應合成 cDNA。以 cDNA 為模板，PCR 放大輕鏈可變區域及恆定區域、以及重鏈可變區域及恆定區域之基因，決定 DNA 序列。接著，基於所決定之可變區域序列及恆定區域序列，以 PCR 放大抗體全長基因，進行選殖。此等抗體基因所編碼之胺基酸序列，係如以下所述。

[0142] (1) B5.116A3 輕鏈胺基酸序列 (序列表之序列編號 4)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPD
GTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
ATYFCQQNLNTPWTFGGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT
DQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI
VKSFNRNEC

[0143] (2) B5.116A3 重鏈胺基酸序列 (序列表之序列編號 5)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQ
SPEKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKR
SVYQLQMNNLRAEDTGIYYCTRRDGAYWGQGTLVTVSAAK
TTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTN
SGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCS
VAHPASSTTVDDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLE
GGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCTVVDVSEDDPDVQIS
WVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMS

GKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQ
LSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPV
LDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYL
KKTISRSPGK

[0144] (3) B5.70E4 輕鏈胺基酸序列 (序列表之序
列編號 6)

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHW
YLQRPQGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDLGLYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKRADAAPTVSI
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQN
GVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEAT
HKTSTSPIVKSFNRNEC

[0145] (4) B5.70E4 重鏈胺基酸序列 (序列表之序
列編號 7)

DVKLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTSYYWNWIRQF
PGNKLEWMGYISYDGTNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFL
RLNSVTTEDTATYYCAGSFGYSQGTLVTVSAAKTTPPSVY
PLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTVWNSGSLSSS
VHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASS
TTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIF
PPNIKDVLMI SLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWNNVE
VHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQH QDWMSGKEFKCKV
NNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSL
TCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYF

IYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKKTISRSP
GK

[0146]

實施例 6：重組小鼠抗體及重組大鼠小鼠嵌合體抗體之配製

配製來自融合瘤之 2 種抗 RGMa 抗體 B5.116A3 或 B5.70E4 的重組小鼠抗體（以後分別記載為「r116A3」、「r70E4」）。

又，作為比較例，基於專利文獻 1（WO2009/106356），融合大鼠抗體 5F9 之可變區域與小鼠抗體（IgG2b κ ）之恆定區域（輕鏈恆定區域為序列表之序列編號 4 之 Arg108~Cys214、重鏈恆定區域為序列表之序列編號 5 之 Ala117~Lys452），配製重組大鼠小鼠嵌合體抗體（以後記載為「r5F9」）。

將編碼各抗體之輕鏈及重鏈的 DNA，插入 pcDNA3.3（Life Technologies 公司製），製作表現載體。使用 Neofection 293（Astec 公司製），將表現載體導入 HEK293F 細胞（Life Technologies 公司製）。將細胞於 37℃、8%二氧化碳氣體條件下培養 6 日後，回收培養上清液。重組抗體之純化，係將培養上清液，加入固定化有 Protein A 或 Protein G 之親和性管柱（GE healthcare 公司製），將結合於管柱之抗體以 10mM 甘胺酸鹽酸鹽（pH2.8）溶出，迅速中和後，取代為 PBS。

依使用目的，必須提高純化純度時，係將 Protein A

管柱純化後之抗體，以 Ceramic Hydroxyapatite Type1 (CHT) 管柱 (BIORAD 公司製) 純化。將結合於 CHT 管柱之抗體以 10 mM KH_2PO_4 (pH6.5) 洗淨後，以 20 mM KH_2PO_4 (pH6.5)、0.5 M NaCl 溶出。回收溶出區分後，取代為 PBS。

[0147]

實施例 7：對 RGMa 蛋白質表現細胞之結合試驗

將表現全長人類 RGMa 蛋白質 (序列表之序列編號 1 之 Met1~Cys450)、人類 RGMa 蛋白質 C 末側結構域 (序列表之序列編號 1 之 Pro169~Cys450)、全長小鼠 RGMa 蛋白質 (序列表之序列編號 2 之 Met1~Trp454)、或大鼠 RGMa 蛋白質 C 末側結構域 (序列表之序列編號 3 之 Pro170~Trp449) 的載體，導入 CHO 細胞或 HEK293 細胞，製作抗原表現細胞。

再者，RGMa 蛋白質，於 GPI 錨定附加反應之時，C 末端胜肽係受到加工。小鼠 RGMa 蛋白質及大鼠 RGMa 蛋白質，均為於 Ala427 被切斷，C 末端側之胜肽被去除。因此，透過 GPI 錨定而於細胞上表現的全長蛋白質及 C 末側結構域之胺基酸序列，於小鼠與大鼠係相同。

始終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之被驗抗體 (r116A3 及 r70E4) 及 r5F9 (比較例)，與上述之抗原表現細胞反應後，以含有 0.1% 牛血清白蛋白、0.05% NaN_3 之 PBS 洗淨細胞。使 FITC 標識抗小鼠免疫球蛋白抗體 (DAKO 公司製) 進行反應，洗淨細胞。以流式細胞儀 (Becton Dickinson 公司

製、FACSCalibur) 測定螢光，評估被驗抗體對抗原表現細胞之結合性 (表 1)。

其結果，可知 r116A3 及 r70E4，與 r5F9 不同地，亦會結合於人類及大鼠 RGMa 蛋白質之 C 末側結構域。RGMa 蛋白質僅以 C 末側結構域亦觀察到神經突成長阻礙作用，r116A3 及 r70E4，會阻礙全長 RGMa 蛋白質及 C 末側結構域之兩者。

[0148]

[表 1]

表 1. 各種重組抗 RGMa 抗體對抗原表現細胞之結合評估 *

	全長人類 RGMa	人類 RGMa C 端側結構域	全長小鼠 RGMa	大鼠 RGMa C 端側結構域
r116A3	++	++	++	++
r70E4	++	++	+	++
r5F9	++	-	++	-

* ; ++ 強結合
 + 弱結合
 - 不結合

[0149]

實施例 8：對 RGMa 蛋白質之解離常數測定

被驗抗體 (r116A3、r70E4) 及 r5F9 (比較例) 對 RGMa 蛋白質之親和性，係藉由使用 Proteon XPR36 (BIORAD 公司製) 之表面電漿共振 (SPR) 法來測定。

將經 10mM 乙酸緩衝液 (pH4.5) 稀釋為 10µg/mL 之人類 RGMa 蛋白質 (R&D Systems 公司製、2459-RM)、人類 RGMa 蛋白質 C 末端側結構域 (於實施例 1 配製)、

或小鼠 RGMa 蛋白質（R&D Systems 公司製、2458-RG），藉由胺偶合法固定於 GLC 感測晶片。將經階段稀釋之被驗抗體以流速 100 μ L/min 加入 60 秒，作為分析物，來測定解離常數（Kd 值）。

如表 2 所示，r116A3 及 r70E4，係與 r5F9 不同地，亦會結合於人類 RGMa 蛋白質之 C 末側結構域。r116A3 相較於 r5F9，對人類 RGMa 蛋白質係強 32 倍、對小鼠 RGMa 蛋白質係強 44 倍地結合。

[0150]

[表 2]

表 2. 抗 RGMa 單株抗體之親和性

抗體	解離常數 (Kd 值、nM)		
	人類 RGMa	人類 RGMa C 端側結構域	小鼠 RGMa
r116A3	0.0487	0.0568	0.201
r70E	2.43	1.12	174
r5F9 (比較例)	1.59	未結合	8.98

[0151]

實施例 9：RGMa-Neogenin 結合阻礙試驗

純化重組人類 Neogenin 蛋白質（序列表之序列編號 10）之細胞外結構域（Ala34~Leu1105）。建立會表現人類 Neogenin 蛋白質細胞外結構域之 CHO 細胞株。於 C 末端融合組胺酸標籤。由 CHO 細胞之培養上清液，吸附於鎳管柱（GE Healthcare 公司製、17-5247-01）後，以 100mM 咪唑溶液溶出。藉由透析，由咪唑溶出區分取代為 PBS。

使用 ChromaLink Biotin Labeling Kit (Solulink 公司製)，將人類 RGMa 蛋白質 (R&D systems 公司製、2459-RM) 予以生物素標識。將配製為 $2\mu\text{g/mL}$ 之生物素標識人類 RGMa 蛋白質，與 2 倍階段稀釋之被驗抗體 (r116A3、r70E4) 等量混合，於室溫反應 2 小時，配製混合溶液。

同時地，將以 PBS 配製為 $2\mu\text{g/mL}$ 之人類 Neogenin 蛋白質細胞外結構域各添加 $50\mu\text{L/well}$ 於 96 孔盤，於室溫靜置 1 小時，製作 Neogenin 固相微量盤。將液體去除後，添加 2.5%牛血清白蛋白溶液，靜置 1 小時以阻斷非特異結合。對該 Neogenin 固相微量盤，添加上述混合溶液 $50\mu\text{L/well}$ ，於室溫靜置 1 小時。之後進行洗淨操作，添加過氧化酶標識 Avidin (VECTASTAIN ABC 系統、Vector Laboratories 公司製)，於室溫靜置 1 小時。之後進行洗淨操作，添加基質溶液顯色一定時間，以微量盤分析儀測定吸光度。以抗體不存在時之吸光度比為 1 來作圖，評估抗體所致之濃度依存性的 RGMa-Neogenin 之結合阻礙 (圖 1)。

其結果，與抗人類 RGMa 多株抗體 (R&D Systems 公司製、AF2459) 及 r5F9 不同地，r116A3 及 r70E4 不阻礙 RGMa-Neogenin 之結合。

[0152]

實施例 10：RGMa-BMP2 結合阻礙試驗

將以 PBS 配製為 $2\mu\text{g/mL}$ 之人類 RGMa 蛋白質 (R&D

systems 公司製、2459-RM) 各添加 50 μ L/well 於 96 孔盤，於室溫靜置 1 小時。添加 2.5%牛血清白蛋白溶液，靜置 1 小時以阻斷非特異結合，配製 RGMa 蛋白質固相化微量盤。對該 RGMa 蛋白質固相微量盤添加階段稀釋為 0.01~10 μ g/mL 之被驗抗體 (B5.116A3、B5.70E4)，於室溫靜置 1 小時。之後進行洗淨操作，添加稀釋為 0.5 μ g/mL 之人類 BMP2 蛋白質 (R&D systems 公司製、355-BM)，於室溫靜置 1 小時。

使生物素標識抗 BMP2 抗體進行反應，進一步添加過氧化酶標識 Avidin (VECTASTAIN ABC 系統、Vector Laboratories 公司製)、基質溶液，顯色一定時間，以微量盤分析儀測定吸光度 (圖 2)。

其結果，特別是抗 RGMa 抗體 (B5.116A3)，係濃度依存性地微弱地阻礙 RGMa-BMP2 之結合 (於 0.01 μ g/mL 吸光度為 0.45、於 0.1 μ g/mL 吸光度為 0.4、於 1 μ g/mL 吸光度為 0.32、於 10 μ g/mL 吸光度為 0.1)。

[0153]

實施例 11：人類化抗體之設計

小鼠單株抗體 B5.116A3 之人類化，係遵照日本專利第 2912618 號公報記載之 Winter 等之方法，以互補性決定區域 (CDR) 移植法進行。

首先，製成小鼠單株抗體 B5.116A3 之輕鏈及重鏈可變區域之 3D homology model，特定出於框架 (FW) 區域，位於 CDR 附近之胺基酸殘基。選擇此等胺基酸儘可

能被維持的人類抗體 FW，移植小鼠抗體之 CDR，設計人類化抗體序列。所設計之人類化抗體序列，重鏈記載為 HA（序列表之序列編號 11）、輕鏈記載為 KA（序列表之序列編號 19）。進一步地，對可變區域之構造安定性相關的 FW 內之胺基酸進行追加導入變異，設計複數個人類化抗體序列（重鏈包含 HA，至 HB~HH 共 8 種、輕鏈包含 KA，至 KB~KG 共 7 種）。

[0154]

[表 3]

表 3. 所設計之人類化抗體序列

重鏈		序列表之 序列編號
HA	將小鼠抗體 B5.116A3 之 CDR 移植於人類抗體之 FW 的序列	11
HB	將 HA 之 Ala81 取代為 Val、Lys89 取代為 Arg 的序列	12
HC	將 HA 之 Ala81 取代為 Val 的序列	13
HD	將 HA 之 Lys89 取代為 Arg 的序列	14
HE	將 HA 之 Ala81 取代為 Val、Lys89 取代為 Arg、及 Phe37 取代為 Val 的序列	15
HF	將 HA 之 Leu95 取代為 Val 的序列	16
HG	將 HA 之 Phe37 取代為 Val 的序列	17
HH	將 HA 之 Phe37 取代為 Val、Leu95 取代為 Val 的序列	18
輕鏈		
KA	將小鼠抗體 B5.116A3 之 CDR 移植於人類抗體之 FW 的序列	19
KB	將 KA 之 Phe71 取代為 Tyr 的序列	20
KC	將 KA 之 Phe71 取代為 Tyr、Phe44 取代為 Val 的序列	21
KD	將 KA 之 Ser85 取代為 Thr 的序列	22
KE	將 KA 之 Pro44 取代為 Val 的序列	23
KF	將 KA 之 Pro44 取代為 Val、Ser85 取代為 Thr 的序列	24
KG	將 KA 之 Phe71 取代為 Tyr、Pro44 取代為 Val、Ser85 取代為 Thr 的序列	25

[0155]

實施例 12：重組小鼠人類嵌合體及重組人類化抗體之配製

(1) 根據實施例 6，配製具有以下胺基酸序列之重組小鼠人類嵌合體抗 RGMa 抗體 116A3 (r116A3C)。

[0156] 輕鏈 (序列表之序列編號 8)

DIQMTQTTSSLSASLGDRV TISC RASQDISS YLNWYQQKPD
GTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
ATYFCQQNLNTPWTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0157] 重鏈 (序列表之序列編號 9)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQ
SPEKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKR
SVY LQMNNLRAEDTGIYYCTRRDGAYWGQGTLVTVSAAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

[0158] (2) 根據實施例 6，配製由以下重鏈及輕鏈之組合所成之共 20 種人類化抗 RGMa 抗體。

[0159] 重鏈/輕鏈之組合；

HA/KA、HA/KB、HA/KC、HA/KG、HB/KC、HC/KA、HC/KB、HD/KA、HD/KB、HD/KC、HD/KD、HE/KA、HF/KA、HF/KF、HF/KG、HG/KD、HG/KH、HH/KA、HH/KD、HH/KF

[0160] (3) 根據實施例 6，配製重組人類化抗 RGMa 抗體（以後記載為 rH5F9）（比較例）。

將專利文獻 1（WO2009/106356）記載之人類化抗 RGMa 單株抗體 h5F9 之可變區域（輕鏈為專利文獻 1 之 seq ID_53、重鏈為專利文獻 1 之 seq ID_50），與人類抗體恆定區域（輕鏈為序列表之序列編號 26 的 Arg108~Cys214、重鏈為序列表之序列編號 27 的 Ala117~Lys446）連結。

[0161]

實施例 13：抗體之熱安定性試驗

將表現實施例 12 記載之重組抗體的培養上清液各分取 20 μ L，使用熱循環器（Takara bio 公司製、TP600），以 40、45、50、55、60、65、70、75℃ 之 8 點溫度各自熱處理 10 分鐘。

以抗體終濃度成為 125ng/mL 的方式將培養上清液以 PBS 稀釋。之後，將實施例 3 記載之人類 RGMa 蛋白質固相化，進行 ELISA，評估抗體之抗原結合性（圖 3）。

其結果，由重鏈 HE、輕鏈 KA 之組合所成之人類化抗體（以下稱為「rH116A3」）、及小鼠人類嵌合體抗體（r116A3C），顯示較人類化抗體（rH5F9）更優良的熱安定性。以後，將由該 HE/KA 之組合所成之人類化抗體記載為 rH116A3。

再者，未進行熱處理時，小鼠人類嵌合體抗體（r116A3C）與人類化抗體（rH116A3）顯示同等之抗原結合性，並無伴隨人類化之抗原結合性的降低。

[0162]

實施例 14：產生人類化抗 RGMa 抗體（rH116A3）之 CHO 安定表現株之建立

生產人類化抗 RGMa 抗體（rH116A3）之 CHO 安定表現株，係以 Lonza GS Xceed 系統（Lonza 公司）建立。將包含人類化抗 RGMa 抗體（rH116A3）之輕鏈編碼序列（序列表之序列編號 44）及重鏈編碼序列（序列表之序列編號 43）的 pXC double-gene 載體，導入 CHOK1SV GS knock out 親細胞株，於 methionine sulfoximine（MSX）選擇下取得轉形細胞池。以流式細胞儀分離為單一細胞後，評估於培養上清液中之抗體產生量、細胞增殖性等，取得 CHO 安定表現株。

[0163]

實施例 15：神經突成長試驗

由大鼠新生兒（P7）中摘出小腦，懸浮於胰蛋白酶溶液（含有 0.2%DNase 之 0.25%胰蛋白酶 PBS 溶液），於

37℃ 消化 10~15 分鐘。接著添加含有 10%胎牛血清之 DMEM 培養基予以離心分離。以同培養基再懸浮，進行離心分離，同樣地重複操作 2 次，洗淨細胞。進一步地將該細胞懸浮液以 70 μ m 細胞濾篩過濾後予以離心分離，將沈澱區分以同培養基再懸浮。於細胞浮游液添加 B27 supplement (GIBCO 公司製)，配製大鼠新生兒小腦顆粒細胞。

接著，對細胞微量盤播種大鼠新生兒小腦顆粒細胞，於 37℃ 進行培養 1 日。

添加終濃度 2 μ g/mL 之重組 RGMa 蛋白質 (R&D systems 公司製、2459-RM)，於 37℃ 培養 2 日。以顯微鏡觀察測定神經突長度後，如圖 4 所示，藉由 RGMa 之添加，於左圖之實驗中神經突長度由 37 μ m 變成 26 μ m、於右圖中由 38 μ m 變成 27 μ m，神經突成長被阻礙。僅將被驗抗體 (B5.116A3、B5.70E4) 以終濃度 10 μ g/mL 添加，雖於神經突長度亦未見到變化，但與重組 RGMa 蛋白質同時地添加被驗抗體時，神經突與對照 (RGMa 非添加) 相同程度地成長，觀察到抗體所致之 RGMa 蛋白質之中和作用。

[0164]

實施例 16：使用脊髓損傷模式大鼠之效力試驗

對經鹵乙烷 (武田藥品工業公司製) 吸引麻醉之 Wistar 系大鼠 (雌、8 週齡、體重約 200g)，以脊椎節段 T9 為中心，施以前後 1 椎骨部分 (T8~T10) 之椎弓切除

術，使脊髓露出。使用脊髓挫傷模式評估時，係使用 IH impactor (Precision System 公司製)，對露出之脊髓施加 200 kdyn 之壓力。

於剛如前述般使脊髓損傷之後，將充滿 400 μ g/mL 之被驗抗體 (r116A3, r70E4) 或對照小鼠抗體 (mo-IgG2b κ) 之滲透壓小型泵 (200 μ L 液量、0.5 μ L/小時、14 日送達) (Alzet 公司製、model 2002) 放置於大鼠之背部皮下。滲透壓小型泵之出口所連接之矽製管路的前端，係放置於脊髓損傷部位之硬膜下。該管路係縫於椎弓切除術部位之正下肢側之棘突並固定，縫合肌肉及皮膚層並予以飼育。

脊髓損傷模式大鼠之運動功能，係使用 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 分數 (Basso, D.M., Beattie, M.S., & Bresnahan, J.C., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 12, 1-21 (1995))，以損傷後第 0、1、3、7 日、以後每 1 週，最長至 8 週來進行評估。其結果，如圖 5 (A) 所示，r116A3 或 r70E4 與對照抗體 (mo-IgG2b κ) 比較，分別於投與後 4 或 3 週以後顯著地改善了 BBB 分數 ($p < 0.05$, Student's t-檢定)。

使用脊髓半側切斷模式來評估時，係將露出之脊髓背側部於 1.8mm~2.0mm 之深度切斷。與上述同樣地使用滲透壓小型泵來投與被檢抗體 (B5.116A3) 或對照小鼠抗體 (mo-IgG2b κ)，以損傷後第 0、1、3、7 日日、以後每 1

週，最長至 10 週，使用 BBB 分數來進行評估。如圖 5 (B) 所示，B5.116A3 與對照抗體 (mo-IgG2b κ) 比較，於投與後 4 週以後顯著地改善了 BBB 分數 ($p < 0.01$, Student's t-檢定)。

[0165]

實施例 17：使用多發性硬化症模式小鼠之效力試驗

將 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 胜肽 (HSLGKWLGHDPKF：序列表之序列編號 45、胜肽研究所製) 以生理食鹽液 (大塚製藥工廠製) 溶解，與添加了結核死菌 H37 Ra (Difco Laboratories 公司製) 之不完全弗氏佐劑 (Sigma 公司製) 混合，製作乳化液。作為 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 胜肽，係以 50 $\mu\text{g/head}$ 對 SJL/JorllcoCrj (SJL/J) 小鼠 (日本 Charles River) 之背部皮下誘發免疫，評估 EAE 分數 (H. Kataoka, K Sugahara, K. Shimano, K. Teshima, M. Koyama, A. Fukunari and K. Chiba. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. Cellular & Molecular Immunology 6, 439-448, 2005.) 及體重變化 (圖 6)。

將經生理食鹽液稀釋之被驗抗體 (B5.116A3)，於經 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 胜肽誘發免疫之 7 日及 10 日後或 18 日及 21 日後分別以 20 mg/kg 對腹腔內投與。

其結果，如圖 6 所示，抗 RGMa 小鼠單株抗體 (B5.116A3)，與對照抗體 (mo-IgG2b κ) 比較，於發病

前之投與會抑制 EAE 分數惡化（圖 6 上段）、於發病後之投與，顯示了復發預防效果（圖 6 下段）。

[0166]

實施例 18：抗體之免疫原性試驗

將來自 51 名健康人捐贈者之末梢血中所含有的未分化樹狀細胞，以顆粒球單核球集落刺激因子（GM-CSF）及 Interleukin-4 刺激使其成熟。對成熟樹狀細胞添加終濃度 50 μ g/mL 之被驗抗體（rH116A3），藉由培養 4、5 日，使抗體攝入樹狀細胞。對其混合來自同一捐贈者之末梢血 CD4+T 細胞（輔助 T 細胞），進一步共培養 1 週後，以流式細胞儀測定 T 細胞增殖。以被驗抗體之 T 細胞增殖活性為指標，評估於人類之免疫原性風險。其結果，51 名捐贈者當中，於 4 名（7.8%）觀察到 T 細胞之增殖，免疫原性風險低。

【序列表】

<110> 田邊三菱製藥股份有限公司 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)
國立大學法人大阪大學 (Osaka University)
國立大學法人千葉大學 (National University Corporation Chiba University)

<120> RGMa 結合蛋白質及其使用

<150> JP2015-091095
<151> 2015-04-28

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
1 5 10 15
Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
20 25 30
Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys
35 40 45
Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
50 55 60
His Ala Pro Ala Ser Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
65 70 75 80
Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp
85 90 95
Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
100 105 110
His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
115 120 125
Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
130 135 140
Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
145 150 155 160
Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
165 170 175
Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
180 185 190
Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser
195 200 205
Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln
210 215 220
Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro
225 230 235 240
Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala
245 250 255
Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile
260 265 270
Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg
275 280 285
Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val
290 295 300
Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro

305 310 315 320
 Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly
 325 330 335
 Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro
 340 345 350
 Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
 355 360 365
 Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
 370 375 380
 Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
 385 390 395 400
 Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Asp Arg
 405 410 415
 Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
 420 425 430
 Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 435 440 445
 Phe Cys
 450

<210> 2
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2
 Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
 1 5 10 15
 Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Leu Trp Pro
 20 25 30
 Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Ile Ser Pro Cys
 35 40 45
 Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly
 50 55 60
 Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu
 65 70 75 80
 Arg Thr Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly
 85 90 95
 Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser
 100 105 110
 Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg
 115 120 125
 Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu
 130 135 140
 Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn
 145 150 155 160
 Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr
 165 170 175
 Asp His Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly
 195 200 205
 Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe
 210 215 220
 Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu
 225 230 235 240
 Pro Ser Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly
 245 250 255
 Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu
 260 265 270
 Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly

```

      275      280      285
Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala
290      295      300
Val Glu Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys
305      310      315      320
Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu
      325      330      335
Ser Pro Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu
      340      345      350
Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro
      355      360      365
Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr
      370      375      380
Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly
385      390      395      400
Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr
      405      410      415
Arg Glu Leu Pro Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr
      420      425      430
Phe Pro Leu Ala Pro Gln Ile Leu Leu Gly Thr Ile Pro Leu Leu Val
      435      440      445
Leu Leu Pro Val Leu Trp
450

```

<210> 3
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

```

<400> 3
Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
1      5      10      15
Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Leu Trp Pro
      20      25      30
Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Ile Ser Pro Cys
      35      40      45
Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly
      50      55      60
Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu
65      70      75      80
Arg Thr Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly
      85      90      95
Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser
      100      105      110
Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg
      115      120      125
Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu
      130      135      140
Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn
145      150      155      160
Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr
      165      170      175
Asp His Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp
      180      185      190
Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly
      195      200      205
Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe
      210      215      220
Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu
225      230      235      240
Pro Ser Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly

```

Ala Asn Ser Leu 245 Lys Ile Thr Glu Lys 250 Val Ser Gly Gln His 255 Val Glu
Ile Gln Ala Lys 260 Tyr Ile Gly Thr Thr 265 Ile Val Val Arg 270 Gln Val Gly
Arg Tyr 275 Leu Thr Phe Ala Val 280 Arg Met Pro Glu 285 Val Val Asn Ala
Val Glu Asp Arg Asp Ser 295 Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys
305 Pro Leu Asn Gln Gln 310 Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu
Ser Pro Arg Arg 325 Pro Ala Ala Ala Ser 330 Pro Ser Pro Val Val Pro Glu
Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val 345 Ala Lys Cys Lys Glu 350 Lys Leu Pro
Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln 360 Ala Cys Val Phe Asp 365 Leu Leu Thr Thr
Gly 370 Asp Val Asn Phe Thr 375 Leu Ala Ala Tyr Tyr 380 Ala Leu Glu Asp Gly
385 Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr
Arg Glu Leu Pro Gly Ala Val Ala Ala Ala Phe Pro Leu Ala Pro
Glu Met Leu 420 Pro Gly Thr Val Thr 425 Leu Leu Val Leu 430 Pro Leu Phe
435 440 445
Trp

<210> 4
<211> 234
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
1 5 10 15
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn
100 105 110
Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
130 135 140
Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
165 170 175
Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190
Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195 200 205
His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro

210 215 220
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 5
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu
 180 185 190
 Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205
 Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser
 210 215 220
 Ser Thr Thr Val Asp Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr
 225 230 235 240
 Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys
 260 265 270
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
 290 295 300
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 340 345 350
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg
 355 360 365
 Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg
 370 375 380
 Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp
 385 390 395 400
 Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys

Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser
 405 420 425 430
 Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
 435 440 445
 Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr
 450 455 460
 Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 6
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 7
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
 1 5 10 15
 Met Ser Asp Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

50 55 60
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Phe Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Gly Ser Phe Gly Tyr Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125
Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
130 135 140
Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160
Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr
180 185 190
Thr Met Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
195 200 205
Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp
210 215 220
Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro
225 230 235 240
Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly
245 250 255
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
260 265 270
Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
275 280 285
Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
290 295 300
Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg
305 310 315 320
Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
325 330 335
Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
340 345 350
Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
355 360 365
Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu
370 375 380
Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
385 390 395 400
Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val
405 410 415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys
420 425 430
Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His
435 440 445
Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
450 455 460
Gly Lys
465

- <210> 8
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> chimeric antibody light chain

<400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 9
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chimeric antibody heavy chain

<400> 9
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Arg Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

Gly Leu Tyr Ser 165 Leu Ser Ser Val Val 170 Thr Val Pro Ser Ser 175 Ser Leu
 Gly Thr Gln Thr 180 Tyr Ile Cys Asn Val 185 Asn His Lys Pro Ser 190 Asn Thr
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 Cys 210 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 Leu Phe Pro Pro Lys 230 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 280 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 Leu 290 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 10
 <211> 1461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Ala Ala Glu Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Ser Thr Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Trp Leu Tyr Cys Leu Leu Leu Leu Gly Arg Arg Ala Pro Gly Ala Ala
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ser Gly Ser Ala Pro Gln Ser Pro Gly Ala Ser Ile Arg
 35 40 45
 Thr Phe Thr Pro Phe Tyr Phe Leu Val Glu Pro Val Asp Thr Leu Ser
 50 55 60
 Val Arg Gly Ser Ser Val Ile Leu Asn Cys Ser Ala Tyr Ser Glu Pro
 65 70 75 80
 Ser Pro Lys Ile Glu Trp Lys Lys Asp Gly Thr Phe Leu Asn Leu Val
 85 90 95
 Ser Asp Asp Arg Gln Leu Leu Pro Asp Gly Ser Leu Phe Ile Ser
 100 105 110
 Asn Val Val His Ser Lys His Asn Lys Pro Asp Glu Gly Tyr Tyr Gln
 115 120 125
 Cys Val Ala Thr Val Glu Ser Leu Gly Thr Ile Ile Ser Arg Thr Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ile Val Ala Gly Leu Pro Arg Phe Thr Ser Gln Pro Glu Pro

145	Ser	Ser	Val	Tyr	Ala	Gly	Asn	Asn	Ala	Ile	Leu	Asn	Cys	Glu	Val	Asn
	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Arg	Trp	Glu	Gln	Asn	Arg	Gln	Pro	Leu
	Leu	Leu	Asp	Asp	Arg	Val	Ile	Lys	Leu	Pro	Ser	Gly	Met	Leu	Val	Ile
	Ser	Asn	Ala	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Tyr	Arg	Cys	Val	Val	Glu
	Ser	Gly	Gly	Pro	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asp	Glu	Val	Glu	Leu	Lys	Val	Leu
	Pro	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Lys	Gln	Pro	Ser
	Pro	Leu	Val	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Asp	Val	Val	Leu	Pro	Cys	Val	Ala
	Ser	Gly	Leu	Pro	Thr	Pro	Thr	Ile	Lys	Trp	Met	Lys	Asn	Glu	Glu	Ala
	Leu	Asp	Thr	Glu	Ser	Ser	Glu	Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser
	Leu	Glu	Ile	Ser	Asp	Val	Thr	Glu	Asp	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Phe	Cys
	Ile	Ala	Asp	Asn	Gly	Asn	Glu	Thr	Ile	Glu	Ala	Gln	Ala	Glu	Leu	Thr
	Val	Gln	Ala	Gln	Pro	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Pro	Thr	Asn	Ile	Tyr	Ala
	His	Glu	Ser	Met	Asp	Ile	Val	Phe	Glu	Cys	Glu	Val	Thr	Gly	Lys	Pro
	Thr	Pro	Thr	Val	Lys	Trp	Val	Lys	Asn	Gly	Asp	Met	Val	Ile	Pro	Ser
	Asp	Tyr	Phe	Lys	Ile	Val	Lys	Glu	His	Asn	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Leu
	Val	Lys	Ser	Asp	Glu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ala	Glu	Asn	Asp	Val
	Gly	Asn	Ala	Gln	Ala	Gly	Ala	Gln	Leu	Ile	Ile	Leu	Glu	His	Ala	Pro
	Ala	Thr	Thr	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Val	Ala	Ser
	Leu	Val	Ser	Thr	Arg	Phe	Ile	Lys	Leu	Thr	Trp	Arg	Thr	Pro	Ala	Ser
	Asp	Pro	His	Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Tyr	Ser	Val	Phe	Tyr	Thr	Lys	Glu
	Gly	Ile	Ala	Arg	Glu	Arg	Val	Glu	Asn	Thr	Ser	His	Pro	Gly	Glu	Met
	Gln	Val	Thr	Ile	Gln	Asn	Leu	Met	Pro	Ala	Thr	Val	Tyr	Ile	Phe	Arg
	Val	Met	Ala	Gln	Asn	Lys	His	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Ala	Pro	Leu
	Arg	Val	Glu	Thr	Gln	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Pro	Gly	Pro	Ala	Pro	Asn
	Leu	Arg	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Trp	Glu
	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Glu	Ile	Gln	Asn	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Tyr
	Met	Glu	Lys	Gly	Thr	Asp	Lys	Glu	Gln	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Ser	His
	Ser	Tyr	Thr	Ile	Asn	Gly	Leu	Lys	Lys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Ser	Phe	Arg
	Val	Val	Ala	Tyr	Asn	Lys	His	Gly	Pro	Gly	Val	Ser	Thr	Pro	Asp	Val
	Ala	Val	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Val	Pro	Ser	Ala	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu
	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Asn	Ser	Lys	Ser	Ile	Met	Ile	His	Trp	Gln	Pro

Pro	Ala	Pro	Ala	645	Gln	Asn	Gly	Gln	650	Ile	Thr	Gly	Tyr	Lys	655	Ile	Arg
Tyr	Arg	Lys	660	Ser	Arg	Lys	Ser	665	Asp	Val	Thr	Glu	Thr	670	Leu	Val	Ser
Gly	Thr	Gln	675	Leu	Ser	Gln	Leu	680	Ile	Glu	Gly	Leu	Asp	685	Arg	Gly	Thr
Tyr	Asn	Phe	Arg	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	720	Ala
705	Thr	Asp	Trp	Leu	710	Ser	Ala	Glu	Thr	Phe	Glu	715	Ser	Asp	Leu	Asp	Glu
Thr	Asp	Trp	Leu	725	Ser	Ala	Glu	Thr	Phe	Glu	730	Ser	Asp	Leu	Asp	Glu	Thr
Arg	Val	Pro	Glu	740	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	His	Val	Arg	Pro	Leu	Val	Thr	735
Ser	Ile	Val	Val	755	Ser	Trp	Thr	Pro	Pro	Glu	Asn	Gln	Asn	Ile	Val	Val	750
Arg	Gly	Tyr	Ala	Ile	Gly	Tyr	Gly	Ile	Gly	Ser	Pro	His	Ala	Gln	Thr	765	760
Ile	Lys	Val	Asp	Tyr	Lys	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Glu	Asn	Leu	Asp	800	775
785	Pro	Ser	Ser	His	Tyr	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Ala	Phe	Asn	Asn	Val	Gly	790
Glu	Gly	Ile	Pro	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Arg	Pro	His	Thr	Asp	815	805
Thr	Ser	Glu	Val	Asp	Leu	Phe	Val	Ile	Asn	Ala	Pro	Tyr	Thr	Pro	Val	830	820
Pro	Asp	Pro	Thr	Pro	Met	Met	Pro	Pro	Val	Gly	Val	Gln	Ala	Ser	Ile	845	835
Leu	Ser	His	Asp	Thr	Ile	Arg	Ile	Thr	Trp	Ala	Asp	Asn	Ser	Leu	Pro	860	850
865	Lys	His	Gln	Lys	Ile	Thr	Asp	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Thr	Val	Arg	Trp	Lys	870
Thr	Asn	Ile	Pro	Ala	Asn	Thr	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Asn	Ala	Thr	Thr	895	885
Leu	Ser	Tyr	Leu	Val	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Glu	Phe	910	900
Ser	Val	Met	Val	Thr	Lys	Gly	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	Trp	Ser	Met	Thr	925	915
Ala	His	Gly	Thr	Thr	Phe	Glu	Leu	Val	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	940	930
945	Val	Thr	Val	Val	950	Ser	Lys	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	955
Trp	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Ala	Asn	Gly	Lys	Ile	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	975	965
Tyr	Tyr	Ser	Thr	Asp	Val	Asn	Ala	Glu	Ile	His	Asp	Trp	Val	Ile	Glu	990	980
Pro	Val	Val	Gly	Asn	Arg	Leu	Thr	His	Gln	Ile	Gln	Glu	Leu	Thr	1005	1000	995
Leu	Asp	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Lys	Ile	Gln	Ala	Arg	Asn	Ser	Lys	1020	1015	1010
Gly	Met	Gly	Pro	Met	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Phe	Arg	Thr	Pro	Lys	1035	1030	1025
Ala	Asp	Ser	Ser	Asp	Lys	Met	Pro	Asn	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	1050	1045	1040
Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Gly	Ser	Asp	Tyr	Lys	1065	1060	1055
Pro	Pro	Met	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Pro	His	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	1080	1075	1070
Pro	Leu	Asp	Ser	Asn	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Ile	Val	Ser	Val	Gly	1095	1090	1085
Val	Ile	Thr	Ile	Val	Val	Val	Val	Ile	Ile	Ala	Val	Phe	Cys	Thr	1110	1105	1100
Arg	Arg	Thr	Thr	Ser	His	Gln	Lys	Lys	Lys	Arg	Ala	Ala	Cys	Lys	1125	1120	1115

1130	Ser Val Asn Gly Ser His	1135	Lys Tyr Lys Gly Asn	1140	Ser Lys Asp Val
1145	Lys Pro Pro Asp Leu Trp	1150	Ile His His Glu Arg	1155	Leu Glu Leu Lys
1160	Pro Ile Asp Lys Ser Pro	1165	Asp Pro Asn Pro Ile	1170	Met Thr Asp Thr
1175	Pro Ile Pro Arg Asn Ser	1180	Gln Asp Ile Thr Pro	1185	Val Asp Asn Ser
1190	Met Asp Ser Asn Ile His	1195	Gln Arg Arg Asn Ser	1200	Tyr Arg Gly His
1205	Glu Ser Glu Asp Ser Met	1210	Ser Thr Leu Ala Gly	1215	Arg Arg Gly Met
1220	Arg Pro Lys Met Met Met	1225	Pro Phe Asp Ser Gln	1230	Pro Pro Gln Pro
1235	Val Ile Ser Ala His Pro	1240	Ile His Ser Leu Asp	1245	Asn Pro His His
1250	His Phe His Ser Ser Ser	1255	Leu Ala Ser Pro Ala	1260	Arg Ser His Leu
1265	Tyr His Pro Gly Ser Pro	1270	Trp Pro Ile Gly Thr	1275	Ser Met Ser Leu
1280	Ser Asp Arg Ala Asn Ser	1285	Thr Glu Ser Val Arg	1290	Asn Thr Pro Ser
1295	Thr Asp Thr Met Pro Ala	1300	Ser Ser Ser Gln Thr	1305	Cys Cys Thr Asp
1310	His Gln Asp Pro Glu Gly	1315	Ala Thr Ser Ser Ser	1320	Tyr Leu Ala Ser
1325	Ser Gln Glu Glu Asp Ser	1330	Gly Gln Ser Leu Pro	1335	Thr Ala His Val
1340	Arg Pro Ser His Pro Leu	1345	Lys Ser Phe Ala Val	1350	Pro Ala Ile Pro
1355	Pro Pro Gly Pro Pro Thr	1360	Tyr Asp Pro Ala Leu	1365	Pro Ser Thr Pro
1370	Leu Leu Ser Gln Gln Ala	1375	Leu Asn His His Ile	1380	His Ser Val Lys
1385	Thr Ala Ser Ile Gly Thr	1390	Leu Gly Arg Ser Arg	1395	Pro Pro Met Pro
1400	Val Val Val Pro Ser Ala	1405	Pro Glu Val Gln Glu	1410	Thr Thr Arg Met
1415	Leu Glu Asp Ser Glu Ser	1420	Ser Tyr Glu Pro Asp	1425	Glu Leu Thr Lys
1430	Glu Met Ala His Leu Glu	1435	Gly Leu Met Lys Asp	1440	Leu Asn Ala Ile
1445	Thr Thr Ala	1450		1455	
1460					

<210> 11
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized antibody heavy chain HA

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30
Trp Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala	Glu	Ile	Arg	Ser	Lys	Ala	Asn	Asn	His	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu
50						55				60					
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ile
65					70				75						80
Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr
			85						90					95	
Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Asp	Gly	Ala	Tyr	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150				155						160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
			165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225					230					235					240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
			245						250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270		
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275					280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			325						330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
		340						345					350		
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370					375					380				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
			405						410					415	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420					425					430		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440					445			

<210> 12
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody heavy chain HB

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1	Ser	Leu	Arg	Leu	5	Ser	Cys	Thr	Ala	10	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	15	Ser	Asp	Ala
	Trp	Met	Asp	20	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	25	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	30	Glu	Trp	Val
	Ala	Glu	Ile	35	Arg	Ser	Lys	Ala	40	Asn	Asn	His	Ala	Thr	Tyr	45	Tyr	Ala	Glu
	50	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	55	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	60	Lys	Ser	Ile
	65	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	70	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	75	Ala	Leu	Tyr
					85							90					95		
	Tyr	Cys	Thr	Arg	100	Arg	Asp	Gly	Ala	105	Tyr	Trp	Gly	Lys	Gly	110	Thr	Thr	Val
	Thr	Val	Ser	Ser	115	Ala	Ser	Thr	Lys	120	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	125	Pro	Leu	Ala
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	135	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	140	Cys	Leu	
	145	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	150	Val	Thr	Val	Ser	Trp	155	Asn	Ser	Gly
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	165	Val	His	Thr	170	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	175	Gln	Ser	Ser
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	185	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	190	Ser	Ser	Leu
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	200	Asn	His	Lys	Pro	Ser	205	Asn	Thr	
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	215	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	220	His	Thr	
	225	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	230	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	235	Ser	Val	Phe
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	250	Thr	Pro	
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	Ser	His	Glu	Asp	Pro	265	Glu	Val	
	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	275	Glu	Val	His	Asn	Ala	280	Lys	Thr	
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	285	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	290	Ser	Val	
	305	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	310	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	315	Tyr	Lys	Cys
	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	325	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	330	Ile	Ser	
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	340	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	345	Pro	Pro	
	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	355	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	360	Leu	Val	
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	365	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	370	Asn	Gly	
	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	375	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	380	Ser	Asp	
	385	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	390	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	395	Arg	Trp	
	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	405	Val	Met	His	Glu	Ala	410	Leu	His	
	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	420	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	425	Lys		
	435							440							445				

<210> 13
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody heavy chain HC

<400> 13

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20      25      30
Trp Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50      55      60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65      70      75      80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85      90      95
Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
100      105      110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115      120      125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130      135      140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145      150      155      160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165      170      175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180      185      190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195      200      205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210      215      220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225      230      235      240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245      250      255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260      265      270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275      280      285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290      295      300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305      310      315      320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325      330      335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340      345      350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355      360      365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370      375      380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385      390      395      400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405      410      415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420      425      430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435      440      445

```

<210> 14
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody heavy chain HD

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

Asn His Tyr 420 Thr Gln Lys Ser Leu 425 Ser Leu Ser Pro Gly 430 Lys
435 440 445

<210> 15
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized antibody heavy chain HE

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30
Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 16
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized antibody heavy chain HF

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30
Trp Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

Ser	Arg	Asp	340	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	345	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	350	Cys	Leu	Val
Lys	Gly	Phe	355	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	360	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	365	Ser	Asn	Gly
Gln	Pro	Glu	370	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	375	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	380	Asp	Ser	Asp
385	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	390	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	395	Ser	Arg	Trp
Gln	Gln	Gly	405	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	410	Val	Met	His	Glu	Ala	415	Leu	His	
Asn	His	Tyr	420	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	425	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	430	Lys		
		435						440						445				

<210> 17
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody heavy chain HG

<400> 17

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ala
		20					25					30			
Trp	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40					45				
Ala	Glu	Ile	Arg	Ser	Lys	Ala	Asn	Asn	His	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu
	50				55					60					
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ile
65				70					75					80	
Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr
			85					90					95		
Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Asp	Gly	Ala	Tyr	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val
		100				105						110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115				120						125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135				140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145				150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
			165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
		180					185						190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195				200						205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225				230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
			245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
		260				265						270			
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275				280					285				
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				

```

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305          310          315          320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
          325          330          335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
          340          345          350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
          355          360          365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
          370          375          380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385          390          395          400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
          405          410          415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
          420          425          430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445

```

<210> 18
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody heavy chain HH

```

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
          20          25          30
Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
          50          55          60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65          70          75          80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85          90          95
Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
          115          120          125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
          130          135          140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145          150          155          160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
          165          170          175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
          180          185          190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
          195          200          205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
          210          215          220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225          230          235          240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
          245          250          255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

```

```

      260      265      270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
      275      280      285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
      290      295      300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
      305      310      315      320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
      325      330      335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
      340      345      350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
      355      360      365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
      370      375      380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
      385      390      395      400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
      405      410      415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      420      425      430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435      440      445

```

<210> 19
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody light chain KA

```

<400> 19
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
      20      25      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
      85      90      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

<210> 20
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody light chain KB

<400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 21
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody light chain KC

<400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 22
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized antibody light chain KD

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody light chain KE

<400> 23

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20      25      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
85      90      95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

<210> 24

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody light chain KF

<400> 24

```

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

```

```

145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

<210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized antibody light chain KG

```

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
85      90      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 26
Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly
1      5      10

```

<210> 27

<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27

Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro

1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

Arg Asp Gly Ala Tyr
1 5

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

Ser Gln Ser Thr His Val Pro
1 5

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

Thr Ser Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 40
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 41
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized antibody heavy chain

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30
Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized antibody light chain

<400> 42
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu
100 105

<210> 43
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> a gene encoding humanized antibody heavy chain

<400> 43
gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcagatc cctgagactg 60
tcctgtaccg cctccggctt caccttctcc gacgcctgga tggattgggt gcgacaggct 120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggcggag atccgggtcca aggccaacaa ccacgccacc 180
tactacgccg agtctgtgaa gggccgggtt accatctccc gggacgactc caagtccatc 240
gtgtacctgc agatgaactc cctgoggacc gaggacaccg ccctgtacta ctgcaccaga 300
agggacggcg cctactgggg caagggcacc acagtgcagc tgtcctcc 348

<210> 44
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> a gene encoding humanized antibody light chain

<400> 44
gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtggggoga cagagtgacc 60
atcacctgtc gggcctccca ggacatctcc tcctacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctcccgga tgcactccgg cgtgccctct 180
agattttccg gctctggctc cggcaccgac ttaccctga ccctctccag cctgcagccc 240
gaggacttcg cctcctactt ctgtcagcag ctgaacaccc tgccctggac ctttggcgga 300
ggcaccaagg tggaatgga a 321

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PLP139-151

<400> 45
His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> spacer

<400> 46
Ser Gly Ser Gly
1

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種經單離之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，其輕鏈可變區域(VL)包含 VL：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISSYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFASYFCQQQLNTLPWTFGGGTVEME（序列表之序列
編號 42）表示之胺基酸序列，

重鏈之互補性決定區域 1（HCDR1）之胺基酸序列包含 DAWMD（序列表之序列編號 33），

重鏈之互補性決定區域 2（HCDR2）之胺基酸序列包含 EIRSKANNHATYYAESVKG（序列表之序列編號 34），及

重鏈之互補性決定區域 3（HCDR3）之胺基酸序列包含 RDGAY（序列表之序列編號 35）。

【請求項 2】一種經單離之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，其重鏈可變區域(VH)包含 VH：

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDW
VRQAPGKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRTISRDD
SKSIVYLMNSLRTEDTALYYCTRRDGAYWGKGTTVTVS
S（序列表之序列編號 41）表示之胺基酸序列，

輕鏈可變區域(VL)包含 VL：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISSYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFASYFCQQQLNTLPWTFGGGTVEME（序列表之序列

編號 42) 表示之胺基酸序列。

【請求項 3】如請求項 1 之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，其重鏈可變區域(VH)包含 VH：

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDW
VRQAPGKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDD
SKSIVYLLQMNSLRTEDTALYYCTRRDGAYWGKGTTVTVS
S (序列表之序列編號 41) 表示之胺基酸序列。

【請求項 4】如請求項 1 至 3 中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，其中抗 RGMa 抗體為人類化抗體。

【請求項 5】如請求項 1 至 3 中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段，其中抗 RGMa 抗體具有人類 IgG 之恆定區域。

【請求項 6】一種核酸分子，其係編碼如請求項 1 至 3 中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段的蛋白質部分。

【請求項 7】一種重組載體，其係包含如請求項 6 之核酸分子。

【請求項 8】一種宿主細胞，其係包含如請求項 7 之重組載體。

【請求項 9】一種如請求項 1 至 3 中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段之製造方法，其係包含培養如請求項 8 之宿主細胞的步驟。

【請求項 10】一種醫藥組成物，其係包含如請求項 1 至 3 中任一項之抗 RGMa 抗體或其抗原結合片段。

【請求項 11】如請求項 10 之醫藥組成物，其係神經學疾病或免疫學疾病之預防、治療或復發預防用。

【請求項 12】如請求項 11 之醫藥組成物，其中神經學疾病，係選自由肌萎縮性側索硬化症、上臂神經叢損傷、包含外傷性腦損傷之腦損傷、腦性麻痺、格林-巴利症候群、大腦白質萎縮症；包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症之多發性硬化症；小兒麻痺後症候群、脊柱裂、脊髓損傷、脊髓性肌肉萎縮症、脊椎腫瘤、橫貫性脊髓炎；包含老年性失智症、輕度認知功能障礙、阿茲海默症、阿茲海默相關失智症之失智症；杭丁頓氏舞蹈症、遲發性運動障礙、躁症、巴金森氏症、史蒂爾-理查症候群、唐氏症、重症肌無力症、包含視神經外傷之神經外傷、血管類澱粉症、類澱粉症所伴隨之大腦出血、腦梗塞、腦炎、急性混亂障礙、青光眼及思覺失調症所成之群。

【請求項 13】如請求項 11 之醫藥組成物，其中免疫學疾病，係選自由包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症之多發性硬化症；乾癬；包含風濕性關節炎、變形性關節病、乾癬性關節炎之關節炎；格林-巴利症候群、神經貝賽特氏症、惡性貧血、I 型（胰島素依賴型）糖尿病、全身紅斑性狼瘡（SLE）、發炎性腸疾病（IBD）、休格倫氏症候群、古巴士德氏症候群、葛瑞夫茲氏症、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性血小板減少性紫斑病、氣喘、花粉症、異

位性皮膚炎、絲球體腎炎、重症肌無力症、橋本氏病及肉狀瘤病所成之群。

【請求項14】如請求項11之醫藥組成物，其中神經學疾病或免疫學疾病，係選自由脊髓損傷、包含視神經外傷之神經外傷；及包含復發緩解型多發性硬化症、首發漸進型多發性硬化症、次發漸進型多發性硬化症之多發性硬化症所成之群。

【發明圖式】

圖 1

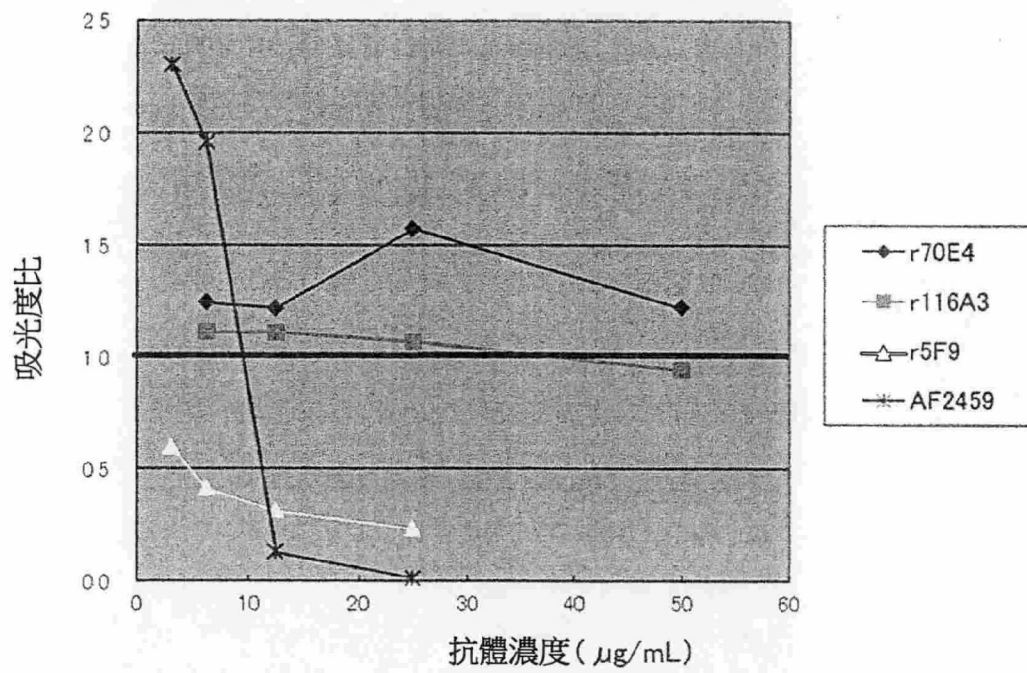


圖 2

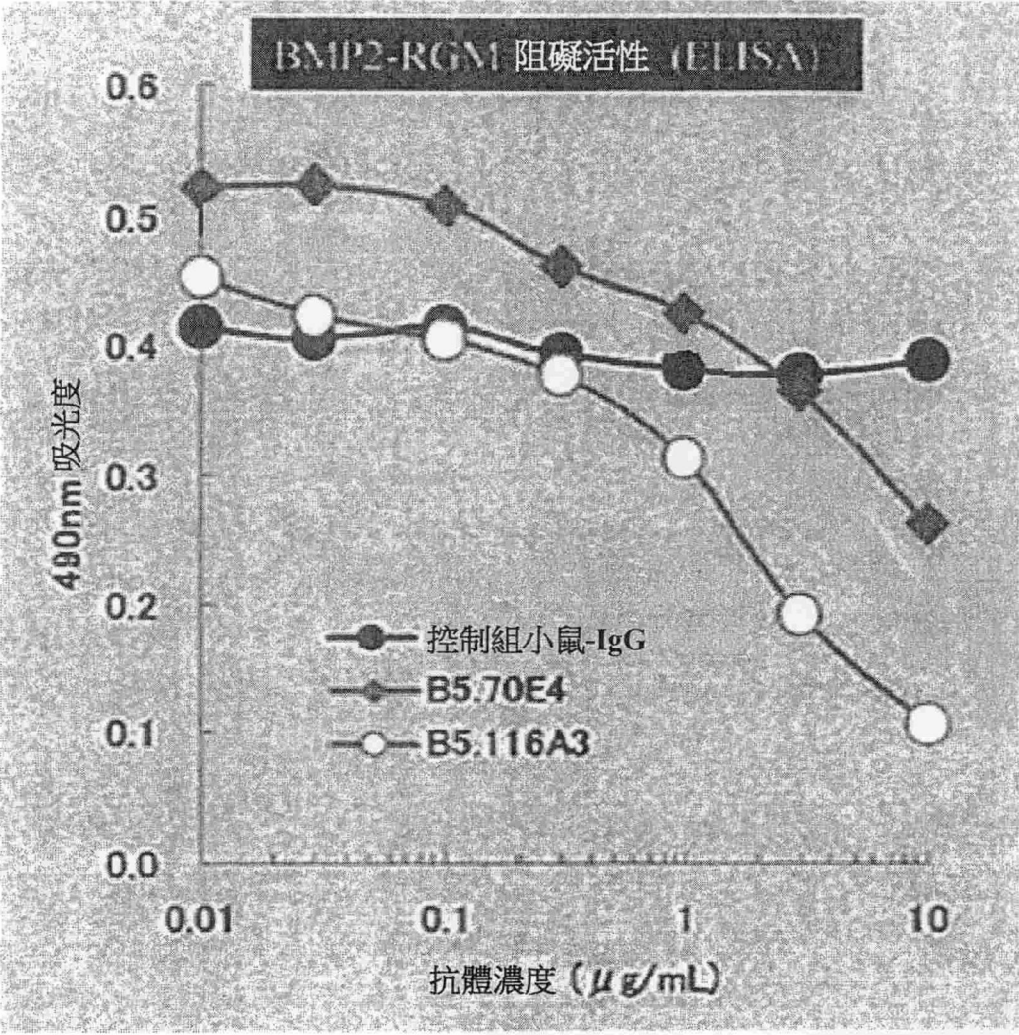


圖 3

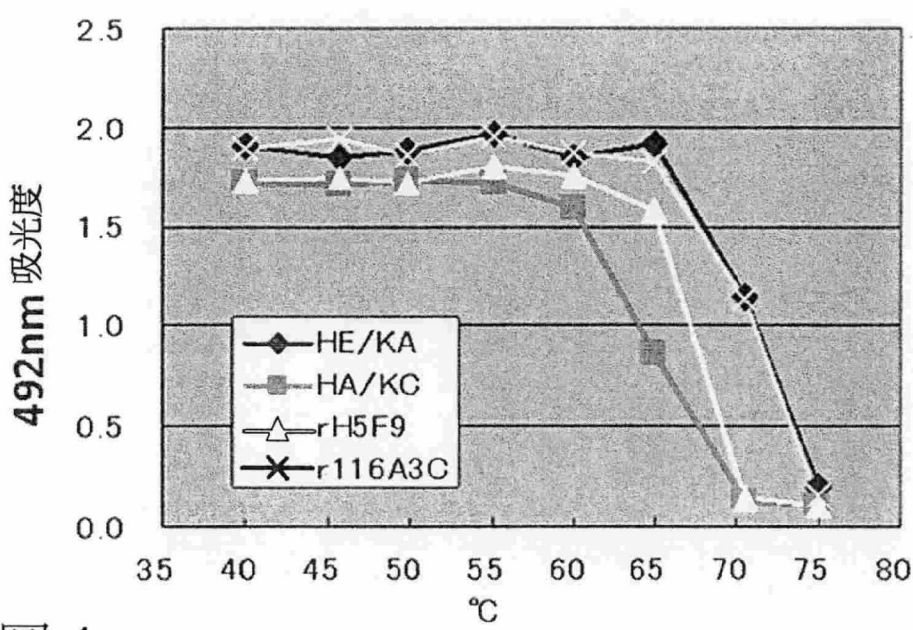


圖 4

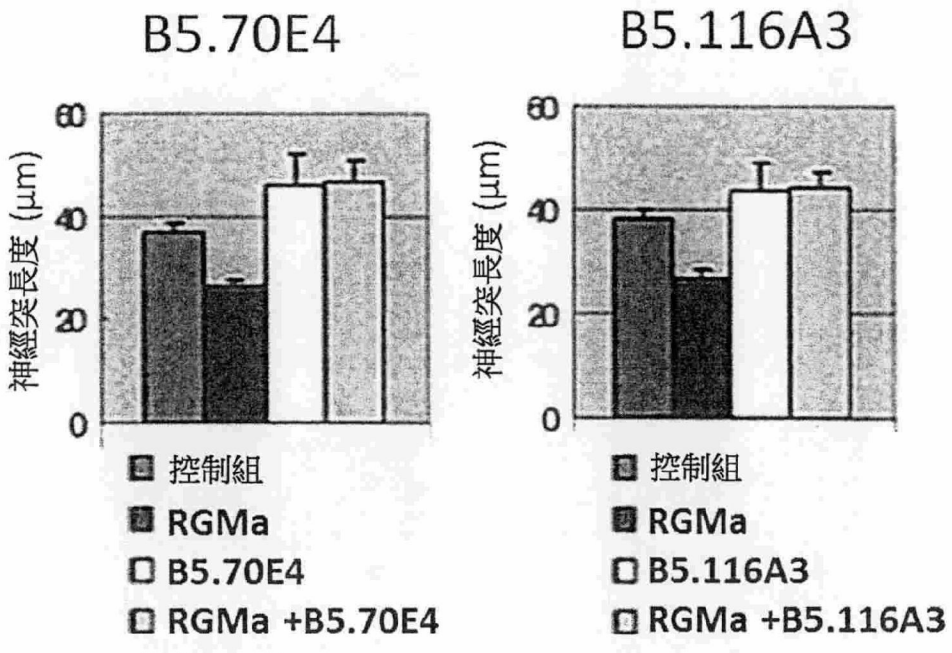


圖 5

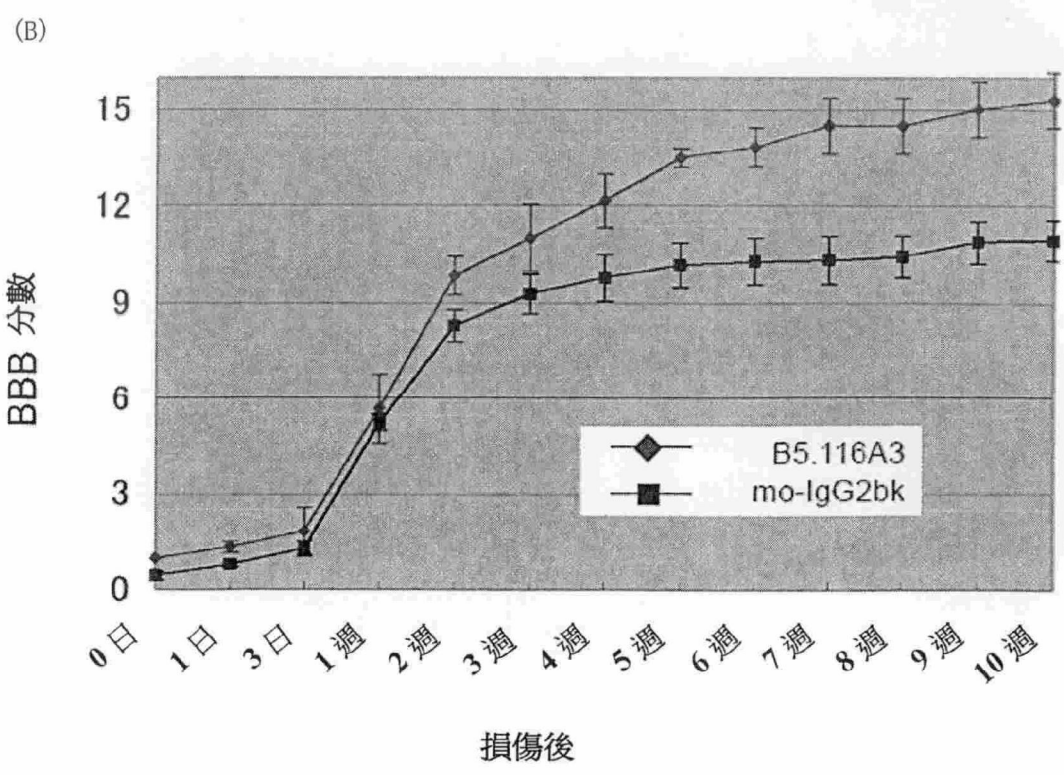
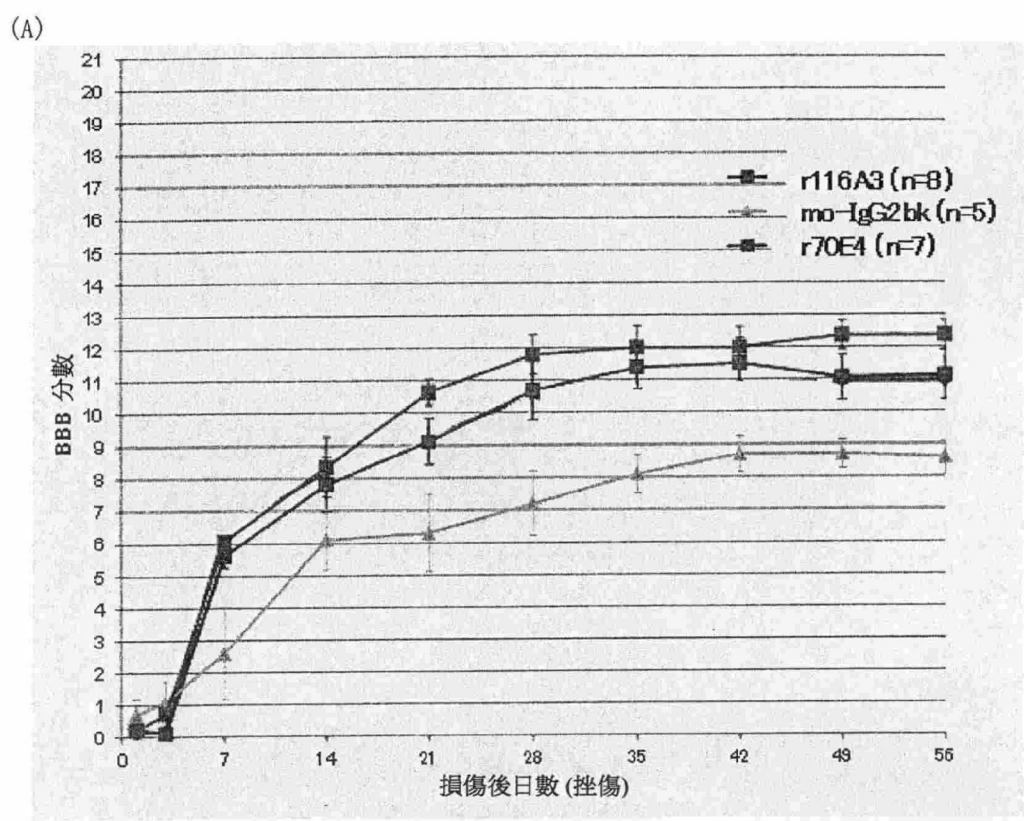


圖 6

