

明 細 書

発明の名称：抗E p h A 4抗体

技術分野

[0001] 本発明は、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、C D K 5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）。家族性前頭側頭型認知症から見出されたP 3 0 1 L変異を有するヒトタウ遺伝子を発現させた遺伝子改変マウス（r T g 4 5 1 0マウス）は、ADモデルマウスであり、AD同様にタウの過剰リン酸化および神経細胞内のタウの異常蓄積が起きる。r T g 4 5 1 0マウスではADの病理学的特徴である神経原線維変化が起き、脳の萎縮及び神経細胞脱落による認知機能障害が引き起こされている（非特許文献

14 および非特許文献5)。

[0003] EphA4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 disintegrin and metalloproteinase) およびγセクレターゼによって切断される。このEphA4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15)。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16)、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17)。

[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18および非特許文献19)、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: Ramsden M et al., J Neurosci. 2005 Nov 16; 25 (46): 10637-47.
- 非特許文献15: Inoue E et al., J Cell Biol. 2009 May 4; 185 (3): 551-64
- 非特許文献16: Boros et al., Ann Neurol. 2017 Oct; 82 (4): 602-614
- 非特許文献17: Matsui C et al., Brain Pathol. 2012 Nov; 22 (6): 776-87. doi: 10.1111/j.1750-3639

非特許文献18: Goldshmit et al., PLoS one, 2011; 6 (9): e24636

非特許文献19: 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、マウス抗EphA4モノクローナル抗体を取得し、当該抗体のヒト化抗体を作製することによって、目的の抗体を完成するに至った。

[0009] 本開示は、以下の特徴を包含する。

(1) 抗EphA4抗体であって、前記抗EphA4抗体は、重鎖および軽鎖を含み、

(a) 配列番号44に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1;

(b) 配列番号27に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2;

(c) 配列番号28に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3;

(d) 配列番号29に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1;

(e) 配列番号30に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2; および

(f) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3

を含む、

抗EphA4抗体。

[0010] (2) (1)に記載の抗EphA4抗体であって、

前記抗EphA4抗体は、ヒト化されている、

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、
前記重鎖の可変領域は、配列番号 4 5 に示すアミノ酸配列からなり、
前記軽鎖の可変領域は、配列番号 4 6 に示すアミノ酸配列からなる、
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 4 7 に示すアミノ酸配列を含む、
抗E p h A 4 抗体。

[0018] (10) (6) ~ (9) 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 κ の定常領域である、
抗 E p h A 4 抗体。

[0019] (11) (10) に記載の抗 E p h A 4 抗体であって、
前記ヒト I g κ の定常領域は、配列番号 48 に示すアミノ酸配列を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0020] (12) 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 59 に示すアミノ酸配列を含み、
前記軽鎖は、配列番号 60 に示すアミノ酸配列を含む、
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。

[0022] (14) 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 59 に示すアミノ酸配列を含み、
前記軽鎖は、配列番号 60 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る、
抗 E p h A 4 抗体。

[0023] (15) (1) ~ (14) 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。

[0024] (16) (15) に記載の核酸を含むベクター。

[0025] (17) (16) に記載のベクターを含む宿主細胞。

[0026] (18) (17) 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。

[0027] (19) (1) ~ (14) 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。

[0028] (20) (19) 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。

- [0029] (21) (19) または (20) に記載の医薬組成物であって、
アルツハイマー病の治療のための医薬組成物。
- [0030] (22) アルツハイマー病の治療において使用するための (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体。
- [0031] (23) 治療上有効量の (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、アルツハイマー病の治療方法。
- [0032] (24) アルツハイマー病治療用の医薬組成物を製造するための (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体の使用。
- [0033] (25) (19) または (20) に記載の医薬組成物であって、
タウオパチーの治療のための医薬組成物。
- [0034] (26) タウオパチーの治療において使用するための (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体。
- [0035] (27) 治療上有効量の (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、タウオパチーの治療方法。
- [0036] (28) タウオパチー治療用の医薬組成物を製造するための (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体の使用。
- [0037] (29) タウオパチーがアルツハイマー病またはタウ病理を有する前頭側頭葉変性症である、(25) ~ (28) のいずれかに記載の医薬組成物、抗 E p h A 4 抗体、治療方法または使用。
- [0038] (30) タウオパチーがアルツハイマー病である、(29) に記載の医薬組成物、抗 E p h A 4 抗体、治療方法または使用。
- [0039] (31) タウオパチーがタウ病理を有する前頭側頭葉変性症である、(29) に記載の医薬組成物、抗 E p h A 4 抗体、治療方法または使用。
- [0040] (32) タウ病理を有する前頭側頭葉変性症が進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、神経原線維変化型老年期認知症また

はピック病である、(31)に記載の医薬組成物、抗E p h A 4抗体、治療方法または使用。

[0041] (33) タウ病理を有する前頭側頭葉変性症が進行性核上性麻痺である、(32)に記載の医薬組成物、抗E p h A 4抗体、治療方法または使用。

[0042] (34) タウ病理を有する前頭側頭葉変性症が脳皮質基底核変性症である、(32)に記載の医薬組成物、抗E p h A 4抗体、治療方法または使用。

[0043] (35) タウ病理を有する前頭側頭葉変性症が嗜銀顆粒性認知症である、(32)に記載の医薬組成物、抗E p h A 4抗体、治療方法または使用。

[0044] (36) タウ病理を有する前頭側頭葉変性症が神経原線維変化型老年期認知症である、(32)に記載の医薬組成物、抗E p h A 4抗体、治療方法または使用。

[0045] (37) タウ病理を有する前頭側頭葉変性症がピック病である、(32)に記載の医薬組成物、抗E p h A 4抗体、治療方法または使用。

発明の効果

[0046] 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

[0047] [図1]図1は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）のマウスおよびヒトE p h A 4に対する結合親和性を示す。

[図2]図2は、海馬ニューロンを用いた抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）のE p h A 4切断促進活性を示す。

[図3]図3は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）のマウスE p h A 4-マウスリガンド結合阻害活性を示す。

[図4]図4は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）のヒトE p h A 4-ヒトリガンド結合阻害活性を示す。

[図5]図5は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）の各ヒトE p h レセプターに対する選択性を示す。

[図6]図6は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）の各マウスE p h レセプターに対する選択性を示す。

[図7]図7は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）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8]図8は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）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III型ドメイン1（F N 1）、およびフィブロネクチンIII型ドメイン2（F N 2）に対する反応性を示す。

[図9]図9は、抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体A）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。

[図10]図10は、抗E p h A 4モノクローナル抗体のi n v i v oにおけるタウのリン酸化抑制効果を示す。

[図11A]図11Aは、横軸にE p h A 4－L i g a n d B i n d i n g D o m a i n（E p h A 4－L B D）のアミノ酸、縦軸に抗体A－F a bの構造領域を示す。黒のビットは相互作用が存在する組み合わせの交点を示す。

[図11B]図11Bは、E p h A 4－L i g a n d B i n d i n g D o m a i n（E p h A 4－L B D）の表面構造を示す。図11Bにおいて、結合領域に含まれるアミノ酸名と残基番号が該当する位置に示され、結合する抗体A－F a bのH鎖およびL鎖のC D Rがリボンモデルで示される。

[図12]図12は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体B）のヒトE p h A 4に対する親和性を示す。

[図13]図13は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体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14]図14は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体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15]図15は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体B）のマウ

スE p h A 4ーマウスリガンド結合阻害活性を示す。

[図16]図16は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体B）のヒトE p h レセプターに対する選択性を示す。

[図17]図17は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体B）のマウスE p h レセプターに対する選択性を示す。

[図18]図18は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体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19]図19は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体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III型ドメイン1（F N 1）、およびフィブロネクチンIII型ドメイン2（F N 2）に対する反応性を示す。

[図20]図20は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体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。

[図21]図21は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体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22]図22は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体B）によるMMPおよびA D A Mを介した海馬ニューロンのスパイン数に対する増加効果を示す。

[図23]図23は、ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体（抗体B）のi n v i v oにおけるタウのリン酸化抑制効果を示す。

発明を実施するための形態

[0048] 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	マウス EphA4 (F3/酸配列)	32	ヒト EphA4 (F3/酸配列)
2	マウス EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)	33	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)
3	マウス EphA4 細胞外領域-SEAP-His タグ (F3/酸配列)	34	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)
4	マウス EphA4 のシグナル配列 (F3/酸配列)	35	ヒト EphA4 のシグナル配列 (F3/酸配列)
5	ヒト EphA4 (F3/酸配列)	36	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)
6	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)	37	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)
7	マウス EphA4 ad285 (核酸配列)	38	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)
8	マウス EphA4 ad285 (核酸配列)	39	ヒト EphA4 の細胞外領域 (F3/酸配列)
9	ヒト EphA4 の細胞外領域 (核酸配列)	40	ヒト抗体の軽鎖 FR IGKV1-12 (F3/酸配列)
10	マウス IgG 重鎖用 3' タグ (核酸配列)	41	ヒト抗体の軽鎖 FR JK4 (F3/酸配列)
11	マウス IgG 軽鎖用 3' タグ (核酸配列)	42	ヒト抗体の重鎖 FR IGHV3-33*03 (F3/酸配列)
12	抗体 A の重鎖シグナル配列 (F3/酸配列)	43	ヒト抗体の重鎖 FR JK4 (F3/酸配列)
13	抗体 A の重鎖可変領域 (F3/酸配列)	44	抗体 B の重鎖 CDR1 (F3/酸配列)
14	抗体 A の軽鎖シグナル配列 (F3/酸配列)	45	抗体 B の重鎖可変領域 H2-42 (F3/酸配列)
15	抗体 A の軽鎖可変領域 (F3/酸配列)	46	抗体 B の軽鎖可変領域 L1-8 (F3/酸配列)
16	抗体 A の重鎖シグナル配列 (核酸配列)	47	抗体 B のヒト IgG 重鎖定常領域 (F3/酸配列)
17	抗体 A の重鎖可変領域 (核酸配列)	48	抗体 B のヒト IgG 軽鎖定常領域 (F3/酸配列)
18	抗体 A の軽鎖シグナル配列 (核酸配列)	49	抗体 B の重鎖 CDR1 (核酸配列)
19	抗体 A の軽鎖可変領域 (核酸配列)	50	抗体 B の重鎖 CDR2 (核酸配列)
20	抗体 A 重鎖用 5' タグ (核酸配列)	51	抗体 B の重鎖 CDR3 (核酸配列)
21	抗体 A 軽鎖用 5' タグ (核酸配列)	52	抗体 B の軽鎖 CDR1 (核酸配列)
22	抗体 A 重鎖用 3' タグ (核酸配列)	53	抗体 B の軽鎖 CDR2 (核酸配列)
23	抗体 A 軽鎖用 3' タグ (核酸配列)	54	抗体 B の軽鎖 CDR3 (核酸配列)
24	抗体 A の重鎖定常領域 (F3/酸配列)	55	抗体 B の重鎖可変領域 H2-42 (核酸配列)
25	抗体 A の軽鎖定常領域 (F3/酸配列)	56	抗体 B の軽鎖可変領域 L1-8 (核酸配列)
26	抗体 A の重鎖 CDR1 (F3/酸配列)	57	抗体 B のヒト IgG 重鎖定常領域 (核酸配列)
27	抗体 A の重鎖 CDR2 (F3/酸配列)	58	抗体 B のヒト IgG 軽鎖定常領域 (核酸配列)
28	抗体 A の重鎖 CDR3 (F3/酸配列)	59	抗体 B の重鎖全長配列 (F3/酸配列)
29	抗体 A の軽鎖 CDR1 (F3/酸配列)	60	抗体 B の軽鎖全長配列 (F3/酸配列)
30	抗体 A の軽鎖 CDR2 (F3/酸配列)	61	抗体 B の重鎖全長配列 (核酸配列)
31	抗体 A の軽鎖 CDR3 (F3/酸配列)	62	抗体 B の軽鎖全長配列 (核酸配列)

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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 disintegrin and metalloproteinase) による EphA4 細胞外ドメインの切断を促進することができる。

[0053] 一実施形態において、抗 EphA4 抗体は、EphA4 に特異的に結合し、EphA4 とそのリガンドである ephrin との結合を阻害することができる。

[0054] 別の実施形態において、抗 EphA4 抗体は、EphA4 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。

[0055] 本開示は、一実施形態において、ヒト EphA4、マウス EphA4、ラット EphA4、およびサル EphA4 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 EphA4 抗体を包含する。本開示は、別の実施形態において、ヒト EphA4、マウス EphA4、ラット EphA4、およびサル EphA4 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 EphA4 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 EphA4、マウス EphA4、ラット EphA4、およびサル EphA4 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 EphA4 抗体を包含する。

[0056] 抗 EphA4 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、Biacore（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（IGEN 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。

[0057] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、E p h A 4と結合する限り、モノクローナル抗体であってよい。

[0058] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、I g G、I g AまたはI g M（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：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mがあり、これらの幾つかは、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁およびI g A₂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。本開示に係る抗E p h A 4抗体は、I g G抗体であってよく、例えば、I g G₁抗体またはI g G₂抗体等であってよい。また、本開示に係る抗E p h A 4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。

[0059] 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、限定はされないが、例えば、（1）異種間配列可変性に基づくアプローチ（例えば、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD）；および（2）抗原

ー抗体複合体の結晶構造学的研究に基づくアプローチ (A l - l a z i k a n i e t a l . , 1997 J. M o l e c . B i o l . 273 : 927 - 948) が挙げられる。これらのアプローチや、他のアプローチを組合せて用いてもよい。

[0060] 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。

[0061] 本開示に係る抗 E p h A 4 抗体は、マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体であってよい。キメラ抗体は、例えば、非ヒト（例えば、マウスまたはラット）抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域に融合させた抗体であり、例えば、可変領域は非ヒト抗体由来、定常領域はヒト抗体由来となっている抗体を指してよい。ヒト化抗体は、例えば、非ヒト抗体の相補性決定領域 (c o m p l e m e n t a r i t y - d e t e r m i n i n g r e g i o n : C D R (超可変領域ということもある)) をヒト抗体に導入した抗体であり、例えば、C D R は非ヒト抗体由来、それ以外の抗体領域はヒト抗体由来となっている抗体を指してよい。ただし、キメラ抗体とヒト化抗体の境界は必ずしも明確である必要はなく、キメラ抗体ともヒト化抗体とも呼びうるような状態であってもよい。また、キメラ抗体またはヒト化抗体において、ヒト抗体由来の抗体領域 (F R、定常領域) は、必ずしもすべてがヒト抗体由来のアミノ酸から構成される必要はなく、ヒト対象において正常に使用できる限り、一個または複数個の非ヒト抗体由来のアミノ酸を含んでもよい。ヒト

化抗体の一実施態様としては、CDRはげっ歯類抗体由来、それ以外の抗体領域はヒト抗体由来となっている抗体である。ヒト化抗体の特定の実施態様としては、CDRはマウス抗体由来、それ以外の抗体領域はヒト抗体由来となっている抗体である。これらの実施態様において、CDRは、一個または複数個の非げっ歯類抗体由来のアミノ酸、または、一個または複数個の非マウス抗体由来のアミノ酸を含んでいてもよく、CDR以外の抗体領域は一個または複数個の非ヒト抗体由来のアミノ酸を含んでもよい。ここで、「複数個」は、これに限定されるものではないが、2個～20個、または2個～15個、例えば、14個、13個、12個、11個、10個、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、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。ヒト化は、CDR移植法 (Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001) および Tsurushita et al., *Methods* 36:69-83 (2005)) を用いて行うことができる他、当該技術分野において公知の方法 (例えば Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); および Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988) を参照) を用いて、CDR配列を、ヒト抗体の対応する配列に対して置換することによっても行うことができる。

[0062] 抗原性を減少させるためには、ヒト化抗体の作製において、軽鎖および重鎖の両方でヒト可変領域の使用を選択することが重要であり得る。「最良適合」法によれば、既知のヒトFR配列の全ライブラリーに対して、げっ歯類抗体の可変領域の配列がスクリーニングされる。次に、げっ歯類の配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のヒトFRとして受け入れられる。例えば、Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296-

2308 (1993) および Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) を参照されたい。別の方法では、軽鎖または重鎖の特定の亜群の、全てのヒト抗体の共通配列に由来する特定のフレームワークが用いられる。いくつかの異なるヒト化抗体に対して、同じフレームワークが用いられ得る。例えば、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 (1992) および Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993) を参照されたい。

[0063] さらに、ヒト化抗体は一般に、抗原に対する高い結合親和性およびその他の好ましい生物学的性質を保持されることが望ましい。この目標を達成するため、一方法によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列および様々な概念的ヒト化産物の分析工程によって調製される。一般に三次元の免疫グロブリンモデルが利用可能であり、当業者に知られている。選択された候補である免疫グロブリン配列の有望な三次元立体構造を模式化し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を検討することにより、候補である免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち、候補である免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。この方法により、単数または複数の標的抗原（例えば E p h A 4 またはその断片）に対する結合親和性の増大のような、望ましい抗体の特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント配列およびインポート配列から選択して、組み合わせることができる。

[0064] 言うまでもなく、上記に例示したキメラ抗体またはヒト化抗体を、当該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 E p h A 4 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E_u n u m b e r i n gにおける234位のバリン（V a l）がアラニン（A l a）に置換され、237位のグリシン（G l y）がアラニン（A l a）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E p h A 4抗体のCDR配列を有する抗体結合部位と共に、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（K o n t e r m a n n（2012）, m A b s 4, 182-97）も本開示の範囲に含まれる。

[0065] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、所望により、修飾してもよい。抗E p h A 4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。

[0066] 本開示に係る抗E p h A 4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。

[0067] 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（S e r）、アスパラギン（A s n）、バリン（V a l）、ロイシン（L e u）、イソロイシン（I l e）、アラニン（A l a）、チロシン（T y r）、グリシン（G l y）、リシン（L y s）、アルギニン（A r g）、ヒスチジン（H i s）、アスパラギン酸（A s p）、グルタミン酸（G l u）、グルタミン（G l n）、スレオニン（T h r）、システイン（C y s）、メチオニン（M e t）、フェニルアラニン（P h e）、トリプトファン（T r p）、プロリン（P r o）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-ヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジン、 α -メチル-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アミノ酸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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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產生させてもよい。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。

[0073] 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。本開示においては、具体的に、重鎖に関するシグナル配列として、配列番号12または16で表されるアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができ、軽鎖に関するシグナル配列としては、配列番号14または18で表されるアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。また、機能的に同等であれば、配列番号12または16で表されるアミノ酸配列、配列番号14または18で表されるアミノ酸配列において、1または複数個（例えば2、3、4または5個）のアミノ酸の置換、付加および／または欠失を有してもよい。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体は、以下のCDRを含んでいる：

- (a) 配列番号44に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
- (b) 配列番号27に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；
- (c) 配列番号28に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；
- (d) 配列番号29に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (e) 配列番号30に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

(f) 配列番号31に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3。

[0077] 一実施態様において、前記抗E p h A 4抗体は、ヒト化抗体またはキメラ抗体であり、特定の実施態様においてはヒト化抗体である。

[0078] 別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、前記重鎖の可変領域は、配列番号45に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖の可変領域は、配列番号46に示すアミノ酸配列を含んでいる。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45に示すアミノ酸配列および／または配列番号46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。

[0079] 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。

[0080] 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47のアミノ酸配列を含んでいる。

[0081] 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 κの定常領域を含んでいる。

[0082] 特定の実施形態において、ヒトI g κの定常領域は、配列番号48のアミノ酸配列を含んでいる。

[0083] 一実施形態において、抗E p h A 4抗体は、配列番号59に示すアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号60に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を含んでいる。

[0084] 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2010/0297

697号明細書やLiu H et al., MAbs. 2014 Sep-Oct; 6(5): 1145-1154)、抗EphA4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る。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EphA4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EphA4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EphA4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EphA4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EphA4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EphA4抗体も含まれる。

[0085] 一態様において、本開示は、抗EphA4抗体をコードする単離された核酸に関する。抗EphA4抗体をコードする単離された核酸は、抗EphA4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EphA4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EphA4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EphA4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EphA4抗体の重鎖をコードする第一の核酸分子、および抗EphA4抗体の軽鎖をコードする第二の核酸分子も含まれる。

[0086] 別の態様において、本開示は、抗EphA4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EphA4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EphA4抗体の重鎖をコードする核酸および抗EphA4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EphA4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EphA4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EphA4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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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、本開示は、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。

[0090] 本開示に係る抗E p h A 4抗体は、タウオパチーの治療に有用であり得る。すなわち、本開示は、他の態様において、治療上有効量の抗E p h A 4抗体をタウオパチーの対象に投与する工程を含む、タウオパチーの治療方法を包含する。また、本開示は、他の態様において、タウオパチー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

において、タウオパチー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。本開示のタウオパチーには、アルツハイマー病やタウ病理を有する前頭側頭葉変性症（F T L D - t a u）が含まれる。また、タウ病理を有する前頭側頭葉変性症には、進行性核上性麻痺（P S P）、大脳皮質基底核変性症（C B D）、嗜銀顆粒性認知症（A G D）、神経原線維変化型老年期認知症（S D - N F T）およびピック病（P i D）等が含まれる。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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、本発明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、本発明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。

[0095] 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、本発明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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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 (consist essentially of)」という用語で記載される態様を包含する。

[0099] 本明細書において用いられる「中和活性」という用語は、EphA4とそのリガンドの結合を阻害する活性、および／または、EphA4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。

[0100] 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、本発明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。

[0101] 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、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明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、本発明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、置換等を伴って本発明を実施できる。

実施例

[0105] 参考例1：抗E p h A 4モノクローナル抗体の作製

(A) マウス抗E p h A 4モノクローナル抗体の作製

マウスE p h A 4 (Genbank Accession No. NP_031962.2、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、マウス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、「マウス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)を以下の工程により調製した。

[0106] まず、マウスEphA4のシグナル配列（配列番号4）と細胞外領域（配列番号2）をコードするDNA配列をマウスの脳由来のTotal 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pENTR1Aベクター（Invitrogen/LifeTechnologies）のSalI/NotIサイトにクローニングした。次に、マウスEphA4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配列をGateway System（Invitrogen/LifeTechnologies）のLR反応により、pcDNA3.1__rfcBベクターに移し、pcDNA3.1-マウスEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターを構築した。構築したpcDNA3.1-マウスEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターを、TransIT-LT1（TAKARA）を用いてHEK293EBNA細胞（Invitrogen/LifeTechnologies）へ形質移入した。6日間のインキュベーション（5%CO₂、37℃）の後、培養上清を回収した。回収した培養上清より、マウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質（配列番号3）を、Protinoカラム（MACHEREY-NAGEL）を用いて精製した。

[0107] 20μgのマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質を、同量のTiterMax Goldアジュバント（TiterMax USA）、あるいはGERBUアジュバント（GERBU Biotechnik GmbH）と混合し、Balb/cマウスの足蹠へ皮下注射した。その後、3、7、および10日目に同様にマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質を投与した。このとき、TiterMax Goldアジュバント（TiterMax USA）は10日目のみ、GERBUアジュバント（GERBU Biotechnik GmbH）は3、7、および10日目に使用した。13日目にマウスを屠殺し（sacrificed）、末梢リンパ節を回収してリンパ節細胞を調製した。GenomeO

NE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.) の存在下で、調製したリンパ節細胞とP3U1ミエローマ細胞（京都大学より分与）とを5：1の割合で融合した。前記融合細胞は、96ウェルプラスチックプレートで培養した。7日間のインキュベーション（5%CO₂、37℃）の後、培養上清を回収した。

- [0108] 得られた培養上清を用いて、マウス、ラットおよびヒトEphA4に対する反応性を有するウェルをピックアップした。
- [0109] マウス、ラットおよびヒトのEphA4に対する反応性は、マウスEphA4の細胞外領域、ラットEphA4 (Genbank Accession No. NP_001155883.1) の細胞外領域（20～547位）またはヒトEphA4 (Genbank Accession No. NP_004429.1、配列番号5）の細胞外領域（20～547位）（配列番号6）に対して、ヒトIgG₁のFc領域とヒスチジンタグを融合したタンパク質（以下、それぞれ「マウスEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質」、「ラットEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質」または「ヒトEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質」という）を用い、ELISAにて評価した。
- [0110] マウス、ラットまたはヒトEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質は、以下の工程により調製した。最初に、pcDNA3.1-マウス、ラットまたはヒトEphA4細胞外領域-Fc-His発現ベクターを構築した。まず、マウス、ラットまたはヒトEphA4のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列をマウス、ラットまたはヒトの脳由来のTotal RNAを用いて、RT-PCRによって増幅し、FcおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpENTR1Aベクター (Invitrogen/Life Technologies) のSalI/NotIサイトにクローニングした。次に、マウス、ラットまたはヒトの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 T

technologies) のLR反応により、pcDNA3.1__rfcBベクターに移し、pcDNA3.1-マウス、ラットまたはヒトEphA4細胞外領域-Fc-His発現ベクターを構築した。構築したこれらの発現ベクターを、TransIT-LT1 (TAKARA) を用いてHEK293EBNA細胞 (Invitrogen/Life Technologies) へ形質移入した。6日間のインキュベーション (5%CO₂、37°C) の後、培養上清を回収した。

[0111] マウス、ラットまたはヒトEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質を用いたELISAは、以下の工程に従って行った。抗ヒトIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 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 (大日本製薬) により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.02% Tween20/PBS (ナカライテスク) で3回洗浄した後、各ウェルにマウス、ラットまたはヒトEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質を含む培養上清を加え (最終濃度1nM)、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、各ウェルに前記融合細胞の培養上清を添加した。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抗マウスIgG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、各ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、Sigma) 溶液を加え、5~20分、室温にてインキュベートした。各ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、和光純薬) を加え、マイクロプレートリーダー (PerkinElmer) により450nmの吸光度を読み取った。

[0112] 上記工程を経てピックアップしたウェルより限界希釈法にてハイブリドーマをクローニングし、最終的にマウス、ラットおよびヒトのEphA4に対する結合活性を有するマウス抗EphA4抗体を発現するハイブリドーマク

ローンを得た。

[0113] 得られたハイブリドーマクローンを培養し、培養上清からProtein A (GE Healthcare) を用いてマウス抗EphA4モノクローナル抗体を精製した。

[0114] (B) EphA4切断促進活性の評価

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(137mM NaCl (和光純薬), 5mM KCl (和光純薬), 7mM Na₂HPO₄ (和光純薬), 25mM Hepes (DOJINDO), 0.5mg/mL DNase (Sigma), 0.25%トリプシン (Life technologies))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ッティングして細胞懸濁液を作製した。培養液(Neurobasal medium (Life technologies)、1×B-27 supplement (Life technologies)、0.5mM L-グルタミン (Life technologies))を入れたポリLリジンをコートした96ウェルディッシュ(Falcon)に細胞を播種した。

[0115] 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(67nM)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16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。このサンプルを用いてS

D S - P A G E を行い、抗 E p h A 4 モノクローナル抗体 (A b n o v a) 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、E p h A 4 C 末端フラグメント／全長 E p h A 4 の値を算出した。

[0116] E p h A 4 の切断を促進する活性を有するマウス抗 E p h A 4 モノクローナル抗体 (抗体 A) を得た。抗体 A のアイソタイプは、モノクローナル抗体アイソタイピングキット (S e r o t e c) にて決定し、重鎖に対しては I g G ₁、軽鎖に対しては κ であった。

[0117] (C) 抗体 A の配列解析

抗体 A の重鎖および軽鎖のシグナル配列、および可変領域をコードする D N A 配列を、5' - R A C E (5' - r a p i d a m p l i f i c a t i o n o f c D N A e n d s) 法によって増幅した。前記ハイブリドーマから、R N e a s y (Q I A G E N) を用いて全 R N A を調製し、D N a s e (Q I A G E N , R N a s e f r e e D N a s e s e t) で処理した。c D N A 合成キット (T A K A R A) を用いて、前記全 R N A から二本鎖 c D N A を調製した。オリゴ D N A a d 2 9 S (A C A T C A C T C C G T) (配列番号 7) およびオリゴ D N A a d 2 9 A S (A C G G A G T G A T G T C C G T C G A C G T A T C T C T G C G T T G A T A C T T C A G C G T A G C T) (配列番号 8) のアニーリングによって得られた 5' アダプターを前記 c D N A に付加した。得られた c D N A を、5' フォワードプライマー (5' - P C R 4 p r i m e r , A G C T A C G C T G A A G T A T C A A C G C A G A G) (配列番号 9) および 3' リバースプライマー (マウス I g G 重鎖の増幅には G C C A G T G G A T A G A C T G A T G G (配列番号 1 0) を用い、マウス I g κ 軽鎖の増幅には G A T G G A T A C A G T T G G T G C A G C (配列番号 1 1) を用いた) によって増幅した。増幅された c D N A を、p C R 2 . 1 ベクター (I n v i t r o g e n / L i f e T e c h n o l o g i e s) に挿入した。抗体 A の遺伝子配列を、A B I 3 1 3 0 X L を用いて解析した。本解析によって同定された抗体 A の遺伝子配列にコードされたアミノ酸配列として、重鎖シグナル配列は配列番号 1 2 に示す配列であり、重鎖可変領域は配列番号 1 3 に示す配列であり、軽鎖シグナル配列は配列番号 1 4 に示す配列であり、軽鎖可変領域

は配列番号 15 に示す配列である。抗体 A の遺伝子配列をコードするヌクレオチド配列として、重鎖シグナル配列は配列番号 16 に示す配列であり、重鎖可変領域は配列番号 17 に示す配列であり、軽鎖シグナル配列は配列番号 18 に示す配列であり、軽鎖可変領域は配列番号 19 に示す配列である。

[0118] 抗体 A の重鎖および軽鎖の全長配列は、以下の工程により取得した。前記ハイブリドーマから、RNeasy (QIAGEN) を用いて全 RNA を調製し、DNase (QIAGEN, RNase free DNase set) で処理した。RNA PCR キット (TAKARA) を用いて、前記全 RNA から逆転写産物を調製した。得られた逆転写産物を鋳型に用い、抗体 A の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子配列を 5' フォワードプライマー (重鎖の増幅には GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTGTCCTGGTGCTGCTCC (primerID7455) (配列番号 20) を使用し、軽鎖の増幅には GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTTCCTGCTCAG (primerID7453) (配列番号 21) を使用した) と 3' リバースプライマー (重鎖の増幅には GCGGAATTCATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC (primerID7257) (配列番号 22) を使用し、軽鎖の増幅には CGCGAATTCATAA CACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC (primer ID7249) (配列番号 23) を使用した) を用いて、PCR にて増幅し、pEE6.4、および pEE12.4 ベクター (Lonza) にそれぞれクローニングした。遺伝子配列を、ABI 3130XL を用いて解析した。本解析によって同定された抗体 A の遺伝子配列にコードされたアミノ酸配列として、重鎖定常領域は配列番号 24 に示す配列であり、軽鎖定常領域は配列番号 25 に示す配列である。

[0119] 抗体 A の CDR は、以下の方法で決定した。抗体 A のアミノ酸配列を、Kabats の番号付システム (Kabat numbering system) に従って、Abyssis ソフトウェア (UCL) を用いて番号付けした。この番号を基に、CDR の同定のための Kabats の定義 (Kabat definition) に従って決定した。抗体 A の CDR のアミノ酸配列を表 1 に示す。

[表1]

抗体AのCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	RYGVH (配列番号26)
重鎖CDR2	VIVRGKSTDYNAAFHS (配列番号27)
重鎖CDR3	ESLPQVYYDYGYTSMIV (配列番号28)
軽鎖CDR1	RASQEISGYLS (配列番号29)
軽鎖CDR2	AASTLDS (配列番号30)
軽鎖CDR3	LQYASYFLT (配列番号31)

[0120] 参考例2：抗EphA4モノクローナル抗体のマウスおよびヒトEphA4に対する結合親和性

抗体AのマウスおよびヒトEphA4に対する結合親和性をBiacore T200 (GE Healthcare)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 (GE Healthcare、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GE Healthcare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3.5 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。マウスもしくはヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His10をランニング緩衝液HBS-EP (GE Healthcare、BR-1001-88)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 (10 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、4 M MgCl₂ (60秒間、和光純薬)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 B I A e v a l u a t i o n 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、マウスおよびヒトの E p h A 4 に対する結合親和性 ($KD = kd / ka$) を算出した。

[0121] 抗体 A のマウスおよびヒト E p h A 4 に対する結合親和性 (KD 値) は、それぞれ $1.32 \times 10^{-9} M$ 、 $1.19 \times 10^{-9} M$ であった (図 1)。マウスおよびヒト E p h A 4 に対するその他の結合パラメータもほぼ同程度であった。よって、抗体 A は、マウスおよびヒトの E p h A 4 に対して同程度の結合親和性を持つと考えられる。

[0122] 参考例 3 : 抗 E p h A 4 モノクローナル抗体の海馬ニューロンにおける E p h A 4 切断促進活性

抗体 A について、海馬ニューロンを用いた E p h A 4 切断促進活性の評価を以下の工程に従って行った。96 ウェルディッシュ (F a l c o n) に播種したラット海馬ニューロンに、抗体 A (2.0、6.7、20 nM) および γ セクレターゼ阻害薬である Compound E (50 nM、E n z o L i f e S c i e n c e s) を処置して 24 時間後に PBS (和光純薬) で洗浄して、SDS s a m p l e b u f f e r (L a e m m l i 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、抗 E p h A 4 モノクローナル抗体 (A b n o v a) 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、E p h A 4 C 末端フラグメント / 全長 E p h A 4 の値を算出した。

[0123] 抗体 A は、海馬ニューロンにおいて、濃度依存的に E p h A 4 切断反応を促進した (図 2)。

[0124] 参考例 4 : 抗 E p h A 4 モノクローナル抗体のマウス E p h A 4 - マウスリガンド結合阻害活性

抗体 A について、マウス E p h A 4 とマウス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 (T

hermo 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 (DSファーマバイオメディカル) 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 (Thermo SCIENTIFIC) で3回洗浄した後、ウェルにマウス EphA4 細胞外領域-SEAP-His タンパク質を加え (最終濃度 10 nM)、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抗体 A を (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マウス Ephrin A1-Fc キメラ (R&D Systems、最終濃度 6 nM) およびビオチン化マウス Ephrin B2-Fc キメラ (R&D Systems、最終濃度 2.5 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、Sigma) 溶液を加え、2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 (1N H₂SO₄、和光純薬) を加え、マイクロプレートリーダー (PerkinElmer) により 450 nm の吸光度を読み取った。

[0125] 抗体 A は、マウス EphA4 とマウスリガンドとの結合を濃度依存的に抑制し、マウス Ephrin A1、Ephrin B2 結合に対する IC₅₀ 値はそれぞれ約 5.9 nM、3.1 nM であった (図3)。よって、抗体 A はマウス EphA4 とマウスリガンドとの結合を強く阻害することが示された。

[0126] 参考例5：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 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（DSファーマバイオメディカル）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween 20/PBS（Thermo Scientific）で3回洗浄した後、ウェルにヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質を加え（最終濃度10nM）、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（0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000nM）を添加した。なお、リガンドにはビオチン化ヒトEphrinA5-Fcキメラ（R&D Systems、最終濃度0.7nM）およびビオチン化ヒトEphrinB3-Fcキメラ（R&D Systems、最終濃度2.3nM）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、Sigma）溶液を加え、2～5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（1N H₂SO₄、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（Molecular DevicesまたはPerkinElmer）により450nmの吸光度を読み取った。

[0127] 抗体A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、ヒトEphrinA5、EphrinB3結合に対するIC₅₀値はそれぞれ約2.8nM、1.4nMであった（図4）。よって、抗体AはヒトEphA4とヒトリガンドとの結合も強く阻害することが示された。

[0128] 参考例6：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

参考例1に記載のマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質の調製方法に従って、ヒトの各Ephレセプター（EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、E

p h A 8、E p h A 1 0、E p h B 1、E p h B 2、E p h B 3、E p h B 4、E p h B 6) のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列を組織由来のTotal 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pENTR1Aベクター (Invitrogen/Life Technologies) にクローニングした。次に、ヒトの各Ephレセプター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配列をGateway System (Invitrogen/Life Technologies) のLR反応により、pcDNA3.1__rfcBベクターに移し、ヒトの各Ephレセプターの細胞外領域に対してSEAPとHisタグを融合したタンパク質 (「Ephレセプター細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質」という) を発現するベクター (「Ephレセプター細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター」という) を構築した。

[0129] 次に、Expi293発現システム (Gibco/ThermoFisher) を用いて、ヒトの各Ephレセプター細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクターを、Expi293F細胞 (Gibco/ThermoFisher) に導入した。5日間の培養 (5%CO₂、37℃、120rpm) の後、培養上清を回収し、室温で1500rpm、5分間遠心した。遠心上清を0.45μmフィルター (Millipore) でろ過した。

[0130] 抗体A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。4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロックエース (DSファーマバイオメディカル) により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween20/PBS (Thermo Scientific) 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-SEAP-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、ウェルにヒトIgG溶液（100 μg/mL、三菱ウェルファーマ）および抗体A（10 μg/mL）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウスIgG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、Sigma）溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液（1 N H₂SO₄、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（Perkin Elmer）により450 nmの吸光度を読み取った。

[0131] 抗体Aは、ヒトEphレセプターファミリー間ではヒトEphA4にのみ特異的に結合活性を有していた（図5）。

[0132] 参考例7：抗EphA4モノクローナル抗体のマウスEphレセプターに対する選択性

参考例1に記載のEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質の調製方法に従って、マウスの各Ephレセプター（EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB6）のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列を組織由来のTotal RNAを用いて、RT-PCRによって増幅し、ヒトIgG₁のFc領域およびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpENTR1Aベクター（Invitrogen/Life Technologies）にクローニングした。次に、マウスの各Ephレセプター（EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB6）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、マウスの各Ephレセプターの細胞外領域-Fc-His

タンパク質発現ベクターを構築した。マウスEphA2の細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターの構築では、マウスEphA2のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列を組織由来のTotal RNAを用いて、RT-PCRによって増幅し、FcおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.1ベクターにクローニングして、マウスEphA2細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターを構築した。

[0133] 次に、Expi293発現システム(Gibco/ThermoFisher)を用いて、マウスの各Ephレセプター細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターを、Expi293F細胞(Gibco/ThermoFisher)に導入した。5日間の培養(5%CO₂、37℃、120rpm)の後、培養上清を回収し、室温で1500rpm、5分間遠心した。遠心上清を0.45μmフィルター(Millipore)でろ過した。

[0134] 抗体Aについて、マウス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。4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロッケーズ(DSファーマバイオメディカル)により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween20/PBS(Thermo Scientific)で3回洗浄した後、各ウェルにマウスの各Ephレセプター細胞外領域-Fc-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、ウェルにヒトIgG溶液(100μg/mL、Sigma)および抗体A(10μg/mL)を添加し、室温にて1時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウスIgG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TM

BZ (3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン、Sigma) 溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液 (1 N H₂SO₄、和光純薬) を加え、マイクロプレートリーダー (PerkinElmer) により 450 nm の吸光度を読み取った。

[0135] 抗体 A は、マウス Eph レセプターファミリー間ではマウス Eph A4 にのみ特異的に結合活性を有していた (図 6)。

[0136] 参考例 8 : 抗 Eph A4 モノクローナル抗体のマウス、ラット、サルおよびヒト Eph A4 に対する反応性

マウス、ラット、サルおよびヒト Eph A4 細胞外領域-Fc-His タンパク質の作製は、以下の工程に従って行った。まず、参考例 1 に記載の Eph A4 細胞外領域-Fc-His タンパク質の調製方法に従って、サル Eph A4 細胞外領域-Fc-His タンパク質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サル Eph A4 のアミノ酸配列を配列番号 32、その細胞外領域は配列番号 33 として示す。サル Eph A4 細胞外領域-Fc-His タンパク質発現ベクター、および参考例 1 に記載のマウス、ラットおよびヒト Eph A4 細胞外領域-Fc-His タンパク質発現ベクターを用いて、各種 Eph A4 細胞外領域-Fc-His タンパク質を調製した。

[0137] 抗体 A について、各種 Eph A4 細胞外領域との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。

ロバ抗ヒト IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 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 (DS ファーマバイオメディカル) により、ウェルを室温にて 1 時間ブロッキングした。0.05% Tween 20/PBS (Thermo Scientific) 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 Eph A4 細胞外領域-Fc-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、ウェルにヒ

ト IgG 溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、三菱ウェルファーマ) および抗体 A (0、0.00013、0.00064、0.0032、0.016、0.08、0.4、2、10、 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、室温にて 1 時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウス IgG 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、Sigma) 溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液 (1N H_2SO_4 、和光純薬) を加え、マイクロプレートリーダー (PerkinElmer) により 450 nm の吸光度を読み取った。

[0138] 抗体 A 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 7)。

[0139] 参考例 9 : 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 34) あるいはプレプロトリプシンのシグナル配列 (配列番号 35) とヒ

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、MBP およびヒスチジンタグをコードする DNA 配列を有する p c DNA 3.4 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 5、その細胞外領域は配列番号 36、リガンド結合ドメインは配列番号 37、フィブロネクチン III 型ドメイン 1 は配列番号 38、フィブロネクチン III 型ドメイン 2 は配列番号 39 として示す。Expi293 発現システム (Thermo Scientific) を用いて、上記発現ベクターを Expi293F 細胞 (Thermo Scientific) へ形質移入した。4 日後に培養上清を回収し、0.45 μ m フィルター (Millipore) を通した。Amylose resin (NEB) を用いて粗精製を行い、Zeba Spin Desalting column (Thermo Scientific) を用いて PBS (和光純薬) にバッファー置換した。Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) にて単量体画分を分画精製した。

[0140] 抗体 A について、各種ヒト EphA4 内ドメイン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。4℃ にて一晩インキュベートした後、1% ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル) 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 (ナカライテスク) で 2 回洗浄した後、ウェルにヒト 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（最終濃度10nM）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、ウェルに抗体A（最終濃度10nM）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス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。5回洗浄した後、ウェルにTMB溶液（KPL）を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（PerkinElmer）により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0141] 抗体A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8）。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。

[0142] 参考例10：抗EphA4モノクローナル抗体の海馬ニューロンのスパイン数に対する増加効果

ラット海馬ニューロンの調製は、上記参考例1の（B）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、遺伝子導入を行わないラット海馬ニューロンと混合して、ポリリジンをコートしたカバーガラス（松浪硝子工業）を入れた24ウェルプレート（Falcon）に播種した。

[0143] 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。ポリリジンをコートしたカバーガラス（松浪硝子工業）を入れた24ウェルプレート（Falcon）に播種した培養13日目のEGFP導入ラット海馬ニューロンに、コントロール抗体（マウスIgG₁；BioLegend

）もしくは抗体A（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。固定液を除き、細胞をPBSで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。液を除き、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GFP抗体（ナカライテスク）を1時間30分反応させた。1次抗体液を除き、PBSで3回洗浄したのち、2次抗体を1時間反応させた。2次抗体液を除き、PBSで3回洗浄したのち、Prolong Gold antifade reagent（Molecular probes）を加えて封入し、LSM800（ZEISS）で観察を行った。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 μmあたりのスパイン数を算出した。

[0144] 抗体Aは、海馬ニューロンのスパイン数を増加させた（図9）。本結果は、抗体A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。

[0145] 参考例11：抗EphA4モノクローナル抗体のin vivoにおけるタウのリン酸化抑制効果

タウトランスジェニックマウス（rTg4510）を用いたin vivoにおけるタウのリン酸化抑制効果の評価は、以下の工程に従って行った。タウトランスジェニックマウス（rTg4510）に、抗体Aもしくは、ジニトロフェノールをマウスに免疫して常法により作製したコントロール抗体（マウス抗ジニトロフェノール抗体）をそれぞれ100 mg/kgの用量（10 mL/kg）で、20週齢から26週齢まで週2回皮下投与した。最終投与から3、5日後に2%イソフルラン（インターベット）および3種混合麻酔

薬（4. 0mg/kgドルミカム（アステラス製薬）、0. 3mg/kgドミトール（日本全薬工業）、5. 0mg/kgベトルファール（Meiji Seikaファルマ））で麻酔し、麻酔下で3ユニット/mLヘパリン（味の素）と1%ホスファターゼ阻害剤カクテル（ナカライテスク）含有のPBS（和光純薬）で灌流を行い、大脳半球を摘出した。採材した大脳半球を、2%パラホルムアルデヒド（TAAB）/0. 1Mリン酸緩衝液（和光純薬）に一晩振とうしながら4℃で固定した。大脳半球を20%Sucrose（和光純薬）/0. 1Mリン酸緩衝液（和光純薬）、続いて25%Sucrose/0. 1Mリン酸緩衝液（和光純薬）で置換したのち、ティッシュュー・テックO. C. T. コンパウンド（サクラファインテックジャパン）/25%Sucroseに包埋して液体窒素にて凍結した。クライオスタットCM1860（ライカ）を用いて7μm厚で切片を作製し、スライドガラス（武藤化学）に貼付したのち、冷風で風乾させた後、密封した袋の中に入れ、-80℃で保存した。免疫染色に使用するスライドガラスを融解し、冷風で風乾させた後、PBS（和光純薬）で洗浄し、1%BSA（Sigma）/10%正常ロバ血清（Jackson ImmunoResearch Laboratories）/0. 5%TritonX-100（和光純薬）/PBS液に浸して、1時間ブロッキングを施したあと、抗リン酸化タウ抗体AT8（Fujirebio Europe N. V.）を一晩常温で反応させた。PBSで3回洗浄したのち、2次抗体を1時間反応させた。PBSで3回洗浄したのち、Prolong Gold antifade reagent（Molecular probes）を切片に載せて封入し、LSM700（ZEISS）で観察を行った。海馬CA1放射状層におけるAT8シグナル陽性の面積を、画像解析ソフトImageJを用いて計測し、総面積に対するAT8陽性シグナル面積の割合を算出した。

[0146] 抗体Aは、海馬CA1領域のリン酸化タウのシグナルを減少させた（図10）。本結果は、抗体Aがタウトランスジェニックマウス（rTg4510）においてタウ病理の進行を抑制する活性を有することを示すものである。

[0147] 参考例 12 : X線結晶構造解析による E p h A 4 - リガンド結合ドメイン (E p h A 4 - L B D) のエピトープマッピング

抗体 A - F a b の調製は、以下の工程に従って行った。抗体 A 101、1 mg を、15 mg / mL の濃度で 30 mM レーシステインおよび 2 mM E D T A を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。この抗体溶液に、パパイン (Sigma) を抗体に対して 1 / 200 量加えて、37℃で18時間酵素消化を行った。抗体 A 酵素消化液は、PBS に対して透析したのち、遠心分離にて沈殿を除去した (生じた沈殿は PBS で再溶解して、遠心分離上清と混合した)。次に、抗体 A - F a b 以外の不純物を除去する目的で、以下の工程を行った。

1) Protein A カラムによる精製

この酵素消化溶液を、PBS で平衡化した 2 mL の ProSep vA High Capacity (Millipore) にアプライして、素通り画分および、PBS での洗浄画分を回収した。

2) 抗ヒト IgG Fcγ 抗体を用いたアフィニティー精製

抗ヒト IgG Fcγ 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を、NHS-Activated Sepharose 4FF (GE Healthcare) に共有結合させたアフィニティーカラムを、この Sepharose のマニュアルに従って調製した。このアフィニティーカラムに対して、上記 1) で回収した溶液をチャージして、その素通り溶液と PBS での洗浄液を回収した。

3) ゲルろ過による精製

上記 2) で得た素通り画分を、限外ろ過膜を用いて濃縮した。Superose 12 (GE Healthcare) を PBS で平衡化し、濃縮した標品をアプライして分離精製した。分離精製した画分の一部を、SDS-PAGE で分析して、純度高く抗体 A - F a b を含む画分を回収してプールした。このようにして精製した標品を、抗体 A - F a b とした。

[0148] 抗体 A - F a b と抗原である E p h A 4 - L B D の複合体を作製するため

、EphA4-LBDを調製した (Qin H. et al., J. Biol. Chem., 283: 29473-29484 (2008))。EphA4-LBDが抗体A-Fabに対して約1.5倍のモル比になるように、0.68 μ mol (200 μ M、3.4 mL) のEphA4-LBDと0.45 μ mol (300 μ M、1.5 mL) の抗体A-Fabを混合した。次に混合液をHILOAD 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) にアプライし、クロマト用緩衝液 (25 mM Tris/HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl) で溶出を行った。複合体を含む画分をSDS PAGEで分析し、高純度の画分を集めて約40.8 mg/mLまで濃縮し、これを結晶化に用いた。

[0149] 複体の結晶化は、自動結晶化装置Hydra II Plus Oneシステム (Matrix Technologies Corp., Ltd.) を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法によって行った。プレートはMRC-2 (Molecular Dimensions) を使用した。リザーバー溶液の組成は100 mM HEPES (pH 7.5)、10% Polyethylene Glycol 8000、8% Ethylene Glycolで、このリザーバー溶液と上記の複合体溶液の体積比が1:1になるよう混合して結晶化ドロップレットを作製した。作製した結晶化プレートは20°Cで静置した。

[0150] 上記の条件で結晶化を行ったところ、空間群P 2 1 2 1 2 1、格子定数 $a = 71.0 \text{ \AA}$ 、 $b = 84.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 116.1 \text{ \AA}$ の結晶が得られた。得られた結晶に放射光X線 (1.0 $\text{\AA}$) を入射して1.79 $\text{\AA}$ の回折データを取得した。回折データをHKL 2000 (HKL Research Inc.) によって処理し、分子置換法によって位相決定を行った。分子置換法にはCCP4 Software Suite (Collaborative computational project number 4、[CCP4] version 6.5.0、Acta Cryst. D 67: 235-242 (2011)) に含まれるプログラムPHASER (ve

rsion 2.5.0、McCoy A. J. et al., J. Appl. Cryst. 40:658-674 (2007))を用いた。分子置換法のサーチモデルとしてはEphA4-LBDの結晶構造(PDB ID: 3CKH)とIgGのFab領域の結晶構造(PDB ID: 2VXT (L鎖)と1FGN (H鎖))を用いた。決定した位相から得られた電子密度に合うように分子モデルをプログラムCOOT (Emsley P. et al., Acta Cryst. D 60: 2126-2132n (2004))を用いて構築し、構造精密化をプログラムREFMAC (Murshudov G.N., Acta Cryst. D 53: 240-255 (1997))を用いて行った。

以上の構造計算によって2.0 Å分解能の複合体結晶構造を得た(R=0.212、Rfree=0.258)。

[0151] 得られた抗体A-Fab/EphA4-LBD複合体の結晶構造を計算化学システムMOE 2018.0101 (Chemical Computing Group Inc.)に搭載されている相互作用検出ツールを用いて解析し、抗体A-Fabと直接接触しているEphA4-LBD上のアミノ酸残基を同定した(図11A)。同定されたアミノ酸残基は、Glu51、Gly52、Ile59、Gln71、Cys73、Asn74、Val75、Met76、Glu77、Thr104、Arg106、Leu111、Pro112、Met115、Arg162、Met164、Cys191、Ala193、Val195である。図11Bに、Maestro (version 11.0、Schrodinger、LLC)で作成したEphA4-LBDの表面構造を示す。この結果、本発明者らはこれらのアミノ酸残基が存在する領域がEphA4-LBDにおける抗体A-Fab結合領域であると結論づけた。

[0152] 実施例1：抗体Aのヒト化抗体の作製

ヒト化抗EphA4抗体の調製

ヒト化抗体の可変領域を設計した。抗体Aのフレームワーク領域(FR)

に対する高い相同性を基に、ヒト抗体のFRの中から、重鎖についてはIGHV3-33*03（配列番号42）、およびJH6（配列番号43）、軽鎖についてはIGKV1-17*01（配列番号40）、およびJK4（配列番号41）をヒト化抗体のFRとして選択した。その後、マウス抗体Aの3D構造予測モデルを用いて、CDRのアミノ酸と相互作用するFRにおけるアミノ酸を予測し、重鎖のCDR1にY32Fの変異を有する抗体AのCDR（配列番号44、27、28、および29-31）とともに移植し、ヒト化抗体の重鎖可変領域としてHK2-42（配列番号45）が設計され、ヒト化抗体の軽鎖可変領域としてL1-8（配列番号46）が設計された。移植したCDRのアミノ酸配列を表2に示し、核酸配列を表3に示す。

[0153] 重鎖定常領域として、ヒトIgG₂の定常領域（配列番号47）を用いた。軽鎖定常領域としては、ヒトIgκ（配列番号48）を用いた。Exp293発現システム（Gibco/ThermoFisher）を用いて、ヒト化抗体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（pcDNA3.4）をExp293F細胞（Gibco/ThermoFisher）へ形質移入した。ヒト化抗体のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、それぞれ、重鎖可変領域については配列番号55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56に示す核酸配列を用い、重鎖定常領域については配列番号57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58に示す核酸配列を用いた。ヒト化抗体の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号59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60に示すアミノ酸配列である。ヒト化抗体の重鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号61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62に示す核酸配列である。上清を回収し、MabSelect Sure（GE Healthcare）を用いて抗体Aのヒト化抗体（抗体B）を精製した。

[0154]

[表2]

抗体BのCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	RFGVH (配列番号44)
重鎖CDR2	VINWGGSIDYNAAFMS (配列番号27)
重鎖CDR3	ESLFOVYVDYGYISMDY (配列番号28)
軽鎖CDR1	RASGEISGYLS (配列番号29)
軽鎖CDR2	AASTLDS (配列番号30)
軽鎖CDR3	LQYASYFLT (配列番号31)

[表3]

抗体EのCDRの核酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	AGATTGGAGTGCAT (配列番号49)
重鎖CDR2	GTGATCTGGAGGGAGGATCCACCGACTACAGCCTGCTTTATGAGC (配列番号50)
重鎖CDR3	GAGAGCCTGTTCGGCTGTACTATGACTACCGCTACTATCTATGGATTAT (配列番号51)
軽鎖CDR1	CGGCGCTCCAGGAGATCTCTGGCTACCTTCC (配列番号52)
軽鎖CDR2	GCTGCTCCAGCGTGGACTCT (配列番号53)
軽鎖CDR3	CTGGAGTACCGTTCCTATCCACTGACC (配列番号54)

[0155] 実施例2：ヒト化抗EphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4に対する親和性

実施例1で得た抗体BのヒトEphA4に対する結合親和性をBiacore T200 (GE Healthcare)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 (GE Healthcare, 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GE Healthcare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3.5 μ g/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 (GE Healthcare、BR-1001-88)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(10RU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、0nMの範囲で系列希釈した抗体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、4M MgCl₂(60秒間、和光純薬)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BIA 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に対する親和性($KD = k_d / k_a$)を算出した。

[0156] 抗体BのヒトEphA4に対する結合親和性(KD値)は、 1.34×10^{-9} Mであった(図12)。抗体Bは、ヒト化を行う前の抗体Aとほぼ同等の親和性を示すことが分かった。

[0157] 実施例3：ヒト化抗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

実施例1で得た抗体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ウェルディッシュ(Falcon)に播種したラット海馬ニューロンに、抗体B(2.0、6.7、20nM)およびγセクレターゼ阻害薬であるCompoundE(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。このサンプルを用いてSDS-PAGEを行い、抗EphA4モノクローナル抗体(Abnova)を用いたウェスタンブロットティングを行い、バンド強度を定量化し、EphA4C末端フラグメン

ト／全長E p h A 4の値を算出した。

[0158] 抗体Bは、海馬ニューロンにおいて、濃度依存的にE p h A 4切断反応を促進した（図13）

[0159] 実施例4：ヒト化抗E p h A 4モノクローナル抗体のヒトE p h A 4－ヒトリガンド結合阻害活性

実施例1で得た抗体Bについて、ヒトE p h A 4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（T h e r m o S C I E N T I F I C）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、1%ブロックエース（D Sファーマバイオメディカル）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05%T w e e n 20／PBS（T h e r m o S C I E N T I F I C）で3回洗浄した後、ウェルにヒトE p h A 4細胞外領域－S E A P－H i s タンパク質（最終濃度10nM）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B（0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1000、3000nM）を添加した。なお、リガンドにはビオチン化ヒトE p h r i n A 5－F cキメラ（R & D S y s t e m s、最終濃度0.7nM）およびビオチン化ヒトE p h r i n B 3－F cキメラ（R & D S y s t e m s、最終濃度2.3nM）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（G E H e a l t h c a r e）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T M B Z（3，3'，5，5'－テトラメチルベンジジン、S i g m a）溶液を加え、2～5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（1N H₂SO₄、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（M o l e c u l a r D e v i c e sまたはP e r k i n E l m e r）により450nmの吸光度を読み取った。

[0160] 抗体Bは、ヒトE p h A 4とヒトリガンドとの結合を濃度依存的に抑制し

、ヒトEphrinA5、EphrinB3結合に対する IC_{50} 値はそれぞれ約4.9 nM、1.6 nMであった。よって、抗体Bは、ヒトEphA4とヒトリガンドとの結合を強く阻害し、ヒト化を行う前の抗体Aとほぼ同等の阻害活性を示すことが分かった（図14）。

[0161] 実施例5：ヒト化抗EphA4モノクローナル抗体のマウスEphA4－マウスリガンド結合阻害活性

実施例1で得た抗体Bについて、マウスEphA4とマウス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%ブロッケーヌ（DSファーマバイオメディカル）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.02% Tween20/PBS（Thermo SCIENTIFIC）で3回洗浄した後、ウェルにマウスEphA4細胞外領域－SEAP－Hisタンパク質を加え（最終濃度10 nM）、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マウスEphrinA1－Fcキメラ（R&D Systems、最終濃度6 nM）およびビオチン化マウスEphrinB2－Fcキメラ（R&D Systems、最終濃度2.5 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、Sigma）溶液を加え、2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（1N H_2SO_4 、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（Molecular DevicesまたはPerkinElmer）により450 nmの吸光度を読み取った。

[0162] 抗体Bは、マウスEphA4とマウスリガンドとの結合を濃度依存的に抑制し、マウスEphrinA1、EphrinB2結合に対する IC_{50} 値はそれぞれ約8.7 nM、4.2 nMであった。よって、抗体Bは、マウスEphA4とマウスリガンドとの結合を強く阻害し、ヒト化を行う前の抗体Aとほぼ同等の阻害活性を示すことが分かった（図15）。

[0163] 実施例6：ヒト化抗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

参考例1に記載のマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質の調製方法と同様に、ヒトの各Ephレセプター（EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB6）のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列を組織由来のTotal RNAを用いて、RT-PCRによって増幅し、SEAPタンパク質およびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpENTR1Aベクター（Invitrogen/Life Technologies）にクローニングした。次に、ヒトの各Ephレセプターのシグナル配列と細胞外領域、SEAPタンパク質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、ヒトの各Ephレセプターの細胞外領域に対してSEAPタンパク質とHisタグを融合したタンパク質（「Ephレセプター細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質」という）を発現するベクター（「Ephレセプター細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター」という）を構築した。

[0164] 次に、Expi293発現システム（Gibco/ThermoFisher）を用いて、ヒトの各Ephレセプター細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクターを、Expi293F細胞（Gibco/ThermoFisher）に導入した。5日間のインキュベーション（5%CO₂、

37℃)の後、培養上清を回収し、室温で1500rpm、5分間遠心した。遠心上清を0.45μmフィルター(Millipore)でろ過した。

[0165] 実施例1で得た抗体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。4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロックエース(DSファーマバイオメディカル)により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween20/PBS(Thermo Scientific)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-SEAP-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、ウェルにヒトIgG溶液(100μg/mL、三菱ウェルファーマ)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。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒトIgG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、Sigma)溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液(1N H₂SO₄、和光純薬)を加え、マイクロプレートリーダー(PerkinElmer)により450nmの吸光度を読み取った。

[0166] 抗体Bは、ヒト化を行う前の抗体A同様、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16)。

[0167] 実施例7：ヒト化抗EphA4モノクローナル抗体のマウスEphレセプターに対する選択性

参考例1に記載のEphA4細胞外領域-Fc-Hisタンパク質の調製方法に従って、マウスの各Ephレセプター(EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA1

0、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB6)のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列を組織由来のTotal RNAを用いて、RT-PCRによって増幅し、ヒトIgG₁のFc領域およびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpENTR1Aベクター (Invitrogen/Life Technologies) にクローニングした。次に、マウスの各Ephレセプター (EphA1、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB6)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、マウスの各Ephレセプターの細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターを構築した。マウスEphA2の細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターの構築では、マウスEphA2のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列を組織由来のTotal RNAを用いて、RT-PCRによって増幅し、FcおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.1ベクターにクローニングして、マウスEphA2細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターを構築した。

[0168] 次に、Expi293発現システム (Gibco/ThermoFisher) を用いて、マウスの各Ephレセプター細胞外領域-Fc-Hisタンパク質発現ベクターを、Expi293F細胞 (Gibco/ThermoFisher) に導入した。5日間の培養 (5%CO₂、37℃、120 rpm) の後、培養上清を回収し、室温で1500 rpm、5 分間遠心した。遠心上清を0.45 μmフィルター (Millipore) でろ過した。

[0169] 抗体Bについて、マウス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。4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロッカー（DSファーマバイオメディカル）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween 20/PBS（Thermo SCIENTIFIC）で3回洗浄した後、各ウェルにマウスの各Ephレセプター細胞外領域-Fc-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、ウェルにヒトIgG溶液（100 μg/mL、Sigma）および抗体B（10 μg/mL）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトKappa Light Chain抗体（IBL）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、Sigma）溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液（1N H₂SO₄、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（PerkinElmer）により450 nmの吸光度を読み取った。

[0170] 抗体Bは、マウスEphレセプターファミリー間ではマウスEphA4にのみ特異的に結合活性を有していた（図17）。

[0171] 実施例8：ヒト化抗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

[0172] 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。

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%ブロッカー（DSファーマバイオメディカル）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.05% Tween 20/PBS（Thermo SCIENTIFIC）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、ウェルにヒトIgG溶液（100 μ g/mL、三菱ウェルファーマ）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。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒトIgG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、Sigma）溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液（1N H_2SO_4 、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（PerkinElmer）により450nmの吸光度を読み取った。

[0173] 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18）。

[0174] 実施例9：ヒト化抗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

実施例1で得た抗体Bについて、各種ヒトEphA4内ドメイン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。4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロックエース（DSファーマバイオメディカル）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（ナカライテスク）で2回洗浄した後、ウェルにヒト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（最終濃度10nM）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、ウェルに抗体B（最終濃度10nM）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。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。5回洗浄した後、ウェルにTMB（KPL）溶液を加え、適度な発色を確認したらウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、和光純薬）を加え、マイクロプレートリーダー（PerkinElmer）により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0175] 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19）。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。

[0176] 実施例10：ヒト化抗EphA4モノクローナル抗体の海馬ニューロンのスパイン数に対する増加効果

ラット海馬ニューロンの調製は、参考例1の（B）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、ポリLリジンをコートしたカバーガラス（松浪硝子工業）を入れた24ウェルプレート（Falcon）に播種した。

[0177] 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。ポリLリジンをコートしたカバーガラス（松浪硝子工業）を入れた24ウェルプレート（Falcon）に播種した培養13日目のEGFP導入ラット海馬ニューロンに、コントロール抗体（ヒトIgG₂；Sigma）あるいは抗体B（6、7、20nM）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。固定液を除き、細胞をPBSで3回洗浄したのち、0.25%TritonX-100（和光純薬）／PBSを加えて、15分間、細胞透過処理を行った。液を除き、2%BSA（Sigma

a) / 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GFP抗体（ナカライテスク）を1時間30分反応させた。1次抗体液を除き、PBSで3回洗浄したのち、2次抗体を1時間反応させた。2次抗体液を除き、PBSで3回洗浄したのち、Prolong Gold antifade reagent (Molecular probes) を加えて封入し、LSM800 (ZEISS) で観察を行った。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。

[0178] 抗体Bは、海馬ニューロンのスパイン数を増加させた（図20）。本結果は、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。

[0179] 実施例11：ヒト化抗EphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4切断促進活性

実施例1で得た抗体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の調製は、参考例1の(B)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) を用いてヒトEphA4-HAタンパク質発現ベクターを導入し、ポリLリジン をコートした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、抗体B (6.7、20、67 nM) およびγセクレターゼ阻害薬であるCompound E (50 nM, Enzo Life Sciences) を処置して約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。このサンプルを用いてS

D S - P A G E を行い、ラット抗 H A モノクローナル抗体 (R o c h e) 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、E p h A 4 C 末端フラグメント / 全長 E p h A 4 の値を算出した。

[0180] 抗体 B は、海馬ニューロンにおいてヒト E p h A 4 切断反応を促進した (図 2 1) 。

[0181] 実施例 1 2 : ヒト化抗 E p h A 4 モノクローナル抗体の海馬ニューロンのスパイン数増加効果に対する MMP および A D A M の関与

ラット海馬ニューロンの調製は、参考例 1 の (B) に記載されるように行った。一部のラット海馬ニューロンに N u c l e o f e c t o r (L o n z a) を用いて E G F P 遺伝子を導入し、ポリ L リジンをコートしたカバーガラス (松浪硝子工業) を入れた 2 4 ウェルプレート (F a l c o n) に播種した。

[0182] 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。ポリ L リジンをコートしたカバーガラス (松浪硝子工業) を入れた 2 4 ウェルプレート (F a l c o n) に播種した培養 1 3 日目の E G F P 導入ラット海馬ニューロンに、コントロール抗体 (ヒト I g G ₂ ; S i g m a) あるいは抗体 B (2 0 n M) と、D M S O (S i g m a) あるいは MMP および A D A M の阻害剤である G M 6 0 0 1 (2 . 5 μ M , M e d C h e m E x p r e s s) を 2 4 時間処置した。その後、カバーガラスを 2 % P F A (和光純薬) / 4 % S u c r o s e (和光純薬) / P B S に移し、2 0 分間静置し、細胞を固定した。固定液を除き、細胞を P B S で 3 回洗浄したのち、0 . 2 5 % T r i t o n X - 1 0 0 (和光純薬) / P B S を加えて、1 5 分間、細胞透過処理を行った。0 . 2 5 % T r i t o n X - 1 0 0 / P B S を除き、2 % B S A (S i g m a) / 0 . 2 5 % T r i t o n X - 1 0 0 / O P T I - M E M (G I B C O) 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 G F P 抗体 (ナカライテスク) を 1 時間 3 0 分反応させた。1 次抗体液を除き、P B S で 3 回洗浄したのち、2 次抗体を 1 時間反応させた。2 次抗体液を除き、P B S で 3 回洗浄したのち、P r o l o n g G o l d

antifade reagent (Molecular probes) を加えて封入し、LSM800 (ZEISS) で観察を行った。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。

[0183] 抗体Bによる海馬ニューロンのスパイン数増加は、GM6001を同時処理することにより阻害された(図22)。本結果は、抗体Bが海馬ニューロンにおいて、MMPおよびADAMを介したスパイン安定化活性を有することを示すものである。

[0184] 実施例13：ヒト化抗EphA4モノクローナル抗体のin vivoにおけるタウのリン酸化抑制効果

タウトランスジェニックマウス(rTg4510)を用いたin vivoにおけるタウのリン酸化抑制効果の評価は、以下の工程に従って行った。タウトランスジェニックマウス(rTg4510)に、抗体Bを100mg/kgの用量(10mL/kg)で、20週齢から26週齢まで週2回皮下投与した。対照群にはPBS(和光純薬)を10mL/kgで皮下投与した。最終投与から3.5日後に、マウスを2~2.5%イソフルラン吸入麻酔薬(インターベット)および3種混合麻酔薬(4.0mg/kgドルミカム(アステラス製薬)、0.3mg/kgドミトール(日本全薬工業)、5.0mg/kgベトルファール(Meiji Seikaファルマ))で麻酔し、麻酔下で3ユニット/mLヘパリン(味の素)と1%ホスファターゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)含有のPBS(和光純薬)で灌流を行い、マウスの大脳半球を摘出した。採材した大脳半球を、2%パラホルムアルデヒド(TAAB)/0.1Mリン酸緩衝液(和光純薬)に浸漬し4℃で一晩振とうしながら固定した。大脳半球を10%スクロース(和光純薬)/0.1Mリン酸緩衝液(和光純薬)、続いて20%スクロース/0.1Mリン酸緩衝液(和光純薬)で置換したのち、ティッシュ・テックO.C.T.コン

パウンド（サクラファインテックジャパン）／20％スクロースに包埋して液体窒素にて冷却したアルミブロックを用いて凍結した。クライオスタットCM1860（ライカ）を用いて7 μ m厚で大脳半球の切片を作製した。切片をシランコーティングスライドガラス（武藤化学）に貼付し、冷風で風乾させた後、密封した袋の中に入れ、 -80°C で保存した。免疫染色に使用するスライドガラスを -80°C より取り出し冷風で風乾させた後、PBS（和光純薬）で洗浄し、1％BSA（Sigma）／10％正常ロバ血清（Jackson ImmunoResearch Laboratories）／0.5％Triton X-100（和光純薬）／PBS液に浸して、1時間ブロッキングを施したあと、抗リン酸化タウ抗体AT8（Fujirebio Europe N. V.）を一晩常温で反応させた。PBSで3回洗浄したのち、2次抗体を1時間反応させた。PBSで3回洗浄したのち、Prolong Gold antifade reagent（Molecular probes）を切片に載せて封入し、LSM700（ZEISS）で観察を行った。海馬CA1放射状層におけるAT8シグナル陽性の面積を、画像解析ソフトMetamorphを用いて計測し、総面積に対するAT8陽性シグナル面積の割合を算出した。

[0185] 抗体Bは、海馬CA1領域のリン酸化タウのシグナルを減少させた（図23）。本結果は、抗体Bがタウトランスジェニックマウス（rTg4510）においてタウ病理の進行を抑制す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、重鎖および軽鎖を含み、
（a）配列番号44に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 1 ；
（b）配列番号27に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 2 ；
（c）配列番号28に示すアミノ酸配列からなる重鎖C D R 3 ；
（d）配列番号29に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 1 ；
（e）配列番号30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31に示すアミノ酸配列からなる軽鎖C D R 3
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、ヒト化されている、
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、
前記重鎖の可変領域は、配列番号45に示すアミノ酸配列からなり
、
前記軽鎖の可変領域は、配列番号46に示すアミノ酸配列からなる
、

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47に示すアミノ酸配列
を含む、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項10] 請求項6～9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I g κの定常領域である、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項11] 請求項10に記載の抗E p h A 4 抗体であって、
前記ヒトI g κの定常領域は、配列番号48に示すアミノ酸配列を
含む、
抗E p h A 4 抗体。

[請求項12] 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59に示すアミノ酸配列を含み、
前記軽鎖は、配列番号60に示すアミノ酸配列を含む、
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14] 請求項1～13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15] 請求項14に記載の核酸を含むベクター。
- [請求項16] 請求項15に記載のベクターを含む宿主細胞。
- [請求項17] 請求項16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。
- [請求項18] 請求項1～13のいずれか1項に記載の抗E p h A 4抗体を含む、医薬組成物。
- [請求項19] 請求項18に記載の医薬組成物であって、アルツハイマー病の治療のための医薬組成物。