

ANTICUERPO ANTI-EPHA4

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a EphA4.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

EphA4 es un miembro del receptor de la familia tirosina quinasa. Efrina tipo A y tipo B son conocidas como ligandos de EphA4. Tras la unión de EphA4 a su ligando efrina, se inducen señales de desadhesión. EphA4 es expresada en neuronas motoras y regula la orientación axonal correcta a través de efrina expresada en regiones no proyectivas de las neuronas motoras en la médula espinal durante una fase de formación de la red neural.

Estudios previos sugieren que la inhibición funcional de EphA4 es un proceso terapéutico efectivo para enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica (a la que se alude en lo que sigue en esta memoria como "ELA") y la enfermedad de Alzheimer, y lesión de la médula espinal.

Se ha informado que el gen EphA4 ajusta el fenotipo de ELA (Bibliografía de Patentes 1; y Bibliografía de No Patentes 1). Se ha encontrado que un defecto genético de EphA4 o el antagonismo por parte de EphA4-Fc o similar fomenta el alargamiento axonal o la recuperación funcional en el momento de lesión de la médula espinal en ratones o ratas (Bibliografía de Patentes 2; y Bibliografía de No Patentes 3).

El péptido KYL y compuesto 1 son conocidos como inhibidores de la señalización de EphA4 existentes (Bibliografía de Patentes 1; Bibliografía de No Patentes 1; y Bibliografía de No Patentes 2). Sin embargo, no ha habido

informe alguno sobre un anticuerpo que tenga actividad neutralizante.

TÉCNICA ANTERIOR

Bibliografía de Patentes 1: documento WO2012/156351 A1

5 Bibliografía de No Patentes 1: Van Hoecke et al.,
Nature Medicine, vol. 18: 1418-1422, 2012

Bibliografía de No Patentes 2: Goldschmit et al., PLoS
one, vol. 6: e24636, 2011

10 Bibliografía de No Patentes 3: Spanevello et al.,
Journal of Neurotrauma, vol. 30: 1023-1034, 2013

SUMARIO DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo que sea capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión
15 entre EphA4 y su ligando, y una composición farmacéutica que comprenda el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo como un ingrediente activo.

Los autores de la presente invención han realizado estudios concienzudos para lograr el objeto y
20 consecuentemente completaron la presente invención al obtener un anticuerpo anti-EphA4 capaz de unirse a EphA4 y de inhibir la unión entre EphA4 y su ligando.

Específicamente, en una realización, la presente
25 invención se refiere a las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo, que comprende

(a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 27;

30 (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 29;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;

(d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 31;

5 (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 33.

10 (2) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1), en donde

el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo está humanizado.

(3) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1) o (2), en donde

15 el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y efrina.

20 (4) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en donde

el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y

25 la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera comprende cada una una secuencia derivada de un anticuerpo humano.

(5) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (4), en donde

30 la región constante de la cadena pesada se deriva de IgG humana.

(6) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (5), en donde

la IgG humana es IgG₁ humana o IgG₂ humana.

(7) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (4) a (6), en donde

5 la región constante de la cadena ligera se deriva de Igκ.

(8) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (7), en donde

10 el fragmento de unión a EphA4 se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

(9) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (8), en donde

el fragmento de unión a EphA4 es F(ab')₂.

15 (10) Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (9).

(11) La composición farmacéutica de acuerdo con (10), que comprende, además,

20 un soporte farmacéuticamente aceptable.

(12) La composición farmacéutica de acuerdo con (10) u (11), en donde

25 la composición farmacéutica se utiliza para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En otra realización, la presente invención se refiere también a las siguientes invenciones.

30 (1') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, 68,

70, 72, 74 o 76, o una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia mediante sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos,

una región variable de la cadena ligera comprende la
5 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, 80, 82 u 84, o una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia mediante la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos, y

el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a
10 EphA4 del mismo se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y efrina.

(2') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde

15 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, 68, 70, 72, 74 o 76, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, 80,
20 82 u 84.

(3') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la
25 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

(4') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

30 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

(5') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

5 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

10 (6') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

15 (7') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y

20 una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

(8') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

25 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

(9') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

30 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

(10') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

5 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

10 (11') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

15 (12') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y

20 una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

(13') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

25 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

(14') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

30 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

(15') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

5 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

10 (16') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

15 (17') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y

20 una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

(18') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

25 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

(19') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

30 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

(20') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

5 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

10 (21') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

15 (22') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y

20 una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

(23') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

25 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

(24') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

30 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

(25') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

5 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

10 (26') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') o (2'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

15 (27') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a (26'), en donde

20 el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y efrina.

(28') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a (27'), en donde

25 la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera comprende cada una una secuencia derivada de un anticuerpo humano.

(29') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (28'), en donde

30 la región constante de la cadena pesada se deriva de IgG humana.

(30') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (29'), en donde

la IgG humana es IgG humana que consiste en IgG₂ humana o una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana.

5 (31') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (30'), en donde

la IgG humana es IgG₂ humana.

(32') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (31'), en donde

10 la IgG₂ humana tiene una mutación C131S, C219S, V234A y/o G237A bajo la numeración Eu y no tiene un residuo lisina en el extremo carboxi.

(33') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (32'), en donde

15 la IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62.

(34') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (30'), en donde

20 la IgG humana es IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana.

(35') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (34'), en donde

25 en la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana, una región CH1 y una región bisagra son IgG₁ humana y una región CH2 y una región CH3 son IgG₂ humana.

(36') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (35'), en donde

30 la IgG humana, que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana, tiene una mutación V234A y/o una

mutación G237A bajo la numeración Eu y no tiene un residuo lisina en el extremo carboxi.

(37') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (36'), en donde

5 la IgG humana, que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana, comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 60.

(38') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (28') a
10 (37'), en donde

 la región constante de la cadena ligera se deriva de Igκ.

(39') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a
15 (38'), en donde

 el fragmento de unión a EphA4 se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

(40') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (39'), en donde
20 el fragmento de unión a EphA4 es F(ab')₂.

(41') Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a
25 (40').

(42') La composición farmacéutica de acuerdo con (41'), que comprende, además,

 un soporte farmacéuticamente aceptable.

(43') La composición farmacéutica de acuerdo con (41')
30 o (42'), en donde

 la composición farmacéutica se utiliza para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Uno de o cualquier combinación de dos o más de los aspectos de la presente invención arriba mencionados está también incluido en el alcance de la presente invención.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo que es capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y su ligando, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo como un ingrediente activo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG.1 muestra la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) para EphA4 humana y EphA4 de ratón.

La FIG. 2 muestra la inhibición de la unión de EphA4 de ratón a Efrina A1 de ratón y Efrina B2 de ratón por parte del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A), péptido KYL y compuesto 1.

La FIG. 3 muestra la inhibición de la unión de EphA4 humana a Efrina A5 humana y Efrina B3 humana por parte del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) y péptido KYL.

La FIG. 4A muestra la afinidad de unión de anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-Fab para EphA4 de ratón.

La FIG. 4B muestra la afinidad de unión de anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-F(ab')₂ para EphA4 de ratón.

La FIG. 4C muestra la afinidad de unión de anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-Fab para EphA4 humana.

La FIG. 4D muestra la afinidad de unión de anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-F(ab')₂ para EphA4 humana.

La FIG. 5 muestra la inhibición de la unión entre EphA4 de ratón y Efrina B2 de ratón por parte del anticuerpo A-IgG (anticuerpo A), anticuerpo A-F(ab')₂, anticuerpo A-Fab y péptido KYL.

5 La FIG. 6 muestra la especificidad para la unión de anticuerpo A para el receptor de Eph humana (FIG.6A) y el receptor de Eph de ratón (FIG.6B).

La FIG. 7 muestra la actividad de unión de anticuerpo A frente a EphA4 de ratón, rata, mono y humana.

10 La FIG. 8 muestra que el anticuerpo A suprime, de una manera dependiente de la concentración, la autofosforilación de EphA4 inducida por Efrina A1 en neuronas del hipocampo. El pY en la FIG.8 exhibe EphA4 fosforilada.

15 La FIG. 9 muestra que el anticuerpo A suprime, de una manera dependiente de la concentración, el colapso del cono de crecimiento inducido por Efrina A1 en neuronas del hipocampo.

20 La FIG. 10 muestra que el anticuerpo A suprime la autofosforilación de EphA4 inducida por Efrina A1 en el cerebro de neonatos de ratón. El pY en la FIG.10 exhibe EphA4 fosforilada.

25 La FIG. 11 muestra una vista esquemática de un sistema de evaluación llevado a cabo en el Ejemplo 13.

La FIG. 12 muestra que el anticuerpo A protege a las neuronas motoras en modelos de ELA *in vitro* utilizando células ES de ratón.

30 La FIG. 13 muestra una vista esquemática de un sistema de evaluación llevado a cabo en el Ejemplo 14.

La FIG. 14 muestra que el anticuerpo A protege a las neuronas motoras en modelos de ELA *in vitro* utilizando células iPS humanas.

La FIG: 15 muestra los aminoácidos del Dominio de Unión a Ligando de EphA4 (EphA4-LBD) en las abscisas y la región estructural de Fab en las ordenadas. Los cuadros en negro representan los puntos de intersección de combinaciones que tienen una interacción. Una pluralidad de cuadros que presentan un aminoácido corresponden a los tipos de interacción (enlace hidrógeno, contacto con la superficie, etc.). Un aminoácido que tiene un mayor número de cuadros significa que el aminoácido se une a Fab con diversas interacciones.

La FIG. 16 muestra la estructura de la superficie del Dominio de Unión a Ligando de EphA4 (EphA4-LBD). En la FIG. 16, las regiones de color oscuro corresponden a regiones de unión a Fab. En esta figura, los nombres y los números de residuo de aminoácidos contenidos en las regiones de unión se muestran en las posiciones correspondientes, y las CDRs de la cadena H y la cadena L de Fab a unir se indican por modelos de cintas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-EphA4 que se une a EphA4.

El anticuerpo anti-EphA4 utilizado en la presente invención es un anticuerpo que puede reconocer y unirse a EphA4. Tal como se menciona más adelante, el anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto o puede ser un fragmento de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo sintético (p. ej., un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado) siempre que tenga afinidad de

unión a EphA4. En la presente invención, se puede entender que EphA4 se refiere a EphA4 derivada de ser humano, ratón, rata o mono. La EphA4 derivada de ser humano, ratón, rata o mono se puede obtener de una base de datos pública en la que está registrada la información de la secuencia, tal como GenBank, proporcionada por el National Center for Biotechnology Information (EE.UU.). Alternativamente, se diseñan cebadores sobre la base de la información de la secuencia de nucleótidos en EphA4 de una especie animal estrechamente relacionada con ello, y la información de la secuencia en el gen EphA4 se puede obtener mediante clonación a partir de ARN extraído de la especie animal deseada. Por ejemplo, la información de la secuencia de nucleótidos en EphA4 humana, de ratón, rata o mono está registrada bajo los N°s de Acceso de GenBank NM_004438.4, NM_007936.3, NM_001162411.1 y NM_001260870, respectivamente, en la base de datos.

En un aspecto de la presente invención, EphA4 comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos, o la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos. En la presente invención, la expresión "o más" utilizada con respecto a EphA4, no está limitada, siempre que la secuencia resultante conserve características funcionales equivalentes a la secuencia original. La expresión "o más" es 2 a 100, por ejemplo 2 a 90, 2 a 80, 2 a 70, 2 a 60, 2 a 50, 2 a 40, 2 a 30, 2 a 20, 2 a 10 o 2 a

5 o está dentro del 10%, por ejemplo dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6% o dentro del 5% del número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo
5 anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es un anticuerpo que se une específicamente a EphA4. La expresión "se une específicamente" es una expresión bien conocida por los expertos en la técnica, y también es bien conocido un
10 método para determinar la unión específica de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un antígeno o un epítipo. En una realización de la presente invención, se entiende que la "unión específica" significa que el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es capaz de unirse a EphA4 a través de una reacción
15 inmunológica más rápidamente y/o durante una duración de un tiempo mayor con una mayor afinidad de unión y una mayor actividad de unión en comparación con su unión a otras moléculas diana. En este contexto, no se excluye la unión específica a otras dianas de un anticuerpo o un fragmento
20 de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una diana. En otra realización de la presente invención, la "unión específica" se puede indicar por un anticuerpo que tiene una KD de al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M o al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor por EphA4. En una realización alternativa adicional de la presente invención, se entiende que la "unión específica" es la
30 unión de EphA4 a través de una reacción inmunológica, pero no la unión sustancial a otras subclases y subtipos de receptores de Eph.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención es un anticuerpo que se une a la región extracelular de EphA4. El anticuerpo anti-EphA4 o el
5 fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por
10 la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos, o comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos,
15 y se une a cualquier sitio en la región extracelular de EphA4. En la presente invención, la expresión "o más" utilizada con respecto a la región extracelular de EphA4 es, pero no se limita a 2 a 50, por ejemplo 2 a 45, 2 a 40, 2 a 35, 2 a 30, 2 a 25, 2 a 20, 2 a 15, 2 a 10 o 2 a 5 o está
20 dentro del 10%, por ejemplo dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6% o dentro del 5% del número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se
25 puede unir específicamente a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y efrina.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del
30 mismo se puede unir específicamente a al menos uno de EphA4 humana, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión de las mismas a sus ligandos. En una

realización preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se puede unir específicamente a dos o más de EphA4 humana, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión de las mismas a sus ligandos. En otra realización preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se puede unir específicamente a la totalidad de EphA4 humana, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión de las mismas a sus ligandos.

Un método generalmente conocido por los expertos en la técnica se puede utilizar como un método para medir las propiedades de unión a antígeno (p. ej., afinidad de unión y reactividad cruzada entre especies) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir mediante el uso del biosensor Biacore(R), del biosensor KinExA, ensayo de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN International), citometría de flujo, supresión de fluorescencia, transferencia de fluorescencia, visualización de levaduras y/o inmunotinción, aunque el método no está limitado a los mismos. La actividad neutralizante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo frente a la unión entre EphA4 y su ligando se puede medir mediante el uso del biosensor Biacore(R), ELISA y/o citometría de flujo, aunque el método no está limitado a los mismos.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser cualquiera de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal y un fragmento de unión a EphA4 del mismo,

siempre que se una a EphA4, de preferencia se una específicamente a EphA4.

En la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser de cualquier clase tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de la misma) y no está limitado por una clase particular. Las inmunoglobulinas se clasifican en diferentes clases, dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de sus regiones constantes de cadena pesada (también denominada cadena H). Existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, algunas de las cuales pueden estar divididas, además, en subclases (isotipos) de, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Las regiones constantes de la cadena pesada correspondientes a diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan respectivamente α , δ , ϵ , γ y μ . Los tipos de cadena ligera (también denominada cadena L) de anticuerpos son cadenas λ y κ .

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo IgG y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgG₁ o un anticuerpo IgG₂. También, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser un monómero, un dímero o un multímero en algunos casos.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser una combinación de anticuerpos IgG derivados de diferentes subclases tales como anticuerpo

IgG que consiste en una combinación de anticuerpo IgG₁ y anticuerpo IgG₂.

En la presente memoria descriptiva, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo no está particularmente limitado siempre que el fragmento de unión a antígeno sea un fragmento funcional y estructural del anticuerpo y conserve la actividad de unión frente al antígeno al que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos del fragmento de unión a antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y Fv de cadena sencilla (scFv), sus variantes, proteínas de fusión que comprenden un resto de anticuerpo y otras estructuras modificadas de moléculas de inmunoglobulina que comprenden un sitio de reconocimiento del antígeno. En un aspecto, el fragmento de unión del anticuerpo de la presente invención es F(ab')₂.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se puede obtener, por ejemplo, a través de la digestión de proteínas del anticuerpo completo con una proteasa tal como papaína o pepsina, o se puede producir directamente mediante células huéspedes recombinantes (p. ej., eucariotas tales como células de levaduras, células vegetales, células de insectos o células de mamíferos, o procariotas tales como *E. coli*). Por ejemplo, fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y unir químicamente para formar un fragmento F(ab')₂. Alternativamente, F(ab')₂ se puede formar utilizando la cremallera de leucina GCN4, que fomenta el ensamblaje de moléculas de F(ab')₂. En el caso de producir scFv mediante una técnica de síntesis química, se puede utilizar un sintetizador automático. En el caso de producir scFv mediante una técnica de recombinación de genes, un plásmido

apropiado que contiene un polinucleótido que codifica scFv puede ser transferido a células huéspedes apropiadas (p. ej., eucariotas tales como células de levaduras, células vegetales, células de insectos o células de mamíferos, o procariotas tales como *E. coli*). El polinucleótido que codifica scFv de interés se puede preparar mediante una operación bien conocida tal como ligamiento de polinucleótidos. El scFv resultante se puede aislar mediante el uso de una técnica estándar de purificación de proteínas conocida en la técnica.

En la presente invención, la región variable del anticuerpo puede significar una región variable de una cadena ligera del anticuerpo y/o una región variable de una cadena pesada del anticuerpo, y la región constante del anticuerpo puede significar una región constante de una cadena ligera del anticuerpo y/o una región constante de una cadena pesada del anticuerpo. La región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están compuestas cada una de cuatro regiones marco (FRs) conectadas a través de tres CDRs, también conocidas como regiones hipervariables. Las CDRs en cada una de las cadenas se mantienen en estrecha proximidad mediante los FRs y contribuyen, junto con las CDRs en otra cadena, en la formación del sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Ejemplos de técnicas para determinar CDRs incluyen, pero no se limitan a: (1) un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia en especies cruzadas (p. ej., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); y (2) un enfoque basado en el estudio cristalográfico de un complejo antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997 *J. Molec.*

Biol. 273: 927-948). Estos enfoques u otros enfoques se pueden utilizar en combinación. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, es decir, CH1, CH2 y CH3, y una región bisagra, y está situados desde el extremo amino (extremo N) al extremo carboxi (extremo C) en el orden de CH1, una región bisagra, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio CL.

En la presente invención, el anticuerpo monoclonal puede significar un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Específicamente, los anticuerpos individuales contenidos en la población son idénticos, excepto por mutantes naturales que pudieran estar presentes en cierta medida. El anticuerpo monoclonal está dirigido a un único sitio del antígeno y es muy específico. Además de ello, en contraposición a un anticuerpo policlonal típico que fija como objetivo diferentes antígenos o diferentes epítomos, cada uno de los anticuerpos monoclonales fija como objetivo un único epítomo en un antígeno. El modificador "monoclonal" designa las características del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no debe interpretarse de modo restrictivo como que requiere la producción del anticuerpo por un método particular.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de mamífero no humano (p. ej., mono, ratón, rata, conejo, bovino, caballo o cabra), o un fragmento de unión a EphA4 del mismo. El anticuerpo

quimérico es, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las regiones variables de un anticuerpo no humano (p. ej., ratón o rata) unido a las regiones constantes de un anticuerpo humano, y puede referirse, por ejemplo, a un anticuerpo que tiene regiones variables derivadas de un anticuerpo no humano y regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado es, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las regiones hipervariables (a las que se alude también como regiones determinantes de complementariedad (CDRs)) de un anticuerpo no humano introducido en un anticuerpo humano y puede referirse, por ejemplo, a un anticuerpo que tiene CDRs derivadas de un anticuerpo no humano y las otras regiones de anticuerpo derivadas de un anticuerpo humano. Sin embargo, en la presente invención, no se requiere necesariamente la distinción entre el anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado para que quede clara, y el anticuerpo puede estar en una forma que puede considerarse como tanto del anticuerpo quimérico como del anticuerpo humanizado. Un aspecto preferido del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que tiene CDRs derivadas de anticuerpos de roedores y las otras regiones del anticuerpo derivadas de un anticuerpo humano, de manera particularmente preferida un anticuerpo que tiene CDRs derivadas de un anticuerpo de ratón y las otras regiones del anticuerpo derivadas de un anticuerpo humano. La humanización se puede realizar mediante el uso de un método de injerto de CDR (Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001); y Tsurushita et al., *Methods* 36: 69-83 (2005)) y también se puede realizar por un método conocido en la técnica (véase, p. ej., Jones et al., *Nature*

321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); y Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988)), que implica reemplazar secuencias de CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado es típicamente un anticuerpo humano, algunos residuos de la CDR y, opcionalmente, algunos de cuyos residuos de FR están reemplazados por residuos derivados de los sitios análogos de un anticuerpo no humano.

Para reducir la antigenicidad, puede ser importante seleccionar el uso de regiones variables humanas, tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada en la preparación del anticuerpo humanizado. De acuerdo con un método de "mejor ajuste", la bibliografía completa de secuencias de FR humanas conocidas es rastreada en cuanto a la secuencia de regiones variables de un anticuerpo de roedor. Seguidamente, las secuencias humanas más similares a las secuencias de roedores son aceptadas como FRs humanos del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims et al., J. Immunol. 151: 2296-2308 (1993) y Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987). En otro método se utilizan marcos particulares derivados de secuencias comunes de todos los anticuerpos humanos en cuanto a subgrupos de cadena ligera o cadena pesada particulares. Los mismos marcos se pueden utilizar para algunos anticuerpos humanizados diferentes. Véase, por ejemplo, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Set USA 89: 4285-4289 (1992) y Presta et al., J. Immunol. 151: 2623-2632 (1993).

Además de ello, generalmente es deseable que el anticuerpo humanizado deba conservar una elevada afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas preferidas. Con el fin de lograr este objetivo, de acuerdo

con un método, el anticuerpo humanizado se prepara mediante la etapa de analizar secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y secuencias humanizadas. En general, se puede utilizar un modelo tridimensional de inmunoglobulinas y es conocido por los expertos en la técnica. Se puede utilizar un programa de ordenador que ilustre e indique conformaciones tridimensionales potenciales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. Estas indicaciones se pueden estudiar para analizar los posibles papeles de residuos en las funciones de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas, es decir, para analizar residuos que influyan en la capacidad de las inmunoglobulinas candidatas de unirse al antígeno. Por este método, residuos FR se pueden seleccionar de una secuencia receptora y una secuencia importadora y combinar con el fin de conseguir características deseables de los anticuerpos tales como afinidad por la unión potenciada para uno o más antígenos diana (p. ej., EphA4 o un fragmento de la misma).

Huelga decir que el anticuerpo de la presente invención incluye también un anticuerpo derivado del anticuerpo quimérico o del anticuerpo humanizado arriba ejemplificado mediante ingeniería apropiada (p. ej., la modificación del anticuerpo o la sustitución, adición y/o delección parcial de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo), de modo que el anticuerpo conserva sus funciones (o una función es impartida al anticuerpo o una función del anticuerpo es mejorada). Más específicamente, también está incluido en el alcance de la presente invención un anticuerpo que carece de lisina (Lys)

dispuesta en el extremo carboxi (extremo C) de la cadena pesada por un método artificial tal como ingeniería genética con el fin de reducir la heterogeneidad de anticuerpos producidos por células productoras de anticuerpos. También está incluido en el alcance de la presente invención un anticuerpo que tiene secuencias de aminoácidos modificadas en la región constante para modificar una función efectora del anticuerpo, tal como un anticuerpo en el que valina (Val) en la posición 234 del anticuerpo IgG₂ humano bajo la numeración Eu ha sido sustituido con alanina (Ala), y glicina (Gly) en la posición 237 ha sido sustituida con alanina (Ala), con el fin de reducir la actividad de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o de la fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP). Además, también está incluido en el alcance de la presente invención un anticuerpo biespecífico (Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97) que tiene, junto con una región de unión a anticuerpos que tiene secuencias de CDR del anticuerpo de la presente invención, una región de unión a antígenos que se une a otro antígeno.

Si se desea, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede estar modificado. La modificación del anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser una modificación que cambia (a) la estructura tridimensional de una secuencia de aminoácidos en una región de modificación tal como una conformación en lámina o hélice; (b) la carga eléctrica o el estado hidrofóbico de la molécula en un sitio diana; o (c) los efectos de una modificación en el mantenimiento del volumen

de la cadena lateral, o puede ser una modificación mediante la cual no se observen claramente estos cambios.

La modificación del anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede conseguir, por ejemplo, mediante la sustitución, delección y/o adición de uno o más residuos aminoácidos constituyentes.

En la presente memoria descriptiva, el aminoácido se utiliza en su sentido más amplio, e incluye no sólo aminoácidos naturales, por ejemplo serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro), sino también aminoácidos no naturales tales como variantes y derivados de aminoácidos. Naturalmente, los expertos en la técnica entienden, considerando esta amplia definición, que ejemplos de los aminoácidos en la presente memoria descriptiva incluye: L-aminoácidos; D-aminoácidos; aminoácidos químicamente modificados tales como variantes de aminoácidos y derivados de aminoácidos; aminoácidos tales como norleucina, β -alanina y ornitina, los cuales no sirven como materiales que constituyen proteínas *in vivo*; y compuestos sintetizados por vía química que tienen las características de aminoácidos generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de los aminoácidos no naturales incluyen ácidos α -metilamino (α -metilalanina, etc.), D-aminoácidos (ácido D-aspártico, ácido D-glutámico, etc.), aminoácidos similares a histidina (2-amino-histidina,

β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, etc.), aminoácidos que tiene un metileno extra en sus cadenas laterales ("homo" aminoácidos) y aminoácidos en los que un grupo ácido carboxílico funcional en la cadena lateral está reemplazado por un grupo ácido sulfónico (ácido cisteico, etc.).

Residuos de aminoácidos que se producen de forma natural se pueden clasificar, por ejemplo, en los siguientes grupos en base a las características generales de la cadena lateral:

- (1) residuos hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu e Ile;
- (2) residuos hidrofílicos neutros: Cys, Ser y Thr;
- (3) residuos de carácter ácido: Asp y Glu;
- (4) residuos de carácter básico: Asn, Gln, His, Lys y Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena; Gly y Pro; y
- (6) residuos aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

La sustitución no conservativa de una secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se puede realizar reemplazando un aminoácido que pertenece a uno de estos grupos por un aminoácido que pertenece a cualquiera de los otros grupos. Se pueden realizar sustituciones más conservativas reemplazando un aminoácido que pertenece a uno de estos grupos por otro aminoácido que pertenece al mismo grupo allí. De igual manera, la delección o sustitución en una secuencia de aminoácidos se puede realizar de forma apropiada.

La modificación de aminoácido(s) que constituye(n) el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo

puede ser, por ejemplo, una modificación post-traduccion tal como glicosilación con un azúcar, acetilación o fosforilación. El anticuerpo puede estar glicosilado en una posición conservada en su región constante. La glicosilación del anticuerpo es habitualmente del tipo enlazada a N o enlazado a O. La glicosilación enlazada a N significa la unión de un resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína (en donde X es cualquier aminoácido distinto de prolina) son secuencias de reconocimiento para añadir enzimáticamente un resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Cualquiera de estas secuencias de tripéptidos están presentes en el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de modo que está presente un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O puede ser la unión de N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido (p. ej., serina o treonina), o puede ser la unión del mismo a 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina en algunos casos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente las condiciones de glicosilación (en el caso de realizar la glicosilación utilizando un enfoque biológico, por ejemplo, células huéspedes y el tipo y pH de un medio celular) de acuerdo con el fin.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede modificar adicionalmente utilizando otros métodos de modificación solos o en combinación sobre la base del sentido común técnico generalmente conocido por los expertos en la técnica.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede producir por un método bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un hibridoma que produce el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede utilizar para producir un anticuerpo, o un gen que codifica el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede integrar en un vector de expresión, que luego se puede transferir a células de *E. coli*, células COS de mono, células del ovario de hámster chino (CHO) o similares para producir un anticuerpo. El gen que codifica el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención tiene preferiblemente ADN que codifica una secuencia señal, y más preferiblemente tiene ADN que codifica una secuencia señal en cada uno de los extremos 5' de ADN que codifica la región variable de la cadena pesada y ADN que codifica la región variable de la cadena ligera. La secuencia señal es residuos aminoácidos situados en el extremo N de una proteína, que se requieren para que una proteína secretora o una proteína de la membrana integral atraviesen la bicapa de lípidos después de haber sido sintetizadas en el ribosoma. La secuencia señal de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada, siempre que la secuencia tenga esta función. Ejemplos de la secuencia señal que puede estar contenida en el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención incluyen secuencias señal derivadas de un ser humano, un ratón, una rata, un conejo, un burro, una cabra, un caballo, un pollo, un gato, una levadura, y similares.

En aspecto de la secuencia señal incluye un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 55 como la secuencia señal para la cadena pesada y un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 58 como la secuencia señal para la cadena ligera. La secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10, la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55, la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 12 o la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58 puede tener la sustitución, adición y/o delección de uno o más (p. ej., 2, 3, 4 o 5) aminoácidos, siempre que la secuencia resultante sea funcionalmente equivalente a la misma.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede aislar o purificar de acuerdo con un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. En este contexto, el término "aislado" o "purificado" significa que está artificialmente aislado o purificado a partir de un estado natural. Cuando una molécula o composición que se produce de forma natural se altera o retira de su entorno original, o ambos, la molécula o la composición está "aislada" o "purificada". Ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen enfoques electroforéticos, de biología molecular, inmunológicos y cromatográficos e incluyen específicamente, pero no se limitan a cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía HPLC de fase inversa y electroforesis de enfoque isoeléctrico.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene las siguientes CDRs:

5 (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 27;

(b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 29;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;

10 (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32; y

15 (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 33.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo humanizado.

20 En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene las siguientes CDRs:

25 (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 26;

(b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;

30 (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 33.

5 En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene las siguientes CDRs:

(a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 27;

10 (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;

15 (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 33.

20 En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, una región variable de la cadena pesada
25 comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia por la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos, y una región variable de la cadena ligera
30 comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia por la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde una región variable de la

5 cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia por la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos, y una región variable de la cadena ligera comprende la

10 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, 80, 82 u 84, o una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia mediante la sustitución, adición y/o delección de uno o más aminoácidos.

En este contexto, la expresión "una o más", utilizada

15 con respecto a la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera en el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención, no está limitada, siempre que conserve afinidad de unión por EphA4 e inhiba la unión entre EphA4 y

20 efrina. La expresión "o más" es 2 a 15, más preferiblemente 2 a 10, por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2, o está dentro del 10%, por ejemplo, dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6%, dentro del 5%, dentro del 4%, dentro

25 del 3%, dentro del 2% o dentro del 1% del número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de

30 la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 11, y

la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 13.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, 68, 70, 72, 74 o 76, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, 80, 82 u 84.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y

dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y

5 dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y

10 dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde

15

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, o

20

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, o

25

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, o

30

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, o

5 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

10 En una realización preferida alternativa de la presente invención, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde

15 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, o

20 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, o

25 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, o

30 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, o

 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y

dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y

5 dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

En una realización preferida alternativa de la presente invención, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66, y

dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84.

5 En una realización específica de la presente invención, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene una región constante de IgG₂ humana. Preferiblemente, dicha región constante de IgG₂ humana tiene al menos una mutación de aminoácidos seleccionada de
10 C131S, C219S, V234A y G237A (numeración Eu). En una realización, dicha región constante de IgG₂ humana tiene una combinación de mutaciones de aminoácidos C131S y C219S. En una realización, dicha región constante de IgG₂ humana tiene una combinación de mutaciones de aminoácidos V234A y
15 G237A. En otra realización, dicha región constante de IgG₂ humana tiene todas las mutaciones de aminoácidos de C131S, C219S, V234A y G237A. En una realización alternativa adicional, dicha región constante de IgG₂ humana no tiene un residuo lisina en el extremo C.

20 En una realización preferida de la presente invención, la región constante de IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62.

 En una realización específica de la presente invención,
25 un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene una región constante de IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana. Preferiblemente, en dicha región constante de IgG humana, CH1 y una región bisagra son IgG₁ humana, y CH2 y CH3 son
30 IgG₂ humana. En una realización, dicha región constante de IgG humana tiene una mutación de aminoácidos V234A o G237A (numeración Eu). En otro aspecto, dicha región constante de

IgG humana tiene mutaciones de aminoácidos V234A y G237A. En un aspecto alternativo adicional, dicha región constante de IgG humana no tiene un residuo lisina en el extremo C.

En una realización preferida de la presente invención,
5 la región constante de IgG humana, que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana, comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 60.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-
10 EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede comprender, además, un
15 soporte, excipiente y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable en forma de una preparación acuosa o seca. Ejemplos del soporte, excipiente y/o estabilizador aceptable incluyen: solución salina fisiológica; soluciones tampón de fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de
20 bajo peso molecular; proteínas (p. ej., albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulinas); polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa y dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcar-alcoholes tales como manitol y sorbitol; contraiones
25 formadores de sales tales como sodio; y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN (marca registrada), PLURONICS (marca registrada) y PEG.
30

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del

mismo de la presente invención puede estar encerrada, por ejemplo, en una microcápsula, un sistema de suministro de fármaco coloidal (p. ej., un liposoma, una microesfera de albúmina, una microemulsión, una nanopartícula o una nanocápsula) o una microemulsión. Cuando se desea la administración de liberación retardada del anticuerpo para una preparación que tenga propiedades de liberación adecuadas para cualquier enfermedad que necesite la administración del anticuerpo, el anticuerpo puede estar destinado a ser microencapsulado. Ejemplos de la matriz de liberación retardada incluyen poliéster, hidrogeles (p. ej., poli(2-hidroxietil-metacrilato) y poli(alcohol vinílico)), ácidos polilácticos, copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables (microesferas para inyección constituidas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) tal como LUPRON DEPOT (marca registrada) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

En un aspecto, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo puede inhibir la unión entre EphA4 y su ligando. Por lo tanto, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de la ELA. Específicamente, un aspecto alternativo de la presente invención abarca un método para tratar la ELA, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéutica eficaz del anticuerpo anti-EphA4 o del fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención a un sujeto. Un aspecto alternativo de la presente invención abarca el uso

del anticuerpo anti-EphA4 o del fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención para producir un fármaco terapéutico para la ELA. Un aspecto alternativo de la presente invención abarca el uso del anticuerpo anti-EphA4 o del fragmento de unión a EphA4 del mismo para uso en un método para tratar la ELA.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede utilizar solo o en combinación con un fármaco o composición adicional en el método de tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes con un fármaco adicional. Una terapia de combinación de este tipo incluye la administración combinada (dos o más fármacos están contenidos en la misma preparación o en preparaciones separadas) y la administración separada (p. ej., concurrente o continua). En el caso de administrar por separado dos o más fármacos, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede administrar antes o después del método de tratamiento concomitante.

El sujeto a administrar la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención no está limitado, y la composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar, por ejemplo, para un ser humano o un mamífero no humano (un mono, un ratón, una rata, un conejo, ganado vacuno, un caballo, una cabra, etc.).

El método para administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el

fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención (vía de administración, dosis, número de dosis al día, programa de administración, etc.) no está limitado y se puede determinar apropiadamente por parte de los
5 expertos en la técnica (p. ej., un médico) de acuerdo con el estado de salud del sujeto, la gravedad de la enfermedad, el tipo de fármaco a utilizar en combinación con ello, etc.

Los expertos en la técnica deben entender que la presente invención puede llevarse a cabo por uno cualquiera
10 o una combinación apropiada de dos o más de todos los aspectos descritos en la presente memoria descriptiva, a menos que surja una contradicción técnica. Además, los expertos en la técnica deben entender que la presente invención puede llevarse a cabo preferiblemente por una
15 combinación apropiada de todos los aspectos preferibles o ventajosos descritos en la presente memoria descriptiva, a menos que surja una contradicción técnica.

Las bibliografía citadas en la presente memoria descriptiva deben interpretarse como claramente
20 incorporadas en esta memoria como referencia en su totalidad. Los expertos en la técnica pueden entender contenidos relacionados descritos en esta bibliografía por referencia como una parte de la presente memoria
25 descriptiva sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención de acuerdo con el contexto de la presente memoria descriptiva.

La bibliografía citada en la presente memoria descriptiva se proporciona meramente con el fin de
30 describir técnicas relacionadas antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Debe entenderse que los autores de la presente invención admiten no tener

derecho que preceda a dicha divulgación debido a invenciones anteriores o cualesquiera otras razones. Todas las declaraciones de esta bibliografía se basan en información que ha estado a disposición de la presente solicitante, y no existe reconocimiento de que el contenido de estas declaraciones sea exacto.

Los términos en la presente memoria descriptiva se utilizan para ilustrar realizaciones particulares y no pretenden limitar la invención.

El término "comprenden", utilizado en la presente memoria descriptiva, significa que están presentes los elementos descritos (miembros, etapas, factores, números, etc.) y que no se excluye de la misma la presencia de los otros elementos (miembros, etapas, factores, números, etc.), a menos que el contexto requiera evidentemente una interpretación diferente. La expresión "consiste en" abarca aspectos descritos por las expresiones "consiste en" y/o "consiste esencialmente en".

La expresión "actividad neutralizante", utilizada en la presente memoria descriptiva, significa la actividad de inhibir la unión entre EphA4 y su ligando y/o la actividad de inhibir la transducción de señales o el cambio de la respuesta o funcional de la expresión molecular de células, inducido por la unión entre EphA4 y su ligando en el cuerpo vivo de un ser humano.

Todos los términos (incluyendo términos técnicos y términos científicos) utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que los que se entienden en un sentido amplio por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención, a menos que se defina de otro modo. Los términos utilizados en esta memoria deben interpretarse

como que tienen significados consistentes con los significados en la presente memoria descriptiva y campos técnicos relacionados, y no deben interpretarse en un sentido idealizado o excesivamente formal, a menos que se defina de otro modo.

Términos tales como "primero" o "segundo" se utilizan para expresar diversos factores. Sin embargo, se entiende que estos factores no están limitados por estos términos por sí mismos. Estos términos se utilizan meramente para diferenciar un factor de los otros factores. Por ejemplo, el primer factor se puede describir como el segundo factor, y viceversa, sin apartarse del alcance de la presente invención.

En la presente memoria descriptiva debe entenderse que los valores numéricos utilizados para indicar contenidos de componentes, intervalos numéricos, etc., están modificados con el término "aproximadamente", a menos que se especifique de otro modo. Por ejemplo, "4°C" se interpreta como que significa "aproximadamente 4°C", a menos que se especifique de otro modo. Naturalmente, los expertos en la técnica pueden entender la medida del mismo racionalmente de acuerdo con el sentido común técnico y el contexto de la presente memoria descriptiva.

Debe entenderse que cada uno de los aspectos indicados en una forma en singular utilizados en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones puede estar en una forma en plural, y viceversa, a menos que el contexto requiera evidentemente una interpretación diferente y a menos que surja una contradicción técnica.

En lo que sigue en esta memoria, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia los Ejemplos.

Sin embargo, la presente invención puede ser materializada mediante diversos aspectos y no se pretende que esté limitada por Ejemplos descritos en esta memoria. Los expertos en la técnica en el campo relacionado pueden
5 implementar la presente invención mediante diversas modificaciones, adiciones, deleciones, sustituciones, etc., sin alterar el espíritu o alcance de la presente invención.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo monoclonal EphA4 anti-ratón

Preparación de anticuerpo monoclonal EphA4 de ratón anti-ratón

Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal que se une a EphA4 de ratón (N° Acceso GenBank NP_031962.2, SEQ ID
15 NO: 1), una proteína de una región extracelular de EphA4 de ratón (posiciones 20 a 547) (SEQ ID NO: 2) condensada con fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y etiqueta de histidina (a la que se alude en los que sigue en esta memoria "proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-
20 His", SEQ ID NO: 43) se preparó mediante las siguientes etapas.

Primero, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal (SEQ ID NO: 42) y la región extracelular
25 (SEQ ID NO: 2) de EphA4 de ratón se amplificó mediante RT-PCR utilizando ARN total derivado de cerebro de ratón y se clonó en el sitio SalI/NotI de un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica SEAP y la etiqueta de histidina. A
30 continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA4, SEAP y etiqueta de histidina se transfirió a un vector pCDNA3.1_rfcB a través

de reacción LR utilizando el Sistema Gateway (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector de expresión pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His. Células HEK293EBNA (Invitrogen/Life Technologies) fueron transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His construido utilizando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 6 días, se recuperó el sobrenadante del cultivo. A partir del sobrenadante del cultivo recuperado, la proteína región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His (SEQ ID NO: 43) se purificó utilizando la columna Protino (MACHEREY-NAGEL).

20 µg de la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His se mezclaron con la misma cantidad de adyuvante TiterMax Gold (TiterMax USA) o adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik), y la mezcla se inyectó por vía subcutánea en la almohadilla plantar de un ratón Balb/c. Después, los días 3, 7 y 10, la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His se administró de la misma manera que arriba. En esta operación, el adyuvante TiterMax Gold (TiterMax USA) se utilizó sólo para el día 10 y el adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik) se utilizó para los días 3, 7 y 10. El día 13 se sacrificó al ratón y se recuperó el nódulo linfático periférico para preparar células del nódulo linfático. Las células del nódulo linfático preparadas y las células mieloma P3U1 (amablemente proporcionadas por la Universidad de Kyoto) se condensaron a una relación de 5:1 en presencia de GenomONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha). Las células condensadas se cultivaron en una placa de plástico de 96 pocillos. Después de incubación

(5% de CO₂, 37°C) durante 7 días, se recuperó el sobrenadante del cultivo.

5 El sobrenadante del cultivo obtenido se utilizó para recoger un pocillo que tiene reactividad con EphA4 de ratón, rata y humana y actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 de ratón y Efrina A1 de ratón.

10 La reactividad con EphA4 de ratón, rata y humana se evaluó mediante ELISA utilizando una proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, la región extracelular (posiciones 20 a 547) de EphA4 de rata (N° Acceso GenBank NP_001155883.1) o la región extracelular (posiciones 20 a 547) (SEQ ID NO: 4) de EphA4 humana (N° Acceso GenBank NP_004429.1, SEQ ID NO: 3) condensada con una región Fc de IgG1 humana y etiqueta de histidina (a la que se alude en 15 lo que sigue en esta memoria como "proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-Fc-His", "proteína de la región extracelular de EphA4 de rata-Fc-His" o "proteína de la región extracelular de EphA4 humana-Fc-His", respectivamente).

20 La proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana-Fc-His se preparó mediante las siguientes etapas. Primero se construyó un vector de expresión pCDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana-Fc-His. Primero, una secuencia de ADN que 25 codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana se amplificó mediante RT-PCR utilizando ARN total derivado de cerebro de ratón, rata o humana y se clonó en el sitio SalI/NotI de un vector 30 pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica Fc y la etiqueta de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la

secuencia señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, rata y humana, Fc y etiqueta de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_rfcB a través de reacción LR utilizando el Sistema Gateway (Invitrogen/Life Technologies) para
5 construir un vector de expresión pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana-Fc-His. Células HEK293EBNA (Invitrogen/Life Technologies) fueron transfectadas con cada uno de los vectores de expresión utilizando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5%
10 de CO₂, 37°C) durante 6 días, se recuperó cada uno de los sobrenadantes del cultivo.

ELISA utilizando la proteína región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana-Fc-His se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. Cada uno de los pocillos de una
15 placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo IgG anti-humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1 x de BlockAce (Sumitomo Dainippon Pharma) a la temperatura ambiente durante 1 hora.
20 Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.02% (Nacalai Tesque) durante tres veces, se añadió la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana-Fc-His (concentración final: 1 nM) a cada uno de los pocillos y se
25 incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada uno de los pocillos el sobrenadante del cultivo de las células condensadas. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y del subsiguiente lavado durante tres veces, se añadió a
30 ello un anticuerpo IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se

incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos. A cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H_2SO_4 , 2N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer).

La actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 de ratón y Efrina A1 de ratón se evaluó de acuerdo con las siguientes etapas. Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Seradyn). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1 × de BlockAce (Sumitomo Dainippon Pharma) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.02% (Nacalai Tesque) durante tres veces, se añadió la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His (concentración final: 10 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a cada uno de los pocillos quimera de Efrina A1-Fc (R&D Systems, concentración final: 20 nM) y sobrenadante del cultivo de las células condensadas. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y del subsiguiente lavado durante tres veces, se añadió a ello un anticuerpo IgG anti-humana marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-

tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos. A cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H_2SO_4 , 2N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Del pocillo recogido a través de estas etapas se clonó un hibridoma mediante el método de dilución limitante. Finalmente, se obtuvo un clon de hibridoma que expresa un anticuerpo anti-EphA4 de ratón que tiene actividad de reacción contra EphA4 de ratón, rata y humana y que tiene actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 de ratón y Efrina A1 de ratón.

El clon de hibridoma obtenido se cultivó y el anticuerpo anti-EphA4 (anticuerpo A) se purificó a partir del sobrenadante del cultivo utilizando proteína A (GE Healthcare). El isotipo del anticuerpo A se determinó utilizando un kit que isotipa anticuerpos monoclonales (Serotec) y era IgG1 para la cadena pesada y κ para la cadena ligera.

Análisis de la secuencia del anticuerpo A

Secuencias de ADN que codifican las secuencias señal de la cadena pesada y la cadena ligera y regiones variables de anticuerpo A se amplificaron mediante 5'-RACE (5'-amplificación rápida de extremos de ADNc). El ARN total se preparó a partir del hibridoma utilizando TRIZOL (Invitrogen/Life Technologies) y se trató con ADNasa (Qiagen N.V., set de ADNasa libre de ARNasa). ADNc de doble cadena se preparó a partir del ARN total, utilizando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA). 5' adaptador obtenido por la reasociación de oligo ADN ad29S (ACATCACTCCGT) (SEQ ID NO:

5) y oligo ADN ad29AS

(ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT) (SEQ

ID NO: 6) se añadió al ADNc. El ADNc obtenido se amplificó

utilizando cebador directo 5' (cebador 5'-PCR4,

5 AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG) (SEQ ID NO: 7) y el cebador 3'

inverso (GCCAGTGGATAGACTGATGG (SEQ ID NO: 8) se utilizó

para la amplificación del gen de la cadena pesada de IgG de

ratón y GATGGATACAGTTGGTGCAGC (SEQ ID NO: 9) se utilizó

para la amplificación del gen de la cadena ligera de Igκ de

10 ratón). El ADNc amplificado se insertó en un vector pCR2.1

(Invitrogen/Life Technologies). La secuencia del gen del

anticuerpo A se analizó utilizando ABI3130XL. En cuanto a

la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del

gen de anticuerpo A identificado mediante este análisis, la

15 secuencia señal de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO:

10; la región variable de la cadena pesada se muestra en

SEQ ID NO: 11; la secuencia señal de la cadena ligera se

muestra en SEQ ID NO: 12; y la región variable de la cadena

ligera se muestra en SEQ ID NO: 13. En cuanto a la

20 secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del gen

de anticuerpo A, la secuencia señal de la cadena pesada se

muestra en SEQ ID NO: 14, la región variable de la cadena

pesada se muestra en SEQ ID NO: 15; la secuencia señal de

25 la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 16; y la región

variable de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 17.

Las secuencias de longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo A se obtuvieron

mediante las siguientes etapas. El ARN total se preparó a

30 partir del hibridoma utilizando TRIZOL (Invitrogen/Life

Technologies) y se trató con ADNasa (Qiagen N.V., set de

ADNasa libre de ARNasa). ADNc se preparó a partir del ARN

total utilizando el kit de síntesis de ADNc (TAKARA). El ADNc obtenido se utilizó como un molde en la PCR para amplificar las secuencias de genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo A utilizando cebador directo 5' (GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGCGTGTGGACCTTGC (SEQ ID NO: 18) se utilizó para la amplificación del gen de la cadena pesada y GCGAAGCTTGCCGCCACCATGAGTGTGCCCACTCAGGTCC (SEQ ID NO: 19) se utilizó para la amplificación del gen de la cadena ligera y cebador inverso 3' (GCGGAATTCATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC (SEQ ID NO: 20) se utilizó para la amplificación del gen de la cadena pesada y CGCGAATTCATAAATACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC (SEQ ID NO: 21) se utilizó para la amplificación del gen de la cadena ligera). Los productos de la amplificación se clonaron en vectores pEE6.4 y pEE12.4 (Lonza), respectivamente. Estas secuencias de genes se analizaron utilizando ABI3130XL. En cuanto a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del gen de anticuerpo A identificado mediante este análisis, la región constante de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 22, y la región constante de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 23. En cuanto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del gen de anticuerpo A, la región constante de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 24, y la región constante de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 25.

Las CDRs de anticuerpo A se determinaron numerando la secuencia de aminoácidos de anticuerpo A utilizando el software Abysis (UCL) de acuerdo con el sistema de numeración Kabat e identificando las CDRs de acuerdo con la definición de Kabat o el método de definición AbM sobre la

base de los números. Las secuencias de aminoácidos de la CDR y las secuencias de nucleótidos de anticuerpo A se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

[Tabla 1]

5

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de CDRs de anticuerpo A

Nombre	Secuencia
CDR 1 cadena pesada (definición Kabat)	DYSMH (SEQ ID NO: 26)
CDR 1 cadena pesada (definición AbM)	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 27)
CDR 2 cadena pesada (definición Kabat)	WINTETGEPTYADDFKG (SEQ ID NO: 28)
CDR 2 cadena pesada (definición AbM)	WINTETGEPT (SEQ ID NO: 29)
CDR 3 cadena pesada	IPLYYYGSRYWYFDV (SEQ ID NO: 30)
CDR 1 cadena ligera	RASENIYRNLA (SEQ ID NO: 31)
CDR 2 cadena ligera	AATNLAD (SEQ ID NO: 32)
CDR 3 cadena ligera	QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 33)

10

15

[Tabla 2]

20

25

30

Tabla 2 Secuencias de ácidos nucleicos de CDRs de anticuerpo A

Nombre	Secuencia
CDR1 cadena pesada (definición Kabat)	GACTATTCAATGCAC (SEQ ID NO: 34)
CDR1 cadena pesada (definición AbM)	GGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCAC (SEQ ID NO: 35)
CDR2 cadena pesada (definición Kabat)	TGGATAAACACTGAGACTGGTGAGCCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGA (SEQ ID NO: 36)
CDR2 cadena pesada (definición AbM)	TGGATAAACACTGAGACTGGTGAGCCAACA (SEQ ID NO: 37)
CDR3 cadena pesada	ATTCCCCTCTATTACTACGGTAGTAGGTACTGGTACTTCGATGTC (SEQ ID NO: 38)
CDR1 cadena ligera	CGAGCAAGTGAGAATATTACAGAAATTAGCA (SEQ ID NO: 39)
CDR2 cadena ligera	GCTGCAACAACTTAGCAGAT (SEQ ID NO: 40)
CDR3 cadena ligera	CAACATTTTGGGGTACTCCGTGGACG (SEQ ID NO: 41)

Ejemplo 2: Afinidad de unión de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 para EphA4 de ratón y humana

La afinidad de unión de anticuerpo A obtenida en el Ejemplo 1 para EphA4 de ratón y humana se determinó mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) utilizando Biacore A100 (GE Healthcare). Primero, un anticuerpo IgG₁ anti-ratón de rata, producido con un procedimiento convencional al inmunizar ratas con un anticuerpo IgG₁ de ratón se inmovilizó en el chip sensor de CM5. La inmovilización del anticuerpo IgG₁ anti-ratón de rata en el chip sensor de CM5 se realizó mediante el método de acoplamiento de aminos utilizando N-hidroxisuccinimida (NHS) e hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se utilizó etanolamina para el bloqueo (el chip sensor y los reactivos para la inmovilización se fabricaron todos por GE Healthcare). El anticuerpo se diluyó con una solución

tampón para la inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 4.5) en 1 a 2 $\mu\text{g/mL}$ y se inmovilizó en el chip sensor de acuerdo con el protocolo unido a Biacore A100. Anticuerpo A se diluyó con una solución de tampón de desarrollo HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), se inyectó en una celda de flujo durante 120 segundos y se capturó (cantidad del anticuerpo capturado: aproximadamente 70 a 100 RU). Subsiguientemente, región extracelular de EphA4 de ratón o humana-SEAP-His diluida en serie en el intervalo de 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 y 0 nM utilizando HBS-EP se añadió al chip sensor durante 120 segundos. Curvas de la reacción de unión se observaron secuencialmente en el momento de la adición (fase de asociación, durante 120 s) y después de la compleción de la adición (fase de disociación, durante 900 s). Después de la compleción de cada una de las observaciones, el chip sensor se regeneró mediante la adición de MgCl_2 3 M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (durante 30 s). Las curvas de la reacción de unión obtenidas se sometieron a un análisis de ajuste con modelos de unión 1:1 utilizando la evaluación del software BIA unido al sistema para calcular la afinidad de unión ($K_D = k_d / k_a$) para EphA4 de ratón y humana.

La afinidad de unión (K_D) de anticuerpo A para EphA4 de ratón y humana era 7.29×10^{-10} M y 6.61×10^{-10} M, respectivamente (FIG. 1). Otros parámetros de unión para EphA4 de ratón y humana eran casi equivalentes. Por consiguiente, se considera que el anticuerpo A tiene una afinidad de unión equivalente para EphA4 de ratón y humana.

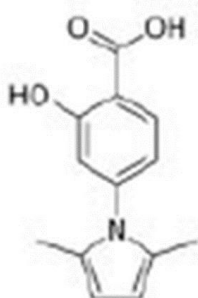
Ejemplo 3: Actividad inhibidora de la unión EphA4 de ratón-ligando de ratón de anticuerpo monoclonal anti-EphA4

Anticuerpo A obtenido en el Ejemplo 1 se evaluó en cuanto a actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 de ratón y su ligando de ratón de acuerdo con las siguientes etapas. Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1% de BlockAce (DS Pharma Biomedical) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Thermo Fisher Scientific) durante tres veces, se añadió la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His obtenida por el método del Ejemplo 1 (concentración final: 10 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a cada uno de los pocillos ligandos y anticuerpo A diluido en serie (0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 nM) o un inhibidor de EphA4 conocido péptido KYL (KYLPHYWPVLSSL, 0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 µM, su síntesis se externalizó a Hokkaido System Science) o compuesto 1 (0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 µM, Fórmula 1, Matrix Scientific). Los ligandos utilizados eran quimera de Efrina A1-Fc de ratón (R&D Systems, concentración final: 20 nM) y quimera de Efrina B2-Fc de ratón (R&D Systems, concentración final: 0.6 nM). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y del subsiguiente lavado durante tres veces, se añadió a ello un anticuerpo IgG anti-humana marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres

veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A cada uno de los pocillos se añadió una cantidad
5 igual de una disolución de parada de la reacción (H_2SO_4 , 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices).

Fórmula 1

[Fórmula 1]



Anticuerpo A suprimió la unión entre EphA4 de ratón y su ligando de ratón de una manera dependiente de la
20 concentración, con valores CI_{50} de aproximadamente 1.2 y 1.2 nM para la unión a Efrina A1 y Efrina B2 de ratón, respectivamente. Los valores CI_{50} del inhibidor de EphA4 péptido KYL existente eran de aproximadamente 1.3 y 1.3 μM
25 para la unión a Efrina A1 y Efrina B2 de ratón, respectivamente (FIG. 2). El Compuesto 1 tenía una actividad más débil y no se encontró dependencia de la concentración alguna. Por consiguiente, se encontró que anticuerpo A inhibe la unión entre EphA4 de ratón y ligando
30 de ratón, siendo la actividad 1,000 o más veces más intensa que la del inhibidor de EphA4 péptido KYL existente.

Ejemplo 4: Actividad inhibidora de la unión EphA4 humana-ligando humano de anticuerpo monoclonal anti-EphA4

Anticuerpo A obtenido en el Ejemplo 1 se evaluó en cuanto a su actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 humana y su ligando humano de acuerdo con las siguientes etapas. Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1% de BlockAce (DS Pharma Biomedical) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Thermo Fisher Scientific) durante tres veces, se añadió la proteína de la región extracelular de EphA4 humana-SEAP-His obtenida por el método del Ejemplo 1 (concentración final: 10 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a cada uno de los pocillos ligandos y anticuerpo A diluido en serie (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM) o un inhibidor de EphA4 péptido KYL (KYLPYWPVLSSL, 0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 μ M, su síntesis se externalizó a Toray Research Center). Los ligandos utilizados eran quimera de Efrina A5-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final: 0.7 nM) y quimera de Efrina B3-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final: 2.3 nM). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y del subsiguiente lavado durante tres veces, se añadió a ello estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres

veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A cada uno de los pocillos se añadió una cantidad
5 igual de una disolución de parada de la reacción (H_2SO_4 , 1 N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

Anticuerpo A suprimió la unión entre EphA4 humana y su
10 ligando humano de una manera dependiente de la concentración, con valores CI_{50} de aproximadamente 2.7 y 1.9 nM para la unión a Efrina A5 y Efrina B3 humana, respectivamente. Los valores CI_{50} del inhibidor de EphA4 péptido KYL eran de aproximadamente 6.1 y 1.6 μM para la
15 unión a Efrina A5 y Efrina B3 humana, respectivamente (FIG. 3). Por consiguiente, se encontró que anticuerpo A inhibe intensamente la unión entre EphA4 humana y su ligando humano.

Ejemplo 5: Afinidad de unión de fragmento de unión a
20 EphA4 para EphA4 de ratón y humana

Primero se prepararon como fragmentos de unión a EphA4 un fragmento Fab y un fragmento F(ab')_2 de anticuerpo A (al que se alude a continuación en esta memoria como anticuerpo
25 A-Fab y anticuerpo A- F(ab')_2 , respectivamente).

La preparación de anticuerpo A-Fab se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. En un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) se mezclaron anticuerpo A (4.36 mg/mL, 1 mL), L-cisteína 10 mM (Wako Pure Chemical Industries), EDTA 1 mM
30 (Gibco) y 2.18 $\mu\text{g/mL}$ de papaína (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Se añadió yodoacetamida

(Wako Pure Chemical Industries) a una concentración final de 50 mM al tubo después de la incubación. Después de terminada la reacción, la solución de anticuerpo se dializó frente a PBS (Sigma-Aldrich). A la solución de anticuerpo se añadió una cantidad igual de Tris (Sigma-Aldrich)-HCl 0.1 M/NaCl 5 M (pH 8.0, Wako Pure Chemical Industries), seguido de purificación utilizando resina rProtein A FF. Un tubo de 2 mL se llenó con 800 µL de rProtein A FF, que luego se equilibró mediante la adición de 3.5. C.V. cada uno de agua ultra-pura y un tampón de unión (Tris (Sigma-Aldrich)-HCl 0.1 M/NaCl 3 M (pH 8.0, Wako Pure Chemical Industries)) en este orden. La solución de anticuerpo complementada con una cantidad igual de (Tris (Sigma-Aldrich)-HCl 0.1 M/NaCl 5 M (Wako Pure Chemical Industries) (pH 8.0) se inyectó a la columna. Se recuperó una solución eluida de la columna (fracción no retenida) y se añadió de nuevo a la columna. Esta operación se repitió tres veces. Después se recuperó la fracción no retenida de la operación final. El lavado se repitió dos veces mediante la adición de 2.5 mL de un tampón de unión. Las fracciones no retenida y de lavado se dializaron frente a PBS para obtener anticuerpo A-Fab.

La preparación de anticuerpo A-F(ab')₂ se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. Anticuerpo A se dializó frente a tampón acetato 0.2 M (pH 4.0, Wako Pure Chemical Industries) durante la noche a 4°C. La solución dializada se recuperó y filtró a través de un filtro de 0.22-µm (Merck Millipore), y luego se cuantificó, y la concentración de anticuerpo se ajustó a 4.0 mg/mL. Pepsina (Sigma-Aldrich) se llevó de nuevo a temperatura ambiente y

se ajustó a 2.0 mg/mL utilizando un tampón acetato 0.2 M (pH 4.0, Wako Pure Chemical Industries). En un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) anticuerpo A (4.0 mg/mL, 800 μ L), la solución de pepsina (2.0 mg/mL, 16 μ L) y un tampón acetato 0.2 M (pH 4.0, Wako Pure Chemical Industries) se mezclaron a razón de 64 μ L/tubo y se incubaron a 37°C durante 15 horas. La reacción se terminó mediante la adición al tubo de base Tris 2 M (Sigma-Aldrich) a razón de 112 μ L/tubo después de la incubación. Después, las especies moleculares se confirmaron mediante SDS-PAGE. Después de terminada la reacción, la solución de anticuerpo se dializó frente a Tris-HCl 100 mM (pH 8.0). Subsiguientemente, anticuerpo A-F(ab')₂ se purificó utilizando rProtein A FF (GE Healthcare, 17-1279-02). Un tubo de 5 mL se llenó con 1 mL de resina rProtein A, que luego se equilibró mediante la adición de 3.5. C.V. cada uno de agua ultra-pura y un tampón de unión en este orden. La solución de anticuerpo dializada equilibrada mediante la adición de una cantidad igual de Tris (Sigma-Aldrich)-HCl 0.1 M/NaCl 5 M (pH 8.0, Wako Pure Chemical Industries) se inyectó a la columna. Se recuperó una fracción no retenida y se añadió de nuevo a la columna. Esta operación se repitió tres veces. Después se recuperó la fracción no retenida de la operación final. Después, el lavado se repitió dos veces mediante la adición de 5 mL de un tampón de unión. Con el fin de separar IgG que no había reaccionado, etc., la elución se realizó con citrato 0.1 M (pH 3.0, Wako Pure Chemical Industries). Después, las especies moleculares se confirmaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones no retenida y de lavado se dializaron frente a PBS para obtener anticuerpo A-F(ab')₂.

A continuación, la afinidad de unión de anticuerpo A-Fab y anticuerpo A-F(ab')₂ para EphA4 de ratón y humana se determinó mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) utilizando Biacore T200 (GE Healthcare). Anticuerpo A
5 obtenido en el Ejemplo 1 se utilizó como un control para la comparación de cada uno de los fragmentos. Primero, un anticuerpo anti-etiqueta His se inmovilizó sobre el chip sensor de CM5. La inmovilización del anticuerpo anti-etiqueta His en el chip sensor de CM5 se realizó mediante
10 el método de acoplamiento de aminas utilizando N-hidroxisuccinimida (NHS) e hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se utilizó etanolamina para el bloqueo (el chip sensor y los reactivos para la inmovilización se fabricaron todos por GE
15 Healthcare). El anticuerpo se diluyó con una solución tampón para la inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 4.5) en 3 µg/mL y se inmovilizó en el chip sensor de acuerdo con el protocolo unido a Biacore T200.

Proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón o
20 humana-SEAP-His se diluyó con una solución de tampón de desarrollo HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), se inyectó en una celda de flujo durante 120 segundos y se capturó (cantidad de la proteína capturada: aproximadamente 10 a 20
25 RU). Subsiguientemente, anticuerpo A (50, 16.7, 5.6, 1.9, 0.6 y 0 nM), anticuerpo A-Fab (500, 166.7, 55.6, 18.5, 6.2 y 0 nM) o anticuerpo A-F(ab')₂ (50, 16.7, 5.6, 1.9, 0.6 y 0 nM), diluido en serie utilizando HBS-EP, se añadió al chip sensor durante 120 segundos. Curvas de la reacción de unión
30 se observaron secuencialmente en el momento de la adición (fase de asociación, durante 120 s) y después de la compleción de la adición (fase de disociación, durante 900

s). Después de la compleción de cada una de las observaciones, el chip sensor se regeneró mediante la adición de MgCl_2 3 M (Wako Pure Chemical Industries) (durante 30 s). Las curvas de la reacción de unión obtenidas se sometieron a un análisis de ajuste con modelos de unión 1:1 utilizando la evaluación del software BIA unido al sistema para calcular la afinidad de unión ($KD = k_d / k_a$) para EphA4 de ratón y humana.

La afinidad de unión (KD) de anticuerpo A-Fab para EphA4 de ratón y humana era 4.51×10^{-8} M y 4.04×10^{-8} M, respectivamente (FIGs. 4A y 4C). Por otra parte, la afinidad de unión (KD) de anticuerpo A-F(ab')₂ para EphA4 de ratón y humana era 2.29×10^{-11} M y 5.30×10^{-11} M, respectivamente (FIGs. 4B y 4D).

Ejemplo 6: Actividad inhibidora de la unión EphA4 de ratón-ligando de ratón de fragmento de unión a EphA4

Anticuerpo A-Fab y anticuerpo A-F(ab')₂ obtenido en el Ejemplo 5 se evaluaron en cuanto a su actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 y su ligando de acuerdo con las siguientes etapas. Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1% de BlockAce (DS Pharma Biomedical) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Thermo Fisher Scientific) durante tres veces, se añadió la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His obtenida por el método del Ejemplo 1 (concentración final: 10 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente

durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a cada uno de los pocillos un ligando y anticuerpo A diluido en serie (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM), anticuerpo A-Fab (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM), anticuerpo A-F(ab')₂ (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM), o el inhibidor de EphA4 péptido KYL (KYLPYWPVLSSL, 0, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 μ M, su síntesis se externalizó a Toray Research Center). El ligando utilizado era quimera de Efrina B2-Fc de ratón biotinilada (R&D Systems, concentración final: 2.5 nM). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y del subsiguiente lavado durante tres veces, se añadió a ello estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H₂SO₄, 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

Los valores CI₅₀ de anticuerpo A (Anticuerpo A-IgG), anticuerpo A-Fab, anticuerpo A-F(ab')₂ y péptido KYL eran 2.6 (o 3.6) nM, 438.5 nM, 2.9 nM y 5.293 μ M, respectivamente (FIG. 5). Anticuerpo A y anticuerpo A-F(ab')₂ tenían 1000 o más veces la actividad del péptido

KYL, y el anticuerpo A-Fab tenía también 10 o más veces la actividad del péptido KYL.

Ejemplo 7: Selectividad de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 para el receptor de Eph humano

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada uno de los receptores de Eph humanos (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6) se amplificó mediante RT-PCR utilizando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica una región Fc de IgG humana y etiqueta de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada uno de receptor de Eph, Fc y etiqueta de histidina se transfirieron a un vector pcDNA3.1_rfcB a través de una reacción LR utilizando el Sistema Gateway (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector para la expresión de una proteína de la región extracelular de cada uno de los receptores de Eph humanos condensados con la región Fcv de IgG1 humana y la etiqueta His (a la que se alude como "proteína de la región extracelular del receptor de Eph-Fc-His") (a este vector se le alude como (vector de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor de Eph-Fc-His").

A continuación, se inocularon células HEK293EBNA (Life Technologies) en una placa de 10 cm (Falcon) y se cultivaron a 37°C durante 1 día. Las células HEK293EBNA se transfectaron con cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor de Eph-Fc-His de seres humanos arriba obtenidos utilizando

TransIT-LT1 (TAKARA). Después de la incubación, (5% de CO₂, 37°C) durante 4 días, el sobrenadante del cultivo se recuperó y centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se
5 filtró a través de un filtro de 0.22- μ m (Merck Millipore) y Hepes (Dojindo Laboratories) y azida de sodio (Wako Pure Chemical Industries) se añadieron a ello a una concentración final de 20 mM y 0.02%, respectivamente.

Anticuerpo A se evaluó en cuanto a su actividad de
10 unión frente a cada uno de los receptores de Eph humanos de acuerdo con las siguientes etapas.

Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo IgG anti-humano de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de la
15 incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1% de BlockAce (DS Pharma Biomedical) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Nacalai Tesque) durante tres veces, se diseminó cada una de las proteínas de la región
20 extracelular del receptor de Eph humana-Fc-His (concentración final: 1 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, una solución de IgG humana (100
25 μ g/mL, Mitsubishi Pharma) y anticuerpo A (10 μ g/mL) se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora. A ello se añadió un anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y
30 se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió una disolución de TMBZ

(3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos. Después de la confirmación de un desarrollo de color moderado, a cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la
5 reacción (H_2SO_4 , 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Anticuerpo A específicamente tenía una actividad de reacción con EphA4 humana entre los miembros de la familia
10 de receptores de Eph humanos (FIG. 6A).

Ejemplo 8: Selectividad de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 para el receptor de Eph de ratón

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la
15 región extracelular de cada uno de los receptores de Eph de ratón (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6) se amplificó mediante RT-PCR utilizando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies)
20 que tiene una secuencia de ADN que codifica una región Fc de IgG humana y etiqueta de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada uno de los receptores de Eph de
25 ratón (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6), Fc y etiqueta de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_rfcB a través de reacción LR utilizando el Sistema Gateway (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector de
30 expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-Fc-His. Para la construcción de un vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA2

de ratón-Fc-His, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA2 de ratón se amplificó mediante RT-PCR utilizando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pcDNA3.1 que tiene una
5 secuencia de ADN que codifica Fc y etiqueta de histidina para construir un vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA2 de ratón-Fc-His.

A continuación, se inocularon células HEK293EBNA (Life Technologies) en una placa de 10 cm (Falcon o BD Biosciences) y se cultivaron a 37°C durante 1 día. Las
10 células HEK293EBNA se transfectaron con el vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 o EphB6 de ratón-Fc-His obtenido
15 según se describe arriba, utilizando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de la incubación, (5% de CO₂, 37°C) durante 4 días, el sobrenadante del cultivo se recuperó y centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un
20 filtro de 0.22-µm (Merck Millipore) y Hepes (Dojindo Laboratories) y azida de sodio (Wako Pure Chemical Industries) se añadieron a ello a una concentración final de 20 mM y 0.02%, respectivamente.

25 Anticuerpo A se evaluó en cuanto a su actividad de unión frente a cada uno de los receptores de Eph de ratón de acuerdo con las siguientes etapas.

Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo IgG anti-humano de
30 burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos

se bloqueó con 1% de BlockAce (DS Pharma Biomedical) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Thermo Fisher Scientific) durante tres veces, se inoculó cada una de las proteínas de la región extracelular del receptor de Eph de ratón-Fc-His (concentración final: 1 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, una solución de IgG humana (100 µg/mL, Sigma-Aldrich) y anticuerpo A (10 µg/mL) se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora. A ello se añadió un anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos. Después de la confirmación de un desarrollo de color moderado, a cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H₂SO₄, 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Anticuerpo A específicamente tenía una actividad de reacción sólo con EphA4 de ratón entre los miembros de la familia de receptores de Eph de ratón (FIG. 6B).

Ejemplo 9: Reactividad de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 con EphA4 de ratón, rata, mono y humana

Proteínas de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata, mono y humana-Fc-His se preparó de acuerdo con las siguientes etapas. Primero, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, se construyó un vector de

expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de mono-Fc-His. La secuencia de aminoácidos de EphA4 de mono en la construcción de vector se muestra en SEQ ID NO: 44, y su región extracelular se muestra en SEQ ID NO: 45. A
5 continuación, se inocularon células HEK293EBNA (Life Technologies) en una placa de 10 cm (Falcon) y se cultivaron a 37°C durante 1 día. Las células HEK293EBNA se transfectaron con el vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de mono-Fc-His o el vector
10 de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-, EphA4 de rata- o EphA4 humana-Fc-His descrito en el Ejemplo 1 utilizando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de la incubación, (5% de CO₂, 37°C) durante 4 días, el sobrenadante del cultivo se recuperó y centrifugó a 1500
15 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0.22-µm (Merck Millipore) y Hepes (Dojindo Laboratories) y azida de sodio (Wako Pure Chemical Industries) se añadieron a ello a una concentración final
20 de 20 mM y 0.02%, respectivamente.

Anticuerpo A se evaluó en cuanto a su actividad de unión frente a diversos receptores de Eph de acuerdo con las siguientes etapas.

25 Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo IgG anti-ratón de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1% de BlockAce (Sumitomo Dainippon Pharma) a
30 la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Nacalai Tesque) durante tres

veces, se diseminó la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata, mono o humana-Fc-His (concentración final: 1 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, una solución de IgG humana (100 µg/mL, Mitsubishi Pharma) y anticuerpo A (0, 0.00128, 0.0064, 0.032, 0.16, 0.8, 4 y 20 µg/mL) se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora. A ello se añadió un anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos. Después de la confirmación de un desarrollo de color moderado, a cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H₂SO₄, 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Anticuerpo A tenía una actividad de reacción equivalente frente a todas las EphA4 de ratón, rata, mono y humana (FIG. 7).

Ejemplo 10: Efecto inhibidor de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 sobre la autofosforilación de EphA4 inducida por ligando en neuronas del hipocampo

Neuronas del hipocampo de ratas se prepararon de acuerdo con las siguientes etapas. Un feto se separó de una rata preñada de 18 días (Charles River Laboratories Japón) y se hizo una incisión en su cabeza para aislar el cerebro. Una región del hipocampo se escindió bajo un microscopio

estereoscópico, luego se colocó en una solución de digestión (NaCl 137 mM (Wako Pure Chemical Industries), KCl 5 mM (Wako Pure Chemical Industries), Na_2HPO_4 7 mM (Wako Pure Chemical Industries), Hepes 25 mM (Dojindo Laboratories), 0.5 mg/ml de DNasa (Sigma-Aldrich) y tripsina al 0.25% (Life Technologies)), y se sacudió a 37°C durante 10 minutos. La solución se separó y a los tejidos del hipocampo se añadió una solución de suero bovino fetal al 20%/Hanks (Sigma-Aldrich). La solución se retiró y los tejidos del hipocampo se lavaron dos veces con una solución de tampón de Hanks y después se pipetearon en una solución de tampón de Hanks para preparar una solución de células. Las células se inocularon en una placa de 6 pocillos (Falcon) recubierta con poli-L-lisina que contenía una solución de cultivo (medio Neurobasal (Life Technologies), 1 × B-27 complemento (Life Technologies) y L-glutamina 0.5 mM (Life Technologies)).

La evaluación de la actividad inhibidora de la autofosforilación de EphA4 utilizando las neuronas del hipocampo se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. Las neuronas del hipocampo de rata inoculadas en una placa de 6 pocillos (Falcon) se trataron con quimera de Efrina A1-Fc de ratón (R&D Systems, concentración final: 10 nM), anticuerpo A (0, 1, 10, 100 y 1000 nM) o péptido KYL (KYLPYWPVLSSL, un inhibidor de EphA4, su síntesis se externalizó a Hokkaido System Science, 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM ,) y se lavó con PBS frío (Wako Pure Chemical Industries) 45 minutos más tarde. A ellos se añadió un tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (Wako Pure Chemical Industries), inhibidor de

proteasa 1 × (Nacalai Tesque) e inhibidor de fosfatasa 1 × (Nacalai Tesque)) para recuperar las células. Después de mezclar a 4°C durante 15 minutos, el sobrenadante se recuperó mediante centrifugación refrigerada a 15000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Un anticuerpo policlonal anti-EphA4 de conejo (Medical & Biological Laboratories) se añadió al sobrenadante y se hizo reaccionar durante 90 minutos. Después se añadieron a ello perlas de proteína G (GE Healthcare) y se hizo reaccionar durante 30 minutos adicionales. El sobrenadante se separó mediante centrifugación refrigerada a 3000 rpm a 4°C durante 1 minuto, seguido de la adición de 1 mL de un tampón de lisis. Esta operación se realizó tres veces. Después se añadieron 2 × de tampón de muestra SDS a cada una de las muestras, las cuales se hirvieron después durante 10 minutos. Esta muestra se utilizó en SDS-PAGE y transferencia Western utilizando un anticuerpo de tirosina anti-fosforilado (Santa Cruz Biotechnology). Se realizó adicionalmente una transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y se cuantificó la intensidad de la banda para calcular un valor de EphA4 fosforilada/EphA4 total. El anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), cuyo inmunógeno es un péptido sintético para una región C-terminal de EphA4 humana, es reconocido como un anticuerpo que carece de actividad neutralizante frente a EphA4 humana que tiene una región extracelular N-terminal.

Anticuerpo A y péptido KYL (un inhibidor de EphA4) suprimían, de una manera dependiente de la concentración, la autofosforilación de EphA4 inducida por Efrina A1 de ratón en las neuronas del hipocampo, y los valores de CI_{50}

eran 24.2 nM y 9.91 μ M, respectivamente (FIG. 8). Estos resultados demostraron que el anticuerpo A antagoniza la señalización de EphA4/efrina, al igual que el péptido KYL, en sistemas de células.

5 Ejemplo 11: Efecto inhibidor de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 sobre el colapso del cono de crecimiento inducido por ligando en neuronas del hipocampo

10 Neuronas del hipocampo de rata se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 10 arriba. Las células se inocularon a una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One) recubierta con solución de cultivo que contiene poli-L-lisina.

15 El ensayo del colapso del cono de crecimiento utilizando las neuronas del hipocampo se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. Las neuronas del hipocampo de rata de día de cultivo 2 inoculadas a una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One) se trataron con PBS (Wako Pure Chemical Industries), anticuerpo A (0.1, 0.3 y 1 μ M), o un inhibidor de EphA4 péptido KYL (KYLPYWPVLSSL, 10, 30 y 100
20 μ M, su síntesis se externalizó a Toray Research Center) durante 15 minutos, y luego se trataron con anticuerpo IgG1 con fragmento Fc γ anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories)-quimera pre-arracimada de
25 Efrina A1-Fc (R&D Systems, concentración final: 1 μ g/mL) (relación: 1:5) durante 30 minutos. Después se retiró la solución de cultivo y se añadió PFA al 2% (Wako Pure Chemical Industries)/sacarosa al 4% (Wako Pure Chemical Industries)/PBS y se dejó reposar durante 20 minutos para
30 fijar las células. La solución se separó y las células se lavaron con PBS tres veces, seguido de la adición de Triton

X-100 al 0.25% (Wako Pure Chemical Industries)/PBS para el tratamiento de penetración de las células durante 15 minutos. La solución se separó y se bloqueó durante 1 hora mediante la adición de BSA al 2% (Sigma-Aldrich)/Triton X-100 al 0.25%/Opti-MEM (Life technologies) y luego se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-Tau-1 (Merck Millipore) y un anticuerpo anti-MAP-2 (Merck Millipore) durante 2 horas. La solución de anticuerpos primarios se separó y se lavó con PBS tres veces y se hizo reaccionar con un anticuerpo secundario y Alexa Fluor 546 Phalloidin (Molecular Probes) durante 1 hora. La solución de anticuerpo secundario se separó y se lavó con PBS tres veces y luego se encerró mediante la adición de reactivos SlowFade Gold Antifade (Molecular Probes) y se observó bajo BIOREVO (Keyence). Neuronas formadoras del cono de crecimiento se contaron en 30 campos de visión por muestra para calcular la proporción del número de neuronas que provocan el colapso del cono de crecimiento.

Anticuerpo A y el inhibidor de EphA4 péptido KYL suprimieron, de una manera dependiente de la concentración, el colapso del crecimiento del cono por parte de Efrina A1 de ratón en las neuronas del hipocampo (FIG. 9). Por consiguiente, se demuestra que la funcionalidad del anticuerpo A inhibe EphA4, al igual que con el péptido KYL, en sistemas celulares.

Ejemplo 12: Efecto antagonístico del ligando de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 in vivo

El ensayo de competencia *in vivo* utilizando neonatos de ratón se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. PBS (Wako Pure Chemical Industries), anticuerpo A o un anticuerpo control (anticuerpo anti-dinitrofenol de ratón),

producido con un procedimiento convencional inmunizando ratas con dinitrofenol se administró por vía subcutánea a una dosis de 300 mg/kg (30 mL/kg) a cada uno de ratones de 8 días de edad (Charles River Laboratories Japón). Al cabo de 24 horas, se hizo una incisión en la cabellera bajo anestesia con isoflurano al 4% (Intervet) y quimera de Efrina A1-Fc de ratón (300 pmol/cabeza, R&D Systems) o PBS (Wako Pure Chemical Industries) se administró al ventrículo lateral. 1 hora después de ello, el ratón fue eutanizado mediante decapitación, seguido de la extirpación del hemisferio cerebral. El hemisferio cerebral recogido se colocó en un tubo de filtro cargado en un tubo para la recuperación de BioMasher(R) I (Nippi). Después de la inserción de una varilla machacadora, el hemisferio cerebral se homogeneizó mediante centrifugación refrigerada a 15000 rpm a 4°C durante 2 minutos. El producto homogeneizado se suspendió en tampón TNE (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, inhibidor de proteasa 1 × (Nacalai Tesque), inhibidor de fosfatasa 1 × (Nacalai Tesque)). 3 × de tampón de muestra SDS se añadieron a una parte del producto homogeneizado, que luego se hirvió durante 10 minutos, seguido de la cuantificación de proteínas. Esta muestra se utilizó en SDS-PAGE y transferencia Western utilizando un anticuerpo IgG (H+L) anti-humano de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories), un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y un anticuerpo anti-actina (Sigma-Aldrich). El producto homogeneizado restante se sometió a cuantificación de proteínas y luego se dispensó en una cantidad correspondiente a 3 mg de proteína y a ello se añadieron Triton X-100 al 1% (Wako Pure Chemical

Industries) y SDS al 0.1% (Nacalai Tesque). Después de mezclar a 4°C durante 15 minutos, el sobrenadante se recuperó mediante centrifugación refrigerada a 15000 rpm a 4°C durante 15 minutos. 3 × de tampón de muestra SDS se añadieron a una parte del sobrenadante, que luego se hirvió durante 10 minutos para preparar una muestra de entrada. Esta muestra se utilizó en SDS-PAGE y transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y un anticuerpo anti-actina (Sigma-Aldrich). Un anticuerpo policlonal anti-EphA4 de conejo (Santa Cruz Biotechnology) se añadió al sobrenadante restante y se hizo reaccionar durante 60 minutos. Después se añadieron a ello perlas de proteína G (GE Healthcare) y se hizo reaccionar durante 30 minutos adicionales. El sobrenadante se retiró mediante centrifugación refrigerada a 3000 rpm a 4°C durante 2 minutos, seguido de la adición de 0.5 mL de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (Wako Pure Chemical Industries), SDS al 0.1% (Nacalai Tesque), inhibidor de proteasa 1 × (Nacalai Tesque), inhibidor de fosfatasa 1 × (Nacalai Tesque)). Esta operación se realizó tres veces. Después, 1 × de tampón de muestra SDS se añadió a las perlas, que luego se hirvieron durante 10 minutos para preparar una muestra de perlas. Esta muestra se utilizó en SDS-PAGE y transferencia Western utilizando un anticuerpo de tirosina anti-fosforilado (Santa Cruz Biotechnology). Se realizó adicionalmente una transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y se cuantificó la intensidad de la banda para calcular un valor de EphA4 fosforilada/EphA4 total. El anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), cuyo

inmunógeno es un péptido sintético para una región C-terminal de EphA4 humana, es reconocido como un anticuerpo que carece de actividad neutralizante frente a EphA4 humana que tiene una región extracelular N-terminal.

5 La administración de Efrina A1 de ratón al ventrículo lateral del neonato de ratón inducía la autofosforilación de EphA4 en un hemisferio cerebral. Anticuerpo A suprimía la autofosforilación de EphA4 inducida por Efrina A1 de ratón en un 66% (FIG. 10). Por consiguiente, se demuestra
10 que anticuerpo A también inhibe la unión entre EphA4 y su ligando *in vivo*.

Ejemplo 13: Efecto protector de neuronas motoras del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en modelo ELA *in vitro* derivado de células ES de ratón

15 Células ES de ratón se mantuvieron y cultivaron de acuerdo con las siguientes etapas. Células ES de ratón (129x1/SvJ) criopreservadas a -80°C se descongelaron en un baño termostático y luego se diluyeron con un medio de cultivo de células ES de ratón (KnockOut(TM) DMEM (Gibco)
20 que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS, Gibco), β -mercaptoetanol 0.1 mM (Gibco), piruvato sódico 1 mM (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogen), 100 unidades/mL de
25 penicilina-100 μ g/mL de estreptomicina (Invitrogen) y 1000 unidades/mL de factor inhibidor de leucemia ESGRO(R) (Merck Millipore)) calentado a 37°C. Cada una de las suspensiones de células se centrifugó (1500 rpm, 3 min, temperatura ambiente), seguido de la separación del sobrenadante. Las
30 células se suspendieron en un medio reciente, después se transfirieron a una placa de cultivo con células

alimentadoras inoculados de antemano y se mantuvieron y cultivaron en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C).

Se establecieron astrocitos de un neonato de ratón y se cultivaron de acuerdo con las siguientes etapas. Un
5 neonato de ratón de tipo salvaje de dos días de edad (C57BL/6JmsSlc (Japan SLC)) y un neonato de ratón híbrido de un ratón de tipo salvaje y un SOD1 humano variante (G93A) Tg- (B6.Cg-Tg(SOD1_G93A)1Gur/J (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) fueron eutanizados cada uno mediante
10 inhalación de anestesia con isoflurano (Intervet) o decapitación. Después, se aisló la corteza cerebral de cada uno de los ratones y se dispersó mediante tratamiento con tripsina-EDTA al 0.25% (Invitrogen) a 37°C durante 15 minutos. Después del tratamiento enzimático, las células se
15 diluyeron con 4 mL de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (Gibco) que contenía FBS al 10% (Gibco) y penicilina-estreptomicina al 1% (Invitrogen) (FBS-DMEM al 10%) para terminar la digestión enzimática. Después, impurezas distintas a otras células individuales se
20 sometieron a filtración utilizando un tamiz de células (BD Biosciences) y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró, se diluyó con 4 mL de FBS-DMEM al 10% reciente, se inoculó en una placa
25 de cultivo de 60 mm sobre una base individual y se cultivó a 37°C. Dos días después de la inoculación, el medio se aspiró y se reemplazó por la adición de 4 mL de FBS-DMEM al 10% reciente. Después de alcanzar la confluencia, se recuperó un sobrenadante del cultivo que contenía células
30 no adherentes y se sometió a genotipado de SOD1 humano variante (G93A). 2 mL de PBS (Wako Pure Chemical Industries)

se añadieron nuevamente al sobrenadante y se aspiraron de nuevo. 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% se añadió a las células y se incubó a 37°C durante 3 minutos. El tratamiento enzimático se terminó con 3 mL de FBS-DMEM al 10% y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, el medio se aspiró y 6 mL de FBS-DMEM al 10% reciente se añadieron a las células, las cuales fueron cada una inoculadas a una placa de cultivo de 100 mm y se sub-cultivaron (número de pasajes: 2). Después de alcanzar la confluencia, el medio se aspiró y luego se añadieron 3 mL de PBS (Wako Pure Chemical Industries) a las células y se aspiró de nuevo. 2 mL de tripsina-EDTA al 0.25% se añadió a las células y se incubó a 37°C durante 3 minutos. El tratamiento enzimático se terminó con 4 mL de FBS-DMEM al 10% y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, el medio se aspiró y 12 mL de FBS-DMEM al 10% reciente se añadieron a las células, después 6 mL de cada una fueron inoculados a una placa de cultivo de 100 mm y se sub-cultivaron (número de pasajes: 3). El medio de los astrocitos a un número de pasajes de 3 se aspiró y luego se añadieron 2 mL de PBS (Wako Pure Chemical Industries) a las células y se aspiró de nuevo. 2 mL de tripsina-EDTA al 0.25% se añadió a las células y se incubó a 37°C durante 3 minutos. El tratamiento enzimático se terminó mediante la adición de 4 mL de FBS-DMEM al 10%. La suspensión se recuperó, se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos, se diluyó con Cell banker (Nippon Zenyaku Kogyo) y se crioconservó a -80°C hasta ser sometido a un ensayo. Cuando se sometió a un ensayo, cada una de la suspensión de

células crioconservadas de descongeló en un baño termostatzado y luego se diluyó con FBS-DMEM al 10% calentado a 37°C. Después de la centrifugación (1500 rpm, 3 min, temperatura ambiente) de cada una de las suspensiones de células, se retiró el sobrenadante y las células se suspendieron en un medio reciente, luego se inocularon en una cámara de 8 pocillos (ibidi) y se mantuvieron y cultivaron en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C).

El genotipado de SOD1 humano variante (G93A) se realizó utilizando el kit de PCR de Tejidos REDExtract-N-Amp(TM) (Sigma-Aldrich). En la etapa de mantener y cultivar las células ES de ratón, el sobrenadante del cultivo que contenía células no adherentes de astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) recuperadas durante el subcultivo se recuperaron en un tubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se aspiró y las células se lavaron mediante la adición de 1 mL de PBS y se centrifugaron de nuevo, seguido de la aspiración de PBS. 50 µL de una solución de extracción y 12.5 µL de una solución de preparación de tejido se mezclaron y añadieron a cada una de las muestras. Después de la mezcladura, la mezcla se transfirió a un tubo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de la extracción del genoma a un ciclo de 55°C durante 10 minutos → 95°C durante 3 minutos → 4°C ∞ utilizando el sistema PCR 9700 GeneAmp(R) (Applied Biosystems(R)). Después, la solución de la reacción se neutralizó mediante la adición de 50 µL de solución de neutralización B.

El genoma extraído se utilizó en la PCR genómica de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 3. Las secuencias de cebador utilizadas en la PCR se muestran en la Tabla 4. Cada uno de los productos de la PCR resultantes se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V durante 20 minutos. Muestras con dos bandas de un patrón interno de 324 pb y SOD1 humano variante (G93A) de 236 pb detectadas se identificaron como astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A).

[Tabla 3]

Tabla 3 Mezcla de PCR Genómica

Nombre del reactivo	Volumen de líquido
Molde:	1 μ L
Mezcla Roja:	5 μ L
Cebador 1 (100 μ mol/L):	0.05 μ L
Cebador 2 (100 μ mol/L):	0.05 μ L
Cebador 3 (100 μ mol/L):	0.05 μ L
Cebador 4 (100 μ mol/L):	0.05 μ L
Agua destilada	3.8 μ L
Total:	10 μ L

Mezcla roja = mezcla de reacción PCR REExtract-N-Amp

[Tabla 4]

Tabla 4 Secuencias de nucleótidos de cebadores

Cebador 1	Variante humana <i>SOD1</i> (G93A)	CATCAGCCCTAATCCATCTGA
Cebador 2	Variante humana <i>SOD1</i> (G93A)	CGCGACTAACAATCAAAGTGA
Cebador 3	Patrón interno	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Cebador 4	Patrón interno	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

El efecto protector de neuronas motoras en los modelos de ELA *in vitro* se evaluó de acuerdo con las siguientes etapas. Las células ES de ratón cultivadas y mantenidas se trataron con solución de tripsina al 0.25%/solución de EDTA al 0.05% (Gibco) para disociar las células de la placa de cultivo. Las células se recuperaron mediante centrifugación y luego se preparó una suspensión y se inoculó a razón de 1.2×10^5 células/mL a una placa de 12 pocillos de baja adsorción (Nunc) (día 0). Se realizó un cultivo flotante de agregados durante 2 días en un medio DFK (medio avanzado DMEM/F-12 (Invitrogen):Neurobasal (Invitrogen) [1:1] que contiene reemplazo de suero KnockOut al 5% (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/mL de penicilina-100 µg/mL de estreptomycin y β-mercaptoetanol 0.1 mM). El día 2, el medio DFK fue reemplazado por un medio DFK que contenía ácido retinoico 1 µM (Sigma-Aldrich) y purmorfamina 2 µM (Stemgent). Después, se realizó un reemplazo de medio a una frecuencia de una vez cada dos días. La diferenciación en neuronas motoras se indujo mediante cultivo durante 5 días (días 3 a 7).

El día 7, las masas de células de neuronas motoras diferenciadas se dispersaron en una solución de dispersión de células Accumax (MS Tech) y se prepararon en una suspensión que tenía una densidad de células de 5.5×10^5 células/mL. La suspensión se inoculó después a razón de 200 µL/pocillo en una cámara de 8 pocillos que contenía los astrocitos de tipo salvaje derivados de ratón o los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) cultivados y mantenidos de antemano, y las células de los

astrocitos co-cultivadas resultantes y las neuronas motoras se utilizaron en evaluación.

El número de neuronas motoras observadas mediante el co-cultivo de los astrocitos de tipo salvaje y las neuronas motoras se utilizaron como control. Para el grupo tratado con fármaco, los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) y las neuronas motoras se co-cultivaron bajo una condición que implica adición de vehículo (IgG y agua ultra-pura al 0.1%), anticuerpo A (10, 30 y 100 nM), EphA4-Fc (R&D Systems, 3, 10 y 30 nM) o péptido KYL (Toray Research Center, 1, 3 y 10 μ M). Después del cultivo durante 2 días a 37°C en un entorno de 5% de CO₂ bajo cada una de las condiciones, las neuronas motoras se tiñeron inmunocitoquímicamente con un anticuerpo ISL1 anti-conejo (Abcam) y Hoechst 33342 (Molecular Probes). Células ISL1/Hoechst 33342-copositivas por cada área unidad se contaron como neuronas motoras vivas, y la tasa de supervivencia de las neuronas motoras se calculó como un porcentaje (%) con respecto al control. La FIG. 11 muestra una visión esquemática simple que muestra las etapas del sistema de evaluación.

La tasa de supervivencia de las neuronas motoras se redujo significativamente en el co-cultivo de neuronas motoras derivadas de astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A)/células ES de ratón (40-50%). El anticuerpo A suprimía, de una manera dependiente de la concentración, la muerte de neuronas motoras derivadas de células ES de ratón, inducida por los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) (Fig. 12). Se confirmó que el tratamiento con péptido KYL o EphA4-Fc, al igual que con anticuerpo A, tenía un efecto protector de neuronas motoras en este

sistema experimental, demostrando que anticuerpo A fomenta la supervivencia de neuronas motoras derivadas de células ES de ratón inhibiendo la señalización de EphA4/efrina en este modelo de ELA *in vitro*.

5 Ejemplo 14: Efecto protector de neuronas motoras del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en modelo ELA *in vitro* derivado de células iPS humanas

Células iPS humanas se mantuvieron y cultivaron de acuerdo con las siguientes etapas. Células iPS humanas
10 (201B7), crioconservadas en nitrógeno líquido utilizando Stem cell banker (TAKARA) se recogieron de la fase gaseosa de nitrógeno líquido e inmediatamente se suspendieron y descongelaron en 5 mL de un medio de cultivo de células iPS humanas (Essential 8, Thermo Fisher Scientific) pre-
15 calentado a 37°C. La suspensión de células se recuperó en un tubo cónico de 15 mL (Falcon) y se centrifugó (1000 rpm, 5 min, temperatura ambiente), seguido de la separación del sobrenadante. Las células se suspendieron en un medio reciente y luego se diseminaron a una placa de cultivo de
20 $\phi 60$ mm (Falcon BD) recubierta con $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de vitronectina recombinante humana (Invitrogen) de antemano. $10 \mu\text{M}$ de Y-27632 (Wako Pure Chemical Industries) se añadieron a ello y las células se mantuvieron y cultivaron
25 en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2 , 37°C). El reemplazo de medio se realizó cada día y las células se sometieron al experimento cuando alcanzan la confluencia.

El efecto protector de neuronas motoras en los modelos
30 de ELA *in vitro* se evaluó de acuerdo con las siguientes etapas. El medio de cultivo de las células iPS humanas mantenidas y cultivadas se aspiró y las células se lavaron

con 2 mL de PBS (Wako Pure Chemical Industries). Después de la aspiración de PBS, se añadieron 500 μ L de EDTA 0.5 mM a las células, las cuales se incubaron después durante 2 a 3 minutos en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C) (las células se confirmaron bajo un microscopio cada 30 segundos, y la incubación se interrumpió cuando se debilitó la asociación intercelular). La reacción de EDTA se terminó mediante suspensión en 5 mL de un medio de cultivo de células iPS humanas, y las células se recuperaron en un tubo cónico de 15 mL. Las células se centrifugaron a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y el sobrenadante se aspiró. La suspensión de células que contenía masas de células iPS se inoculó en una cantidad de aproximadamente 1/10 por pocillo en una placa de cultivo de células de 6 pocillos de baja adhesión (Nunc) y se cultivó en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C) utilizando un medio DFK (medio avanzado DMEM/F-12 (Invitrogen):Neurobasal (Invitrogen) [1:1] que contiene suplemento B27 al 2%, reemplazo de suero KnockOut al 5% (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/mL de penicilina-100 μ g/mL de estreptomicina y β -mercaptoetanol 0.1 mmol/L) complementado con SB431542 2 μ M (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich, y CHIR99021 3 μ M (Sigma-Aldrich). El reemplazo de medio se realizó cada 2 días mediante el siguiente método. Primero, agregados de células (SFEBS) diferenciados en células iPS humanas se recuperaron sobre una base de medio en un tubo cónico de 15 mL y se dejó reposar a la temperatura ordinaria durante 5 minutos para precipitar las masas de células. Este sobrenadante se aspiró y se añadieron un medio DFK reciente y SB431542 2 μ M

(Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich), CHIR99021 3 μ M (Sigma-Aldrich) y luego se devolvieron al pocillo original para el reemplazo del medio. El día de cultivo 8 los SFEBs se recuperaron sobre una base de medio en un tubo cónico de 15 mL y se dejó reposar a la temperatura ordinaria durante 5 minutos para precipitar los SFEBs. Este sobrenadante se aspiró y se añadieron un medio DFK reciente y luego ácido retinoico 0.1 μ M (Sigma-Aldrich) y purmorfamina 0.5 μ M (Miltenyi Biotec), y después se devolvieron al pocillo original y se cultivaron en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C). El reemplazo de medio se realizó cada 2 días. El día de cultivo 12 los SFEBs se recuperaron sobre una base de medio en un tubo cónico de 15 mL y se dejó reposar a la temperatura ordinaria durante 5 minutos para precipitar los SFEBs. El sobrenadante se aspiró y a las células se añadieron 500 μ L de Accumax (MS TechnoSystems), que después se pipetearon varias veces y luego se incubaron durante 5 minutos en una incubadora de CO₂ (37°C, 5% de CO₂). Las células se recogieron de la incubadora, se suspendieron en 5 mL de un medio DFK y se pipetearon varias veces para dispersar las masas de células. La suspensión de células se disoció en células individuales mediante filtración a través de un filtro de células (Falcon). Después, el número de células se contó utilizando una cámara de recuento. La suspensión de células se recuperó en otro tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una suspensión que tiene una densidad de células de 5.5×10^5 células/mL se preparó con un medio de cultivo de neuronas motoras (medio avanzado DMEM/F-12 (Invitrogen):Neurobasal

(Invitrogen) [1:1] que contiene suplemento B27 al 2%, suero de caballo al 1%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/mL de penicilina-100 µg/mL de estreptomycin y β-mercaptoetanol 0.1 mmol/L) y se inoculó a razón de 200 µL/pocillo en una
5 cámara de 8 pocillos que contenía astrocitos de tipo salvaje derivados de ratón o astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) inoculados a razón de 8×10^4 células/pocillo de antemano. Las células co-cultivadas resultantes de los astrocitos y las neuronas motoras se
10 utilizaron en evaluación (el establecimiento, la congelación, descongelación, inoculación y el mantenimiento y cultivo de los astrocitos de tipo salvaje y los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 13). El
15 número de neuronas motoras observadas mediante el co-cultivo de los astrocitos de tipo salvaje y las neuronas motoras se utilizaron como control. Para el grupo tratado con fármaco, los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) y las neuronas motoras se co-cultivaron
20 bajo una condición que implica adición de vehículo (IgG y agua ultra-pura al 0.1%), anticuerpo A (10, 30 y 100 nM), el inhibidor de EphA4 péptido KYL (KYLPYWPVLSSL, 1, 3 y 10 µM, su síntesis se externalizó a Toray Research Center), o
25 EphA4-Fc (3, 10 y 30 nM, R&D systems). Después del cultivo durante 2 días a 37°C en un entorno de 5% de CO₂ bajo cada una de las condiciones, las neuronas motoras se tiñeron inmunocitoquímicamente con un anticuerpo anti-ISL1 (obtenido de Developmental Studies Hybridoma Bank) y
30 Hoechst 33342 (Molecular Probes). Células ISL1/Hoechst 33342-copositivas por cada pocillo se contaron como

neuronas motoras vivas, y la tasa de supervivencia de las neuronas motoras se calculó como % con respecto al control. La FIG. 13 muestra una visión esquemática simple que muestra las etapas del sistema de evaluación.

La tasa de supervivencia de las neuronas motoras se redujo significativamente (aproximadamente un 50%) en el co-cultivo de astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A)/neuronas motoras derivadas de células iPS humanas, al igual que con el sistema de ensayo utilizando células ES de ratón. El anticuerpo A suprimía, de una manera dependiente de la concentración, la muerte de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas, inducida por los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) (Fig. 14). Se confirmó que el tratamiento con péptido KYL o EphA4-Fc, al igual que con anticuerpo A, tiene un efecto protector de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas en este sistema experimental. Por consiguiente, se demuestra que anticuerpo A fomenta también la supervivencia de neuronas motoras inhibiendo la unión entre EphA4 y su ligando en células humanas.

Ejemplo 15: Mapeo de epítomos del Dominio de Unión a Ligando de EphA4 (EphA4-LBD) mediante cristalografía por rayos X

Con el fin de preparar un complejo de anticuerpo A-Fab en el Ejemplo 5 y un antígeno EphA4-LBD, se preparó EphA4-LBD (Qin H. et al., J. Biol. Chem., 283: 29473-29484 (2008)). 1.33 μ mol (950 μ M, 1.4 ml) de EphA4-LBD y 0.9 μ mol (150 μ M, 6 ml) de anticuerpo A-Fab se mezclaron de modo que EphA4-LBD tenía aproximadamente 1.5 veces la relación molar de anticuerpo A-Fab. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación, la solución mixta se aplicó a

HILOAD 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare), seguido de la elución con una solución tampón para cromatografía (Tris/HCl 25 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM). Fracciones que contenían el complejo se analizaron mediante SDS-PAGE y fracciones muy puras se recogieron y concentraron en 34 mg/ml. Este concentrado se utilizó en la cristalización.

La cristalización del complejo se realizó por el método por difusión de vapor de gota colgante utilizando un aparato de cristalización automático Hydra II Plus One system (Matrix Technologies). La placa utilizada era MRC-2 (Molecular Dimensions). La composición de una solución de depósito era Tris/HCl 100 mM (pH 7.5 a 8.5) y polietilenglicol 400 al 30%. Esta solución de depósito y la solución de complejo arriba descrita se mezclaron a una relación en volumen de 1:1 para preparar gotitas de cristalización. La placa de cristalización preparada se dejó reposar a 20°C.

Como resultado de realizar la cristalización bajo las condiciones arriba descritas, se obtuvieron cristales que tiene un grupo espacial de P212121, constante de red a de 70.0 angstrom, constante de red b de 82.3 angstrom y constante de red c de 216.0 angstrom. Los datos de difracción en 2.1 angstrom se obtuvieron mediante la incidencia del sincrotrón de rayos X (1-0 angstrom) en los cristales obtenidos. Los datos de difracción se procesaron con HKL2000 (HKL Research Inc.) y su determinación de fases se realizó por el método de reemplazo molecular. El método de reemplazo molecular empleaba un programa PHASER (versión 2.5.0, McCoy A.J. et al., J. Appl. Cryst. 40: 658-674 (2007)) contenido en CCP4 Software Suite (Proyecto

computacional colaborativo número 4, [CCP4] versión 6.5.0, Acta Cryst. D 67: 235-242 (2011)). Los modelos de búsqueda utilizados en el método de reemplazo molecular eran la estructura del cristal (PDBID:3CKH) de EphA4-LBD y la estructura del cristal de Fab de un anticuerpo diferente determinado en el pasado por los autores de la presente invención. Se construyó un modelo molecular apropiado para una densidad de electrones, obtenido a partir de la fase determinada, utilizando un programa COOT (Emsley P. et al., Acta Cryst. D 60: 2126-2132 (2004)) y sometido a refinamiento de la estructura utilizando un programa REFMAC (Murshudov G.N., Acta Cryst. D 53: 240-255 (1997)).

De esta manera, la estructura cristalina del complejo que tiene una resolución de 2.1 angstrom se obtuvo mediante el cálculo de la estructura ($R = 0.234$, $R_{\text{libre}} = 0.288$).

La estructura cristalina obtenida del complejo Fab/EphA4-LBD se analizó utilizando una herramienta de detección de la interacción instalada en un sistema químico computacional MOE 2011.10 (Chemical Computing Group Inc.) para identificar residuos aminoácidos en EphA4-LBD que interactúan directamente con Fab (FIG. 15). Como protocolo de detección se utilizaron configuraciones estándares de MOE. Los residuos aminoácidos identificados eran Ser58, Met60, Gln71, Val72, Cys73, Thr104, Arg106, Gln156, Asp161, Arg162, Ile163, Cys191 e Ile192. La FIG. 16 muestra la estructura de la superficie de EphA4-LBD, preparada utilizando Maestro (versión 10.6, Schrodinger). Como resultado, los autores de la presente invención concluyeron que regiones que tienen estos residuos aminoácidos son regiones de unión a Fab de EphA4-LBD.

Ejemplo 16: Preparación de anticuerpo humanizado de anticuerpo A

Preparación de anticuerpo EphA4 anti-humano humanizado

Se diseñaron regiones variables de cada uno de los anticuerpos humanizados. Sobre la base de alta homología con las regiones de marco (FRs) de anticuerpo A, FRs de cadena ligera de anticuerpo humano IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO: 50) o IGKV3D-15*01 (SEQ ID NO: 51) y JK1 (SEQ ID NO: 52) y FRs de cadena pesada IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 53) y JH6 (SEQ ID NO: 54) se seleccionaron como FRs de anticuerpos humanizados. Después, se predijeron los aminoácidos de FR que interactúan con los aminoácidos de CDR utilizando el modelo de predicción estructural 3D de anticuerpo A de ratón y se utilizaron en el injerto con CDRs (SEQ ID NOs: 26 a 30, y 31 a 33). A la vista de la potenciación de la fosforilación de EphA4 y la actividad de ADCC, una región constante de cadena pesada de IgG₂ humana (SEQ ID NO: 62), que tenía mutaciones C131S, C219S, V234A y G237A y que carecía de un residuo lisina C-terminal, o una región constante de cadena pesada (SEQ ID NO: 60), que contenía CH1 derivada de IgG₁ humana y región bisagra, y CH2 y CH3 derivadas de IgG₂ que tenían mutaciones V234A y G237A y que carecían de un residuo lisina C-terminal, se utilizó como una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena ligera de Igk humana (SEQ ID NO: 64) se utilizó como una región constante de cadena ligera. HK1 (SEQ ID NO: 72), HK2 (SEQ ID NO: 74), y HK4 (SEQ ID NO: 76) se diseñaron como regiones variables de cadena pesada de anticuerpo humanizado que portan CDRs injertadas (SEQ ID NOs: 26, 28 y 30) determinadas por el método de definición de Kabat. HA1 (SEQ ID NO: 66), HA2 (SEQ ID NO: 68), y HA4

(SEQ ID NO: 70) se diseñaron como regiones variables de cadena pesada de anticuerpo humanizado que portan CDRs injertadas (SEQ ID NOs: 27, 29 y 30) determinadas por el método de definición AbM. L1-4 (SEQ ID NO: 78), L1-5 (SEQ ID NO: 80), y L1-6 (SEQ ID NO: 82) se diseñaron como regiones variables de cadena ligera de anticuerpo humanizado utilizando IGKV1-NL1*01 y JK1. L2-4 (SEQ ID NO: 84) se diseñaron como una región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado utilizando IGKV3D-15*01 y JK1. Incidentalmente, en el diseño de las regiones constantes de cadena pesada, la fosforilación de EphA4 se confirmó de la misma manera que la descrita en el Ejemplo 10.

Una secuencia de genes que codifica la secuencia de aminoácidos de HK1, HK2 o HK4 se sintetizó convirtiendo la secuencia de aminoácidos de CDRs de cadena pesada (SEQ ID NOs: 26, 28 y 30) de anticuerpo A injertada en IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 53) y JH6 (SEQ ID NO: 54) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 55) adicionalmente añadida al extremo N, en una secuencia de genes por GenScript USA Inc. y preparada mediante mutagénesis por PCR (HK1: SEQ ID NO: 73, HK2: SEQ ID NO: 75, HK4: SEQ ID NO: 77, secuencia señal: SEQ ID NO: 57). Una secuencia de genes que codifica la secuencia de aminoácidos de HA1, HA2 o HA4 se sintetizó convirtiendo la secuencia de aminoácidos de CDRs de cadena pesada (SEQ ID NOs: 27, 29 y 30) de anticuerpo A injertada en IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 53) y JH6 (SEQ ID NO: 54) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 55) adicionalmente añadida al extremo N, en una secuencia de genes por GenScript USA Inc. y preparada mediante mutagénesis por PCR (HA1: SEQ ID NO: 67, HA2: SEQ ID NO: 69, HA4: SEQ ID NO: 71, secuencia señal: SEQ ID NO: 56). Los genes que codifican estas

regiones variables de cadena pesada humanizadas y secuencias señal se insertaron en vectores de expresión (pcDNA3.4) que contenían una secuencia de genes (SEQ ID NO: 63), que codifica la región constante de IgG₂ humana (SEQ ID NO: 62), que tenía mutaciones C131S, C219S, V234A y G237A y que carecía de un residuo lisina C-terminal, o vectores de expresión (pcDNA3.4) que contenía una secuencia de genes (SEQ ID NO: 61), que codifica la región constante (SEQ ID NO: 60), que contenía CH1 derivada de IgG₁ humana y bisagra y CH2 y CH3 derivadas de IgG₂ que tienen mutaciones V234A y G237A. Una secuencia de genes que codifica la secuencia de aminoácidos de L1-4, L1-5 o L1-6 se sintetizó convirtiendo la secuencia de aminoácidos de CDRs de cadena ligera (SEQ ID NOs: 31 a 33) de anticuerpo A injertada en IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO: 50) y JK1 (SEQ ID NO: 52) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 58) adicionalmente añadida al extremo N, en una secuencia de genes por GenScript USA Inc. y preparada mediante mutagénesis por PCR (L1-4: SEQ ID NO: 79, L1-5: SEQ ID NO: 81, L1-6: SEQ ID NO: 83, secuencia señal: SEQ ID NO: 59). Una secuencia de genes que codifica la secuencia de aminoácidos de L2-4 se sintetizó convirtiendo la secuencia de aminoácidos de CDRs de cadena ligera (SEQ ID NOs: 31 a 33) de anticuerpo A injertada en IGKV3D-15*01 (SEQ ID NO: 51) y JK1 (SEQ ID NO: 52) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 58) adicionalmente añadida al extremo N, en una secuencia de genes por GenScript USA Inc. y preparada mediante mutagénesis por PCR (L2-4: SEQ ID NO: 85, secuencia señal: SEQ ID NO: 59). Los genes que codifican estas regiones variables de cadena pesada humanizadas y secuencias señal se insertaron en vectores de expresión (pcDNA3.4) que contenían una secuencia de genes

(SEQ ID NO: 65), que codifica la región constante Igκ humana (SEQ ID NO: 64). En este contexto, el término "C131S" se refiere a una mutación que sustituye a cisteína en la posición 131 de la numeración Eu por serina. El término "C219S" se refiere a una mutación que sustituye a cisteína en la posición 219 de la numeración Eu por serina. El término "V234A" se refiere a una mutación que sustituye a valina en la posición 234 de la numeración Eu por alanina. El término "G237A" se refiere a una mutación que sustituye a glicina en la posición 237 de la numeración Eu por alanina. En este contexto, la CH1 se refiere a una región desde las posiciones 118 a 215 de la numeración Eu en la región constante de IgG humana. La región bisagra se refiere a una región desde las posiciones 216 a 230 de la numeración Eu en la región constante de IgG humana. La CH2 se refiere a una región desde las posiciones 231 a 340 de la numeración Eu en la región constante de IgG humana. La CH3 se refiere a una región desde las posiciones 341 a 446 de la numeración Eu en la región constante de IgG humana. Con el fin de producir estos anticuerpos humanizados, los vectores de expresión arriba descritos se utilizaron en combinación tal como se muestra en la Tabla 5, utilizando el sistema de expresión Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific) para transfectar células Expi293F (Gibco/Thermo Fisher Scientific). Cada uno de los sobrenadantes se recuperó y purificó utilizando proteína A (GE Healthcare).

[Tabla 5]

	Anticuerpo humanizado N°	Cadena L			Cadena H				
		Región variable			Región variable			Región constante	
		Nom bre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)	Nom bre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO)
5									
10									
15	75	L1-4	78	79	HA1	66	67	60	61
	76	L1-4	78	79	HA2	68	69		
	67	L1-4	78	79	HA4	70	71		
20	77	L1-4	78	79	HK1	72	73		
	78	L1-4	78	79	HK2	74	75		
25	69	L1-4	78	79	HK4	76	77		
	81	L1-5	80	81	HA1	66	67		
30	82	L1-5	80	81	HA2	68	69		
	83	L1-	80	81	HA4	70	71		

		5						
	84	L1- 5	80	81	HK1	72	73	
5	85	L1- 5	80	81	HK2	74	75	
	86	L1- 5	80	81	HK4	76	77	
	87	L1- 6	82	83	HA1	66	67	
10	88	L1- 6	82	83	HA2	68	69	
	89	L1- 6	82	83	HA4	70	71	
	90	L1- 6	82	83	HK1	72	73	
15	91	L1- 6	82	83	HK2	74	75	
	92	L1- 6	82	83	HK4	76	77	
20	93	L2- 4	84	85	HA1	66	67	
	94	L2- 4	84	85	HA2	68	69	
25	71	L2- 4	84	85	HA4	70	71	
	95	L2- 4	84	85	HK1	72	73	
30	96	L2- 4	84	85	HK2	74	75	
	73	L2- 4	84	85	HK4	76	77	

		4						
5	139	L1- 4	78	79	HA1	66	67	62
	140	L1- 4	78	79	HA2	68	69	
	138	L1- 4	78	79	HA4	70	71	
10	141	L1- 4	78	79	HK1	72	73	
	142	L1- 4	78	79	HK2	74	75	
	143	L1- 4	78	79	HK4	76	77	
15	152	L1- 5	80	81	HA1	66	67	
	153	L1- 5	80	81	HA2	68	69	
	151	L1- 5	80	81	HA4	70	71	
20	154	L1- 5	80	81	HK1	72	73	
	145	L1- 5	80	81	HK2	74	75	
	155	L1- 5	80	81	HK4	76	77	
25	157	L1- 6	82	83	HA1	66	67	
	158	L1- 6	82	83	HA2	68	69	
	156	L1-	82	83	HA4	70	71	
30								63

		6						
	144	L1- 6	82	83	HK1	72	73	
5	159	L1- 6	82	83	HK2	74	75	
	160	L1- 6	82	83	HK4	76	77	
	133	L2- 4	84	85	HA1	66	67	
10	134	L2- 4	84	85	HA2	68	69	
	132	L2- 4	84	85	HA4	70	71	
	135	L2- 4	84	85	HK1	72	73	
15	136	L2- 4	84	85	HK2	74	75	
	137	L2- 4	84	85	HK4	76	77	
20								

Ejemplo 17: Afinidad de anticuerpo humanizado monoclonal anti-EphA4 por EphA4 humana

La afinidad de unión de cada uno de los anticuerpos humanizados monoclonales anti-EphA4 obtenida en el Ejemplo 16 para EphA4 humana se determinó mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) utilizando Biacore T200 (GE Healthcare). Primero, para el ensayo de anticuerpo A, un anticuerpo IgG₁ anti-ratón de rata, producido con un procedimiento convencional al inmunizar ratas con anticuerpo IgG₁ de ratón se inmovilizó en el chip sensor de CM5. La inmovilización del anticuerpo IgG₁ anti-ratón de rata en el chip sensor de CM5 se realizó mediante el método

de acoplamiento de aminos utilizando N-hidroxisuccinimida (NHS) e hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se utilizó etanolamina para el bloqueo (el chip sensor y los reactivos para la inmovilización se fabricaron todos por GE Healthcare). El anticuerpo se diluyó con una solución tampón para la inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 4.5) y se inmovilizó en el chip sensor de acuerdo con el protocolo unido a Biacore T200. Para el ensayo de cada uno de los anticuerpos monoclonales humanizados se utilizó un chip de proteína A (GE Healthcare, 29-1383-03). Anticuerpo A o el anticuerpo monoclonal humanizado se diluyó con una solución de tampón de desarrollo HBS-EP (GE Healthcare), se inyectó en sólo la celda de flujo 2 durante 120 segundos y se capturó (cantidad capturada: aproximadamente 30 a 60 RU). Subsiguientemente, proteína de la región extracelular de EphA4 humana-SEAP-His, diluida en serie en el intervalo de 50, 16.7, 5.6, 1.9 y 0.6 nM utilizando HBS-EP se añadió secuencialmente desde los lados de concentración baja a alta sin operación de regeneración. Curvas de la reacción de unión se observaron secuencialmente en el momento de la adición (fase de asociación, durante 120 s) y después de la completar de la adición (fase de disociación, durante 900 s). Después de la completar cada una de las observaciones, el chip sensor se regeneró mediante la adición de $MgCl_2$ 3 M (durante 60 s) o Glicina-HCl 10 mM pH 1.5 (durante 30 s). Las curvas de la reacción de unión obtenidas se sometieron a un análisis de ajuste con modelos de unión 1:1 utilizando la evaluación del software BIA unido al sistema para calcular la afinidad ($KD = k_d / k_a$) para EphA4 humana (Tabla 6).

Se encontró que todos los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 5 exhibían afinidad sustancialmente equivalente a su anticuerpo A parental (Tabla 6).

[Tabla 6]

anticuerpo humanizado N°	ka 1/Ms	kd 1/s	KD M	Rmax1 RU	Chi ² RU ²
75	3.6.E+05	4.2.E-04	1.2.E-09	29	0.17
76	3.3.E+05	3.4.E-04	1.0.E-09	29	0.18
67	3.3.E+05	3.5.E-04	1.1.E-09	28	0.15
77	4.1.E+05	5.8.E-04	1.4.E-09	27	0.20
78	3.4.E+05	3.9.E-04	1.1.E-09	30	0.17
69	3.4.E+05	3.7.E-04	1.1.E-09	29	0.19
81	3.4.E+05	5.4.E-04	1.6.E-09	24	0.12
82	2.9.E+05	4.6.E-04	1.6.E-09	24	0.10
83	2.9.E+05	5.4.E-04	1.9.E-09	20	0.06
84	3.5.E+05	5.8.E-04	1.7.E-09	25	0.13
85	3.1.E+05	5.0.E-04	1.6.E-09	26	0.12
86	3.1.E+05	4.6.E-04	1.5.E-09	26	0.13
87	3.5.E+05	5.1.E-04	1.5.E-09	27	0.12
88	3.0.E+05	4.2.E-04	1.4.E-09	26	0.13
89	3.1.E+05	4.1.E-04	1.3.E-09	24	0.13
90	3.6.E+05	5.5.E-04	1.5.E-09	27	0.14
91	3.3.E+05	4.4.E-04	1.3.E-09	25	0.13
92	3.3.E+05	4.3.E-04	1.3.E-09	27	0.16
93	3.1.E+05	2.4.E-04	7.7.E-10	24	0.10
94	2.6.E+05	2.4.E-04	9.5.E-10	25	0.06
71	2.8.E+05	2.3.E-04	8.2.E-10	25	0.09
95	3.0.E+05	3.1.E-04	1.0.E-09	27	0.08
96	2.7.E+05	3.1.E-04	1.1.E-09	28	0.07
73	2.9.E+05	2.7.E-04	9.3.E-10	27	0.09
139	3.7.E+05	5.3.E-04	1.4.E-09	29	0.15
140	3.2.E+05	4.3.E-04	1.4.E-09	29	0.12
138	3.3.E+05	4.3.E-04	1.3.E-09	29	0.12
141	3.9.E+05	6.2.E-04	1.6.E-09	26	0.14
142	3.4.E+05	5.0.E-04	1.5.E-09	28	0.12
143	3.5.E+05	5.1.E-04	1.5.E-09	26	0.12
152	4.0.E+05	8.2.E-04	2.0.E-09	23	0.09
153	2.8.E+05	6.0.E-04	2.1.E-09	24	0.07
151	3.2.E+05	5.3.E-04	1.7.E-09	26	0.13
154	3.9.E+05	8.5.E-04	2.2.E-09	24	0.10
145	3.3.E+05	6.5.E-04	2.0.E-09	27	0.11
155	3.3.E+05	6.4.E-04	1.9.E-09	27	0.11
157	3.5.E+05	6.8.E-04	2.0.E-09	24	0.09
158	3.1.E+05	6.1.E-04	1.9.E-09	24	0.06
156	3.1.E+05	5.6.E-04	1.8.E-09	24	0.08
144	4.0.E+05	7.8.E-04	2.0.E-09	23	0.09
159	3.1.E+05	6.1.E-04	2.0.E-09	22	0.07
160	3.2.E+05	6.1.E-04	1.9.E-09	25	0.06
133	3.0.E+05	3.2.E-04	1.1.E-09	26	0.07
134	2.6.E+05	3.2.E-04	1.2.E-09	24	0.06
132	2.7.E+05	3.1.E-04	1.2.E-09	26	0.06
135	3.2.E+05	4.0.E-04	1.3.E-09	26	0.08
136	2.9.E+05	3.9.E-04	1.4.E-09	25	0.07
137	2.9.E+05	3.8.E-04	1.3.E-09	27	0.09
anticuerpo A	4.2.E+05	2.5.E-04	6.0.E-10	37	0.19

Ejemplo 18: Actividad inhibidora de la unión EphA4 humana-ligando humano de anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4

Cada uno de los anticuerpos monoclonales humanizados anti-EphA4 obtenido en el Ejemplo 16 se evaluó en cuanto a su actividad inhibidora contra la unión entre EphA4 humana y su ligando humano de acuerdo con las siguientes etapas. Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada uno de los pocillos se bloqueó con 1% de BlockAce (DS Pharma Biomedical) a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0.05% (Thermo Fisher Scientific) durante tres veces, se añadió la proteína de la región extracelular de EphA4 humana-SEAP-His obtenida por el método del Ejemplo 2 (concentración final: 10 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a cada uno de los pocillos un ligando y cada uno de los anticuerpos humanizados diluidos en serie de anticuerpo A (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM). El ligando utilizado era quimera de Efrina A5-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final: 0.7 nM). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y del subsiguiente lavado durante tres veces, se añadió a ello estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada uno de los

pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H_2SO_4 , 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Se encontró que todos los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 5 exhibían afinidad sustancialmente equivalente a su anticuerpo A parental (Tabla 7).

[Tabla 7]

anticuerpo humanizado Nº	CI50 nM
75	2.9
76	2.9
67	4.4
77	3.5
78	2.8
69	3.1
81	4.0
82	4.1
83	3.7
84	4.8
85	4.0
86	4.0
87	3.0
88	3.6
89	4.3
90	4.5
91	4.9
92	3.5
93	2.5
94	2.7
71	2.5
95	3.1
96	3.7
73	2.4
139	3.3
140	2.4
138	2.9
141	3.0
142	3.7
143	5.3
152	2.0
153	2.3
151	2.0
154	2.5
145	3.7
155	2.4
157	2.6
158	2.8
156	2.5
144	3.6
159	2.6
160	2.2
133	3.0
134	3.0
132	3.1
135	2.5
136	2.5
137	2.5

Ejemplo 19: Selectividad de anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 para el receptor de Eph humano

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 7, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la

región extracelular de cada uno de los receptores de Eph humanos (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6) se amplificó mediante RT-PCR utilizando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica proteína SEAP y etiqueta de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada uno de receptor de Eph, Fc y etiqueta de histidina se transfirieron a un vector pcDNA3.1_rfcB a través de una reacción LR utilizando el Sistema Gateway (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector para la expresión de una proteína de la región extracelular de cada uno de los receptores de Eph humanos condensados con la proteína SEAP y la etiqueta His (a la que se alude como "proteína de la región extracelular del receptor de Eph-SEAP-His") (a este vector se le alude como (vector de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor de Eph-SEAP-His").

A continuación, cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor de Eph humana-SEAP-His se transfirió a células Expi293F (Gibco/Thermo Fisher Scientific) utilizando el sistema de expresión Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación, (5% de CO₂, 37°C) durante 5 días, el sobrenadante del cultivo se recuperó y centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0.45- μ m (Merck Millipore).

Cada uno de los anticuerpos monoclonales humanizados anti-EphA4 obtenido en el Ejemplo 16 se evaluó en cuanto a

su actividad inhibidora contra el receptor de Eph humana de acuerdo con las siguientes etapas.

Cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl Laboratories). Cada uno de los pocillos se bloqueó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se incubó durante la noche con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a 4°C. Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0.05% (Nacalai Tesque), se añadió la proteína SEAP-His de EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 o EphB6 humana (concentración final: 1 nM) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió el anticuerpo humanizado a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a ello un anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada uno de los pocillos TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL)) Después de la confirmación de un desarrollo de color moderado, a cada uno de los pocillos se añadió una cantidad igual de una disolución de parada de la reacción (H_2SO_4 , 1N Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific).

Los porcentajes con respecto a la absorbancia a 450 nm para EphA4 humana (hEphA4-SEAP-His) como 100% se resumen en la Tabla 8. Como resultado, se encontró que todos los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 5 se unían

específicamente a EphA4 humana al igual que con su anticuerpo A parental (Tabla 8).

[Tabla 8]

5

10

15

20

25

30

anticuerpo humanizado	SEAP-His	hEphA1- SEAP-	hEphA2- SEAP-	hEphA3- SEAP-	hEphA4- SEAP-	hEphA5- SEAP-	hEphA6- SEAP-	hEphA7- SEAP-	hEphA8- SEAP-	hEphA10- SEAP-	hEphB1- SEAP-	hEphB2- SEAP-	hEphB3- SEAP-	hEphB4- SEAP-	hEphB6- SEAP-
75	4.4	4.7	4.6	4.8	100	4.7	8.3	4.7	4.8	4.4	4.4	4.5	4.7	4.6	4.7
76	5.5	5.1	4.8	4.9	100	5.3	7.9	4.8	5.5	4.7	4.9	4.9	5.0	5.2	5.2
67	5.0	4.6	4.6	4.8	100	4.8	7.3	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7	4.9	4.9	4.7
77	4.7	4.5	4.5	4.5	100	4.4	6.0	4.3	4.8	4.5	4.6	4.5	4.6	4.5	4.5
78	5.3	6.6	4.9	5.1	100	5.1	10.0	5.0	5.4	5.2	5.0	5.1	5.2	5.1	5.2
69	6.1	5.7	5.5	5.4	100	5.6	9.5	5.3	5.5	5.4	5.6	5.5	5.9	5.5	5.6
81	5.0	4.4	4.8	5.0	100	4.9	8.8	5.2	5.2	4.8	4.9	5.0	4.9	5.0	5.0
82	5.9	5.4	5.4	5.4	100	6.5	8.7	5.4	5.8	5.4	5.4	5.6	5.6	5.7	5.5
83	6.5	5.7	5.8	5.7	100	5.8	7.5	5.5	6.0	5.6	5.6	5.6	5.7	5.7	5.8
84	5.1	5.2	4.9	4.9	100	5.0	6.0	4.8	5.3	5.1	5.2	4.9	4.8	5.4	4.9
85	5.3	5.0	5.1	5.1	100	5.0	6.2	4.8	5.5	5.0	5.0	5.1	5.2	5.2	5.2
86	6.1	5.9	5.7	5.8	100	5.7	8.6	5.6	5.7	5.6	5.7	5.7	5.9	5.8	5.7
87	5.5	5.3	5.4	5.5	100	5.4	6.4	5.3	5.7	5.2	5.3	5.4	5.5	5.5	5.3
88	6.1	5.8	5.8	6.0	100	5.9	7.5	6.0	6.2	5.8	6.1	6.0	6.3	6.1	6.1
89	5.8	5.5	5.6	5.8	100	5.8	8.4	5.4	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	4.8
90	5.2	5.1	5.2	5.2	100	5.1	7.6	4.9	5.4	5.1	4.9	5.9	5.1	5.0	5.2
91	6.4	5.8	6.1	6.6	100	6.4	8.8	5.6	6.2	8.5	6.6	7.0	7.0	6.2	6.3
92	6.5	7.0	6.9	6.5	100	6.8	9.6	6.4	6.7	6.6	6.9	6.6	6.9	6.6	6.5
93	5.0	5.0	5.0	5.1	100	4.9	7.1	4.9	5.0	4.9	5.0	5.0	5.1	5.0	4.9
94	6.7	6.5	6.4	6.8	100	6.5	8.6	6.1	7.0	6.4	6.7	7.0	6.7	6.5	6.4
71	5.6	5.6	5.7	5.6	100	5.6	9.2	5.2	5.3	5.3	5.4	5.5	5.5	5.5	5.3
95	4.4	4.5	4.2	4.8	100	4.6	7.0	4.4	4.4	4.5	4.6	4.7	4.6	4.6	4.7
96	5.5	5.6	5.3	5.5	100	6.0	9.8	5.3	5.4	5.3	5.6	5.5	5.6	5.5	5.5
73	5.8	6.0	5.7	5.8	100	6.0	7.4	5.6	5.8	5.6	5.7	5.6	5.8	5.7	5.6
139	5.7	5.7	5.9	5.9	100	5.7	10.0	5.5	6.0	5.5	5.5	5.7	5.6	5.7	5.9
140	5.4	5.5	5.3	5.5	100	5.4	10.8	5.2	5.4	5.2	5.3	5.3	5.4	5.4	5.2
138	5.1	5.2	5.0	4.9	100	5.1	10.2	4.9	5.4	5.0	5.1	5.2	5.1	5.2	5.0
141	5.0	5.3	5.2	5.3	100	5.3	9.0	5.3	5.5	5.2	5.4	5.2	5.2	5.4	5.4
142	5.8	5.6	5.6	5.5	100	5.7	9.7	5.5	5.7	5.4	5.6	5.6	5.6	5.7	5.6
143	6.3	6.0	5.7	5.6	100	6.1	9.9	5.8	6.0	5.2	5.9	5.8	5.9	5.9	5.6
152	5.4	5.8	5.8	5.8	100	5.8	8.3	5.7	6.0	5.8	5.9	5.8	6.0	5.9	5.9
153	5.9	6.3	6.0	6.1	100	6.1	8.7	6.2	6.1	6.0	6.0	5.9	5.9	6.0	6.2
151	6.8	7.1	6.9	6.9	100	7.0	9.9	6.8	6.9	6.6	6.8	7.0	7.3	7.4	7.1
154	6.3	6.4	6.2	6.2	100	6.3	8.4	6.3	5.5	5.9	6.3	6.2	6.2	6.4	6.4
145	6.4	6.7	6.5	6.6	100	6.6	8.6	6.3	6.6	6.5	6.5	6.7	6.7	6.7	6.6
155	5.8	5.5	5.5	5.6	100	5.6	7.2	5.6	5.5	5.4	5.4	5.5	5.5	5.7	5.6
157	6.1	6.2	6.3	6.4	100	6.1	9.0	6.0	6.0	6.1	6.1	6.2	6.4	6.5	6.3
158	6.3	6.5	6.7	6.5	100	6.7	10.0	6.3	6.4	6.4	6.2	6.3	6.5	6.5	6.3
156	5.4	5.7	5.5	5.7	100	5.7	8.9	5.6	5.5	5.3	5.4	5.5	5.6	5.6	5.7
144	5.7	5.6	5.6	5.7	100	5.6	8.1	5.6	5.8	5.7	5.7	5.7	5.8	5.7	5.9
159	5.3	5.4	5.4	5.4	100	5.5	7.6	5.5	5.5	5.3	5.3	5.4	5.5	5.4	5.5
160	6.3	6.5	6.1	6.2	100	6.5	8.7	6.1	5.4	5.0	6.1	6.2	6.2	6.3	6.2
133	4.7	4.9	4.7	5.0	100	4.7	8.8	4.6	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7	4.9	4.8
134	5.1	5.1	5.0	5.0	100	5.2	9.6	5.1	5.7	5.0	5.1	5.1	5.2	5.1	5.2
132	4.9	4.8	4.8	4.8	100	4.7	9.7	4.5	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.8	4.7
135	5.3	5.2	5.0	5.0	100	5.0	7.0	5.2	5.0	5.1	5.1	5.0	5.0	5.1	5.3
136	5.2	5.3	5.1	5.2	100	5.2	7.2	5.4	5.4	5.2	5.2	5.3	5.5	5.2	5.5
137	5.9	6.1	5.4	5.6	100	5.7	7.1	5.8	5.9	5.6	5.8	5.6	5.7	5.7	5.7

Ejemplo 20: Efecto protector de neuronas motoras del anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 en modelo ELA *in vitro* derivado de células iPS humanas

Células iPS humanas se mantienen y cultivan de acuerdo con las siguientes etapas. Células iPS humanas (201B7), crioconservadas en nitrógeno líquido utilizando Stem cell banker (TAKARA), se recogieron de la fase gaseosa de nitrógeno líquido e inmediatamente se suspendieron y descongelaron en 5 mL de un medio de cultivo de células iPS humanas (Essential 8, Thermo Fisher Scientific) precalentado a 37°C. La suspensión de células se recupera en un tubo cónico de 15 mL (Falcon) y se centrifuga (1000 rpm, 5 min, temperatura ambiente), seguido de la separación del sobrenadante. Las células se suspenden en un medio reciente y luego se diseminan a una placa de cultivo celular de $\phi 60$ mm (Falcon BD) recubierta con 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de vitronectina recombinante humana (Invitrogen) de antemano. 10 μM de Y-27632 (Wako Pure Chemical Industries) se añaden a ello y las células se mantienen y cultivan en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2 , 37°C). El reemplazo de medio se realiza cada día y las células se someten al experimento cuando alcanzan la confluencia.

El efecto protector de las neuronas motoras del anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 obtenido en el Ejemplo 16 en el modelo de ELA *in vitro* se evalúa de acuerdo con las siguientes etapas. El medio de cultivo de las células iPS humanas mantenidas y cultivadas se aspira y las células se lavan con 2 mL de PBS (Wako Pure Chemical Industries). Después de la aspiración de PBS, se añaden 500 μL de EDTA 0.5 mM a las células, las cuales se incuban después durante 2 a 3 minutos en una incubadora de CO_2 (5%

de CO₂, 37°C) (las células se confirman bajo un microscopio cada 30 segundos, y la incubación se interrumpe cuando se debilitó la asociación intercelular). La reacción de EDTA se termina mediante suspensión en 5 mL de un medio de cultivo de células iPS humanas, y las células se recuperan en un tubo cónico de 15 mL. Las células se centrifugan a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y el sobrenadante se aspira. La suspensión de células que contiene masas de células iPS humanas se inocula en una cantidad de aproximadamente 1/10 por pocillo en una placa de cultivo de células de 6 pocillos de baja adhesión (Nunclon Sphere, Nunc) y se cultiva en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C) utilizando un medio DFK (medio avanzado DMEM/F-12 (Invitrogen):Neurobasal (Invitrogen) [1:1] que contiene suplemento B27 al 2%, reemplazo de suero KnockOut al 5% (Invitrogen), L-glutamina 2 mmol/L, 100 unidades/mL de penicilina-100 µg/mL de estreptomicina y 0.1 mmol/L de β-mercaptoetanol) complementado con SB431542 2 µM (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich) y CHIR99021 3 µM (Sigma-Aldrich). El reemplazo de medio se realiza cada 2 días mediante el siguiente método. Primero, agregados de células (SFEBs) diferenciados en células iPS humanas se recuperan sobre una base de medio en un tubo cónico de 15 mL y se deja reposar a la temperatura ordinaria durante 5 minutos para precipitar las masas de células. Este sobrenadante se aspira y se añaden un medio DFK reciente y SB431542 2 µM (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich, CHIR99021 3 µM (Sigma-Aldrich) y luego se devuelven al pocillo original para el reemplazo del medio. El día de cultivo 8 los SFEBs se recuperan sobre una base de medio en un tubo cónico de 15 mL y se deja reposar

a la temperatura ordinaria durante 5 minutos para precipitar los SFEBS. Este sobrenadante se aspira y se añaden un medio DFK reciente y luego ácido retinoico 0.1 μM (Sigma-Aldrich) y purmorfamina 0.5 μM (Miltenyi Biotec), y después se devuelven al pocillo original y se cultivan en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2 , 37°C). El reemplazo de medio se realiza cada 2 días. El día de cultivo 12 los SFEBS se recuperan sobre una base de medio en un tubo cónico de 15 mL y se deja reposar a la temperatura ordinaria durante 5 minutos para precipitar los SFEBS. El sobrenadante se aspira y a las células se añaden 500 μL de Accumax (MS TechnoSystems), que después se pipetea varias veces y luego se incuban durante 5 minutos en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2 , 37°C). Las células se recogen de la incubadora, se suspenden en 5 mL de un medio DFK y se pipetea varias veces para dispersar las masas de células. La suspensión de células se disocia en células individuales mediante filtración a través de un filtro de células (Falcon). Después, el número de células se cuenta utilizando una cámara de recuento. La suspensión de células se recupera en otro tubo cónico de 15 mL y se centrifuga a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una suspensión que tiene una densidad de células de 5.5×10^5 células/mL se prepara con un medio de cultivo de neuronas motoras (medio avanzado DMEM/F-12 (Invitrogen):Neurobasal (Invitrogen) [1:1] que contiene suplemento B27 al 2%, suero de caballo al 1%, L-glutamina 2 mmol/L, 100 unidades/mL de penicilina-100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y 0.1 mmol/L de β -mercaptoetanol) y se inocula a razón de 200 μL /pocillo en una cámara de 8 pocillos que contiene astrocitos de tipo

salvaje derivados de ratón o astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) inoculados a razón de 8×10^4 células/pocillo de antemano. Las células co-cultivadas resultantes de los astrocitos y las neuronas motoras se utilizan en evaluación (el establecimiento, la congelación, descongelación, inoculación y el mantenimiento y cultivo de los astrocitos de tipo salvaje y los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) se realizan de la misma manera que en el Ejemplo 13). El número de neuronas motoras observadas mediante el co-cultivo de los astrocitos de tipo salvaje y las neuronas motoras se utilizan como control. Para el grupo tratado con fármaco, los astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A) y las neuronas motoras se co-cultivan bajo una condición que implica la adición de vehículo (IgG y agua ultra-pura al 0.1%) y el anticuerpo humanizado. Después del cultivo durante 2 días a 37°C en un entorno de 5% de CO₂ bajo cada una de las condiciones, las neuronas motoras se tiñen inmunocitoquímicamente con un anticuerpo anti-ISL1 (obtenido de Developmental Studies Hybridoma Bank) y Hoechst 33342 (Molecular Probes). Células ISL1/Hoechst 33342-copositivas por cada pocillo se cuentan como neuronas motoras vivas, y la tasa de supervivencia de las neuronas motoras se calcula como % con respecto al control.

La tasa de supervivencia de las neuronas motoras se reduce significativamente en el co-cultivo de neuronas motoras derivadas de astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A)/células iPS humanas. El anticuerpo humanizado descrito en la Tabla 5 suprimía, de una manera dependiente de la concentración, la muerte de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas, inducida por los

astrocitos que expresan SOD1 humano variante (G93A). Por consiguiente, se demuestra que el anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 fomenta la supervivencia de neuronas motoras en células humanas.

5 Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo que es capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y su ligando, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo como un ingrediente activo. El anticuerpo o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser útil en el tratamiento de enfermedades provocadas por la unión entre EphA4 y su ligando, por ejemplo, ELA.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

20

25

30