

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391415** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.08

(22) Дата подачи заявки
2021.12.22

(51) Int. Cl. *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО К EρhA4**

(31) **2020-214958**

(32) **2020.12.24**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2021/047534**

(87) **WO 2022/138708 2022.06.30**

(71) Заявитель:
**ЭЙСАЙ Ар ЭНД Ди МЕНЕДЖМЕНТ
КО., ЛТД. (JP)**

(72) Изобретатель:

**Кавакацу Томоми, Ямада Акио,
Накатани Аки, Иноуэ Еидзи (JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлены антитело к EρhA4, способное связываться с EρhA4 и усиливать расщепление EρhA4, и фармацевтическая композиция, содержащая антитело в качестве активного ингредиента. Антитело к EρhA4 содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 30; CDR2 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 32; и легкую цепь, содержащую CDR1 легкой цепи под SEQ ID NO: 33; CDR2 легкой цепи под SEQ ID NO: 34 и CDR3 легкой цепи под SEQ ID NO: 35, или тяжелую цепь, содержащую CDR1 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 42; CDR2 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 43; и легкую цепь, содержащую CDR1 легкой цепи под SEQ ID NO: 44; CDR2 легкой цепи под SEQ ID NO: 34 и CDR3 легкой цепи под SEQ ID NO: 35.

A1

202391415

202391415

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577362EA/055

АНТИТЕЛО К EphA4

[Область техники]

[0001] Настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с EphA4, нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей вектор, способу получения антитела и к фармацевтической композиции, содержащей антитело.

[Уровень техники]

[0002] EphA4 является членом семейства рецепторных тирозинкиназ. Эфрины типа А и типа В известны в качестве лигандов EphA4. При связывании EphA4 с его лигандом эфрином индуцируются сигналы деадгезии. Ранее предполагалось вовлечение EphA4 в патологическое состояние болезни Альцгеймера (далее также называемой "AD") (непатентные литературные источники 1-4). Сообщалось, что подавление связывания между EphA4 и эфрином восстанавливает нейротрансмиссию при ее функциональном нарушении, опосредованном β -амилоидным ($A\beta$)₍₁₋₄₂₎ олигомером (патентный литературный источник 1). Считается, что при AD агрегаты (нейрофибриллярные клубки), образованные чрезмерно фосфорилированным тау-белком, участвуют в гибели нейронных клеток (непатентный литературный источник 5). Также сообщалось, что подавление фосфорилирования тау-белка подавляет нейродегенерацию с потерей синапсов (непатентные литературные источники 6 и 7) и обеспечивает улучшение по отношению к дефициту памяти или когнитивной дисфункции (непатентные литературные источники 8-11). Имеются литературные источники, в которых высказано предположение, что активация CDK5 является причиной фосфорилирования тау-белка (непатентные литературные источники 12 и 13).

[0003] EphA4 характеризуется высоким уровнем экспрессии в гиппокампе и коре головного мозга и расщепляется матриксной металлопротеиназой (MMP), ADAM (дезинтегрином и металлопротеиназой) и γ -секретазой в зависимости от нервной активности. Известно, что эта реакция расщепления EphA4 стабилизирует шипики, которые являются важными структурами для нервных функций (непатентный литературный источник 14). Сообщалось о снижении плотности шипиков при AD (непатентный литературный источник 15). Более того, уменьшение числа расщепленных фрагментов EphA4 также было подтверждено при AD на стадиях V и VI NFT, что позволяет предположить, что реакция расщепления EphA4 участвует в патологическом состоянии AD (непатентный литературный источник 16). Известно, что снижение плотности шипиков коррелирует с когнитивной дисфункцией, которая является клиническим симптомом AD (непатентные литературные источники 15 и 17). Более того, также сообщалось, что стабилизация шипиков (увеличение плотности шипиков) улучшает когнитивные функции в моделях болезни Альцгеймера (непатентный литературный источник 18), предполагая, что стабилизация шипиков имеет терапевтический потенциал

при AD.

[0004] Пептид KYL, соединение 1 и т. п. известны как существующие ингибиторы EphA4 (патентный литературный источник 2, непатентный литературный источник 19 и непатентный литературный источник 20). Однако не было каких-либо сообщений относительно антитела, обладающего активностью в отношении усиления расщепления EphA4.

[Список цитируемой литературы]

[Патентная литература]

[0005] [Патентный литературный источник 1] WO2016/019280A1.

[Патентный литературный источник 2] WO2012/156351A1.

[Непатентная литература]

[0006] [Непатентный литературный источник 1] Vargas LM et al., PLoS One. 2014 Mar 21;9(3).

[Непатентный литературный источник 2] Fu AK et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jul 8; 111(27): 9959-64.

[Непатентный литературный источник 3] Rosenberger AF et al., Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 16; 2: 79.

[Непатентный литературный источник 4] Huang TY et al., J Exp Med. 2017 Dec 4; 214(12): 3669-3685.

[Непатентный литературный источник 5] SantaCruz et al., Science. 2005 Jul 15; 309(5733): 476-81.

[Непатентный литературный источник 6] Seo J et al., J Neurosci. 2017 Oct 11; 37(41): 9917-9924.

[Непатентный литературный источник 7] Patrick GN et al., Nature. 1999 Dec 9; 402(6762): 615-22.

[Непатентный литературный источник 8] Onishi T et al., J Neurochem. 2011 Dec; 119(6): 1330-40.

[Непатентный литературный источник 9] Belfiore R et al., Aging Cell. 2019 Feb; 18(1): e12873.

[Непатентный литературный источник 10] Webster SJ et al., Front Genet. 2014 Apr 23; 5: 88.

[Непатентный литературный источник 11] Grayson B et al., Behav Brain Res. 2015 May 15; 285: 176-93.

[Непатентный литературный источник 12] Cancino GI et al., Neurobiol Aging. 2011 Jul; 32(7): 1249-61.

[Непатентный литературный источник 13] Vargas LM et al., Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Apr; 1864: 1148-1159.

[Непатентный литературный источник 14] Inoue E et al., J Cell Biol. 2009 May 4; 185(3): 551-64.

[Непатентный литературный источник 15] Boros et al., Ann Neurol. 2017 Oct; 82(4):

602-614.

[Непатентный литературный источник 16] Matsui C et al., Brain Pathol. 2012 Nov; 22(6): 776-87. doi: 10.1111/j.1750-3639.

[Непатентный литературный источник 17] Akrama A et al., Neurobiol Aging. 2008 Sep; 29(9): 1296-1307.

[Непатентный литературный источник 18] Suzuki K et al., Science. 2020 Aug 28; 369(6507): eabb4853.

[Непатентный литературный источник 19] Goldshmit et al., PLoS one. 2011; 6(9): e24636.

[Непатентный литературный источник 20] Van Hoescke et al., Nature Medicine. 2012 Sep; 18(9): 1418-22, 2012.

[Сущность изобретения]

[Техническая задача]

[0007] Целью настоящего изобретения является предоставление антитела к EphA4, которое способно связываться с EphA4 и усиливать расщепление EphA4, и фармацевтической композиции, содержащей антитело в качестве активного ингредиента.

[Решение задачи]

[0008] Авторы настоящего изобретения провели тщательные исследования для достижения цели и, как следствие, завершили создание представляющего интерес антитела к EphA4, способного связываться с EphA4 и усиливать расщепление EphA4.

[0009] (1) Антитело к EphA4, содержащее

тяжелую цепь, содержащую

(a) CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 30;

(b) CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31; и

(c) CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 32; и

легкую цепь, содержащую

(d) CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 33;

(e) CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34; и

(f) CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, или

тяжелую цепь, содержащую

(g) CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42;

(h) CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31; и

(i) CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 43; и

легкую цепь, содержащую

(j) CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 44;

(k) CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34; и

(l) CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35.

[0010] (2) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (1), где антитело к EphA4 представляет собой человеческое антитело.

[0011] (3) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (1) или пунктом (2), где антитело к EphA4 специфично связывается с EphA4 и усиливает расщепление EphA4.

[0012] (4) Антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (1) - (3), где антитело к EphA4 специфично связывается с EphA4 и подавляет связывание между EphA4 и эфрином.

[0013] (5) Антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (1) - (4), где тяжелая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7, и легкая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8.

[0014] (6) Антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (1) - (5), где каждая из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, полученную из человеческого антитела.

[0015] (7) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (6), где константная область тяжелой цепи представляет собой константную область человеческого IgG.

[0016] (8) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (7), где константная область человеческого IgG представляет собой константную область человеческого IgG₂.

[0017] (9) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (8), где константная область человеческого IgG₂ содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15.

[0018] (10) Антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (1) - (4), где тяжелая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11, и

легкая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12.

[0019] (11) Антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (1) - (4) и пункта

(10), где

каждая из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, полученную из человеческого антитела.

[0020] (12) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (11), где

константная область тяжелой цепи представляет собой константную область человеческого IgG.

[0021] (13) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (12), где

константная область человеческого IgG представляет собой константную область человеческого IgG, состоящего из комбинации человеческого IgG₁ и человеческого IgG₂.

[0022] (14) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (13), где

константная область человеческого IgG, состоящего из комбинации человеческого IgG₁ и человеческого IgG₂, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 16.

[0023] (15) Антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (6) - (9) и пунктов (11) - (14), где

константная область легкой цепи представляет собой константную область человеческой Igλ-цепи.

[0024] (16) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (15), где

константная область человеческой Igλ-цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 17.

[0025] (17) Антитело к EphA4, содержащее

тяжелую цепь и легкую цепь, где

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20,

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 21, и

C-концевой лизин тяжелой цепи может быть необязательно удален.

[0026] (18) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (17), где

C-концевой лизин тяжелой цепи удален.

[0027] (19) Антитело к EphA4, содержащее

тяжелую цепь и легкую цепь, где

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26,

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и

C-концевой лизин тяжелой цепи может быть необязательно удален.

[0028] (20) Антитело к EphA4 в соответствии с пунктом (19), где

C-концевой лизин тяжелой цепи удален.

[0029] (21) Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к EphA4 в

соответствии с любым из пунктов (1) - (20).

[0030] (22) Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с пунктом (21).

[0031] (23) Клетка-хозяин, содержащая вектор в соответствии с пунктом (22).

[0032] (24) Способ получения антитела к EphA4, предусматривающий стадию культивирования клетки-хозяина в соответствии с пунктом (23).

[0033] (25) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к EphA4 в соответствии с любым из пунктов (1) - (20).

[0034] (26) Фармацевтическая композиция в соответствии с пунктом (25), дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

[Полезные эффекты изобретения]

[0035] Настоящее изобретение относится к антителу к EphA4, способному связываться с EphA4 и усиливать расщепление EphA4, нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей вектор, способу получения антитела и к фармацевтической композиции, содержащей антитело в качестве активного ингредиента.

[Краткое описание графических материалов]

[0036] [Фигура 1] На фигуре 1 показана аффинность связывания моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) с EphA4 человека.

[Фигура 2] На фигуре 2 показана ингибирующая активность моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) по отношению к человеческому лиганд-связывающему EphA4 человека.

[Фигура 3] На фигуре 3 показана селективность моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) по отношению к каждому рецептору Eph человека.

[Фигура 4] На фигуре 4 показана реактивность моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) по отношению к EphA4 мыши, крысы, обезьяны или человека.

[Фигура 5] На фигуре 5 показана реактивность моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) по отношению к внеклеточному домену EphA4 человека (ECD), лиганд-связывающему домену (LBD), домену 1 фибронектина III типа (FN1) и домену 2 фибронектина III типа (FN2).

[Фигура 6] На фигуре 6 показана активность моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) в отношении усиления расщепления EphA4 в нейронах гиппокампа.

[Фигура 7] На фигуре 7 показана активность моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) в отношении усиления расщепления EphA4 в нейронах гиппокампа.

[Фигура 8] На фигуре 8 показан эффект моноклональных антител к EphA4 (антитела А и В) в отношении увеличения количества шипиков у нейронов гиппокампа.

[Описание вариантов осуществления]

[0037] Области, определенные или кодируемые посредством SEQ ID NO, используемых в настоящем описании, являются следующими:

№	Область последовательности	№	Область
---	----------------------------	---	---------

последовательности		последовательности	последовательности
1	Полноразмерный EphA4 человека (аминокислотная последовательность)	32	CDR3 тяжелой цепи антитела А (аминокислотная последовательность)
2	Внеклеточный домен EphA4 человека (аминокислотная последовательность)	33	CDR1 легкой цепи антитела А (аминокислотная последовательность)
3	Белок внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 человека (аминокислотная последовательность)	34	CDR2 легкой цепи антитела А или В (аминокислотная последовательность)
4	Белок внеклеточного домена-Fc-His EphA4 человека (аминокислотная последовательность)	35	CDR3 легкой цепи антитела А или В (аминокислотная последовательность)
5	Белок внеклеточного домена MBP-His EphA4 человека (аминокислотная последовательность)	36	CDR1 тяжелой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)
6	Сигнальная последовательность EphA4 человека (аминокислотная последовательность)	37	CDR2 тяжелой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)
7	Вариабельная область тяжелой цепи антитела А (аминокислотная последовательность)	38	CDR3 тяжелой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)
8	Вариабельная область легкой цепи антитела А (аминокислотная последовательность)	39	CDR1 легкой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)

9	Вариабельная область тяжелой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)	40	CDR2 легкой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)
10	Вариабельная область легкой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)	41	CDR3 легкой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)
11	Вариабельная область тяжелой цепи антитела В (аминокислотная последовательность)	42	CDR1 тяжелой цепи антитела В (аминокислотная последовательность)
12	Вариабельная область легкой цепи антитела В (аминокислотная последовательность)	43	CDR3 тяжелой цепи антитела В (аминокислотная последовательность)
13	Вариабельная область тяжелой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)	44	CDR1 легкой цепи антитела В (аминокислотная последовательность)
14	Вариабельная область легкой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)	45	CDR1 тяжелой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)
15	Константная область тяжелой цепи (человеческого IgG ₂) антитела А (аминокислотная последовательность)	46	CDR2 тяжелой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)
16	Константная область тяжелой цепи (человеческого IgG _{1/2}) антитела В (аминокислотная последовательность)	47	CDR3 тяжелой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)

17	Константная область легкой цепи (человеческой Ig λ -цепи) антитела А или В (аминокислотная последовательность)	48	CDR1 легкой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)
18	Константная область тяжелой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)	49	CDR2 легкой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)
19	Константная область легкой цепи антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)	50	CDR3 легкой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)
20	Полноразмерная тяжелая цепь антитела А (аминокислотная последовательность)	51	Полноразмерный EphA4 обезьяны (аминокислотная последовательность)
21	Полноразмерная легкая цепь антитела А (аминокислотная последовательность)	52	Внеклеточный домен EphA4 обезьяны (аминокислотная последовательность)
22	Полноразмерная тяжелая цепь антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)	53	Полноразмерный EphA4 крысы (аминокислотная последовательность)
23	Полноразмерная легкая цепь антитела А (последовательность нуклеиновой кислоты)	54	Внеклеточный домен EphA4 крысы (аминокислотная последовательность)
24	Константная область тяжелой цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)	55	Полноразмерный EphA4 мыши (аминокислотная последовательность)
25	Константная область легкой цепи	56	Внеклеточный домен

	цепи антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)		EphA4 мыши (аминокислотная последовательность)
26	Полноразмерная тяжелая цепь антитела В (аминокислотная последовательность)	57	Сигнальная последовательность препротрипсина (аминокислотная последовательность)
27	Полноразмерная легкая цепь антитела В (аминокислотная последовательность)	58	Лиганд-связывающий домен EphA4 человека (аминокислотная последовательность)
28	Полноразмерная тяжелая цепь антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)	59	Домен 1 фибронектина III типа EphA4 человека (аминокислотная последовательность)
29	Полноразмерная легкая цепь антитела В (последовательность нуклеиновой кислоты)	60	Домен 2 фибронектина III типа EphA4 человека (аминокислотная последовательность)
30	CDR1 тяжелой цепи антитела А (аминокислотная последовательность)	61	Белок MBP-His (аминокислотная последовательность)
31	CDR2 тяжелой цепи антитела А или В (аминокислотная последовательность)		

[0038] Настоящее изобретение относится к антителу к EphA4, которое связывается с EphA4.

Антитело к EphA4 согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, которое может распознавать EphA4 и связываться с ним. Как упомянуто ниже, антитело может представлять собой интактное антитело или может представлять собой синтетическое антитело (например, рекомбинантное антитело, химерное антитело и гуманизированное антитело), при условии, что оно характеризуется аффинностью связывания с EphA4. Согласно настоящему описанию можно понять, что EphA4 относится к EphA4 человеческого, мышинного, крысиного или обезьяньего происхождения. EphA4

человеческого, мышиноного, крысиного или обезьяньего происхождения может быть получен из общедоступных баз данных, в которых информация о последовательностях является зарегистрированной, таких как GenBank, предоставляемая Национальным центром биотехнологической информации (США). В качестве альтернативы информация о последовательности гена EphA4 может быть получена путем разработки праймеров на основе информации о нуклеотидной последовательности EphA4 близкородственных видов животных и последующего клонирования из РНК, выделенной из организма животных, относящихся к желаемым видам. Например, информация о нуклеотидных последовательностях EphA4 человека, мыши, крысы или обезьяны зарегистрирована в базе данных под номерами доступа в GenBank NM_004438.5, NM_007936.3, NM_001162411.1 и NM_001260870.1 соответственно.

[0039] В одном аспекте антитело к EphA4 представляет собой антитело, которое специфично связывается с EphA4. Термин "специфично связывающийся" представляет собой термин, хорошо известный специалистам в данной области техники, и способ определения специфичного связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном или эпитопом также хорошо известен. В одном варианте осуществления понимается, что "специфичное связывание" означает, что антитело к EphA4 способно связываться с EphA4 посредством иммунологической реакции с большей аффинностью связывания и активностью связывания, быстрее и/или в течение более длительного времени по сравнению с его связыванием с другими молекулами-мишенями. Это не означает, что антитело, которое специфично связывается с EphA4, не связывается с другой молекулой-мишенью. В другом варианте осуществления на "специфичное связывание" может указывать то, что антитело характеризуется K_d по отношению к EphA4, составляющей по меньшей мере примерно 10^{-7} М, по меньшей мере примерно 10^{-8} М или по меньшей мере примерно 10^{-9} М или меньше. В дополнительном альтернативном варианте осуществления понимается, что "специфичное связывание" представляет собой связывание с EphA4 посредством иммунологической реакции, но не значительное связывание с другими молекулами семейства Eph-рецепторов.

[0040] В одном аспекте антитело к EphA4 представляет собой антитело, которое связывается с внеклеточным доменом EphA4. В одном варианте осуществления антитело к EphA4 представляет собой антитело, которое связывается с лиганд-связывающим доменом (LBD) во внеклеточном домене EphA4.

[0041] В одном варианте осуществления антитело к EphA4 может специфично связываться с EphA4 и усиливать расщепление EphA4. В конкретном варианте осуществления антитело к EphA4 может специфично связываться с EphA4 и усиливать расщепление внеклеточного домена EphA4 с помощью матриксной металлопротеиназы (MMP) или ADAM (дизинтегрин и металлопротеиназы).

[0042] В одном варианте осуществления антитело к EphA4 может специфично связываться с EphA4 и подавлять связывание между EphA4 и его лигандом эффрином.

[0043] В другом варианте осуществления антитело к EphA4 может специфично

связываться с EphA4 и увеличивать количество шипиков у нейронов гиппокампа или стабилизировать шипики у нейронов гиппокампа.

[0044] В одном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает антитело к EphA4, которое может специфично связываться с по меньшей мере одним из EphA4 человека, EphA4 мыши, EphA4 крысы и EphA4 обезьяны и подавлять их связывание с их лигандом. В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает антитело к EphA4, которое может специфично связываться с двумя или более из EphA4 человека, EphA4 мыши, EphA4 крысы и EphA4 обезьяны и подавлять их связывание с их лигандами. В дополнительном альтернативном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает антитело к EphA4, которое может специфично связываться со всеми из EphA4 человека, EphA4 мыши, EphA4 крысы и EphA4 обезьяны и подавлять их связывание с их лигандами.

[0045] Способ, общеизвестный специалистам в данной области техники, можно применять в качестве способа измерения антигенсвязывающих свойств (например, аффинности связывания и межвидовой перекрестной реактивности) антитела к EphA4. Например, аффинность связывания может быть измерена с использованием без ограничения биосенсора Biacore(R), биосенсора KinExA, сцинтилляционного анализа сближения, ELISA, иммуноанализа ORIGEN (IGEN International, Inc.), проточной цитометрии, гашения флуоресценции, трансфера флуоресценции, дрожжевого дисплея и/или иммуноокрашивания. Нейтрализующая активность антитела к EphA4 в отношении связывания между EphA4 и его лигандом может быть измерена с использованием без ограничения биосенсора Biacore(R), ELISA и/или проточной цитометрии.

[0046] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой моноклональное антитело, при условии, что оно связывается с EphA4.

[0047] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может относиться к любому классу, такому как IgG, IgA или IgM (или его подклассу), и не ограничивается конкретным классом. Иммуноглобулины классифицируются на различные классы в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных областей тяжелой цепи (которая также может обозначаться как H-цепь). Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, некоторые из которых могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные области тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, соответственно называются α , δ , ϵ , γ и μ . Типы легкой цепи (которая также может обозначаться как L-цепь) антител представлены цепями λ и κ .

[0048] Антитело к EphA4 по настоящему изобретению может представлять собой антитело IgG или может представлять собой, например, антитело IgG₁ или антитело IgG₂. Также антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением в некоторых случаях может быть мономером, димером или мультимером.

[0049] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой комбинацию антител IgG различных подклассов и может

представлять собой, например, человеческое антитело IgG, состоящее из комбинации IgG₁ и IgG₂ (в настоящем описании также называемое человеческим IgG_{1/2}).

[0050] Вариабельная область антитела в соответствии с настоящим изобретением может означать вариабельную область легкой цепи антитела и/или вариабельную область тяжелой цепи антитела, и константная область антитела может означать константную область легкой цепи антитела и/или константную область тяжелой цепи антитела. Каждая из вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи состоит из четырех каркасных областей (FR), соединенных посредством трех CDR, также известных как области, определяющие комплементарность. CDR в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости посредством FR и способствуют совместно с CDR в другой цепи образованию антигенсвязывающего сайта антитела. Система нумерации согласно Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD), которая представляет собой подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей, используется в качестве методики для определения CDR.

[0051] В одном варианте осуществления антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением содержит константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи, полученные из человеческого антитела.

[0052] Согласно настоящему описанию моноклональное антитело может означать антитело, которое получают из популяции по сути гомогенных антител. В частности, отдельные антитела, содержащиеся в популяции, являются идентичными, за исключением природных мутантов, которые могут присутствовать до некоторой степени. Моноклональное антитело направлено на один антигенный сайт и является высокоспецифическим. В отличие от типичного поликлонального антитела, нацеливающегося на разные антигены или разные эпитопы, каждое моноклональное антитело нацеливается на один эпитоп в антигене. Модификатор "моноклональный" означает характеристики антитела, которое получают из популяции по сути гомогенных антител, и его не следует трактовать ограниченно как требующее получения антитело определенным способом.

[0053] В настоящем изобретении человеческое антитело означает антитело, характеризующееся последовательностями вариабельных областей и константных областей, полученными из последовательностей человеческого иммуноглобулина, и оно охватывает антитело, содержащее последовательность, допускающую содержание необходимой модификации, например, сконструированной для повышения аффинности связывания с мишенью, для снижения иммуногенности или повышения стабильности, а также сконструированной для уменьшения негомогенности антител, продуцируемых клетками, отличными от человеческих, при условии, что они получены из последовательности человеческого иммуноглобулина.

[0054] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением также включает антитело, полученное из человеческого антитела посредством

соответствующего конструирования (например, модификации антитела или частичной замены, добавления и/или делеции аминокислотной последовательности антитела) таким образом, что антитело сохраняет свои функции (или происходит обеспечение функции антитела, или происходит улучшение функции антитела). Более конкретно, в объем настоящего изобретения также входит антитело, имеющее аминокислотную последовательность константной области, сконструированную с целью модификации эффекторных функций антитела. Например, антитело, полученное из антитела человеческого IgG₂ путем замены валина (Val) в положении 234 (нумерация Eu) аланином (Ala) и замены глицина (Gly) в положении 237 (нумерация Eu) аланином (Ala), выполненных с целью снижения активности антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или активности антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), также включено в объем настоящего изобретения. Кроме того, биспецифическое антитело, которое имеет как антигенсвязывающий участок с последовательностью CDR антитела к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением, так и антигенсвязывающий участок, который связывается с другим антигеном (Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97), также входит в объем настоящего изобретения.

[0055] Человеческое антитело может быть получено посредством способа, известного в данной области техники. Человеческое антитело по настоящему изобретению может быть получено в виде рекомбинантного антитела, например, путем получения антитела, обладающего аффинностью связывания с EphA4, из известной фаг-дисплейной библиотеки человеческих антител (библиотеки антител, продуцируемых клетками, которые не поддавались влиянию, синтетической библиотеки и т. д.), определения последовательности его переменных областей и переноса последовательности в сочетании с последовательностями требуемых человеческих константных областей в клетки животных, отличных от человека.

[0056] В качестве альтернативы человеческое антитело может быть получено путем иммунизации любого из множества трансгенных животных, отличных от человека (содержащих в своих геномах некоторые или все генные локусы тяжелой цепи и легкой цепи человеческого иммуноглобулина), антигеном EphA4. В одном варианте осуществления животное, отличное от человека, содержащее ген человеческого иммуноглобулина, представляет собой животное, имеющее "минигенные локусы" человеческого иммуноглобулина (например, GenPharm International, Inc.). В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело может быть получено с использованием мыши Xenomouse(R) (Abgenix, Inc., Фремонт, Калифорния), мыши HuMAb-Mouse(R) (Medarex, Inc.), мыши VelocImmune(R) (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), мыши AlivaMab (Ablexis, LLC) и т. п.

[0057] При необходимости, антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может быть модифицировано. Модификация антитела к EphA4 может представлять собой модификацию, которая изменяет (а) трехмерную структуру аминокислотной последовательности в модифицированной области, такую как листовая

или спиральная конформация; (b) электрический заряд или состояние гидрофобности молекулы по целевому сайту или (c) эффекты модификации в направлении сохранения объема боковой цепи, или может представлять собой модификацию, при которой эти изменения не являются четко выраженными.

[0058] Модификация антитела к EphA4 по настоящему изобретению может быть получена, например, посредством замены, делеции и/или добавления составляющего(составляющих) аминокислотного(аминокислотных) остатка(остатков).

[0059] Согласно настоящему описанию аминокислота используется в самом широком своем смысле и включает не только природные аминокислоты, например, серин (Ser), аспарагин (Asn), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), аланин (Ala), тирозин (Tyr), глицин (Gly), лизин (Lys), аргинин (Arg), гистидин (His), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), глутамин (Gln), треонин (Thr), цистеин (Cys), метионин (Met), фенилаланин (Phe), триптофан (Trp) и пролин (Pro), но и неприродные аминокислоты, такие как варианты и производные аминокислот. Специалистам в данной области естественным образом понятно, принимая во внимание это определение в широком смысле, что примеры аминокислот в настоящем описании включают L-аминокислоты; D-аминокислоты; химически модифицированные аминокислоты, такие как варианты аминокислот и производные аминокислот; аминокислоты, такие как норлейцин, β -аланин и орнитин, которые не выступают в роли соединений, входящих в состав белков *in vivo*; и химически синтезированные соединения, имеющие характеристики аминокислот, общеизвестных специалистам в данной области техники. Примеры неприродных аминокислот включают α -метиламинокислоты (α -метилаланин и т. д.), D-аминокислоты (D-аспарагиновая кислота, D-глутаминовая кислота и т. д.), подобные гистидину аминокислоты (2-аминогистидин, β -гидроксигистидин, гомогистидин, α -фторметилгистидин, α -метилгистидин и т. д.), аминокислоты, содержащие дополнительный метилен в своих боковых цепях ("гомо"аминокислоты) и аминокислоты, в которых функциональная группа карбоновой кислоты в боковой цепи замещена группой сульфоновой кислоты (цистеиновая кислота и т. д.).

[0060] Встречающиеся в природе аминокислотные остатки могут быть классифицированы, например, на следующие группы на основе общих характеристик боковых цепей:

- (1) гидрофобные остатки: Met, Ala, Val, Leu и Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные остатки: Asn, Gln, Cys, Ser и Thr;
- (3) кислые остатки: Asp и Glu;
- (4) основные остатки: His, Lys и Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly и Pro; и
- (6) ароматические остатки: Trp, Tyr и Phe.

[0061] Неконсервативная замена аминокислотной последовательности, составляющей антитело, может быть выполнена путем замены аминокислоты, принадлежащей к одной из этих групп, на аминокислоту, принадлежащую к любой из

других групп. Более консервативная замена может быть выполнена путем замены аминокислоты, принадлежащей к одной из этих групп, на другую аминокислоту, принадлежащую к той же группе. Аналогично может быть соответствующим образом выполнена делеция или замена в аминокислотной последовательности.

[0062] Модификация аминокислоты(аминокислот), составляющей(составляющих) антитело, может представлять собой, например, посттрансляционную модификацию, такую как гликозилирование посредством сахара, ацетилирование или фосфорилирование. Антитело может быть гликозилировано в консервативном положении в своей константной области. Гликозилирование антитела обычно относится к N-связанному или O-связанному типу. N-связанное гликозилирование означает связывание углеводного фрагмента с боковой цепью аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин (где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от пролина) являются последовательностями распознавания для ферментативного добавления углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Любая из этих трипептидных последовательностей присутствует в антителе таким образом, что присутствует потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование может представлять собой связывание N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы с гидроксикаминокислотой (например, серином или треонином) или в некоторых случаях может представлять собой их связывание с 5-гидроксипролином или 5-гидроксилизином. Специалисты в данной области техники могут соответствующим образом выбирать условия гликозилирования (в случае выполнения гликозилирования посредством биологического подхода, например, клеток-хозяев и типа и pH среды для культивирования клеток) согласно цели.

[0063] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может быть дополнительно модифицировано с использованием других способов модификации, отдельно или в комбинации, на основе общих технических сведений, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[0064] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением можно получать посредством способа, хорошо известного специалистам в данной области техники. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением, может быть интегрирована в вектор экспрессии. Вектор экспрессии может быть перенесен в клетки-хозяева. Клетки-хозяева можно культивировать для получения антитела. Соответственно, настоящее изобретение охватывает нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к EphA4, вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, клетку-хозяина, содержащую вектор, и способ получения антитела к EphA4, предусматривающий стадию культивирования клетки-хозяина.

[0065] Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением, может содержать ДНК, кодирующую сигнальную последовательность, и может содержать ДНК, кодирующую сигнальную последовательность на каждом из 5'-концов ДНК, кодирующей переменную область

тяжелой цепи, и ДНК, кодирующей переменную область легкой цепи. Сигнальная последовательность представляет собой аминокислотные остатки, расположенные на N-конце белка, которые требуются для секреторного белка или интегрального мембранного белка, чтобы пройти через липидный бислой после синтеза на рибосоме. Сигнальная последовательность согласно настоящему изобретению не ограничена определенным образом при условии, что последовательность имеет эту функцию. Примеры сигнальной последовательности, которая может содержаться в антителе к EphA4 по настоящему изобретению, включают сигнальные последовательности, полученные от человека, мыши, крысы, кролика, осла, козы, лошади, цыпленка, собаки, кошки, дрожжей и т. п.

[0066] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может быть выделено или очищено в соответствии со способом, хорошо известным специалистам в данной области техники.

[0067] Согласно настоящему описанию, термин "выделенный" или "очищенный" означает искусственно выделенный или очищенный из природного состояния. Если встречающаяся в природе молекула или композиция изменена или удалена из ее исходного окружения или подвергнута и тому и другому, то молекула или композиция является "выделенной" или "очищенной". Примеры способа выделения или очищения включают электрофоретические, молекулярно-биологические, иммунологические и хроматографические подходы и, в частности, включают без ограничений ион-обменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, обращенно-фазовую HPLC, электрофорез с изоэлектрическим фокусированием и щелочную экстракцию.

[0068] В одном варианте осуществления антитело к EphA4 содержит следующие CDR:

(a) CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 30;

(b) CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31;

(c) CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 32;

(d) CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 33;

(e) CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34; и

(f) CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35.

[0069] В одном варианте осуществления антитело к EphA4 содержит следующие CDR:

(g) CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42;

(h) CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности,

представленной под SEQ ID NO: 31;

(i) CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 43;

(j) CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 44;

(k) CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34; и

(l) CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35.

[0070] В одном варианте осуществления антитело к EphA4 представляет собой человеческое антитело.

[0071] В другом варианте осуществления антитело к EphA4 содержит тяжелую цепь и легкую цепь. Тяжелая цепь содержит вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7 или 11, и/или легкая цепь содержит вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8 или 12. В этом варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи могут содержать аминокислотную последовательность, полученную из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7 или 11, и/или аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8 или 12, путем замены, добавления и/или делеции одной или нескольких аминокислот. В этом контексте термин "или несколько", используемый в отношении EphA4, не ограничен, при условии, что полученная последовательность сохраняет аффинность связывания с EphA4 и усиливает расщепление EphA4. Термин "или несколько" означает величину от 2 до 15, или от 2 до 10, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2, или нахождение величины в пределах 10%, например, в пределах 9%, в пределах 8%, в пределах 7%, в пределах 6%, в пределах 5%, в пределах 4%, в пределах 3%, в пределах 2% или в пределах 1% от числа аминокислот в аминокислотной последовательности.

[0072] В конкретном варианте осуществления антитело к EphA4 содержит тяжелую цепь и легкую цепь. Тяжелая цепь содержит вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7, и легкая цепь содержит вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8.

[0073] В конкретном варианте осуществления антитело к EphA4 содержит тяжелую цепь и легкую цепь. Тяжелая цепь содержит вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11, и легкая цепь содержит вариабельную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12.

[0074] В одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит константную область человеческого IgG₂. В конкретном варианте осуществления

константная область человеческого IgG₂ содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

[0075] В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит константную область человеческого IgG, состоящего из комбинации человеческих IgG₁ и IgG₂. В конкретном варианте осуществления константная область человеческого IgG, состоящая из комбинации человеческих IgG₁ и IgG₂, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

[0076] В одном варианте осуществления легкая цепь антитела к EphA4 содержит константную область человеческой Igλ-цепи. В конкретном варианте осуществления константная область человеческой Igλ-цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

[0077] В одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, а легкая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 21.

[0078] В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, легкая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 21, и С-концевой лизин тяжелой цепи может быть необязательно удален.

[0079] В конкретном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, легкая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 21, и С-концевой лизин тяжелой цепи удален.

[0080] В одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, а легкая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27.

[0081] В другом варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, легкая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и С-концевой лизин тяжелой цепи может быть необязательно удален.

[0082] В конкретном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, легкая цепь антитела к EphA4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и С-концевой лизин тяжелой цепи удален.

[0083] В альтернативном варианте осуществления антитело к EphA4 может характеризоваться тем, что лизин, расположенный на С-конце (карбоксихонце) тяжелой цепи, удален по той причине, что, например, это обеспечивает снижение неомогенности антител, продуцируемых клетками, продуцирующими антитела (публикация заявки на патент США № 2010/0297697 и Liu H et al., MAbs). 2014 Sep-Oct; 6 (5): 1145-1154). В

настоящем изобретении антитело к EphA4 с удаленным С-концевым лизином тяжелой цепи также включает антитело к EphA4 с С-концевым лизином тяжелой цепи, удаленным посредством генной инженерии, и антитело к EphA4 с С-концевым лизином тяжелой цепи, удаленным посредством посттрансляционного расщепления карбоксипептидазой или т. п. В настоящем изобретении антитело к EphA4 с удаленным С-концевым лизином тяжелой цепи также включает антитело к EphA4 с С-концевым лизином тяжелой цепи, удаленным в обеих тяжелых цепях, а также антитело к EphA4 с удаленным С-концевым лизином только в одной из тяжелых цепей.

[0084] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело к EphA4. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к EphA4, относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела к EphA4. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением кодирует тяжелую цепь антитела к EphA4. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением кодирует легкую цепь антитела к EphA4. В дополнительном альтернативном варианте осуществления нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением кодирует тяжелую цепь и легкую цепь антитела к EphA4. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением также включает первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь антитела к EphA4, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела к EphA4.

[0085] В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к EphA4. Вектор в соответствии с настоящим изобретением относится к одному или нескольким векторам, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к EphA4. В одном варианте осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела к EphA4, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела к EphA4. В другом варианте осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь антитела к EphA4. В дополнительном альтернативном варианте осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением предусматривает первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела к EphA4, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела к EphA4. Вектор в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой без конкретного ограничения плазмиду, космиду, вирус, фаг или т. п. Например, вирусный вектор, такой как вектор на основе ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса или вируса простого герпеса, также включен в вектор согласно настоящему изобретению.

[0086] В дополнительном альтернативном аспекте настоящее изобретение также включает клетку-хозяина, содержащую вектор в соответствии с настоящим изобретением, и способ получения антитела к EphA4, предусматривающий стадию культивирования клетки-хозяина. Клетка-хозяин в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой без конкретного ограничения клетку *E. coli*, клетку COS обезьяны, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0 или т. п. В одном варианте осуществления способ получения антитела к EphA4 предусматривает стадии культивирования клетки-хозяина и извлечения антитела к EphA4, секретируемого из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

[0087] В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к EphA4. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть получена в соответствии с известным способом, например способом, описанным в Японской фармакопее (JP), Фармакопее США (USP) или Европейской фармакопее (EP).

[0088] Антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением может быть применимым для лечения болезни Альцгеймера. В частности, в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения болезни Альцгеймера, содержащей антитело к EphA4. Другой аспект охватывает способ лечения болезни Альцгеймера, предусматривающий стадию введения терапевтически эффективного количества антитела к EphA4 субъекту, страдающему болезнью Альцгеймера. В альтернативном аспекте настоящее изобретение охватывает применение антитела к EphA4 для получения терапевтического лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера. В альтернативном аспекте настоящее изобретение охватывает антитело к EphA4 для применения в лечении болезни Альцгеймера.

[0089] Антитело к EphA4 согласно настоящему изобретению можно использовать отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами или композициями в способе лечения. Например, антитело к EphA4 в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в то же время или в разные моменты времени с дополнительным лекарственным средством. Такая комбинированная терапия включает комбинированное введение (два или более лекарственных препаратов содержатся в одном и том же составе или отдельных составах) и раздельное введение (например, одновременное или последовательное). В случае раздельного введения двух или более лекарственных средств антитело к EphA4 по настоящему изобретению может вводиться до или после сопутствующего способа лечения.

[0090] Субъект для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, не ограничен, и фармацевтическая композиция может быть использована, например, для человека или отличного от человека млекопитающего (обезьяны, мыши, крысы, кролика, крупного рогатого скота, лошади, козы и т. д.).

[0091] Способ введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту (путь введения, доза, число доз в день, временные рамки введения

и т. д.) не ограничен и может быть соответствующим образом определен специалистами в данной области техники (например, врачом) исходя из состояния здоровья субъекта, тяжести заболевания, типа лекарственного средства, подлежащего применению в комбинации с ней, и т. д.

[0092] Специалисты в данной области техники должны понимать, что настоящее изобретение можно осуществлять посредством любого одного из всех аспектов, описанных в настоящем описании, или соответствующей комбинации из двух или более из них, если не возникает техническое противоречие. Также специалисты в данной области техники должны понимать, что настоящее изобретение можно предпочтительно осуществлять посредством соответствующей комбинации из всех предпочтительных или преимущественных аспектов, описанных в настоящем описании, если не возникает техническое противоречие.

[0093] Литературные источники, цитируемые в настоящем описании, следует понимать в качестве включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Специалисты в данной области техники способны понять связанное содержание, раскрытое в этих литературных источниках посредством ссылки в качестве части настоящего описания, без выхода за пределы сути и объема настоящего изобретения согласно контексту настоящего описания.

[0094] Литературные источники, цитируемые в настоящем описании, представлены лишь с целью раскрытия связанных методик до даты подачи настоящей заявки. Не следует истолковывать, что авторы настоящего изобретения признают, что не обладают правом, предшествующим такому раскрытию, по причине существования предшествующих изобретений или любых других причин. Все положения из этих литературных источников основаны на информации, которая была доступна заявителю настоящего изобретения, и признание того, что содержание этих положений является точным, отсутствует.

[0095] Термины в настоящем описании применяются для иллюстрации определенных вариантов осуществления и не предусмотрены для ограничения настоящего изобретения.

[0096] Термин "содержать", используемый в настоящем описании, означает, что описываемые объекты (представители, стадии, факторы, числа и т. д.) присутствуют, и присутствие других объектов (представителей, стадий, факторов, чисел и т. д.) не исключается из них, если в контексте явным образом не требуется другое понимание. Термин "состоять из" охватывает аспекты, описанные терминами "состоять из" и/или "состоять по сути из".

[0097] Термин "нейтрализующая активность", используемый в настоящем описании, означает активность по подавлению связывания между EphA4 и его лигандом и/или активность по подавлению передачи сигнала, или ответ в виде экспрессии молекул, или функциональное изменение клеток, индуцированное связыванием между EphA4 и его лигандом в живом организме человека.

[0098] Все термины (в том числе технические термины и специфические термины), используемые в данном документе, имеют те же значения, что и понимаемые в широком смысле специалистами в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, если не указано иное. Термины, используемые в данном документе, следует понимать как имеющие значения, согласующиеся со значениями в настоящем описании и связанных технических областях, и не следует понимать в идеализированном или крайне формальном смысле, если не указано иное.

[0099] Термины, такие как "первый" или "второй", используются для выражения различных факторов. Однако эти факторы понимаются как неограниченные самими этими терминами. Эти термины используют лишь для отличия одного фактора от других факторов. Например, первый фактор может быть описан в качестве второго фактора и наоборот, не выходя за пределы объема настоящего изобретения.

[0100] Согласно настоящему описанию следует понимать, что численные значения, используемые для указания содержания компонентов, численные диапазоны и т. д. модифицируются термином "примерно", если не указано иное. Например, "4°C" понимается как означающее "примерно 4°C", если не указано иное. Специалисты в данной области техники рационально естественным образом способны понять их степень согласно техническим общим принципам и контексту настоящего описания.

[0101] Следует понимать, что каждый аспект, указанный в форме единственного числа, используемый в настоящем описании и формуле изобретения, может быть использован в форме множественного числа, и наоборот, если в контексте явным образом не требуется иное понимание и если не возникает техническое противоречие.

[0102] Далее в данном документе настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Однако настоящее изобретение может быть осуществлено посредством различных аспектов и не должно истолковываться как ограничиваемое примерами, описываемыми в данном документе. Специалисты в данной области техники могут реализовать настоящее изобретение посредством различных изменений или модификаций, добавлений, удалений, замен и т. д., не отходя от сущности или объема настоящего изобретения.

[Примеры]

[0103] Пример 1. Получение человеческого моноклонального антитела к EphA4

Для получения моноклонального антитела, связывающегося с EphA4 человека (№ доступа в Genbank NP_004429.1, SEQ ID NO: 1), белок внеклеточного домена EphA4 человека (положения 20-547) (SEQ ID NO: 2), слитый с секретируемой щелочной фосфатазой (SEAP) и гистидиновой меткой (далее в данном документе обозначаемый как "белок внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 человека", SEQ ID NO: 3), белок внеклеточного домена EphA4 человека, слитый с Fc-областью (Fc) человеческого IgG₁ и гистидиновой меткой (далее в данном документе обозначаемый как "белок внеклеточного домена-Fc-His EphA4 человека", SEQ ID NO: 4), и белок внеклеточного домена EphA4 человека, слитый со связывающим мальтозу белком (MBP) и гистидиновой меткой (далее

в данном документе обозначаемый как "белок внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека", SEQ ID NO: 5), получали посредством следующих стадий.

[0104] Сначала конструировали вектор экспрессии pcDNA3.1-внеклеточный домен-SEAP-His EphA4 человека, вектор экспрессии pcDNA3.1-внеклеточный домен-Fc-His EphA4 человека и вектор экспрессии pcDNA3.4-внеклеточный домен-MBP-His EphA4 человека. Сначала последовательность ДНК, кодирующую сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 6) и внеклеточный домен EphA4 человека амплифицировали посредством RT-PCR с использованием тотальной РНК, полученной из головного мозга человека, и клонировали в сайт SalI/NotI вектора pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies Corp.), имеющего последовательность ДНК, кодирующую SEAP и гистидиновую метку, или вектора pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies Corp.), имеющего последовательность ДНК, кодирующую Fc и гистидиновую метку. Затем последовательность ДНК, кодирующую сигнальную последовательность и внеклеточный домен EphA4 человека, SEAP и гистидиновую метку, или последовательность ДНК, кодирующую сигнальную последовательность и внеклеточный домен EphA4 человека, Fc и гистидиновую метку, переносили в вектор pcDNA3.1_rfcB посредством реакции LR с использованием Gateway System (Invitrogen/Life Technologies Corp.) с обеспечением конструирования вектора экспрессии pcDNA3.1-внеклеточный домен-SEAP-His EphA4 человека и вектора экспрессии pcDNA3.1-внеклеточный домен-Fc-His EphA4 человека. Что касается вектора экспрессии pcDNA3.4-внеклеточный домен-MBP-His EphA4 человека, последовательность ДНК, кодирующую сигнальную последовательность и внеклеточный домен EphA4 человека, амплифицировали посредством PCR и клонировали в вектор pcDNA3.4 (Invitrogen/Life Technologies Corp.), имеющий последовательность ДНК, кодирующую MBP и гистидиновую метку, с обеспечением конструирования вектора экспрессии внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека. Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) трансфицировали каждым из векторов экспрессии, описанных выше, с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Через четыре дня каждый культуральный раствор извлекали и осветляли путем удаления клеток. Полученный культуральный раствор очищали с использованием смолы TALON (Takara Bio Inc.) и подвергали замене буфера на PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) путем диализа.

[0105] Скрининг проводили с использованием белка EphA4 человека и синтетической фаговой библиотеки полностью человеческих антител с целью получения фрагмента человеческого антитела (scFv), который специфично связывается с EphA4 человека. Осуществляли захват белка внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 человека магнитными шариками Dynabeads (Thermo Fisher Scientific Inc.) или никелевой пластиной (Pierce Biotechnology Inc.) и к ним добавляли синтетическую фаговую библиотеку полностью человеческих антител. Через час или два часа несвязавшиеся фаги удаляли серией циклов промывки с использованием PBS-Tween (0,1% об./об.) или PBS. Связанные фаговые частицы элюировали, а затем амплифицировали путем инфицирования клеток-

хозяев *E. coli* TG1. Инфицированные клетки TG1 собирали, высевали на чашку и инкубировали при 30°C. Эту пэннинговую обработку дополнительно проводили дважды с использованием амплифицированных фагов.

[0106] После трех раундов пэннинга одну колонию из клеток TG1, инфицированных обогащенными фагами, высевали на среду в 96-луночном планшете. Экспрессию FLAG-меченного scFv индуцировали добавлением IPTG с последующим встряхиванием культуры в течение ночи при 30°C. Клетки TG1 осаждали центрифугированием, и лунки, характеризующиеся реактивностью с EphA4 человека, выбирали с использованием супернатанта культуры *E. coli*, содержащего scFv.

[0107] Реактивность с EphA4 человека оценивали посредством ELISA в соответствии со следующими стадиями с использованием белка внеклеточного домена-Fc-His EphA4 человека или белка внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека. Каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) покрывали антителом к FLAG (Sigma-Aldrich Co. LLC). После инкубирования в течение ночи при 4°C каждую лунку блокировали 2% обезжиренным молоком (Becton Dickinson and Company) при комнатной температуре в течение 2 часов. После трехкратной промывки с помощью 0,02% Tween 20/PBS (Nacalai Tesque, Inc.) белок внеклеточного домена-Fc-His EphA4 человека или белок внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека (конечная концентрация: 20 нМ) и супернатант культуры *E. coli*, содержащий scFv, добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После трехкратной промывки к полученному добавляли антитело к His, меченное пероксидазой хрена (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), и осуществляли инкубирование при комнатной температуре в течение 1 часа. После пятикратной промывки в каждую лунку добавляли раствор TMBZ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) и осуществляли инкубирование при комнатной температуре в течение 15-20 минут. В каждую лунку добавляли равное количество раствора, останавливающего реакцию (1 н. H₂SO₄, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Поглощение при длине волны 450 нм считывали с использованием микропланшетного ридера (Thermo Fisher Scientific Inc.). В результате скрининга были выбраны фрагменты антител человека, специфичные к человеческому EphA4, и посредством секвенирования определена генная последовательность каждого фрагмента.

[0108] Последовательности ДНК, кодирующие переменные области каждого полученного фрагмента человеческого антитела (scFv), субклонировали в вектор для экспрессии константных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела для преобразования клона из scFv- в IgG-форму. Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) трансфицировали вектором экспрессии (pcDNA3.4), содержащим последовательность гена, кодирующего человеческое моноклональное антитело к EphA4, с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Супернатант извлекали и получали человеческое моноклональное антитело к EphA4 с использованием MabSelectSuRe (Cytiva). Количество вариантов полученных таким образом человеческих моноклональных антител-кандидатов к EphA4 уменьшали с точки зрения усиливающей

расщепление активности в отношении EphA4, специфичности в отношении EphA4, состояния фосфорилирования молекулы, участвующей в нисходящей передаче сигналов, опосредованной EphA4, иммуногенности и т. д. Иммуногенность оценивали с использованием EpiScreen(R)(Abzena plc). В этой серии процедур оценки получали антитела, полученные путем шаффлинга тяжелых цепей и легких цепей человеческих моноклональных антител к EphA4 и антител с мутациями в CDR, и в общей сложности осуществляли оценку 300 или более человеческих моноклональных антител к EphA4.

[0109] Активность, усиливающую расщепление EphA4, для каждого полученного человеческого моноклонального антитела к EphA4 оценивали с использованием нейронов гиппокампа крысы. Нейроны гиппокампа крысы получали согласно следующим стадиям. У крысы (Charles River Laboratories Japan, Inc.) на 18-й день беременности извлекали плод и его голову разрезали для выделения головного мозга. Под стереоскопическим микроскопом из него вырезали область гиппокампа, затем ее помещали в дигестирующий раствор (137 мМ NaCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 5 мМ KCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 7 мМ Na₂HPO₄ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 25 мМ Hepes (Dojindo Laboratories), 0,5 мг/мл ДНКазы (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,25% раствор трипсина (Life Technologies Corp.)) и встряхивали при 37°C в течение 10 минут. Раствор удаляли и к остатку добавляли 20% фетальной бычьей сыворотки/буферный раствор Хенкса (Sigma-Aldrich Co. LLC). После удаления жидкости и двукратной промывки буферным раствором Хенкса ткани гиппокампа пипетировали в буферном растворе Хенкса с получением клеточной суспензии. Клетки высевали в 96-луночную чашку, покрытую поли-L-лизином (Falcon), содержащую культуральный раствор (нейробазальная среда (Life Technologies Corp.), 1 × добавку B-27 (Life Technologies Corp.), 0,5 мМ L-глутамин (Life Technologies Corp.)).

[0110] Оценка активности, усиливающей расщепление EphA4, с использованием нейронов гиппокампа проводили в соответствии со следующими стадиями. Нейроны гиппокампа крысы, высеянные в 96-луночную чашку (Falcon), обрабатывали моноклональным антителом к EphA4 (20 нМ) и соединением E, представляющим собой ингибитор γ -секретазы (50 нМ, Enzo Life Sciences, Inc.), и по прошествии 24 часов промывали с помощью PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Клетки собирали путем добавления буфера для образцов SDS (буфер для образцов Лэммли (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 5% 2-меркаптоэтанол (Bio-Rad Laboratories, Inc.)) и кипятили в течение 5 минут. Анализ посредством SDS-PAGE и вестерн-блоттинга или анализ с использованием полностью автоматизированной системы вестерн-блоттинга Jess (ProteinSimple Inc.) проводили с использованием моноклонального антитела к EphA4 (Abnova Corp.). Интенсивность полосы определяли количественно, а затем рассчитывали значение для отношения C-концевой фрагмент EphA4/полноразмерный EphA4.

[0111] Антитело А и антитело В получали в виде человеческих моноклональных антител к EphA4, обладающих активностью по усилению расщепления EphA4, посредством оценки активности, усиливающей расщепление EphA4, описанной выше.

Антитело А и антитело В представляли собой антитела, которые не вызывали фосфорилирования молекулы, участвующей в нисходящей передаче сигналов, опосредованной ЕрhA4, и обладали низкой иммуногенностью (как пролиферация Т-клеток, так и продуцирование IL-2 составляли 10% или меньше).

[0112] Гены, кодирующие полноразмерные тяжелые цепи и легкие цепи антитела А и антитела В, полностью синтезировали в GenScript. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела А представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность варибельной области его легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8. В качестве генной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность антитела А, последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 9, использовали в качестве варибельной области тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 10, использовали в качестве варибельной области легкой цепи. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела В представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и аминокислотная последовательность варибельной области его легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12. В качестве генной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность антитела В, последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 13, использовали в качестве варибельной области тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 14, использовали в качестве варибельной области легкой цепи. Константную область человеческого IgG₂ (SEQ ID NO: 15) использовали в качестве константной области тяжелой цепи антитела А и константную область человеческого IgG_{1/2} (SEQ ID NO: 16), характеризующуюся CH1 и шарнирными участками человеческого IgG₁ и CH2 и CH3 человеческого IgG₂, использовали в качестве константной области тяжелой цепи антитела В. Человеческую Igλ-цепь (SEQ ID NO: 17) использовали в качестве константных областей легкой цепи антитела А и антитела В. В качестве последовательности гена, кодирующей аминокислотную последовательность антитела А, последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 18, использовали в качестве константной области тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 19, использовали в качестве константной области легкой цепи. Аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи (исключая сигнальную последовательность) антитела А представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, и аминокислотная последовательность его полноразмерной легкой цепи (за исключением сигнальной последовательности) представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 21. Последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующая полноразмерную тяжелую цепь антитела А, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 22, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая его полноразмерную легкую цепь, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 23. В качестве геновой последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность антитела В, последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 24, использовали в качестве константной области тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 25, использовали в качестве константной области легкой цепи. Аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи (исключая сигнальную последовательность) антитела В представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, и аминокислотная последовательность его полноразмерной легкой цепи (за исключением сигнальной последовательности) представляет собой аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полноразмерную тяжелую цепь антитела В, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 28, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая его полноразмерную легкую цепь, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 29. Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) или клетки CHO K1SV (Lonza) трансфицировали вектором экспрессии (pcDNA3.4 или pEE6.4 и pEE12.4), содержащим последовательность гена, кодирующую аминокислотную последовательность антитела А или антитела В, с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.) или системы GS (Lonza). Супернатант извлекали и антитело А и антитело В очищали с получением их в виде человеческих моноклональных антител к EphA4 с использованием MabSelectSuRe (Cytiva).

[0113] CDR антитела А и антитела В определяли в соответствии с определением Kabat для идентификации CDR (система нумерации согласно Kabat). Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты для CDR антитела А показаны в таблицах 1 и 2 соответственно. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты для CDR антитела В показаны в таблицах 3 и 4 соответственно.

[Таблица 1]

Аминокислотные последовательности CDR антитела А

Название	Последовательность
CDR1 тяжелой цепи	SYAMS (SEQ ID NO: 30)
CDR2 тяжелой цепи	AISGSGGSTYYADSVYKG (SEQ ID NO: 31)
CDR3 тяжелой цепи	DSYYYYWWLYYYFDY (SEQ ID NO: 32)
CDR 1 легкой цепи	QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 33)
CDR 2 легкой цепи	GKNNRPS (SEQ ID NO: 34)
CDR 3 легкой цепи	QSSYSSSYSYV (SEQ ID NO: 35)

[Таблица 2]

Последовательности нуклеиновой кислоты CDR антитела А

Название	Последовательность
CDR1 тяжелой цепи	AGCTACGCTATGTCT (SEQ ID NO: 36)
CDR2 тяжелой цепи	GCTATCTCTGGAAGGGGGCTCCACCTACTATGCTGACAGCGTGAAGGGC (SEQ ID NO: 37)
CDR3 тяжелой цепи	GATAGCTACTATTACTGGTGGCTGTATTACTATTTCGACTAT (SEQ ID NO: 38)
CDR 1 легкой цепи	CAGGGGACAGCGCTGGCTCTTACTATGCCCTCC (SEQ ID NO: 39)
CDR 2 легкой цепи	GGCAAGAACAATAGGCTTCT (SEQ ID NO: 40)
CDR 3 легкой цепи	CAGTCCAGCTACTCTCCAGCTACTCCTACGGT (SEQ ID NO: 41)

[Таблица 3]

Аминокислотные последовательности CDR антитела В

Название	Последовательность
CDR1 тяжелой цепи	SFAMS (SEQ ID NO: 42)
CDR2 тяжелой цепи	AISGSGGSTYYADSVYKG (SEQ ID NO: 31)
CDR3 тяжелой цепи	DDYYPYWWYYYFDY (SEQ ID NO: 43)
CDR 1 легкой цепи	QGDSLRSYFAS (SEQ ID NO: 44)
CDR 2 легкой цепи	GKNNRPS (SEQ ID NO: 34)
CDR 3 легкой цепи	QSSYSSSYSYV (SEQ ID NO: 35)

[Таблица 4]

Последовательности нуклеиновой кислоты CDR антитела В

Название	Последовательность
CDR1 тяжелой цепи	AGCTTCGCTATGTCT (SEQ ID NO: 45)
CDR2 тяжелой цепи	GCTATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACATACTATGCCGACAGCGTGAAGGGC (SEQ ID NO: 46)
CDR3 тяжелой цепи	GACGATTACTATCCATACTGGTGGTACTATTACTATTTCGATTAT (SEQ ID NO: 47)
CDR 1 легкой цепи	CAGGGGACAGCGCTGGCTCTTACTTGGCTCC (SEQ ID NO: 48)
CDR 2 легкой цепи	GGCAAGAACAATAGGCTTCT (SEQ ID NO: 49)
CDR 3 легкой цепи	CAGTCCAGCTATTCTCCAGCTACTCCTACGGT (SEQ ID NO: 50)

[0114] Пример 2. Аффинность связывания человеческого моноклонального антитела к EphA4 с EphA4 человека

Аффинность связывания антитела А и антитела В с EphA4 человека определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Biacore T200 (Cytiva). Сначала антитело к His (Cytiva, 28-9950-56) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. Иммобилизацию выполняли посредством способа конъюгации аминов с использованием N-гидроксисукцинимид (NHS) и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC). При блокировании использовали этаноламин (сенсорный чип и реагенты для иммобилизации были произведены Cytiva). Антитело разводили буферным раствором для иммобилизации (10 mM ацетата натрия, pH 4,5) до 3 мкг/мл и иммобилизовали на сенсорном чипе согласно протоколу, прилагаемому к Biacore T200. Внеклеточный домен-SEAP-His10 EphA4 человека разводили подвижным буферным раствором HBS-EP+ (Cytiva, BR-1001-69), вводили в проточную ячейку на 120 секунд и захватывали (количество захваченного антитела: примерно 6 RU). Затем антитело А или антитело В, серийно разведенные в диапазоне 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2, 1,6 и 0 нМ с использованием HBS-EP+, добавляли к сенсорному чипу на 120 секунд. Затем кривые реакций связывания наблюдали во время добавления (фаза ассоциации, 120 с) и после завершения добавления (фаза диссоциации, 600 с). После завершения каждого наблюдения сенсорный чип восстанавливали путем добавления 3 M MgCl₂ (60 с). Полученные кривые реакции связывания подвергали анализу с аппроксимированием с использованием моделей связывания 1:1 и проводили оценку с помощью программного обеспечения BIA, прилагаемого к системе, для расчета аффинности связывания ($KD=kd/ka$) по отношению к EphA4 человека. Упомянутый выше эксперимент проводился трижды, и вычисляли среднее значение каждого параметра.

[0115] Аффинность связывания (значение KD) антитела А и антитела В по отношению к EphA4 человека составляла $4,67 \times 10^{-10}$ М и $1,56 \times 10^{-10}$ М соответственно (фигура 1). Антитело А и антитело В имели одинаковый уровень аффинности связывания с EphA4 человека. На фигуре 1 в качестве примера показана типичная кривая реакции связывания.

[0116] Пример 3. Ингибирующая активность моноклонального антитела к EphA4 человека по отношению к связыванию EphA4 человека с его человеческим лигандом

Антитело А и антитело В оценивали в отношении их ингибирующей активности по отношению к связыванию между EphA4 человека и его человеческим лигандом согласно следующим стадиям. Каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) покрывали антителом к щелочной фосфатазе (Thermo Fisher Scientific Inc.). После инкубирования в течение ночи при 4°C каждую лунку блокировали с помощью 1% BlockAce (KAC Co., Ltd.) в течение ночи при 4°C. После трехкратного промывания с помощью 0,02% Tween 20/PBS белок внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 человека (конечная концентрация: 10 нМ) высевали в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки в каждую лунку добавляли лиганды и серийно разбавленные антитело А или антитело В (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 и 3000 нМ). Используемыми лигандами были химера биотинилированный

человеческий эфрин A5-Fc (R&D Systems, Inc., конечная концентрация: 0,7 нМ) и химера биотинилированный человеческий эфрин B3-Fc (R&D Systems, Inc., конечная концентрация: 2,3 нМ). После инкубирования при комнатной температуре в течение 1 часа и последующего трехкратного промывания к полученному добавляли меченный пероксидазой хрена стрептавидин (GE Healthcare Japan Corp.) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки в каждую лунку добавляли раствор TMBZ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 минут. В каждую лунку добавляли равное количество раствора, останавливающего реакцию (2 н. H₂SO₄, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Поглощение при длине волны 450 нм считывали с использованием микропланшетного ридера (Thermo Fisher Scientific Inc.).

[0117] Антитело А и антитело В подавляли связывание между EphA4 человека и его человеческим лигандом зависимым от концентрации образом. Значения IC₅₀ антитела А для связывания с человеческим эфрином А5 и эфрином В3 составляли 3,9 нМ и 3,0 нМ соответственно, а значения IC₅₀ антитела В для связывания с человеческим эфрином А5 и эфрином В3 составляли 4,8 нМ и 4,1 нМ соответственно. Соответственно, было обнаружено, что антитело А и антитело В подавляют связывание между EphA4 человека и его человеческим лигандом (фигура 2).

[0118] Пример 4. Избирательность моноклонального антитела к EphA4 человека по отношению к человеческому Eph-рецептору

Антитело А и антитело В оценивали в отношении их активности связывания по отношению к каждому человеческому Eph-рецептору согласно следующим стадиям. Каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) покрывали кроличьим антителом к 6-His (Bethyl Laboratories Inc.). После инкубирования при комнатной температуре в течение 1 часа или в течение ночи при 4°C каждую лунку блокировали с помощью 1% BlockAce (KAC Co., Ltd.) при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания с помощью 0,02% Tween 20/PBS каждый белок внеклеточного домена-His человеческого Eph-рецептора (Creative BioMart Inc., конечная концентрация: 1 нМ) высевали в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания в каждую лунку добавляли антитело А или антитело В (10 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания к полученному добавляли меченное пероксидазой хрена кроличье антитело к Fcγ-фрагменту человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания в каждую лунку добавляли раствор TMBZ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.). В каждую лунку добавляли равное количество раствора, останавливающего реакцию (2 н. H₂SO₄, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Поглощение при длине волны 450 нм считывали с использованием микропланшетного ридера (Thermo Fisher Scientific Inc.).

[0119] Было обнаружено, что антитело А и антитело В специфично связываются с

EphA4 человека среди представителей семейства рецепторов Eph человека (фигура 3).

[0120] Пример 5. Реактивность моноклонального антитела к EphA4 человека по отношению к EphA4 мыши, крысы, обезьяны и человека

Белки внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 мыши, крысы, обезьяны и человека получали согласно следующим стадиям. Гены, кодирующие SEAP-His и внеклеточные домены EphA4 мыши, крысы, обезьяны и человека, были синтезированы в GenScript Japan Inc. Сначала синтезированный генный фрагмент, кодирующий SEAP-His, клонировали в вектор pcDNA3.4 (Invitrogen/Life Technologies Corp.). Каждый из генных фрагментов внеклеточных доменов EphA4 мыши, крысы, обезьяны и человека клонировали в сконструированный вектор экспрессии pcDNA3.4-SEAP-His с обеспечением конструирования векторов экспрессии внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 мыши, крысы, обезьяны и человека. Аминокислотная последовательность EphA4 человека, используемая в конструкции вектора, представлена под SEQ ID NO: 1, а его внеклеточный домен представлен под SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность EphA4 обезьяны представлена под SEQ ID NO: 51, а его внеклеточный домен представлен под SEQ ID NO: 52. Аминокислотная последовательность EphA4 крысы представлена под SEQ ID NO: 53, а его внеклеточный домен представлен под SEQ ID NO: 54. Аминокислотная последовательность EphA4 мыши представлена под SEQ ID NO: 55, а его внеклеточный домен представлен под SEQ ID NO: 56. Различные белки внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 получали с использованием вектора экспрессии белка внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 человека, вектора экспрессии белка внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 обезьяны, вектора экспрессии белка внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 крысы и вектора экспрессии белка внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 мыши. Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) трансфицировали каждым из векторов экспрессии с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Через четыре дня каждый культуральный раствор извлекали и осветляли путем удаления клеток. Полученный культуральный раствор очищали с использованием смолы TALON (Takara Bio Inc.) и подвергали замене буфера на PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) путем диализа.

[0121] Антитело А и антитело В оценивали в отношении их активности связывания по отношению к каждому EphA4 согласно следующим стадиям. Каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) покрывали кроличьим антителом к 6-His (Bethyl Laboratories Inc.). После инкубирования при комнатной температуре в течение 1 часа каждую лунку блокировали с помощью 1% BlockAce (KAC Co., Ltd.) в течение ночи при 4°C. После трехкратного промывания с помощью 0,02% Tween 20/PBS каждый из белков внеклеточного домена-SEAP-His EphA4 мыши, крысы, обезьяны и человека (конечная концентрация: 1 нМ) высевали в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания в каждую лунку добавляли антитело А или антитело В (0, 0,00013, 0,00064, 0,0032, 0,016, 0,08, 0,4, 2 и 10 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного

промывания к полученному добавляли меченное пероксидазой хрена кроличье антитело к Fc γ -фрагменту человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания в каждую лунку добавляли раствор TMBZ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.). В каждую лунку добавляли равное количество раствора, останавливающего реакцию (2 н. H₂SO₄, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Поглощение при длине волны 450 нм считывали с использованием микропланшетного ридера (Thermo Fisher Scientific Inc.).

[0122] Антитело А и антитело В имели одинаковый уровень связывающей активности в отношении EphA4 мыши, EphA4 крысы, EphA4 обезьяны и EphA4 человека (фигура 4).

[0123] Пример 6. Реактивность человеческого моноклонального антитела к EphA4 по отношению к внеклеточному домену, лиганд-связывающему домену, домену 1 фибронектина III типа и домену 2 фибронектина III типа EphA4 человека

Белок внеклеточного домена (ECD), лиганд-связывающего домена (LBD), домена 1 фибронектина III типа (FN1) или домена 2 фибронектина III типа (FN2) EphA4 человека, слитого со связывающим мальтозу белком (MBP) и гистидиновой меткой (далее в данном документе обозначаемый как "белок внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека", "белок лиганд-связывающего домена-MBP-His EphA4 человека", "белок домена-MBP-His 1 фибронектина III типа EphA4 человека" и "белок домена-MBP-His 2 фибронектина III типа EphA4 человека"), получали в соответствии со следующими стадиями. Сначала конструировали вектор экспрессии pCDNA3.4-внеклеточный домен-, -лиганд-связывающий домен-, -домен- 1 фибронектина III типа или -домен-MBP-His 2 фибронектина III типа EphA4 человека. Сначала последовательность ДНК, кодирующую сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 6) EphA4 человека или сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 57) препротрипсина и каждый домен EphA4 человека, амплифицировали с помощью PCR и клонировали в вектор pCDNA3.4 (Invitrogen/Life Technologies Corp.), характеризующийся последовательностью ДНК, кодирующей MBP и гистидиновую метку с линкером AAA или G4S, с обеспечением конструирования векторов экспрессии белка внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека, белка лиганд-связывающего домена-MBP-His EphA4 человека, белка домена-MBP-His 1 фибронектина III типа EphA4 человека и белка домена-MBP-His 2 фибронектина III типа EphA4 человека. Аминокислотная последовательность EphA4 человека, используемая в конструкции вектора, представлена под SEQ ID NO: 1; его внеклеточный домен представлен под SEQ ID NO: 2; лиганд-связывающий домен представлен под SEQ ID NO: 58; домен 1 фибронектина III типа представлен под SEQ ID NO: 59; и домен 2 фибронектина III типа представлен под SEQ ID NO: 60. MBP и гистидиновая метка (белок MBP-His) представлены под SEQ ID NO: 61. Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) трансфицировали каждым из векторов экспрессии с использованием системы экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Через четыре дня каждый

культуральный раствор извлекали и осветляли путем удаления клеток. Белок внеклеточного домена-MBP-His EphA4 человека или белок лиганд-связывающего домена-MBP-His EphA4 человека очищали с использованием смолы TALON (Takara Bio Inc.) и подвергали замене буфера на PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) путем диализа. Белок домена-MBP-His 1 фибронектина III типа EphA4 человека и белок домена-MBP-His 2 фибронектина III типа EphA4 человека очищали с использованием амилозной смолы (New England Biolabs Inc.), а мономерные фракции разделяли и очищали с использованием АКТА Explore. 10s/Superdex 200 10/300 GL (Cytiva).

[0124] Антитело А, антитело В и человеческий IgG (Sigma-Aldrich Co. LLC) оценивали в отношении их активности связывания по отношению к каждому EphA4 согласно следующим стадиям. Каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) покрывали кроличьим антителом к 6-His (Bethyl Laboratories Inc.). После инкубирования при комнатной температуре в течение 1 часа каждую лунку блокировали с помощью 1% BlockAce(КАС Co., Ltd.) в течение ночи при 4°C. После трехкратного промывания с помощью 0,02% Tween 20/PBS каждый из белков внеклеточного домена- EphA4 человека, лиганд-связывающего домена- EphA4 человека, домена- 1 фибронектина III типа EphA4 человека и домена-MBP-His 2 фибронектина III типа EphA4 человека или белка MBP-His (конечная концентрация: 1 нМ) высевали в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания в каждую лунку добавляли антитело А, антитело В или человеческий IgG (10 нМ) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания к полученному добавляли меченное пероксидазой хрена кроличье антитело к Fcγ-фрагменту человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратного промывания в каждую лунку добавляли раствор ТМВЗ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.). В каждую лунку добавляли равное количество раствора, останавливающего реакцию (2 н. H₂SO₄, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Поглощение при длинах волны 450 нм и 650 нм считывали с использованием микропланшетного ридера (Thermo Fisher Scientific Inc.).

[0125] Антитело А и антитело В обладали связывающей активностью по отношению к внеклеточному домену (ECD) и лиганд-связывающему домену (LBD) EphA4 человека (фигура 5). Ни одно из них не реагировало с доменом 1 фибронектина III типа (FN1) и доменом 2 фибронектина III типа (FN2). Соответственно, было обнаружено, что антитело А и антитело В специфично связываются с внеклеточным доменом и лиганд-связывающим доменом EphA4 человека.

[0126] Пример 7. Активность человеческого моноклонального антитела к EphA4, усиливающая расщепление EphA4, в нейронах гиппокампа

Нейроны гиппокампа крысы получали согласно следующим стадиям. У крысы (Charles River Laboratories Japan, Inc.) на 18-й день беременности извлекали плод и его голову разрезали для выделения головного мозга. Под стереоскопическим микроскопом из него вырезали область гиппокампа, затем ее помещали в дигестирующий раствор (137

мМ NaCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 5 мМ KCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 7 мМ Na₂HPO₄ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 25 мМ Hepes (Dojindo Laboratories), 0,5 мг/мл ДНКазы (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,25% раствор трипсина (Thermo Fisher Scientific Inc.) и встряхивали при 37°C в течение 10 минут. Раствор удаляли и к остатку добавляли 20% фетальной бычьей сыворотки/буферный раствор Хенкса (Sigma-Aldrich Co. LLC). После удаления жидкости и двукратной промывки буферным раствором Хенкса ткани гиппокампа пипетировали в буферном растворе Хенкса с получением клеточной суспензии. Затем клетки суспендировали в культуральном растворе (нейробазальная среда (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1 × добавка B-27 (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,5 мМ L-глутамин (Thermo Fisher Scientific Inc.)) и затем высевали в 96-луночную чашку с покрытием из поли-L-лизина (Falcon).

[0127] Антитело А и антитело В, полученные в примере 1, оценивали в отношении их активности, усиливающей расщепление EphA4, с использованием нейронов гиппокампа в соответствии со следующими стадиями. Растворитель (PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)), человеческий IgG, антитело А или антитело В (2,0, 6,7 и 20 нМ) оставляли для оказания воздействия в течение 24 часов вместе с соединением Е, представляющим собой ингибитор γ -секретазы (50 нМ, Enzo Life Sciences, Inc.), оказываемого на нейроны гиппокампа крысы, высеянные в 96-луночную чашку (Falcon). После промывания с помощью PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) клетки собирали путем добавления буфера для образцов SDS (буфер для образцов Лэммли (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 2,5% 2-меркаптоэтанол (Bio-Rad Laboratories, Inc.)) и кипятили в течение 5 минут. Этот образец анализировали с использованием полностью автоматизированной системы вестерн-блоттинга Jess. Для анализа использовали моноклональные антитела к EphA4 (Abnova Corp.). Сигналы, соответствующие С-концевому фрагменту EphA4 и полноразмерному EphA4, определяли количественно и рассчитывали значение для отношения С-концевой фрагмент EphA4/(полноразмерный EphA4+С-концевой фрагмент EphA4).

[0128] Антитело А и антитело В усиливали реакцию расщепления EphA4 зависимым от концентрации образом в нейронах гиппокампа (фигура 6).

[0129] Пример 8. Активность в отношении усиления расщепления EphA4 человека у человеческого моноклонального антитела к EphA4

Сначала последовательность ДНК, кодирующую EphA4 человека, и вектор рСАНА, содержащий последовательность ДНК, кодирующую метку НА, синтезировали в GenScript Japan Inc. Затем последовательность ДНК, кодирующую EphA4 человека, вставляли в SalI/NotI вектора рСАНА с обеспечением конструирования вектора экспрессии рСА-EphA4_человека-НА.

Нейроны гиппокампа крысы получали согласно следующим стадиям. У крысы (Charles River Laboratories Japan, Inc.) на 18-й день беременности извлекали плод и его голову разрезали для выделения головного мозга. Под стереоскопическим микроскопом из него вырезали область гиппокампа, затем ее помещали в дигестирующий раствор (137

мМ NaCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 5 мМ KCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 7 мМ Na₂HPO₄ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 25 мМ Hepes (Dojindo Laboratories), 0,5 мг/мл ДНКазы (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,25% раствор трипсина (Thermo Fisher Scientific Inc.) и встряхивали при 37°C в течение 10 минут. Раствор удаляли и к остатку добавляли 20% фетальной бычьей сыворотки/буферный раствор Хенкса (Sigma-Aldrich Co. LLC). После удаления жидкости и двукратной промывки буферным раствором Хенкса ткани гиппокампа пипетировали в буферном растворе Хенкса с получением клеточной суспензии.

[0130] Антитело А и антитело В, полученные в примере 1, оценивали в отношении их активности, усиливающей расщепление, направленной на EphA4 человека, в соответствии со следующими стадиями. Вектор экспрессии рСА-EphA4_человека-НА переносили в нейроны гиппокампа крысы с использованием нуклеофектора (Lonza Group AG). Клетки суспендировали в культуральном растворе (нейробазальная среда (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1 × добавка В-27 (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,5 мМ L-глутамин (Thermo Fisher Scientific Inc.)) и затем высевали в 96-луночную чашку с покрытием из поли-L-лизина (Falcon). Растворитель (PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)), человеческий IgG, антитело А или антитело В (6,7, 20 и 67 нМ) оставляли для оказания воздействия в течение ночи вместе с соединением Е, представляющим собой ингибитор γ -секретазы (50 нМ, Enzo Life Sciences, Inc.), оказываемого на высевные нейроны гиппокампа крысы. После промывания с помощью PBS клетки собирали путем добавления буфера для образцов SDS (буфер для образцов Лэммли (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 5% 2-меркаптоэтанол (Bio-Rad Laboratories, Inc.)) и кипятили в течение 5 минут. Этот образец подвергали SDS-PAGE и подвергали вестерн-блоттингу с использованием крысиного моноклонального антитела к НА (Roche). Интенсивность полосы определяли количественно и рассчитывали значение для отношения С-концевой фрагмент EphA4 человека/(полноразмерный EphA4 человека+С-концевой фрагмент EphA4 человека).

[0131] Антитело А и антитело В усиливали реакцию расщепления EphA4 человека в нейронах гиппокампа (фигура 7).

[0132] Пример 9. Увеличивающий эффект человеческого моноклонального антитела к EphA4 в отношении плотности шипиков в нейронах гиппокампа

Нейроны гиппокампа крысы получали, как описано в примере 7. Ген EGFP переносили в нейроны гиппокампа крысы с использованием нуклеофектора (Lonza Group AG). Клетки смешивали с нетрансфицированными нейронами и высевали в покрытые поли-L-лизином 24-луночные планшеты (Falcon) после помещения в них покровных стекол (Matsunami Glass Ind., Ltd.).

[0133] Шипики подсчитывали с использованием нейронов гиппокампа в соответствии со следующими стадиями. Нейроны гиппокампа крысы в день 15 культивирования, высевные в покрытые поли-L-лизином 24-луночные планшеты (Falcon) после помещения в них покровных стекол (Matsunami Glass Ind. Ltd.), обрабатывали контрольным антителом (человеческий IgG₂; Sigma-Aldrich Co. LLC),

антителом А или антителом В (6,7 и 20 нМ) в течение 24 часов. Затем покровные стекла переносили в 2% PFA (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)/4% сахарозы (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)/PBS и выдерживали в течение 20 минут с целью обеспечения фиксации в нем клеток. Покровные стекла вынимали из фиксирующего раствора, переносили в PBS и трижды промывали. Затем к полученному добавляли 0,25% Triton X-100 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)/PBS и проводили обработку с пермеабиллизацией клеток в течение 15 минут. Покровные стекла переносили в 2% BSA (Sigma-Aldrich Co. LLC)/0,25% Triton X-100/OPTI-MEM (GIBCO), блокировали в течение 1 часа, а затем проводили реакцию с антителом к GFP (Nacalai Tesque, Inc.) и антителом к Math2 (Abcam plc) при комнатной температуре в течение периода от 1 часа до 1,5 часа. Раствор первичного антитела удаляли и покровные стекла трижды промывали с помощью PBS, а затем проводили реакцию со вторичным антителом при комнатной температуре в течение 1 часа в темноте. Раствор вторичного антитела удаляли и покровные стекла трижды промывали с помощью PBS, а затем покрывали реагентом, препятствующим выгоранию флуоресценции Prolong Gold (Molecular Probes, Inc.), с последующим наблюдением и получением изображений для анализа с помощью LSM800 (Carl Zeiss AG). Упомянутый выше эксперимент проводили три раза. Math2-положительные нейроны, подобные пирамидальным клеткам, извлекали из двух покровных стекол на эксперимент и шипики на их соответствующих дендритах подсчитывали с помощью программного обеспечения для анализа изображений Imaris(R) (Bitplane). Для каждого нейрона подсчитывали количество шипиков на 10 мкм.

[0134] Антитело А и антитело В увеличивали плотность шипиков нейронов гиппокампа (фигура 8). Этот результат указывает на то, что антитело А и антитело В обладают способностью стабилизировать шипики в нейронах гиппокампа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к EphA4, содержащее тяжелую цепь, содержащую
 - (a) CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 30;
 - (b) CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31; и
 - (c) CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 32; и легкую цепь, содержащую
 - (d) CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 33;
 - (e) CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34; и
 - (f) CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, или тяжелую цепь, содержащую
 - (g) CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42;
 - (h) CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31; и
 - (i) CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 43; и легкую цепь, содержащую
 - (j) CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 44;
 - (k) CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34; и
 - (l) CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35.
2. Антитело к EphA4 по п. 1, где антитело к EphA4 представляет собой человеческое антитело.
3. Антитело к EphA4 по п. 1 или п. 2, где антитело к EphA4 специфично связывается с EphA4 и усиливает расщепление EphA4.
4. Антитело к EphA4 по любому из пп. 1-3, где антитело к EphA4 специфично связывается с EphA4 и подавляет связывание между EphA4 и эфрином.
5. Антитело к EphA4 по любому из пп. 1-4, где тяжелая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной

последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7, и

легкая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8.

6. Антитело к E_{ph}A4 по любому из пп. 1-5, где

каждая из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, полученную из человеческого антитела.

7. Антитело к E_{ph}A4 по п. 6, где

константная область тяжелой цепи представляет собой константную область человеческого IgG.

8. Антитело к E_{ph}A4 по п. 7, где

константная область человеческого IgG представляет собой константную область человеческого IgG₂.

9. Антитело к E_{ph}A4 по п. 8, где

константная область человеческого IgG₂ содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15.

10. Антитело к E_{ph}A4 по любому из пп. 1-4, где

тяжелая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11, и

легкая цепь содержит переменную область, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12.

11. Антитело к E_{ph}A4 по любому из пп. 1-4 и п. 10, где

каждая из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, полученную из человеческого антитела.

12. Антитело к E_{ph}A4 по п. 11, где

константная область тяжелой цепи представляет собой константную область человеческого IgG.

13. Антитело к E_{ph}A4 по п. 12, где

константная область человеческого IgG представляет собой константную область человеческого IgG, состоящего из комбинации человеческого IgG₁ и человеческого IgG₂.

14. Антитело к E_{ph}A4 по п. 13, где

константная область человеческого IgG, состоящего из комбинации человеческого IgG₁ и человеческого IgG₂, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 16.

15. Антитело к E_{ph}A4 по любому из пп. 6-9 и пп. 11-14, где

константная область легкой цепи представляет собой константную область человеческой Igλ-цепи.

16. Антитело к E_{ph}A4 по п. 15, где

константная область человеческой Igλ-цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 17.

17. Антитело к E_{ph}A4, содержащее

тяжелую цепь и легкую цепь, где

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20,

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 21, и

С-концевой лизин тяжелой цепи может быть необязательно удален.

18. Антитело к EphA4 по п. 17, где

С-концевой лизин тяжелой цепи удален.

19. Антитело к EphA4, содержащее

тяжелую цепь и легкую цепь, где

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26,

легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и

С-концевой лизин тяжелой цепи может быть необязательно удален.

20. Антитело к EphA4 по п. 19, где

С-концевой лизин тяжелой цепи удален.

21. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к EphA4 по любому из пп. 1-20.

22. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 21.

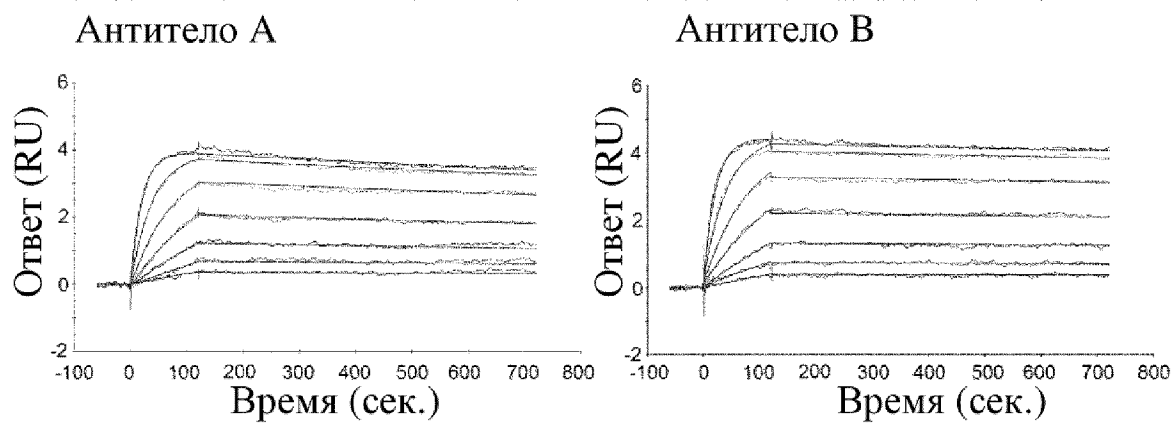
23. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 22.

24. Способ получения антитела к EphA4, предусматривающий стадию культивирования клетки-хозяина по п. 23.

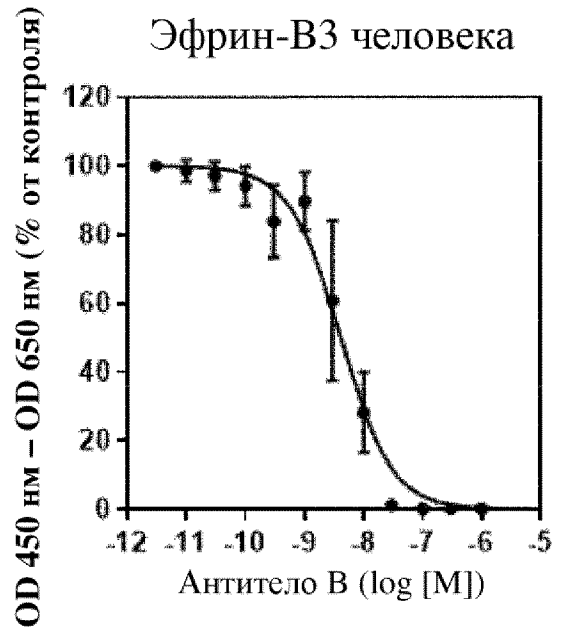
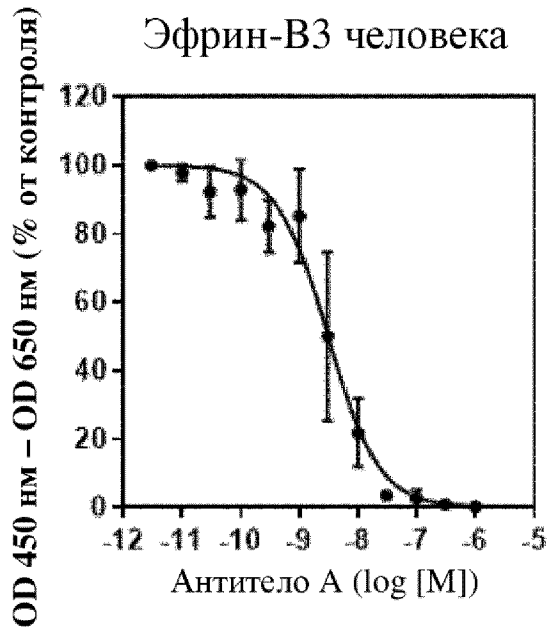
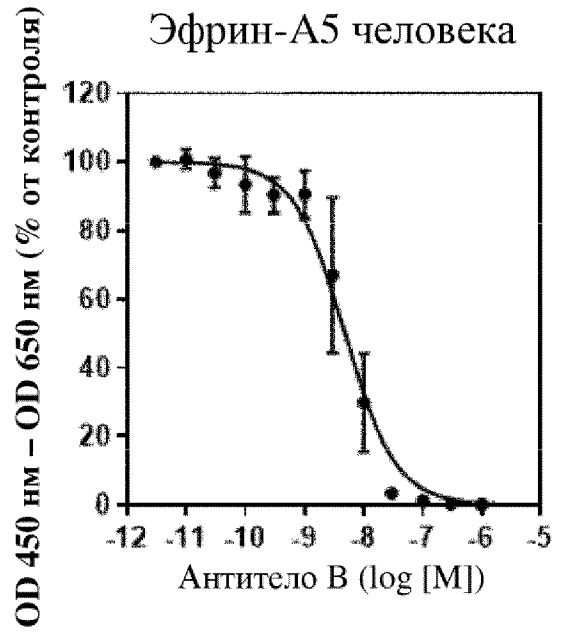
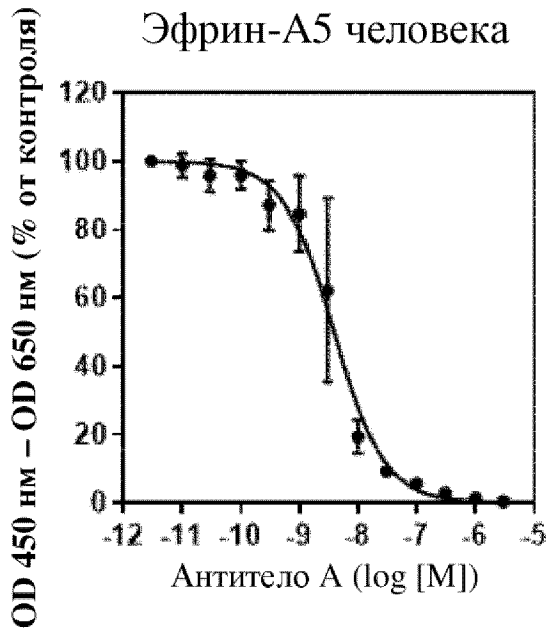
По доверенности

[Фигура 1]

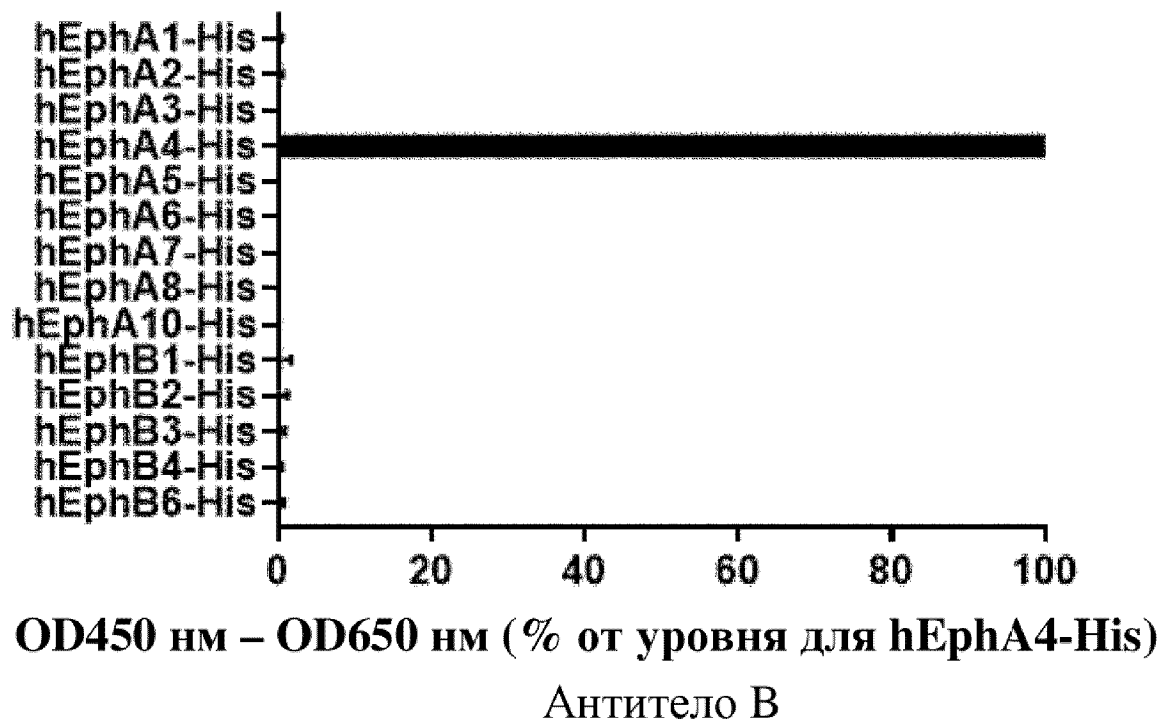
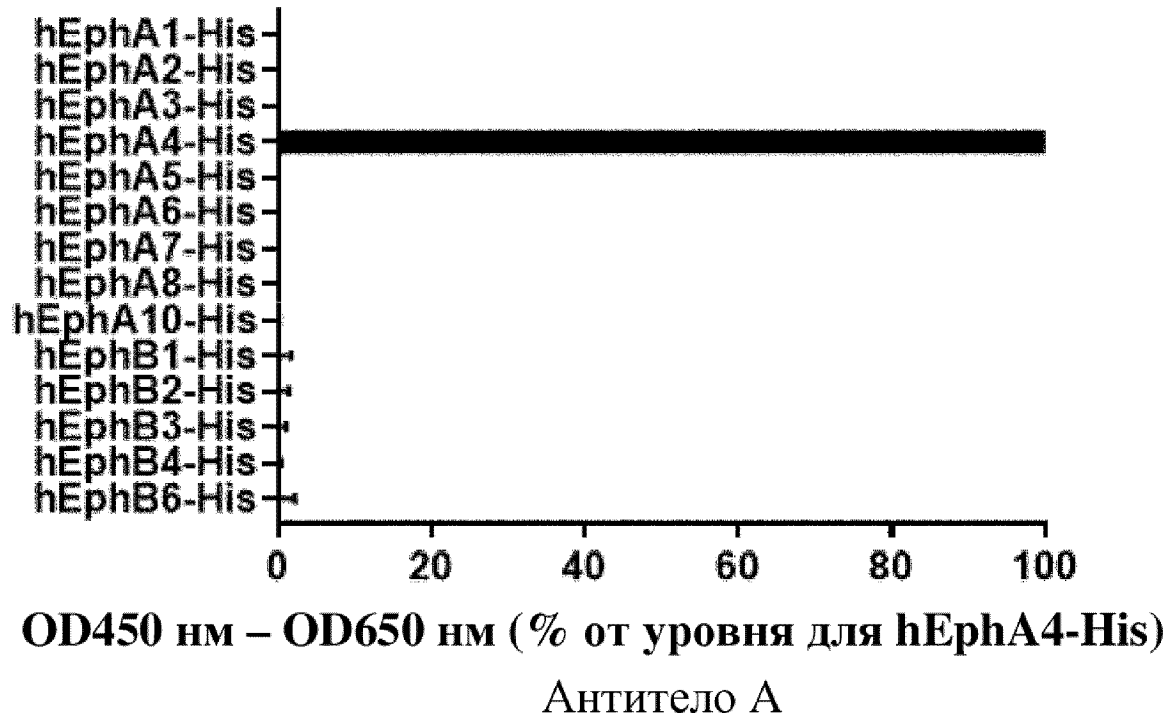
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (M)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
Антитело А	5,37,E+05	2,51,E-04	4,67,E-10	3,91	0,005
Антитело В	5,12,E+05	8,01,E-05	1,56,E-10	4,35	0,012



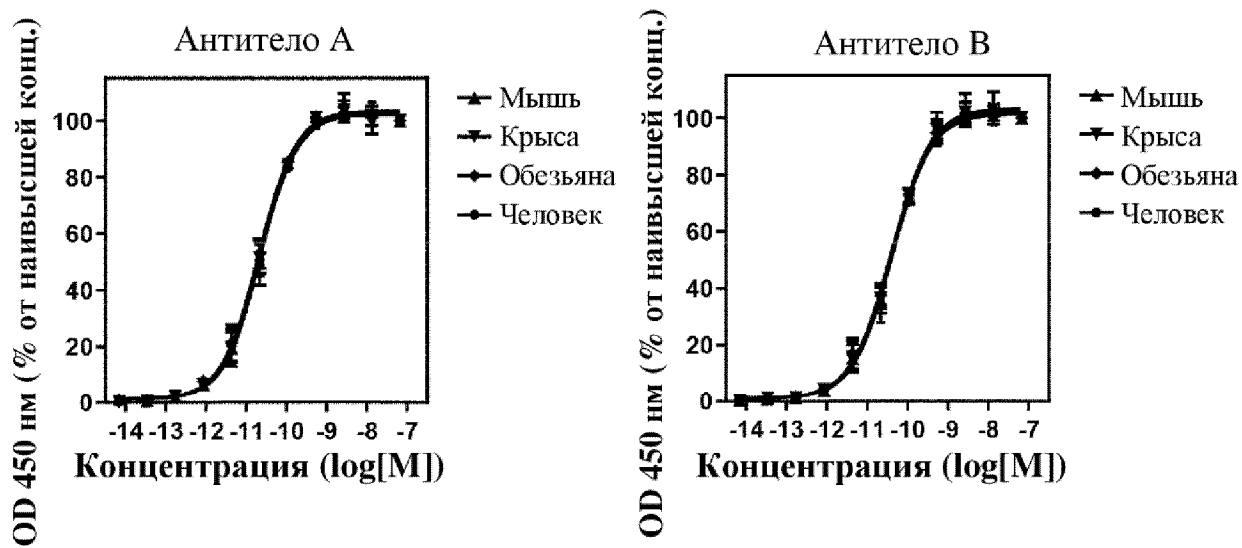
[Фигура 2]



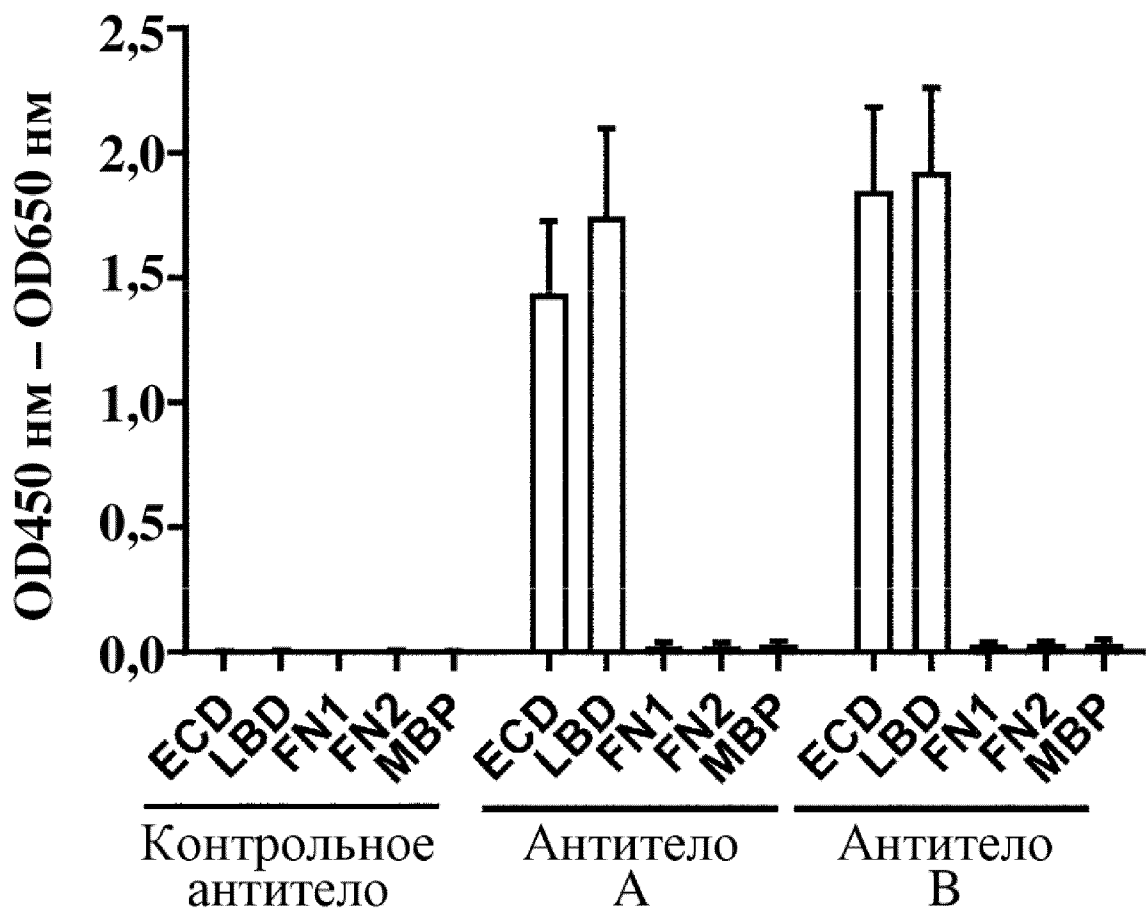
[Фигура 3]



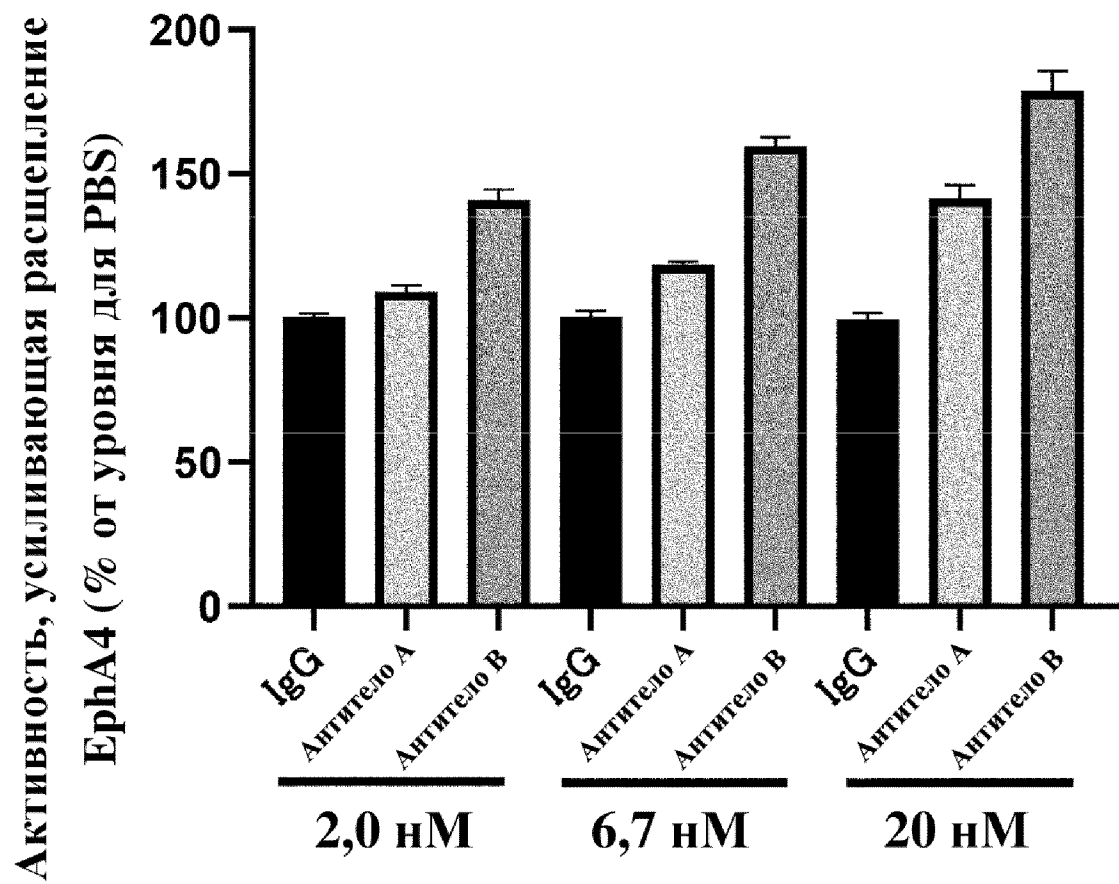
[Фигура 4]



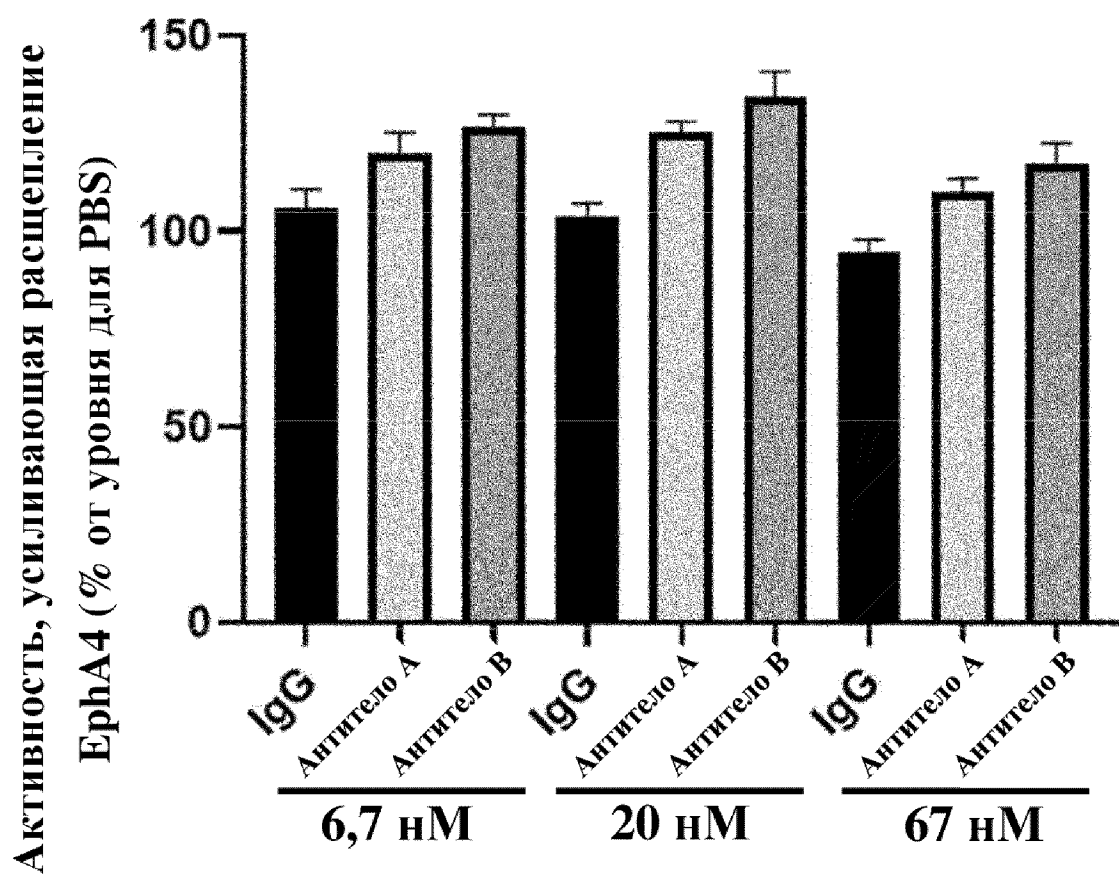
[Фигура 5]



[Фигура б]



[Фигура 7]



[Фигура 8]

