

明 細 書

発明の名称：抗E p h A 4抗体

技術分野

[0001] 本開示は、E p h A 4に結合する抗体、当該抗体をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを含む細胞、当該抗体の作製方法、および、当該抗体を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] E p h A 4は、レセプター型チロシンキナーゼファミリーの1つである。E p h r i n t y p e Aおよびt y p e BがE p h A 4のリガンドとして知られており、E p h A 4とそのリガンドであるe p h r i nが結合すると、脱接着シグナルが誘導される。これまでに、アルツハイマー病（A l z h e i m e r ' s d i s e a s e、以下「AD」とも称する）の病態においてE p h A 4の関与が示唆されており（非特許文献1から4）、E p h A 4とe p h r i nとの結合阻害が、神経伝達のアミロイド β （A β ）^{（1-42）}、オリゴマー媒介機能障害を救済することが報告されている（特許文献1）。ADにおいては、過剰にリン酸化されたタウによって形成される凝集体（神経原線維変化）が神経細胞死に関与していると考えられており（非特許文献5）、また、タウのリン酸化抑制により、シナプス消失の神経変性が抑制されること（非特許文献6および非特許文献7）、および、記憶障害や認知機能障害が改善されることが報告されている（非特許文献8から11）。タウのリン酸化の要因として、CDK5の活性化によることを示唆する報告がある（非特許文献12および非特許文献13）。

[0003] E p h A 4は海馬や大脳皮質で多く発現しており、神経活動依存的にマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、ADAM（a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e i n a s e）および γ セクレターゼによって切断される。このE p h A 4の切断反応が、神経機能に重要な構造体であるスパインを安定化させることが知られている（非特許文献14

）。ADにおいてはスパインの密度が減少していることが報告されており（非特許文献15）、また、NFT stage VおよびVIのADではEphA4の切断断片の減少も確認されていることから、ADの病態にEphA4の切断反応が関与していることが考えられている（非特許文献16）。さらに、スパイン密度の低下がADの臨床症状である認知機能障害と関連することが知られており（非特許文献15および非特許文献17）、また、スパインの安定化（スパイン密度の増加）によりアルツハイマー病モデルにおいて認知機能を改善することも報告されていることから（非特許文献18）、スパインを安定化させることがADの治療可能性を有していることが示唆されている。

[0004] 既存のEphA4阻害薬として、KYLペプチドや化合物1等が知られているが（特許文献2、非特許文献19および非特許文献20）、EphA4の切断を促進する活性を有する抗体については報告がない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2016/019280A1

特許文献2：WO2012/156351A1

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Vargas LM et al., , PLoS One. 2014 Mar 21;9(3)

非特許文献2：Fu AK et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jul 8;111(27):9959-64

非特許文献3：Rosenberger AF et al., Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 16;2:79

非特許文献4：Huang TY et al., J Exp Med. 2017 Dec 4;214(12):3669-3685.

- 非特許文献5: SantaCruz et al., Science. 2005 Jul 15; 309 (5733): 476-81
- 非特許文献6: Seo J et al., J Neurosci. 2017 Oct 11; 37 (41): 9917-9924
- 非特許文献7: Patrick GN et al., Nature. 1999 Dec 9; 402 (6762): 615-22.
- 非特許文献8: Onishi T et al., J Neurochem. 2011 Dec; 119 (6): 1330-40
- 非特許文献9: Belfiore R et al., Aging Cell. 2019 Feb; 18 (1): e12873.
- 非特許文献10: Webster SJ et al., Front Genet. 2014 Apr 23; 5: 88.
- 非特許文献11: Grayson B et al., Behav Brain Res. 2015 May 15; 285: 176-93.
- 非特許文献12: Cancino GI et al., Neurobiol Aging. 2011 Jul; 32 (7): 1249-61.
- 非特許文献13: Vargas LM et al., Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Apr; 1864: 1148-1159.
- 非特許文献14: Inoue E et al., J Cell Biol. 2009 May 4; 185 (3): 551-64
- 非特許文献15: Boros et al., Ann Neurol. 2017 Oct; 82 (4): 602-614
- 非特許文献16: Matsui C et al., Brain Pathol. 2012 Nov; 22 (6): 776-87. doi: 10.1111/j.1750-3639
- 非特許文献17: Akrama A et al., Neurobiol Aging. 2008 Sep; 29 (9): 1296-1307

非特許文献18: Suzuki K et al., Science. 2020 Aug 28; 369 (6507): eabb4853

非特許文献19: Goldshmit et al., PLoS one. 2011; 6 (9): e24636

非特許文献20: Van Hoecke et al., Nature Medicine. 2012 Sep; 18 (9): 1418-22, 2012

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本開示において、EphA4に結合し、EphA4の切断を促進し得る、抗EphA4抗体、および、前記抗体を有効成分として含む医薬組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、EphA4に結合し、EphA4の切断を促進し得る、目的の抗EphA4抗体を完成するに至った。

- [0009] (1) 抗EphA4抗体であって、
前記抗EphA4抗体は、
(a) 配列番号30に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
(b) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および
(c) 配列番号32に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに
(d) 配列番号33に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
(e) 配列番号34に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および
(f) 配列番号35に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖を含む、抗EphA4抗体、
または、
(g) 配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

(h) 配列番号 31 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および
(i) 配列番号 43 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖 ;
ならびに
(j) 配列番号 44 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;
(k) 配列番号 34 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および
(l) 配列番号 35 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖
を含む、抗 E p h A 4 抗体。

[0010] (2) (1) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

抗 E p h A 4 抗体はヒト抗体である、
抗 E p h A 4 抗体。

[0011] (3) (1) または (2) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記抗 E p h A 4 抗体は、E p h A 4 に特異的に結合し、E p h A 4 の切
断を促進する、
抗 E p h A 4 抗体。

[0012] (4) (1) ~ (3) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記抗 E p h A 4 抗体は、E p h A 4 に特異的に結合し、E p h A 4 と e
p h r i n との結合を阻害する、
抗 E p h A 4 抗体。

[0013] (5) (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記重鎖は配列番号 7 に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、
前記軽鎖は配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0014] (6) (1) ~ (5) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記重鎖の定常領域および前記軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸
配列を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0015] (7) (6) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記重鎖の定常領域はヒト I g G の定常領域である、

抗 E p h A 4 抗体。

[0016] (8) (7) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記ヒト I g G の定常領域は、ヒト I g G₂ の定常領域である、
抗 E p h A 4 抗体。

[0017] (9) (8) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記ヒト I g G₂ の定常領域は、配列番号 15 に示すアミノ酸配列を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0018] (10) (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体であって、
、

前記重鎖は配列番号 11 に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、
前記軽鎖は配列番号 12 に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0019] (11) (1) ~ (4) 及び (10) のいずれかに記載の抗 E p h A 4
抗体であって、

前記重鎖の定常領域および前記軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸
配列を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0020] (12) (11) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記重鎖の定常領域はヒト I g G の定常領域である、
抗 E p h A 4 抗体。

[0021] (13) (12) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記ヒト I g G の定常領域は、ヒト I g G₁ とヒト I g G₂ の組み合わせか
らなるヒト I g G の定常領域である、
抗 E p h A 4 抗体。

[0022] (14) (13) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、

前記ヒト I g G₁ とヒト I g G₂ の組み合わせからなるヒト I g G の定常領
域は、配列番号 16 に示すアミノ酸配列を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

- [0023] (15) (6)～(9)および(11)～(14)のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体であって、
前記軽鎖の定常領域は、ヒトI g λの定常領域である、
抗E p h A 4抗体。
- [0024] (16) (15)に記載の抗E p h A 4抗体であって、
前記ヒトI g λの定常領域は、配列番号17に示すアミノ酸配列を含む、
抗E p h A 4抗体。
- [0025] (17) 抗E p h A 4抗体であって、
前記抗E p h A 4抗体は、重鎖および軽鎖を含み、
前記重鎖は、配列番号20に示すアミノ酸配列を含み、かつ
前記軽鎖は、配列番号21に示すアミノ酸配列を含み、
前記重鎖のC末端リシンが欠失されていてもよい、
抗E p h A 4抗体。
- [0026] (18) (17)に記載の抗E p h A 4抗体であって、
前記重鎖のC末端リシンが欠失されている、
抗E p h A 4抗体。
- [0027] (19) 抗E p h A 4抗体であって、
前記抗E p h A 4抗体は、重鎖および軽鎖を含み、
前記重鎖は、配列番号26に示すアミノ酸配列を含み、かつ
前記軽鎖は、配列番号27に示すアミノ酸配列を含み、
前記重鎖のC末端リシンが欠失されていてもよい、
抗E p h A 4抗体。
- [0028] (20) (19)に記載の抗E p h A 4抗体であって、
前記重鎖のC末端リシンが欠失されている、
抗E p h A 4抗体。
- [0029] (21) (1)～(20)のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体をコードする単離された核酸。

- [0030] (22) (21)に記載の核酸を含むベクター。
- [0031] (23) (22)に記載のベクターを含む宿主細胞。
- [0032] (24) (23)に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、抗E p h A 4抗体の作製方法。
- [0033] (25) (1)～(20)のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体を含む、医薬組成物。
- [0034] (26) (25)に記載の医薬組成物であって、少なくとも一つの薬剤学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

発明の効果

- [0035] 本開示において、E p h A 4に結合し、E p h A 4の切断を促進し得る抗E p h A 4抗体、当該抗体をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを含む細胞、当該抗体の作製方法、および、当該抗体を有効成分として含む医薬組成物が提供される。

図面の簡単な説明

- [0036] [図1]図1は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）のヒトE p h A 4に対する結合親和性を示す。
- [図2]図2は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）のヒトE p h A 4－ヒトリガンド結合阻害活性を示す。
- [図3]図3は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）の各ヒトE p h レセプターに対する選択性を示す。
- [図4]図4は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）のマウス、ラット、サルおよびヒトE p h A 4に対する反応性を示す。
- [図5]図5は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）の、ヒトE p h A 4細胞外領域（E C D）、リガンド結合ドメイン（L B D）、フィブロネクチンⅠⅠ型ドメイン1（F N 1）、およびフィブロネクチンⅠⅠ型ドメイン2（F N 2）に対する反応性を示す。
- [図6]図6は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）の海馬ニューロンにおけるE p h A 4切断促進活性を示す。

[図7]図7は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）の海馬ニューロンにおけるヒトE p h A 4切断促進活性を示す。

[図8]図8は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体AおよびB）による海馬ニューロンのスパイン数に対する増加効果を示す。

発明を実施するための形態

[0037] 本明細書で使用される配列番号によって特定またはコードされる領域は下記のとおりである：

SEQ No	配列領域	SEQ No	配列領域
1	ヒトEphA4全長(Aミノ酸配列)	32	抗体Aの重鎖CDR3(Aミノ酸配列)
2	ヒトEphA4の細胞外領域(Aミノ酸配列)	33	抗体Aの軽鎖CDR1(Aミノ酸配列)
3	ヒトEphA4細胞外領域-80P-Hisタグ質(Aミノ酸配列)	34	抗体AおよびBの特異CDR2(Aミノ酸配列)
4	ヒトEphA4細胞外領域-FC-Hisタグ質(Aミノ酸配列)	35	抗体AおよびBの特異CDR3(Aミノ酸配列)
5	ヒトEphA4細胞外領域-80P-Hisタグ質(Aミノ酸配列)	36	抗体Aの重鎖CDR1(核酸配列)
6	ヒトEphA4の7'末端(Aミノ酸配列)	37	抗体Aの重鎖CDR2(核酸配列)
7	抗体Aの重鎖可変領域(Aミノ酸配列)	38	抗体Aの重鎖CDR3(核酸配列)
8	抗体Aの軽鎖可変領域(Aミノ酸配列)	39	抗体Aの軽鎖CDR1(核酸配列)
9	抗体Aの重鎖可変領域(核酸配列)	40	抗体Aの軽鎖CDR2(核酸配列)
10	抗体Aの軽鎖可変領域(核酸配列)	41	抗体Aの軽鎖CDR3(核酸配列)
11	抗体Bの重鎖可変領域(Aミノ酸配列)	42	抗体Bの重鎖CDR1(アミノ酸配列)
12	抗体Bの軽鎖可変領域(Aミノ酸配列)	43	抗体Bの重鎖CDR3(アミノ酸配列)
13	抗体Bの重鎖可変領域(核酸配列)	44	抗体Bの軽鎖CDR1(アミノ酸配列)
14	抗体Bの軽鎖可変領域(核酸配列)	45	抗体Bの重鎖CDR1(核酸配列)
15	抗体Aの重鎖定常領域(1-166)(Aミノ酸配列)	46	抗体Bの重鎖CDR2(核酸配列)
16	抗体Bの重鎖定常領域(1-166)(Aミノ酸配列)	47	抗体Bの重鎖CDR3(核酸配列)
17	抗体AおよびBの軽鎖定常領域(1-166)(Aミノ酸配列)	48	抗体Bの軽鎖CDR1(核酸配列)
18	抗体Aの重鎖定常領域(核酸配列)	49	抗体Bの軽鎖CDR2(核酸配列)
19	抗体Aの軽鎖定常領域(核酸配列)	50	抗体Bの軽鎖CDR3(核酸配列)
20	抗体A重鎖全長(アミノ酸配列)	51	ヒトEphA4全長(アミノ酸配列)
21	抗体Aの軽鎖全長(アミノ酸配列)	52	ヒトEphA4の細胞外領域(アミノ酸配列)
22	抗体Aの重鎖全長(核酸配列)	53	ヒトEphA4全長(アミノ酸配列)
23	抗体Aの軽鎖全長(核酸配列)	54	ヒトEphA4の細胞外領域(アミノ酸配列)
24	抗体Bの重鎖定常領域(核酸配列)	55	ヒトEphA4全長(アミノ酸配列)
25	抗体Bの軽鎖定常領域(核酸配列)	56	ヒトEphA4の細胞外領域(アミノ酸配列)
26	抗体Bの重鎖全長(Aミノ酸配列)	57	ヒトEphA4の7'末端(Aミノ酸配列)
27	抗体Bの軽鎖全長(Aミノ酸配列)	58	ヒトEphA4の7'末端(Aミノ酸配列)
28	抗体Bの重鎖全長(核酸配列)	59	ヒトEphA4の7'末端(Aミノ酸配列)
29	抗体Bの軽鎖全長(核酸配列)	60	ヒトEphA4の7'末端(Aミノ酸配列)
30	抗体Aの重鎖CDR1(Aミノ酸配列)	61	80P-Hisタグ質(Aミノ酸配列)
31	抗体AおよびBの重鎖CDR2(Aミノ酸配列)		

[0038] 本開示は、E p h A 4に結合する抗E p h A 4抗体に関する。

本開示に係る抗E p h A 4抗体は、E p h A 4を認識して結合することが

できる抗体であり、以下に述べるように、当該抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは、E p h A 4 との結合親和性を有する限り、合成抗体（例えば組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体等）であってもよい。本明細書において、E p h A 4 は、ヒト、マウス、ラットおよびサル由来のE p h A 4 を指すものと理解することができる。ヒト、マウス、ラットおよびサル由来のE p h A 4 は、米国生物工学情報センターが提供するG e n b a n k 等、配列情報が登録された公共のデータベースから入手できるほか、近縁関係にある動物種のE p h A 4 の塩基配列情報を元にプライマーを設計し、所望の動物種から抽出したR N A からクローニングすることで、E p h A 4 遺伝子の配列情報を入手することが可能である。例えば、ヒト、マウス、ラット、サルのE p h A 4 の塩基配列情報は、それぞれG e n b a n k A c c e s s i o n N o. N M _ 0 0 4 4 3 8 . 5、N M _ 0 0 7 9 3 6 . 3、N M _ 0 0 1 1 6 2 4 1 1 . 1、N M _ 0 0 1 2 6 0 8 7 0 . 1 としてデータベース上に登録されている。

[0039] 一態様において、抗E p h A 4 抗体は、E p h A 4 に特異的に結合する抗体である。「特異的な結合」という用語は、当該技術分野において当業者に周知の用語であり、抗体またはその抗原結合断片の、抗原やエピトープに対する特異的な結合を決定するための方法も周知である。一実施形態において、「特異的な結合」は、抗E p h A 4 抗体が、他の標的分子に結合するよりも、より大きな結合親和性、結合活性で、より迅速に、および／または、より長時間持続して、E p h A 4 に免疫学的反応により結合可能であると理解される。これは、E p h A 4 に特異的に結合する抗体が他の標的分子に結合しないことを意味するものではない。別の実施形態において、「特異的な結合」は、E p h A 4 に対して少なくとも約 10^{-7} M、または少なくとも約 10^{-8} M、または少なくとも約 10^{-9} M、またはそれ以下のK D を持つ抗体によって示されうる。また、さらに別の実施形態では、「特異的な結合」は、E p h A 4 と免疫学的反応により結合するが、E p h レセプターの他のファミリー分子とは実質的に結合しないと理解される。

- [0040] 一態様において、抗E p h A 4抗体は、E p h A 4の細胞外領域に結合する抗体である。一実施形態において、抗E p h A 4抗体は、E p h A 4の細胞外領域のうちリガンド結合ドメイン（L B D）に結合する抗体である。
- [0041] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体は、E p h A 4に特異的に結合し、E p h A 4の切断を促進することができる。特定の実施形態において、抗E p h A 4抗体は、E p h A 4に特異的に結合し、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）やADAM（a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e i n a s e）によるE p h A 4細胞外ドメインの切断を促進することができる。
- [0042] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体は、E p h A 4に特異的に結合し、E p h A 4とそのリガンドであるe p h r i nとの結合を阻害することができる。
- [0043] 別の実施形態において、抗E p h A 4抗体は、E p h A 4に特異的に結合し、海馬ニューロンのスパイン数を増加または海馬ニューロンのスパインを安定化することができる。
- [0044] 本開示は、一実施形態において、ヒトE p h A 4、マウスE p h A 4、ラットE p h A 4、およびサルE p h A 4のうちの少なくとも1つに特異的に結合し、そのリガンドとの結合を阻害することができる抗E p h A 4抗体を包含する。本開示は、別の実施形態において、ヒトE p h A 4、マウスE p h A 4、ラットE p h A 4、およびサルE p h A 4のうち2つ以上に特異的に結合し、そのリガンドとの結合を阻害することができる抗E p h A 4抗体を包含する。本開示は、さらに別の実施形態において、ヒトE p h A 4、マウスE p h A 4、ラットE p h A 4、およびサルE p h A 4の全てと特異的に結合し、そのリガンドとの結合を阻害することができる抗E p h A 4抗体を包含する。
- [0045] 抗E p h A 4抗体の、抗原への結合特性（例えば、結合親和性および種交差反応性）を測定する方法は、当該技術分野において当業者に公知の方法を用いてよい。例えば、結合親和性は、B i a c o r e（登録商標）バイオセ

ンサー、KinExAバイオセンサー、シンチレーション近接アッセイ、ELISA、ORIGEN免疫測定法（ORIGEN社）、フローサイトメトリー、蛍光消光、蛍光転移、酵母ディスプレイ、および／または、免疫染色を使用して測定してよいが、これらに限定されない。抗EphA4抗体の、EphA4とそのリガンドの結合に対する中和活性は、Biacore（登録商標）バイオセンサー、ELISA、および／または、フローサイトメトリーを使用して測定してよいが、これらに限定されない。

[0046] 本開示に係る抗EphA4抗体は、EphA4と結合する限り、モノクローナル抗体であってよい。

[0047] 本開示に係る抗EphA4抗体は、IgG、IgAまたはIgM（またはこれらのサブクラス）等の任意のクラスであってよく、特定のクラスに限定されない。重鎖（H鎖と呼ぶこともある）の定常領域の抗体アミノ酸配列により、免疫グロブリンは、異なるクラスに分類される。5つの主要な免疫グロブリンのクラス：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらの幾つかは、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、ならびにIgA₁およびIgA₂というサブクラス（アイソタイプ）にさらに細分化され得る。異なるクラスの免疫グロブリンの対応する重鎖の定常領域は、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれている。また、抗体の軽鎖（L鎖と呼ぶこともある）の種類には λ 鎖および κ 鎖が存在する。

[0048] 本開示に係る抗EphA4抗体は、IgG抗体であってよく、例えば、IgG₁抗体またはIgG₂抗体等であってよい。また、本開示に係る抗EphA4抗体は、場合により、単量体、二量体または多量体の形態であってよい。

[0049] 本開示に係る抗EphA4抗体は、異なるサブクラスのIgG抗体の組み合わせであってよく、例えば、IgG₁およびIgG₂の組み合わせからなるヒトIgG（本開示においてヒトIgG_{1/2}ともいう）抗体等であってよい。

[0050] 本開示に係る抗体の可変領域は、抗体軽鎖の可変領域および／または抗体重鎖の可変領域を意味してよく、抗体の定常領域は、抗体軽鎖の定常領域お

よび／または抗体重鎖の定常領域を意味してよい。重鎖および軽鎖の可変領域は、それぞれ、相補性決定領域としても知られる3つのCDRにより連結される4つのフレームワーク領域（FR）からなる。各鎖におけるCDRは、FRにより、近傍に保持されており、他方の鎖におけるCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。CDRを決定するための技術としては、異種間配列可変性に基づくアプローチであるKabatナンバリングシステム（Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD）が用いられる。

[0051] 一実施形態において、本開示に係る抗EphA4抗体は、ヒト抗体由来の重鎖定常領域および／または軽鎖定常領域を含む。

[0052] 本明細書において、モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体のポピュレーションから得られる抗体を意味してよい。すなわち、そのポピュレーションに含まれる個々の抗体は、若干存在し得る可能性のある天然の突然変異体を除いて同一である。モノクローナル抗体は、単一抗原部位に対するものであり、非常に特異的である。さらに、異なる抗原や異なるエピトープを標的とする典型的なポリクローナル抗体とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一のエピトープを標的とするものである。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体ポピュレーションから得られる抗体の特性を示し、特定の方法による抗体の生産を必要とするものとして限定的に解されるべきではない。

[0053] 本開示において、ヒト抗体は、可変領域および定常領域の配列がヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体を意味するが、ヒト免疫グロブリン配列に由来するものである限り、例えば、標的に対する結合親和性を増加させたり、免疫原性を低下させたり、安定性を増加させる改変のほか、非ヒト細胞によって産生される抗体の不均一性を減少させるための改変など、所望の修飾が導入された配列を含む抗体を包含する。

- [0054] ヒト抗体の機能を保持させたまま（あるいは、当該抗体の機能を付加、向上させるために）適宜改変（例えば、抗体の修飾、または、抗体のアミノ酸配列の部分的な置換、付加および／または欠失）した抗体も、本開示に係る抗EphA4抗体に含まれる。より具体的には、抗体のエフェクター機能を修飾するために定常領域のアミノ酸配列を改変した抗体も本開示の範囲に含まれ、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および／または抗体依存性細胞食作用（ADCP）活性を低下させるために、ヒトIgG₂抗体のEu numberingにおける234位のバリン（Val）がアラニン（Ala）に置換され、237位のグリシン（Gly）がアラニン（Ala）に置換された抗体等も本開示の範囲に含まれる。さらに、本開示に係る抗EphA4抗体のCDR配列を有する抗原結合部位と共に、異なる抗原に結合する抗原結合部位を併せ持つ二重特異性抗体（Kontermann（2012），mAbs 4，182－97）も本開示の範囲に含まれる。
- [0055] ヒト抗体は、当該技術分野で公知の方法によって製造することができる。例えば、本開示のヒト抗体は、公知のファージディスプレイヒト抗体ライブラリー（ナイーブラライブラリー、合成ライブラリーなど）から、EphA4と結合親和性のある抗体を取得し、その可変領域の配列を決定し、所望のヒト定常領域の配列と組み合わせて非ヒト動物細胞に導入することで、組換え抗体として製造することができる。
- [0056] あるいは、ヒト抗体は、多くの非ヒトトランスジェニック動物（そのゲノムの中にヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子座のうちのいくらかもしくは全てを含む）のうちのいずれかを、EphA4抗原で免疫することによって生成することができる。一実施形態において、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン「ミニ遺伝子座」を有する動物（例えば、GenPharm International， Inc.）である。いくつかの実施形態において、ヒト抗体は、XenoMouse（登録商標）マウス（Abgenix， Inc.， Fremont， CA）、HuMAb-Mouse（登録商標）マウス（Medarex，

Inc.)、VelocImmune (登録商標) マウス (Regeneration Pharmaceuticals, Inc.)、AlivamaB マウス (Ablexis, LLC) などを使用して、生成することができる。

[0057] 本開示に係る抗EphA4抗体は、所望により、修飾してもよい。抗EphA4抗体の修飾は、(a) 例えばシートまたはヘリックスコンホメーション等の、修飾領域におけるアミノ酸配列の三次元的な構造；(b) 標的部位での分子の電荷または疎水性の状態；または、(c) 側鎖の容積の維持に対する修飾の効果、を変化させる修飾であってもよく、あるいはこれらの変化が明白に観察されないような修飾であってもよい。

[0058] 本開示に係る抗EphA4抗体の修飾は、例えば、構成するアミノ酸残基の置換、欠失、付加等によって達成してよい。

[0059] 本明細書において、アミノ酸とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸、例えばセリン (Ser)、アスパラギン (Asn)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、アラニン (Ala)、チロシン (Tyr)、グリシン (Gly)、リシン (Lys)、アルギニン (Arg)、ヒスチジン (His)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln)、スレオニン (Thr)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、プロリン (Pro) のみならず、アミノ酸変異体および誘導体といった、非天然アミノ酸も含まれる。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えばL-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 β -アラニン、オルニチン等、生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸；および当業者に公知のアミノ酸の特性を有する、化学的に合成された化合物等が挙げられることを当然に理解する。非天然アミノ酸の例としては、 α -メチルアミノ酸 (α -メチルアラニン等)、D-アミノ酸 (D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸等)、ヒスチジ

ン様アミノ酸（2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチルーヒスチジン、 α -メチルーヒスチジン等）、側鎖に余分なメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）および側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸等）等が挙げられる。

[0060] 天然に存在するアミノ酸残基は、例えば、一般的な側鎖特性に基づいて、次のグループに分類され得る：

- (1) 疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Asn、Gln、Cys、Ser、Thr；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；および
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0061] 抗体を構成するアミノ酸配列の非保存的置換は、これらのグループの1つに属するアミノ酸を他のグループに属するアミノ酸と交換することにより行ってもよい。より保存的な置換は、これらのグループの1つに属するアミノ酸を同一グループの他のアミノ酸と交換することにより行ってもよい。同様に、アミノ酸配列の欠失または置換を適宜行ってもよい。

[0062] 抗体を構成するアミノ酸の修飾としては、例えば、糖によるグリコシル化、アセチル化またはリン酸化等の翻訳後修飾であってもよい。抗体は、その定常領域における保存された位置でグリコシル化され得る。抗体のグリコシル化は、通常、N-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖に対する糖質部分の結合を意味する。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-スレオニン、および、アスパラギン-X-システイン（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖に対する糖質部分を酵素的に付加するための認識配列である。これらのトリペプチド配列のいずれかが抗体に存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が存在する。O-結合型グ

リコシル化は、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、または、キシロースのいずれかの、ヒドロキシアミノ酸（例えば、セリンまたはスレオニン）への結合であってよく、場合により、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンへの結合であってもよい。グリコシル化の条件（グリコシル化を、生物学的手法を用いて行う場合には、例えば、宿主細胞や細胞培地の種類、pH等）を、当業者は目的に応じて適宜、選択することができる。

[0063] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、さらに、当業者に公知の技術常識に基づいて、その他の修飾方法により、単独または組み合わせて、修飾されてよい。

[0064] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、当業者に周知の方法によって產生することができる。例えば、本開示に係る抗E p h A 4抗体をコードする核酸を発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターを宿主細胞に導入し、当該宿主細胞を培養することによって抗体を産生させてもよい。したがって、本開示は、抗E p h A 4抗体をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを含む宿主細胞、および当該宿主細胞を培養する工程を含む抗E p h A 4抗体の作製方法を包含する。

[0065] 本開示に係る抗E p h A 4抗体をコードする核酸は、シグナル配列をコードするDNAを有してもよく、重鎖可変領域をコードするDNA、および、軽鎖可変領域をコードするDNAの5'末端にシグナル配列をコードするDNAを有してもよい。シグナル配列は、分泌タンパク質や膜内在性タンパク質が、リボソーム上で合成された後に、脂質2重層を通り抜けるのに必要な、タンパク質のN末端に存在するアミノ酸残基であり、本開示においては、この機能を有する配列であれば特に限定されるものではない。本開示に係る抗E p h A 4抗体が含み得るシグナル配列としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ロバ、ヤギ、ウマ、トリ、イヌ、ネコ、酵母等に由来するシグナル配列が挙げられる。

[0066] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、当業者に公知の方法に従って、単離ま

たは精製されたものであってよい。

[0067] 本明細書において、「単離された」または「精製された」は、自然の状態から、人為的に単離されたか、精製されたことを意味する。分子または組成物が自然に発生したものである場合、それが変化したかもしくは本来の環境から除去されたか、またはその両方であるとき、それは「単離された」かまたは「精製された」である。単離または精製の方法の例としては、電気泳動的、分子生物学的、免疫学的またはクロマトグラフィー的手法等が挙げられ、具体的には、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相HPLCクロマトグラフィー、等電点電気泳動、または、アルカリ抽出法等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0068] 一実施形態において、抗EphA4抗体は、以下のCDRを含んでいる：

- (a) 配列番号30に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
- (b) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；
- (c) 配列番号32に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；
- (d) 配列番号33に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (e) 配列番号34に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および
- (f) 配列番号35に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3。

[0069] 一実施形態において、抗EphA4抗体は、以下のCDRを含んでいる：

- (g) 配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
- (h) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；
- (i) 配列番号43に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；
- (j) 配列番号44に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (k) 配列番号34に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および
- (l) 配列番号35に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3。

[0070] 一実施態様において、前記抗EphA4抗体はヒト抗体である。

[0071] 別の実施形態において、抗EphA4抗体は、重鎖および軽鎖を含んでおり、前記重鎖は、配列番号7または11に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、および／または、前記軽鎖は、配列番号8または12に示すアミ

ノ酸配列からなる可変領域を含んでいる。なお、当該実施形態において、前記重鎖の可変領域および／または前記軽鎖の可変領域は、配列番号7または11に示すアミノ酸配列、および／または、配列番号8または12に示すアミノ酸配列において、1個または複数個のアミノ酸が置換、付加および／または欠失したアミノ酸配列を含んでもよい。ここで、「複数個」は、E p h A 4に対する結合親和性を保持し、E p h A 4の切断を促進する限り限定されないが、2個～15個、または2個～10個、例えば、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個または2個であり、またはアミノ酸配列中のアミノ酸数の10%以内、例えば9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内または1%以内である。

[0072] 特定の実施形態において、抗E p h A 4抗体は、重鎖および軽鎖を含んでおり、前記重鎖は、配列番号7に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、前記軽鎖は、配列番号8に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含んでいる。

[0073] 特定の実施形態において、抗E p h A 4抗体は、重鎖および軽鎖を含んでおり、前記重鎖は、配列番号11に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、前記軽鎖は、配列番号12に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含んでいる。

[0074] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、ヒトI g G₂の定常領域を含んでいる。特定の実施形態において、ヒトI g G₂の定常領域は、配列番号15のアミノ酸配列を含んでいる。

[0075] 別の実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、ヒトI g G₁およびI g G₂の組み合わせからなるヒトI g Gの定常領域を含んでいる。特定の実施形態において、ヒトI g G₁およびI g G₂の組み合わせからなるヒトI g Gの定常領域は、配列番号16のアミノ酸配列を含んでいる。

[0076] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、ヒトI g λの定常領域を含んでいる。特定の実施形態において、ヒトI g λの定常領域は、配列番号17のアミノ酸配列を含んでいる。

- [0077] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号20に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号21に示すアミノ酸配列を含む。
- [0078] 別の実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号20に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号21に示すアミノ酸配列を含んでおり、重鎖のC末端リシンが欠失されていてもよい。
- [0079] 特定の実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号20に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号21に示すアミノ酸配列を含んでおり、重鎖のC末端リシンが欠失されている。
- [0080] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号26に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号27に示すアミノ酸配列を含む。
- [0081] 別の実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号26に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号27に示すアミノ酸配列を含んでおり、重鎖のC末端リシンが欠失されていてもよい。
- [0082] 特定の実施形態において、抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号26に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号27に示すアミノ酸配列を含んでおり、重鎖のC末端リシンが欠失されている。
- [0083] 別の実施形態において、例えば、抗体産生細胞により産生される抗体の不均一性を減少させる等の理由から（米国特許出願公開第2010/0297697号明細書やL i u H e t a l. , M A b s. 2014 S e p - O c t ; 6 (5) : 1145 - 1154）、抗E p h A 4抗体は、重鎖のC末端（カルボキシ末端）に位置するリシンが欠失されていてもよい。本開示において、重鎖のC末端リシンが欠失されている抗E p h A 4抗体には、重鎖のC末端リシンを遺伝子改変によって欠失させた抗E p h A 4抗体やカルボキシペプチダーゼ等によって翻訳後に重鎖のC末端リシンが切断さ

れた抗E p h A 4 抗体等も含まれる。また、本開示において、重鎖のC末端リシンが欠失されている抗E p h A 4 抗体には、両方の重鎖においてC末端リシンが欠失されている抗E p h A 4 抗体だけでなく、片方のみの重鎖においてC末端リシンが欠失されている抗E p h A 4 抗体も含まれる。

[0084] 一態様において、本開示は、抗E p h A 4 抗体をコードする単離された核酸に関する。抗E p h A 4 抗体をコードする単離された核酸は、抗E p h A 4 抗体の重鎖および／または軽鎖をコードする一以上の核酸分子を指す。一実施形態において、本開示に係る核酸は抗E p h A 4 抗体の重鎖をコードする。別の実施形態において、本開示に係る核酸は抗E p h A 4 抗体の軽鎖をコードする。さらに別の実施形態において、本開示に係る核酸は、抗E p h A 4 抗体の重鎖および軽鎖をコードする。本開示に係る核酸には、抗E p h A 4 抗体の重鎖をコードする第一の核酸分子、および抗E p h A 4 抗体の軽鎖をコードする第二の核酸分子も含まれる。

[0085] 別の態様において、本開示は、抗E p h A 4 抗体をコードする単離された核酸を含むベクターに関する。本開示に係るベクターは、抗E p h A 4 抗体をコードする単離された核酸を含む一以上のベクターを指す。一実施形態において、本開示に係るベクターは、抗E p h A 4 抗体の重鎖をコードする核酸および抗E p h A 4 抗体の軽鎖をコードする核酸を含むベクターである。別の実施形態において、本開示に係るベクターは、抗E p h A 4 抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸を含むベクターである。さらに別の実施形態において、本開示に係るベクターは、抗E p h A 4 抗体の重鎖をコードする核酸を含む第一のベクター、および抗E p h A 4 抗体の軽鎖をコードする核酸を含む第二のベクターを含む。本開示に係るベクターは、特にこれらに限定されるものではないが、プラスミド、コスミド、ウイルス、ファージ等であってよい。例えば、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたは単純ヘルペスウイルスベクター等も本開示に係るベクターに含まれる。

[0086] さらに別の態様において、本開示に係るベクターを含む宿主細胞、および

当該宿主細胞を培養する工程を含む抗E p h A 4抗体の作製方法も本開示に含まれる。本開示に係る宿主細胞は、特にこれらに限定されるものではないが、大腸菌細胞、サルC O S細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、N S O細胞等であってよい。一実施形態において、抗E p h A 4抗体の作製方法は、宿主細胞を培養する工程、および当該宿主細胞（または宿主細胞の培養培地）から分泌された抗E p h A 4抗体を回収する工程を含む。

[0087] 一態様において、本開示は、抗E p h A 4抗体を含む医薬組成物に関する。本開示に係る医薬組成物は、例えば、日本薬局方（J P）、米国薬局方（U S P）または欧州薬局方（E P）に記載された方法等、既知の方法に従って製造することができる。

[0088] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、アルツハイマー病の治療に有用であり得る。すなわち、一態様において、本開示は、抗E p h A 4抗体を含む、アルツハイマー病の治療のための医薬組成物を包含する。他の態様において、治療上有効量の抗E p h A 4抗体をアルツハイマー病の対象に投与する工程を含む、アルツハイマー病の治療方法を包含する。また、本開示は、他の態様において、アルツハイマー病の治療薬を製造するための、抗E p h A 4抗体の使用を包含する。本開示は、他の態様において、アルツハイマー病の治療において使用するための抗E p h A 4抗体を包含する。

[0089] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、治療法において単独か、または、その他の薬剤または組成物と併用して用いることができる。例えば本開示に係る抗E p h A 4抗体は、別の薬剤と同時または異時に投与されてよい。このような併用療法には、併用投与（同じかまたは別々の製剤に2以上の薬剤が含まれる）および分離投与（例えば同時にまたは連続的に）が含まれる。2以上の薬剤を別々に投与する場合、本開示に係る抗E p h A 4抗体の投与は、付随する治療法に先立つか、または続いて行われてよい。

[0090] 本開示に係る医薬組成物を投与する対象は限定されず、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（サル、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、ヤギ等）に対して用いることができる。

- [0091] 本開示に係る医薬組成物の対象への投与方法（投与経路、投与量、1日の投与回数、投与のタイミング、等）は限定されず、対象の健康状態、疾患の程度、併用する薬剤の種類等に応じて、当業者（例えば、医師）が適宜決定することができる。
- [0092] 技術的に矛盾しない限り、本明細書に記載の、あらゆる態様の任意の一または複数を、適宜組み合わせ、本開示を実施してよいことを当業者は理解する。さらに、技術的に矛盾しない限り、本明細書に記載の、好ましいまたは有利なあらゆる態様を、適宜組み合わせ、本開示を実施することが好ましいであろうことを当業者は理解する。
- [0093] 本明細書中に引用される文献は、参照により、それらのすべての開示が、明確に本明細書に援用されているとみなされるべきであって、当業者は、本明細書の文脈に従って、本開示の精神および範囲を逸脱することなく、それらの文献における関連する開示内容を、本明細書の一部として援用して理解できる。
- [0094] 本明細書中に引用される文献は、本出願の出願日前の関連技術の開示のみを目的として提供され、本発明者らが、先行発明または任意の他の理由によって、かかる開示に先行する権利を持たないことを自認するものとして解釈されてはならない。これらの文献のすべての記述は、本出願人が入手可能であった情報に基づいており、これらの記述内容が正確であるという自認を何ら構成しない。
- [0095] 本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。
- [0096] 本明細書において用いられる「を含む（comprise）」という用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記載された事項（部材、ステップ、要素または数字等）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素または数字等）が存在することを排除しない。「からなる（consist of）」という用語は、「からなる（consist of）」および／または「実質的に～からなる（con

s i s t e s s e n t i a l l y o f) 」という用語で記載される態様を包含する。

[0097] 本明細書において用いられる「中和活性」という用語は、E p h A 4 とそのリガンドの結合を阻害する活性、および／または、E p h A 4 がそのリガンドの結合によりヒト生体内で誘導する、シグナル伝達や、細胞の分子発現応答もしくは機能性変化を阻害する活性を意味する。

[0098] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語および科学用語を含む。）は、本開示が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書および関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、または、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0099] 第 1 の、第 2 の等の用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はこれらの用語自身によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第 1 の要素を第 2 の要素と記し、同様に、第 2 の要素は第 1 の要素と記すことは、本開示の範囲を逸脱することなく可能である。

[0100] 本明細書において、成分含有量や数値範囲等を示すのに用いられる数値は、特に明示がない限り、用語「約」で修飾されているものと理解されるべきである。例えば、「4℃」とは、特に明示がない限り、「約4℃」を意味するものと理解され、その程度を、当業者は技術常識と本明細書の文意に従って、合理的に理解できることは当然である。

[0101] 文脈上明白に他の意味を示す場合を除き、本明細書および請求の範囲で使用される場合、単数形で表される各態様は、技術的に矛盾しない限り、複数形であってもよいことが理解され、逆もまた真である。

[0102] 以下において、本開示を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本開示はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載

される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。関連技術分野の当業者は、本開示の精神または範囲を変更させることなく、様々な改変、付加、欠失、置換等を伴って本開示を実施できる。

実施例

[0103] 実施例 1 : ヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体の作製

ヒト E p h A 4 (Genbank Accession No. NP_004429.1、配列番号 1) に結合するモノクローナル抗体を作製するため、ヒト E p h A 4 の細胞外領域 (20~547 位) (配列番号 2) に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) およびヒスチジンタグを融合したタンパク質 (以下、「ヒト E p h A 4 細胞外領域-SEAP-His タンパク質」という、配列番号 3)、ヒト E p h A 4 の細胞外領域にヒト I g G₁ の Fc 領域 (Fc) およびヒスチジンタグを融合したタンパク質 (以下、「ヒト E p h A 4 細胞外領域-Fc-His タンパク質」という、配列番号 4) ならびにヒト E p h A 4 の細胞外領域にマルトース結合タンパク質 (MBP) およびヒスチジンタグを融合したタンパク質 (以下、「ヒト E p h A 4 細胞外領域-MBP-His タンパク質」という、配列番号 5) を以下の工程により調製した。

[0104] 最初に、p c D N A 3.1-ヒト E p h A 4 細胞外領域-SEAP-His 発現ベクター、p c D N A 3.1-ヒト E p h A 4 細胞外領域-Fc-His 発現ベクターおよび p c D N A 3.4-ヒト E p h A 4 細胞外領域-MBP-His 発現ベクターを構築した。まず、ヒト E p h A 4 のシグナル配列 (配列番号 6) と細胞外領域をコードする DNA 配列をヒトの脳由来の T o t a l RNA を用いて、RT-PCR によって増幅し、SEAP およびヒスチジンタグをコードする DNA 配列を有する p E N T R 1 A ベクター (Invitrogen/Life Technologies) または、Fc およびヒスチジンタグをコードする DNA 配列を有する p E N T R 1 A ベクター (Invitrogen/Life Technologies) の S a l I /N o t I サイトにクローニングした。次に、ヒトの E p h A 4 のシグ

ナル配列と細胞外領域、SEAPおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列または、ヒトのEphA4のシグナル配列と細胞外領域、FcおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列をGateway System (Invitrogen/Life Technologies) のLR反応により、pcDNA3.1__rfcBベクターに移し、pcDNA3.1-ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターおよびpcDNA3.1-ヒトEphA4細胞外領域-Fc-His発現ベクターを構築した。pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域-MBP-His発現ベクターについては、ヒトEphA4のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列をPCRによって増幅し、MBPおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.4ベクター (Invitrogen/Life Technologies) にクローニングして、ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質の発現ベクターを構築した。Expi293発現システム (Thermo Scientific) を用いて、上記それぞれの発現ベクターをExpi293F細胞 (Thermo Scientific) へ形質移入した。4日後に培養液を回収し、細胞を除いて清澄化した。TALONレジン (Takara) を用いて精製を行い、透析によりPBS (FUJIFILM Wako Pure) にバッファー置換した。

- [0105] ヒトEphA4タンパク質および完全ヒト抗体合成ファージライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、ヒトEphA4と特異的に結合するヒト抗体フラグメント (scFv) を得た。Dynabeads磁気ビーズ (Thermo Scientific)、あるいはニッケルプレート (Pierce) を用いてヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質をキャプチャーし、完全ヒト抗体合成ファージライブラリーを添加して、1時間、あるいは2時間後に、未結合ファージをPBS-Tween (0.1 % v/v) またはPBSを使用して一連の洗浄サイクルによって除去した。結合したファージ粒子を溶出させた後、大腸菌TG1宿主細胞に感染を介し

て増幅した。感染 T G 1 細胞を回収し、プレート上にまき、30℃でインキュベートした。このパンニング処理を、増幅したファージを用いてさらに2回行った。

[0106] 3回のパンニング後、濃縮されたファージを感染させた T G 1 細胞から単一コロニーを用いて、96ウェルプレート中の培地に植菌した。IPTGの添加により、FLAGタグを付加した s c F v の発現を誘導し、30℃で一晩振動培養した。T G 1 細胞をスピンドウンし、s c F v を含む大腸菌培養上清を用いて、ヒト E p h A 4 に対する反応性を有するウェルをピックアップした。

[0107] ヒトの E p h A 4 に対する反応性は、ヒト E p h A 4 細胞外領域-Fc-His タンパク質またはヒト E p h A 4 細胞外領域-MBP-His タンパク質を用い、以下の工程に従って E L I S A にて評価した。抗 FLAG 抗体 (S I G M A) を、96ウェルプレート (N u n c) のウェル上にコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、2%スキムミルク (B D) により、ウェルを室温にて2時間ブロッキングした。0.02% T w e e n 2 0 / P B S (ナカライテスク) で3回洗浄した後、各ウェルにヒト E p h A 4 細胞外領域-Fc-His タンパク質またはヒト E p h A 4 細胞外領域-MBP-His タンパク質と (最終濃度 20 nM)、s c F v を含む大腸菌培養上清を各ウェルに添加し、室温にて2時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 His 抗体 (M B L) を加え、室温にて1時間インキュベートした。5回洗浄した後、ウェルに T M B Z (3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン、K P L) 溶液を加え、15 ~ 20分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (1 N H₂SO₄、F U J I F I L M W a k o P u r e) を加え、マイクロプレートリーダー (T h e r m o S C I E N T I F I C) により 450 nm の吸光度を読み取った。スクリーニングの結果、ヒト E p h A 4 特異的なヒト抗体フラグメントを選抜し、シークエンスを行って各フラグメントの遺伝子配列を決定した。

- [0108] 得られたヒト抗体フラグメント (s c F v) の可変領域をコードする D N A 配列を、それぞれ抗体重鎖および軽鎖定常領域を発現するベクターにサブクローニングすることによってクローンを s c F v から I g G 形式に変換した。E x p i 2 9 3 発現システム (T h e r m o F i s h e r) を用いて、ヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体をコードする遺伝子配列を含む発現ベクター (p c D N A 3. 4) を E x p i 2 9 3 F 細胞 (T h e r m o F i s h e r) へ形質移入した。上清を回収し、M a b S e l e c t S u R e (C y t i v a) を用いてヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体を得た。得られたヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体については、E p h A 4 に対する切断促進活性や E p h A 4 に対する特異性、E p h A 4 シグナルの下流分子のリン酸化状態、免疫原性等の観点から候補を絞った。免疫原性は E p i S c r e e n (登録商標) (A b z e n a) を用いて評価した。これら一連の評価においては、ヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体の重鎖と軽鎖を組み替えた抗体や C D R に変異を導入した抗体も作製し、全部で 3 0 0 以上のヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体を評価した。
- [0109] 得られたヒト抗 E p h A 4 モノクローナル抗体の E p h A 4 に対する切断促進活性は、ラット海馬ニューロンを用いて評価した。ラット海馬ニューロンの調製は、以下の工程に従って行った。妊娠 1 8 日目のラット (日本チャールズ・リバー) から胎仔を取り出し、頭部を切開して脳を取り出した。実体顕微鏡下で海馬領域を切り出したのち、d i g e s t i o n 溶液 (1 3 7 m M N a C l (和光純薬), 5 m M K C l (和光純薬), 7 m M N a₂ H P O₄ (和光純薬), 2 5 m M H e p e s (D O J I N D O)、0. 5 m g / m L D N a s e (S i g m a), 0. 2 5 % トリプシン (L i f e t e c h n o l o g i e s)) に入れて 3 7 ° C で 1 0 分間振とうした。溶液を除き、2 0 % F e t a l b o v i n e s e r u m / H a n k s 緩衝液 (S i g m a) を加えた。液を除いて、H a n k s 緩衝液で 2 回洗浄したのち、H a n k s 緩衝液中で海馬組織をピペティングして細胞懸濁液を作製した。培養液 (N e u r o b a s a l m e d i u m (L i f e t e c h

nologies)、1×B-27 supplement (Life technologies)、0.5mM L-グルタミン (Life technologies))を入れたポリLリジンコートした96ウェルディッシュ (Falcon) に細胞を播種した。

[0110] 海馬ニューロンを用いたEphA4切断促進活性評価は、以下の工程に従って行った。96ウェルディッシュ (Falcon) に播種したラット海馬ニューロンに、抗EphA4モノクローナル抗体 (20nM) およびγセクレターゼ阻害薬であるCompound E (50nM、Enzo Life Sciences) を処置して24時間後にPBS (和光純薬) で洗浄して、SDS sample buffer (Laemmli サンプルバッファー (バイオ・ラッド)、5% 2-メルカプトエタノール (バイオ・ラッド)) を加えて細胞を回収し、5分間煮沸した。SDS-PAGEならびにウェスタンブロッティングによる分析あるいは全自動ウェスタンシステム Jess (プロテインシンプル) による分析を、抗EphA4モノクローナル抗体 (Abnova) を用いて行い、バンド強度を定量化したのち、EphA4 C末端フラグメント/全長EphA4の値を算出した。

[0111] 上記のEphA4切断促進活性の評価により、EphA4の切断を促進する活性を有するヒト抗EphA4モノクローナル抗体である抗体Aおよび抗体Bを得た。抗体Aおよび抗体Bは、EphA4シグナルの下流分子のリン酸化を起こさず、かつ、免疫原性の低い (T細胞増殖及びIL-2産生がともに10%以下) 抗体であった。

[0112] 抗体Aおよび抗体Bの重鎖および軽鎖の全長をコードする遺伝子はGen Scriptにて全合成した。抗体Aの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号7に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号8に示すアミノ酸配列である。抗体Aのアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖可変領域については配列番号9に示す核酸配列を用い、軽鎖可変領域については配列番号10に示す核酸配列を用いた。抗体Bの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号11に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変

領域のアミノ酸配列は配列番号 12 に示すアミノ酸配列である。抗体 B のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖可変領域については配列番号 13 に示す核酸配列を用い、軽鎖可変領域については配列番号 14 に示す核酸配列を用いた。抗体 A の重鎖定常領域としては、ヒト IgG₂ の定常領域（配列番号 15）を用い、抗体 B の重鎖定常領域としては、CH1 およびヒンジ部がヒト IgG₁ であり CH2 および CH3 がヒト IgG₂ であるヒト IgG_{1/2} の定常領域（配列番号 16）を用いた。抗体 A 及び抗体 B の軽鎖定常領域としては、ヒト Igλ（配列番号 17）を用いた。抗体 A のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖定常領域については配列番号 18 に示す核酸配列を用い、軽鎖定常領域については配列番号 19 に示す核酸配列を用いた。抗体 A の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は配列番号 20 に示すアミノ酸配列であり、軽鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は配列番号 21 に示すアミノ酸配列である。抗体 A の重鎖全長をコードする核酸配列は配列番号 22 に示す核酸配列であり、軽鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号 23 に示す核酸配列である。抗体 B のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖定常領域については配列番号 24 に示す核酸配列を用い、軽鎖定常領域については配列番号 25 に示す核酸配列を用いた。抗体 B の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号 26 に示すアミノ酸配列であり、軽鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号 27 に示すアミノ酸配列である。抗体 B の重鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号 28 に示す核酸配列であり、軽鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号 29 に示す核酸配列である。Exp i 293 発現システム（ThermoFisher）もしくは GS システム（Lonza）を用いて、抗体 A および抗体 B のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を含む発現ベクター（p cDNA 3.4 もしくは pEE6.4 および pEE12.4）を Exp i 293 F 細胞（ThermoFisher）もしくは CHOK1SV 細胞（Lonza）へ形質移入した。上清を回収し、MabSelectSure（Cytiva）を用いて

ヒト抗E p h A 4モノクローナル抗体である抗体Aおよび抗体Bを精製した。

[0113] 抗体Aおよび抗体BのCDRは、CDRの同定のためのK a b a tの定義（K a b a tナンバリングシステム）に従って決定した。抗体AのCDRのアミノ酸配列と核酸配列をそれぞれ表1と表2に示す。抗体BのCDRのアミノ酸配列と核酸配列をそれぞれ表3と表4に示す。

[表1]

抗体AのCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYAMS (配列番号30)
重鎖CDR2	AISGSGSTIYYADSVKG (配列番号31)
重鎖CDR3	DSYVYVWLYYFDY (配列番号32)
軽鎖CDR1	QCDGLRSYYAS (配列番号33)
軽鎖CDR2	GENNRPS (配列番号34)
軽鎖CDR3	QSSYSSSYSYV (配列番号35)

[表2]

抗体AのCDRの核酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	AGCTACGCTATGCTCT (配列番号36)
重鎖CDR2	GCTATCTCTGGAGGCGCGGCTCCACCTACTATGCTGACAGCGTGAGGCGC (配列番号37)
重鎖CDR3	GATAGCTACTATTACTGGTGGCTGTATTACTATTTGCACTAT (配列番号38)
軽鎖CDR1	CAGGGGAGACGCGTGGCTCTTACTATGGCTCC (配列番号39)
軽鎖CDR2	GGCAGCAACAATAGGCTTCT (配列番号40)
軽鎖CDR3	CAGTCCAGCTACTCTTCCAGCTACTCCTAAGTG (配列番号41)

[表3]

抗体BのCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SFAMS (配列番号42)
重鎖CDR2	AISGSGSTIYYADSVKG (配列番号31)
重鎖CDR3	DSYVYVWLYYVFDY (配列番号43)
軽鎖CDR1	QCDGLRSYFAS (配列番号44)
軽鎖CDR2	GENNRPS (配列番号34)
軽鎖CDR3	QSSYSSSYSYV (配列番号35)

[表4]

抗体BのCDRの核酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	AGCTTCGCTATGTCI (配列番号45)
重鎖CDR2	GCTATCAGCGGCTCIGGCGGCTCCACATACTATGCGACAGGGGGAAGGG (配列番号46)
重鎖CDR3	GAGGATTACTATCCATACTGGTGGTACTATTACTATTTCGATTAT (配列番号47)
軽鎖CDR1	CAGCGCGACAGCGCTGCGCTTACTTTGGCTCC (配列番号48)
軽鎖CDR2	GCGAAGACAAATAGCGCTTCI (配列番号49)
軽鎖CDR3	CAGTCCAGCTATTCITTCAGCTACTCCTAGGTG (配列番号50)

[0114] 実施例2：ヒト抗EphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4に対する結合親和性

抗体Aおよび抗体BのヒトEphA4に対する結合親和性をBiacore T200 (Cytiva) を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR法) により決定した。まず、抗His抗体 (Cytiva、28-9950-56) をセンサーチップCM5へ固定化した。固定化は、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、および、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) を用いたアミンカップリング法にて行い、ブロッキングにはエタノールアミンを用いた (センサーチップや固定化用試薬は、全てCytiva社製)。固定化用緩衝液 (10 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.5) を用いて3 μg/mLに希釈し、Biacore T200 付属のプロトコルに従い、センサーチップ上に固定した。ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His10をランニング緩衝液HBS-EP+ (Cytiva、BR-1001-69) を用いて希釈し、フローセル上に120秒間送液しキャプチャーさせた (6 RU程度のキャプチャー量)。続いてHBS-EP+を用いて100、50、25、12.5、6.3、3.2、1.6、0 nMの範囲で系列希釈した抗体Aおよび抗体Bを120秒間センサーチップに添加し、添加時 (結合相、120秒間)、および、添加終了後 (解離相、600秒間) の結合反応曲線を順次観測した。各々の観測

終了後に、3 M $MgCl_2$ (60秒間) を添加してセンサーチップを再生した。得られた結合反応曲線に対して、システム付属ソフト *BLA evaluation* ソフトを用いた1:1の結合モデルによるフィッティング解析を行い、ヒトのEphA4に対する結合親和性 ($KD = k_d / k_a$) を算出した。上述の実験を3回実施し、各パラメーターについて平均値を算出した。

[0115] 抗体Aおよび抗体BのヒトEphA4に対する結合親和性 (KD値) は、それぞれ $4.67 \times 10^{-10} M$ 、 $1.56 \times 10^{-10} M$ であった (図1)。抗体Aおよび抗体Bは、ヒトのEphA4に対して同程度の結合親和性を持っていた。図1には、例として代表的な結合反応曲線を示す。

[0116] 実施例3：ヒト抗EphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4－ヒトリガン
ド結合阻害活性

抗体Aおよび抗体Bについて、ヒトEphA4とヒトリガンドとの結合阻害活性の評価は、以下の工程に従って行った。抗アルカリフォスファターゼ抗体 (Thermo Scientific) を、96ウェルプレート (Nunc) のウェル上にコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、1% ブロックエース (KAC) により、ウェルを4℃にて一晩ブロッキングした。0.02% Tween 20 / PBS で3回洗浄した後、ウェルにヒトEphA4細胞外領域－SEAP－Hisタンパク質 (最終濃度10 nM) を播種し室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにリガン

ドと系列希釈した抗体Aまたは抗体B (0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000、3000 nM) を添加した。なお、リガン

ドにはビオチン化ヒトEphrin A5－Fcキメラ (R&D Systems、最終濃度0.7 nM) およびビオチン化ヒトEphrin B3－Fcキメラ (R&D Systems、最終濃度2.3 nM) を用いた。室温にて1時間インキュベートして3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (GE Healthcare) を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗

浄した後、ウェルにTMBZ（3，3'，5，5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、15～20分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako Pure）を加え、マイクロプレートリーダー（Thermo Scientific）により450nmの吸光度を読み取った。

[0117] 抗体Aおよび抗体Bは、ヒトEphA4とヒトリガンドとの結合を濃度依存的に抑制し、抗体AのヒトEphrinA5、EphrinB3結合に対するIC₅₀値はそれぞれ3.9nM、3.0nM、抗体BのヒトEphrinA5、EphrinB3結合に対するIC₅₀値はそれぞれ4.8nM、4.1nMであった。よって、抗体Aおよび抗体Bは、ヒトEphA4とヒトリガンドとの結合を阻害することが分かった（図2）。

[0118] 実施例4：ヒト抗EphA4モノクローナル抗体のヒトEphレセプターに対する選択性

抗体Aおよび抗体Bについて、ヒトEphレセプターの結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。ウサギ抗6-His抗体（Bethyl Laboratories）を、96ウェルプレート（Nunc）のウェル上にコートした。室温にて1時間もしくは4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロックエース（KAC）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.02%Tween 20/PBSで3回洗浄した後、各ウェルにヒトの各Ephレセプター細胞外領域-Hisタンパク質（Creative biomart、最終濃度1nM）を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、抗体Aおよび抗体B（10μg/mL）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG Fcγフラグメント抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ（3，3'，5，5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、3～5分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（

2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako Pure)を加え、マイクロプレートリーダー (Thermo SCIENTIFIC) により450nmの吸光度を読み取った。

[0119] 抗体Aおよび抗体Bは、ヒトEphレセプターファミリー間ではヒトEphA4に対して特異的に結合することが分かった(図3)。

[0120] 実施例5：ヒト抗EphA4モノクローナル抗体のマウス、ラット、サルおよびヒトEphA4に対する反応性

マウス、ラット、サルおよびヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質の作製は、以下の工程に従って行った。SEAP-Hisおよび、マウス、ラット、サルおよびヒトEphA4細胞外領域をコードする遺伝子の合成をGenscriptにて行った。まず、合成されたSEAP-Hisをコードする遺伝子断片を、pcDNA3.4ベクター (Invitrogen/Life Technologies) にクローニングした。構築したpcDNA3.4-SEAP-His発現ベクターに、合成されたマウス、ラット、サルおよびヒトEphA4細胞外領域の遺伝子断片をそれぞれクローニングし、マウス、ラット、サルおよびヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターを構築した。ベクター構築において利用するヒトEphA4のアミノ酸配列を配列番号1、その細胞外領域は配列番号2、サルEphA4のアミノ酸配列を配列番号51、その細胞外領域は配列番号52、ラットEphA4のアミノ酸配列を配列番号53、その細胞外領域は配列番号54、マウスEphA4のアミノ酸配列を配列番号55、その細胞外領域は配列番号56として示す。ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター、サルEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター、ラットEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクターおよびマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクターを用いて、各種EphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質を調製した。Exp293発現システム (Thermo SCIENTIFIC) を用いて、上記発現ベクターをEx

p i 2 9 3 F細胞 (Thermo SCIENTIFIC) へ形質移入した。4 日後に培養液を回収し、細胞を除いて清澄化した。TALONレジン (TaKaRa) を用いて精製を行い、透析によりPBS (FUJIFILM Wako Pure) にバッファー置換した。

[0121] 抗体Aおよび抗体Bについて、各種EphA4との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。ウサギ抗6-His抗体 (Bethyl Laboratories) を、96ウェルプレート (Nunc) のウェル上にコートした。室温にて1時間インキュベートした後、1%ブロッケース (KAC) により、ウェルを4℃にて一晩ブロッキングした。0.02% Tween 20/PBSで3回洗浄した後、ウェルにマウス、ラット、サルおよびヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質 (最終濃度1 nM) を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、抗体Aおよび抗体B (0、0.00013、0.00064、0.0032、0.016、0.08、0.4、2、10 μ g/mL) を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG Fc γ フラグメント抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、3~5分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako Pure) を加え、マイクロプレートリーダー (Thermo SCIENTIFIC) により450nmの吸光度を読み取った。

[0122] 抗体Aおよび抗体Bは、マウス、ラット、サルおよびヒトEphA4いずれにおいても同等の結合活性を有していた (図4)。

[0123] 実施例6：ヒト抗EphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4細胞外領域、リガンド結合ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン1、フィブロネクチンIII型ドメイン2に対する反応性

ヒトEphA4の細胞外領域（ECD）、リガンド結合ドメイン（LBD）、フィブロネクチンⅢ型ドメイン1（FN1）あるいはフィブロネクチンⅢ型ドメイン2（FN2）とマルトース結合タンパク質（MBP）およびヒスチジンタグを融合したタンパク質（以下、「ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質」、「ヒトEphA4リガンド結合ドメイン-MBP-Hisタンパク質」、「ヒトEphA4フィブロネクチンⅢ型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質」、および「ヒトEphA4フィブロネクチンⅢ型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質」という）の作製は、以下の工程に従って行った。最初に、pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域、リガンド結合ドメイン、フィブロネクチンⅢ型ドメイン1、あるいはフィブロネクチンⅢ型ドメイン2-MBP-His発現ベクターを構築した。まず、ヒトEphA4のシグナル配列（配列番号6）あるいはプレプロトリプシンのシグナル配列（配列番号57）とヒトEphA4の各ドメインをコードするDNA配列をPCRによって増幅し、AAA、またはG4SのリンカーのついたMBPおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.4ベクター（Invitrogen/Life Technologies）にクローニングして、ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4リガンド結合ドメイン-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4フィブロネクチンⅢ型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質、およびヒトEphA4フィブロネクチンⅢ型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質の発現ベクターを構築した。ベクター構築において利用するヒトEphA4のアミノ酸配列を配列番号1、その細胞外領域は配列番号2、リガンド結合ドメインは配列番号58、フィブロネクチンⅢ型ドメイン1は配列番号59、フィブロネクチンⅢ型ドメイン2は配列番号60、MBPおよびヒスチジンタグ（MBP-Hisタンパク質）は配列番号61として示す。Exp293発現システム（Thermo Scientific）を用いて、上記発現ベクターをExp293F細胞（Thermo Scientific）

C)へ形質移入した。4日後に培養液を回収し、細胞を除いて清澄化した。ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質、またはヒトEphA4リガンド結合ドメイン-MBP-Hisタンパク質はTALONレジン(TaKaRa)を用いて精製を行い、透析によりPBS(FUJIFILM Wako Pure)にバッファー置換した。ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質、およびヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質はAmylose resin(NEB)を用いて精製を行い、AKTA Explore 10s/Superdex200 10/300 GL(Cytiva)にて単量体画分を分画精製した。

[0124] 抗体Aおよび抗体B、ヒトIgG(Sigma)について、各種EphA4との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。ウサギ抗6-His抗体(Bethyl Laboratories)を、96ウェルプレート(Nunc)のウェル上にコートした。室温にて1時間インキュベートした後、1%ブロッケース(KAC)により、ウェルを4℃にて一晩ブロッキングした。0.02% Tween20/PBSで3回洗浄した後、ウェルにヒトEphA4細胞外領域、ヒトEphA4リガンド結合ドメイン、ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン1、ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質またはMBP-Hisタンパク質(最終濃度1nM)を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、抗体Aおよび抗体B、ヒトIgG(10nM)を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG Fcγフラグメント抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL)溶液を加え、3~5分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液(2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako Pure)を加え、マイクロプ

レートリーダー (Thermo Scientific) により 450 nm および 650 nm の吸光度を読み取った。

[0125] 抗体 A および抗体 B は、ヒト EphA4 細胞外領域 (ECD) およびリガンド結合ドメイン (LBD) に結合活性を有していた (図 5)。フィブロネクチン III 型ドメイン 1 (FN1) およびフィブロネクチン III 型ドメイン 2 (FN2) には反応しなかった。よって、抗体 A および抗体 B はヒト EphA4 細胞外領域のリガンド結合ドメインに特異的に結合することが分かった。

[0126] 実施例 7 : ヒト抗 EphA4 モノクローナル抗体の海馬ニューロンにおける EphA4 切断促進活性

ラット海馬ニューロンの調製は、以下の工程に従って行った。妊娠 18 日目のラット (日本チャールズ・リバー) から胎仔を取り出し、頭部を切開して脳を取り出した。実体顕微鏡下で海馬領域を切り出したのち、digestion 溶液 (137 mM NaCl (和光純薬)、5 mM KCl (和光純薬)、7 mM Na₂HPO₄ (和光純薬)、25 mM Hepes (DOJINDO)、0.5 mg/mL DNase (Sigma)、0.25% トリプシン (Thermo Fisher Scientific)) に入れて 37°C で 10 分間振とうした。溶液を除き、20% Fetal bovine serum/Hanks 緩衝液 (Sigma) を加えた。液を除いて、Hanks 緩衝液で 2 回洗浄したのち、Hanks 緩衝液中で海馬組織をピペティングして細胞懸濁液を作製した。さらに、培養液 (Neuro basal medium (Thermo Fisher Scientific)、1×B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific)、0.5 mM L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific)) に懸濁したのち、ポリ L リジン をコートした 96 ウェルディッシュ (Falcon) に細胞を播種した。

[0127] 実施例 1 で得た抗体 A および抗体 B について、海馬ニューロンを用いた EphA4 切断促進活性の評価は、以下の工程に従って行った。96 ウェルデ

イッシュ (Falcon) に播種したラット海馬ニューロンに、 γ セクレターゼ阻害薬である Compound E (50 nM、Enzo Life Sciences) とともに、溶媒 (PBS (FUJIFILM Wako Pure))、ヒト IgG、抗体 A あるいは抗体 B (2.0、6.7、20 nM) を 24 時間作用させた。PBS (FUJIFILM Wako Pure) で洗浄したのち、SDS sample buffer (Laemmli サンプルバッファー (バイオ・ラッド)、2.5% β -メルカプトエタノール (バイオ・ラッド)) を加えて細胞を回収し、5 分間煮沸した。このサンプルを全自動ウェスタンシステム Jess で解析した。解析には抗 EphA4 モノクローナル抗体 (Abnova) を用いた。EphA4 C 末端フラグメントと全長 EphA4 のシグナルを定量し、EphA4 C 末端フラグメント / (全長 EphA4 + EphA4 C 末端フラグメント) の値を算出した。

[0128] 抗体 A および抗体 B は、海馬ニューロンにおいて、濃度依存的に EphA4 切断反応を促進した (図 6)

[0129] 実施例 8 : ヒト抗 EphA4 モノクローナル抗体のヒト EphA4 切断促進活性

まず、ヒト EphA4 をコードする DNA 配列および HA タグをコードする DNA 配列を有する pCAHA ベクターをジェンスクリプトジャパン株式会社において合成したのち、pCAHA ベクターの SalI / NotI サイトにヒト EphA4 をコードする DNA 配列を挿入し、pCA-ヒト EphA4-HA 発現ベクターを構築した。

ラット海馬ニューロンの調製は、以下の工程に従って行った。妊娠 18 日目のラット (日本チャールズ・リバー) から胎仔を取り出し、頭部を切開して脳を取り出した。実体顕微鏡下で海馬領域を切り出したのち、digestion 溶液 (137 mM NaCl (和光純薬)、5 mM KCl (和光純薬)、7 mM Na_2HPO_4 (和光純薬)、25 mM Hepes (DOJINDO)、0.5 mg/mL DNase (Sigma)、0.25%

トリプシン (Thermo Fisher Scientific)) に入れて 37℃ で 10 分間振とうした。溶液を除き、20% Fetal bovine serum / Hanks 緩衝液 (Sigma) を加えた。液を除いて、Hanks 緩衝液で 2 回洗浄したのち、Hanks 緩衝液中で海馬組織をピペティングして細胞懸濁液を作製した。

[0130] 実施例 1 で得た抗体 A および抗体 B について、ヒト EphA4 に対する切断促進活性の評価は、以下の工程に従って行った。ラット海馬ニューロンに Nucleofector (Lonza) を用いて pCA-ヒト EphA4-HA 発現ベクターを導入し、培養液 (Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific)、1×B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific)、0.5mM L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific)) に懸濁したのち、ポリリジン coated 96 ウェルディッシュ (Falcon) に播種した。播種したラット海馬ニューロンに、γセクレターゼ阻害薬である Compound E (50nM, Enzo Life Sciences) とともに、溶媒 (PBS (和光純薬))、ヒト IgG、抗体 A あるいは抗体 B (6.7、20、67nM) を一晩作用させた。PBS で洗浄したのち、SDS sample buffer (Laemmli サンプルバッファー (バイオ・ラッド))、5% 2-メルカプトエタノール (バイオ・ラッド)) を加えて細胞を回収し、5 分間煮沸した。このサンプルを用いて SDS-PAGE を行い、ラット抗 HA モノクローナル抗体 (Roche) を用いたウェスタンブロッティングを行い、バンド強度を定量化し、ヒト EphA4 C 末端フラグメント / (全長ヒト EphA4 + ヒト EphA4 C 末端フラグメント) の値を算出した。

[0131] 抗体 A および抗体 B は、海馬ニューロンにおいて、ヒト EphA4 切断反応を促進した (図 7)。

[0132] 実施例 9 : ヒト抗 EphA4 モノクローナル抗体の海馬ニューロンのスパイン密度に対する増加効果

ラット海馬ニューロンの調製は、実施例 7 に記載されるように行った。ラット海馬ニューロンに *Nucleofector* (Lonza) を用いて *EGFP* 遺伝子を導入し、遺伝子導入していないニューロンと混合して、カバーガラス (松浪硝子工業) を入れ、ポリリジン をコートした 24 ウェルプレート (Falcon) に播種した。

[0133] 海馬ニューロンを用いたスパインの計数は、以下の工程に従って行った。カバーガラス (松浪硝子工業) を入れ、ポリリジン をコートした 24 ウェルプレート (Falcon) に播種した培養 15 日目のラット海馬ニューロンに、コントロール抗体 (ヒト *IgG*₂; Sigma)、抗体 A あるいは抗体 B (6.7、20 nM) を 24 時間処置した。その後、カバーガラスを 2% PFA (和光純薬) / 4% Sucrose (和光純薬) / PBS に移し、20 分間静置し、細胞を固定した。カバーガラスを固定液から取り出し、PBS に移して 3 回洗浄したのち、0.25% Triton X-100 (和光純薬) / PBS を加えて、15 分間、細胞透過処理を行った。2% BSA (Sigma) / 0.25% Triton X-100 / OPTI-MEM (GIBCO) にカバーガラスを移して、1 時間ブロッキングを施したあと、抗 *EGFP* 抗体 (ナカライテスク) および抗 *Math2* 抗体 (abcam) を室温で 1 時間～1 時間 30 分反応させた。1 次抗体溶液を除き、カバーガラスを PBS で 3 回洗浄したのち、2 次抗体を室温で遮光して 1 時間反応させた。2 次抗体溶液を除き、カバーガラスを PBS で 3 回洗浄したのち、Prolong Gold antifade reagent (Molecular probes) を用いて封入し、LSM800 (ZEISS) で観察と解析画像の取り込みを行った。上述の実験を 3 回実施し、1 回の実験につき、カバーガラス 2 枚から *Math2* 陽性の錐体細胞様ニューロンを抽出し、それぞれの樹状突起にあるスパインを画像解析ソフト *Imaris* (登録商標) (*Bitplane*) を用いて計数し、各ニューロンにおける 10 μ m あたりのスパイン数を算出した。

[0134] 抗体 A および抗体 B は、海馬ニューロンのスパイン密度を増加させた (図

8)。本結果は、抗体Aおよび抗体Bが海馬ニューロンにおいてスパインを安定化させる活性を有することを示すものである。

請求の範囲

[請求項1]

抗E p h A 4 抗体であって、

前記抗E p h A 4 抗体は、

(a) 配列番号30に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 1 ;

(b) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 2 ; および

(c) 配列番号32に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 3 を含む重鎖; ならびに

(d) 配列番号33に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 1 ;

(e) 配列番号34に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 2 ; および

(f) 配列番号35に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 3 を含む軽鎖

を含む、抗E p h A 4 抗体、

または、

(g) 配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 1 ;

(h) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 2 ; および

(i) 配列番号43に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 3 を含む重鎖; ならびに

(j) 配列番号44に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 1 ;

(k) 配列番号34に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 2 ; および

(l) 配列番号35に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 3 を含む軽鎖

を含む、抗E p h A 4 抗体。

[請求項2]

請求項1に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記抗E p h A 4 抗体はヒト抗体である、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項3] 請求項1または2に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記抗E p h A 4 抗体は、E p h A 4 に特異的に結合し、E p h A 4 の切断を促進する、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記抗E p h A 4 抗体は、E p h A 4 に特異的に結合し、E p h A 4 とe p h r i nとの結合を阻害する、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記重鎖は配列番号7に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、
、
前記軽鎖は配列番号8に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含む、
、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項6] 請求項1～5のいずれか1項に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記重鎖の定常領域および前記軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含む、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項7] 請求項6に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記重鎖の定常領域はヒトI g Gの定常領域である、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項8] 請求項7に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記ヒトI g Gの定常領域は、ヒトI g G₂の定常領域である、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項9] 請求項8に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記ヒトI g G₂の定常領域は、配列番号15示すアミノ酸配列を含む、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項10] 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記重鎖は配列番号11に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含み、

前記軽鎖は配列番号12に示すアミノ酸配列からなる可変領域を含む、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項11] 請求項1～4および請求項10のいずれか1項に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記重鎖の定常領域および前記軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含む、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項12] 請求項11に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記重鎖の定常領域はヒトIgGの定常領域である、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項13] 請求項12に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記ヒトIgGの定常領域は、ヒトIgG₁とヒトIgG₂の組み合わせからなるヒトIgGの定常領域である、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項14] 請求項13に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記ヒトIgG₁とヒトIgG₂の組み合わせからなるヒトIgGの定常領域は、配列番号16示すアミノ酸配列を含む、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項15] 請求項6～9および請求項11～14のいずれか1項に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記軽鎖の定常領域は、ヒトIgλの定常領域である、

抗E p h A 4 抗体。

[請求項16] 請求項15に記載の抗E p h A 4 抗体であって、

前記ヒト I g λ の定常領域は、配列番号 17 に示すアミノ酸配列を含む、

抗 E p h A 4 抗体。

[請求項17] 抗 E p h A 4 抗体であって、
前記抗 E p h A 4 抗体は、重鎖および軽鎖を含み、
前記重鎖は、配列番号 20 に示すアミノ酸配列を含み、かつ
前記軽鎖は、配列番号 21 に示すアミノ酸配列を含み、
前記重鎖の C 末端リシンが欠失されていてもよい、
抗 E p h A 4 抗体。

[請求項18] 請求項 17 に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、
前記重鎖の C 末端リシンが欠失されている、
抗 E p h A 4 抗体。

[請求項19] 抗 E p h A 4 抗体であって、
前記抗 E p h A 4 抗体は、重鎖および軽鎖を含み、
前記重鎖は、配列番号 26 に示すアミノ酸配列を含み、かつ
前記軽鎖は、配列番号 27 に示すアミノ酸配列を含み、
前記重鎖の C 末端リシンが欠失されていてもよい、
抗 E p h A 4 抗体。

[請求項20] 請求項 19 に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、
前記重鎖の C 末端リシンが欠失されている、
抗 E p h A 4 抗体。

[請求項21] 請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の抗 E p h A 4 抗体をコードする単離された核酸。

[請求項22] 請求項 21 に記載の核酸を含むベクター。

[請求項23] 請求項 22 に記載のベクターを含む宿主細胞。

[請求項24] 請求項 23 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、抗 E p h A 4 抗体の作製方法。