

Anticuerpo anti-EphA4 humano

Campo técnico

[0001]

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a EphA4, un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula que comprende el vector, un método de producción del anticuerpo, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo.

10

Estado de la técnica

[0002]

EphA4 es un miembro del receptor de la familia tirosina quinasa. Se conocen efrina tipo A y tipo B como ligandos para EphA4, y cuando EphA4 se une con la efrina, que es un ligando de la misma, se induce una señal de des-adhesión. Hasta ahora, se ha sugerido la implicación de EphA4 en la patología de la enfermedad de Alzheimer (a continuación en el presente documento, también denominada "AD") (Bibliografías no de patentes 1-4), y se ha informado que la inhibición de la unión entre EphA4 y efrina rescata la disfunción de neurotransmisión mediada por oligómero amiloide β ($A\beta$)₍₁₋₄₂₎ (Bibliografía de patentes 1). En AD, se cree que los agregados (ovillos neurofibrilares) formados por tau excesivamente fosforilados están implicados en la muerte de las células nerviosas (Bibliografía no de patentes 5), y también se ha informado que la supresión de la fosforilación de tau suprime la neurodegeneración de la desaparición de la sinapsis (Bibliografía no de patentes 6 y Bibliografía no de patentes 7), así como también mejora los déficits de memoria o la disfunción cognitiva (Bibliografías no de patentes 8-11). Hay informes que sugieren que la activación de CDK5 es una causa de fosforilación de tau (Bibliografía no de patentes 12 y Bibliografía no de patentes 13). Un ratón modificado genéticamente que expresa una mutación P301L que se ha encontrado en la demencia frontotemporal familiar (ratón rTg4510) es un ratón modelo AD, y de manera similar a AD, se encuentran hiperfosforilación de tau y acumulación

anormal de tau en células neuronales en el ratón. En el ratón rTg4510, los ovillos neurofibrilares, una característica patológica de AD, se forman y provocan la disfunción cognitiva por atrofia cerebral y pérdida de neuronas (Bibliografía no de patentes 14 y Bibliografía no de patentes 5).

[0003]

EphA4 se expresa abundantemente en el hipocampo o la corteza cerebral, y se escinde de manera dependiente de la actividad neuronal por la metaloproteasa de matriz (MMP), ADAM (una desintegrina y metaloproteinasa), y γ selectasa. Se sabe que esta reacción de escisión de EphA4 estabiliza la espina, que es una estructura clave en la función neuronal (Bibliografía no de patentes 15). Se ha notificado que la densidad de la espina se disminuye en AD (Bibliografía no de patentes 16), y puesto que también se confirma la disminución de los fragmentos escindidos de EphA4 en AD en las fases NFT V y VI, se cree que la reacción de escisión de EphA4 está implicada en la patología de AD (Bibliografía de no patente 17).

[0004]

Aunque el péptido KYL y el compuesto 1, etc., se conocen como fármacos inhibidores de EphA4 existentes (Bibliografía de patente 2, Bibliografía no de patentes 18, y Bibliografía no de patentes 19), no ha habido informes sobre un anticuerpo que tenga actividad que mejore la escisión de EphA4.

Lista de citas

[0005]

[Bibliografía de patente 1] W02016/019280A1

[Bibliografía de patente 2] W02012/156351A1

[0006]

[Bibliografía no de patentes 1] Vargas LM *et al.*, PLoS One. 21 de marzo de 2014; 9 (3)

[Bibliografía no de patentes 2] Fu AK *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 8 de julio de 2014; 111 (27): 9959-64

[Bibliografía no de patentes 3] Rosenberger AF *et al.*, Acta Neuropathol Commun. 16 de julio de 2014; 2: 79

[Bibliografía no de patentes 4] Huang TY *et al.*, J Exp Med. 4 de diciembre de 2017; 214 (12): 3669-3685.

[Bibliografía no de patentes 5] Santa Cruz *et al.*, Science. 15 de julio de 2005; 309 (5733): 476-81

5 [Bibliografía no de patentes 6] Seo J *et al.*, J Neurosci. 11 de octubre de 2017; 37 (41): 9917-9924

[Bibliografía no de patentes 7] Patrick GN *et al.*, Nature. 9 de diciembre de 1999; 402 (6762): 615-22.

10 [Bibliografía no de patentes 8] Onishi T *et al.*, J Neurochem. diciembre de 2011; 119 (6): 1330-40

[Bibliografía no de patentes 9] Belfiore R *et al.*, Aging Cell. Febrero de 2019; 18 (1): e12873.

[Bibliografía no de patentes 10] Webster SJ *et al.*, Front Genet. 23 de abril de 2014; 5: 88.

15 [Bibliografía no de patentes 11] Grayson B *et al.*, Behav Brain Res. 15 de mayo de 2015; 285: 176-93.

[Bibliografía no de patentes 12] Cancino GI *et al.*, Neurobiol Aging. julio de 2011; 32 (7): 1249-61.

20 [Bibliografía no de patentes 13] Vargas LM *et al.*, Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. abril de 2018; 1864: 1148-1159.

[Bibliografía no de patentes 14] Ramsden M *et al.*, J Neurosci. 16 de noviembre de 2005; 25 (46): 10637-47.

[Bibliografía no de patentes 15] Inoue E *et al.*, J Cell Biol. 4 de mayo de 2009; 185 (3): 551-64

25 [Bibliografía no de patentes 16] Boros *et al.*, Ann Neurol. octubre de 2017; 82 (4): 602-614

[Bibliografía no de patentes 17] Matsui C *et al.*, Brain Pathol. noviembre de 2012; 22 (6): 776-87. doi: 10.1111/j.1750-3639

30 [Bibliografía no de patentes 18] Goldshmit *et al.*, PLoS one. 2011; 6 (9): e24636

[Bibliografía no de patentes 19] Van Hoecke *et al.*, Nature Medicine. septiembre de 2012; 18 (9): 1418-22,2012

Sumario de la Invención

35 Problemas a Resolver por la Invención

[0007]

El objeto de la presente descripción es proporcionar un anticuerpo anti-EphA4 que puede unirse a EphA4 y potenciar la escisión de EphA4, así como una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como el principio activo.

5

Medios para Resolver los Problemas

[0008]

Como resultado de una extensa investigación para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores obtuvieron un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 de ratón que puede unirse a EphA4 y potenciar la escisión de EphA4, y produjeron un anticuerpo humanizado del anticuerpo para así completar el anticuerpo de interés.

[0009]

15 La presente descripción abarca las siguientes características.

(1) Un anticuerpo anti-EphA4, en el que

el anticuerpo anti-EphA4 comprende cadenas pesada y ligera, y comprende:

20 (a) una CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 44;

(b) una CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 27;

25 (c) una CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 28;

(d) una CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29;

(e) una CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 30; y

30 (f) una CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 31.

[0010]

(2) El anticuerpo anti-EphA4 según (1), en el que el anticuerpo anti-EphA4 es humanizado.

35 [0011]

(3) El anticuerpo anti-EphA4 según (1) o (2), en el que el

anticuerpo anti-EphA4 se une específicamente a EphA4 y potencia la escisión de EphA4.

[0012]

5 (4) El anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (3), en el que el anticuerpo anti-EphA4 se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y efrina.

[0013]

10 (5) El anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (4), en el que la región variable de la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 45, y la región variable de la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 46.

[0014]

15 (6) El anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (5), en el que la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos derivados de un anticuerpo humano.

20 [0015]

(7) El anticuerpo anti-EphA4 según (6), en el que la región constante de la cadena pesada es la región constante de IgG humano.

[0016]

25 (8) El anticuerpo anti-EphA4 según (7), en el que la región constante de IgG humano es la región constante de IgG₂ humano.

[0017]

30 (9) El anticuerpo anti-EphA4 según (8), en el que la región constante de IgG₂ humano comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 47.

[0018]

35 (10) El anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (6) - (9), en el que la región constante de la cadena ligera es la región constante de Igkhumano.

[0019]

(11) El anticuerpo anti-EphA4 según (10), en el que la región constante de Igκ humano comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 48.

5 [0020]

(12) Un anticuerpo anti-EphA4, en el que el anticuerpo anti-EphA4 comprende cadenas pesada y ligera, La cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 59, y

10 la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 60.

[0021]

(13) El anticuerpo anti-EphA4 según (12), en el que se suprime la lisina C-terminal de la cadena pesada.

15 [0022]

(14) Un anticuerpo anti-EphA4, en el que el anticuerpo anti-EphA4 comprende cadenas pesada y ligera, La cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 59,

20 la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 60, y

se suprime la lisina C-terminal de la cadena pesada.

[0023]

25 (15) Un ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14).

[0024]

(16) Un vector que comprende el ácido nucleico según (15).

[0025]

(17) Una célula huésped que comprende el vector según (16).

30 [0026]

(18) Un método de producción de un anticuerpo anti-EphA4, que comprende una etapa de cultivar la célula huésped según (17).

[0027]

35 (19) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14).

[0028]

(20) Una composición farmacéutica según (19), en la que la composición farmacéutica comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

[0029]

5 (21) La composición farmacéutica según (19) o (20), para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

[0030]

(22) El anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14) para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10 [0031]

(23) Un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14).

15 [0032]

(24) Uso del anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14) para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

[0033]

20 (25) La composición farmacéutica según (19) o (20), para el tratamiento de la tauopatía.

[0034]

(26) El anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14) para su uso en el tratamiento de la tauopatía.

25 [0035]

(27) Un método para el tratamiento de la tauopatía, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14).

30 [0036]

(28) Uso del anticuerpo anti-EphA4 según cualquiera de (1) - (14) para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la tauopatía.

[0037]

35 (29) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según cualquiera de (25)

- (28), donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer o la degeneración lobular frontotemporal con patología tau.

[0038]

5 (30) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (29), donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer.

[0039]

10 (31) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (29), donde la tauopatía es la degeneración lobular frontotemporal con patología tau.

[0040]

15 (32) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (31), donde la degeneración lobular frontotemporal con patología tau es parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia de granos argirófilos, demencia senil del tipo de ovillos neurofibrilares, o enfermedad de Pick.

[0041]

20 (33) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (32), donde la degeneración lobular frontotemporal con patología tau es parálisis supranuclear progresiva.

[0042]

25 (34) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (32), donde la degeneración lobular frontotemporal con patología tau es degeneración corticobasal.

[0043]

30 (35) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (32), donde la degeneración lobular frontotemporal con patología tau es demencia de granos argirófilos.

[0044]

35 (36) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (32), donde la

degeneración lobular frontotemporal con patología tau es demencia senil del tipo de ovillos neurofibrilares.

[0045]

5 (37) La composición farmacéutica, el anticuerpo anti-EphA4, el método para el tratamiento, o el uso según (32), donde la degeneración lobular frontotemporal con patología tau es la enfermedad de Pick.

Efectos de la Invención

10 [0046]

La presente descripción proporciona un anticuerpo anti-EphA4 que puede unirse a EphA4 y potenciar la escisión de EphA4, un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula que comprende el vector,
15 un método de producción del anticuerpo, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como el principio activo.

Breve Descripción de los Dibujos

[0047]

20 La figura 1 muestra la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) frente a EphA4 de ratón y ser humano.

La figura 2 muestra la actividad de mejora de la escisión de EphA4 del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) que
25 emplea neuronas del hipocampo.

La figura 3 muestra la actividad inhibitoria de unión a ligando de EphA4-ratón de ratón del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A).

La figura 4 muestra la actividad inhibitoria de unión a
30 ligando de EphA4-humano de humano del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A).

La figura 5 muestra la selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) frente a cada receptor Eph humano.

35 La figura 6 muestra la selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) frente a cada receptor Eph

de ratón.

La figura 7 muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) frente a EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano.

5 La figura 8 muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) frente a la región extracelular de EphA4 humano (ECD), dominio de unión a ligando (LBD), dominio 1 de fibronectina tipo III (FN1), y dominio 2 de fibronectina tipo III (FN2).

10 La figura 9 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) sobre el aumento del número de espinas en la neurona del hipocampo.

La figura 10 muestra el efecto para suprimir la fosforilación de tau del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 *in vivo*.

15 La figura 11A muestra los aminoácidos del dominio de unión al ligando EphA4 (EphA4-LBD) en el eje horizontal, y la región estructural del anticuerpo A-Fab en el eje vertical. Las partes en negro muestran los puntos de combinación de las intersecciones donde está presente la interacción.

20 La figura 11B muestra la estructura de superficie del dominio de unión al ligando EphA4 (EphA4-LBD). En la figura 11B, los nombres de aminoácidos y los números de residuos contenidos en la región de unión se muestran en las posiciones correspondientes, y las CDR de la cadena H y cadena L del anticuerpo de unión A-Fab se muestran en un modelo de cinta.

La figura 12 muestra la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) frente a EphA4 humano.

30 La figura 13 muestra la actividad de mejora de la escisión de EphA4 del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) en la neurona del hipocampo.

La figura 14 muestra la actividad inhibitoria de unión a ligando de EphA4-humano de ser humano del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B).

35 La figura 15 muestra la actividad inhibitoria de unión a ligando de EphA4-ratón de ratón del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B).

La figura 16 muestra la selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) frente al receptor Eph humano.

La figura 17 muestra la selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) frente al receptor Eph de ratón.

La figura 18 muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) frente a EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano.

La figura 19 muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) frente a la región extracelular de EphA4 humano (ECD), dominio de unión a ligando (LBD), dominio 1 de fibronectina tipo III (FN1), y dominio 2 de fibronectina tipo III (FN2).

La figura 20 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) sobre el aumento del número de espinas en la neurona del hipocampo.

La figura 21 muestra la actividad de mejora de la escisión de EphA4 humano del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) en la neurona del hipocampo.

La figura 22 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) a través de MMP y ADAM sobre el aumento del número de espinas en la neurona del hipocampo.

La figura 23 muestra el efecto para suprimir la fosforilación de tau del Anticuerpos anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado (anticuerpo B) *in vivo*.

Descripción de las realizaciones

[0048]

Las regiones especificadas o codificadas por las SEQ ID NOs. usadas en el presente documento son tal como sigue:

Seq No.	Región de la Secuencia	SEQ No	Región de la Secuencia
1	EphA4 de ratón (secuencia de aminoácidos)	32	EphA4 de mono (secuencia de aminoácidos)

2	Región extracelular de EphA4 de ratón (secuencia de aminoácidos)	33	Región extracelular de EphA4 de mono (secuencia de aminoácidos)
3	Proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His (secuencia de aminoácidos)	34	Secuencia señal de de EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)
4	Secuencia señal de EphA4 de ratón (secuencia de aminoácidos)	35	Secuencia señal de preprotipsina (secuencia de aminoácidos)
5	EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)	36	Región extracelular de EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)
6	Región extracelular de EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)	37	Dominio de unión a ligando de EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)
7	OligoADN ad29S (secuencia de ácido nucleico)	38	Dominio 1 de fibronectina tipo III de EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)
8	OligoADN ad29AS (secuencia de ácido nucleico)	39	Dominio 2 de fibronectina tipo III de EphA4 humano (secuencia de aminoácidos)
9	Cebador directo 5' (secuencia de ácido nucleico)	40	Cadena ligera FR IGKV1-17*01 de anticuerpo humano (secuencia de aminoácidos)
10	Cebador inverso 3' para cadena pesada de IgG de ratón (secuencia de ácido nucleico)	41	Cadena ligera FR JK4 de anticuerpo humano (secuencia de aminoácidos)
11	Cebador inverso 3' para cadena ligera de Igκ de ratón (secuencia de ácido nucleico)	42	Cadena pesada FR IGHV3-33*03 de anticuerpo humano (secuencia de aminoácidos)
12	Secuencia señal de	43	Cadena pesada FR JH6 de

	cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)		anticuerpo humano (secuencia de aminoácidos)
13	Región variable de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	44	CDR1 de cadena pesada del anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
14	Secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	45	Región variable de cadena pesada HK2-42 de anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
15	Región variable de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	46	Región variable de cadena ligera L1-8 de anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
16	Secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	47	Región constante de cadena pesada de IgG ₂ humano de anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
17	Región variable de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	48	Región constante de cadena ligera de Igκ humano de anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
18	Secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	49	CDR1 de cadena pesada del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
19	Región variable de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	50	CDR2 de cadena pesada del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
20	Cebador directo 5' para la cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	51	CDR3 de cadena pesada del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
21	Cebador directo 5' para	52	CDR1 de cadena ligera del

	la cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)		anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
22	Cebador inverso 3' para la cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	53	CDR2 de cadena ligera del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
23	Cebador inverso 3' para la cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de ácido nucleico)	54	CDR3 de cadena ligera del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
24	Región constante de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	55	Región variable de cadena pesada HK2-42 de anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
25	Región constante de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	56	Región variable de cadena ligera L1-8 de anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
26	CDR1 de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	57	Región constante de cadena pesada de IgG ₂ humano de anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
27	CDR2 de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	58	Región constante de cadena ligera de Igκ humano de anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
28	CDR3 de cadena pesada del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	59	Secuencia de longitud completa de cadena pesada del anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
29	CDR1 de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	60	Secuencia de longitud completa de cadena ligera del anticuerpo B (secuencia de aminoácidos)
30	CDR2 de cadena ligera	61	Secuencia de longitud

	del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)		completa de cadena pesada del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)
31	CDR3 de cadena ligera del anticuerpo A (secuencia de aminoácidos)	62	Secuencia de longitud completa de cadena ligera del anticuerpo B (secuencia de ácido nucleico)

[0049]

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

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción es un anticuerpo que puede reconocer y unirse a EphA4, y tal como se describe a continuación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto, o puede ser un anticuerpo sintético (tal como un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y similares), siempre que tiene afinidad de unión con EphA4. EphA4 en el presente documento puede entenderse como una referencia a EphA4 derivado de ser humano, ratón, rata y mono. EphA4 derivado de ser humano, ratón, rata y mono puede obtenerse de una base de datos pública donde se registra la información de secuencia, tal como Genbank proporcionado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos, o la información de la secuencia del gen EphA4 puede obtenerse diseñando cebadores basados en la información de secuencia base de EphA4 de una especie animal estrechamente relacionada, y luego clonando a partir de ARN extraído de la especie animal deseada. Por ejemplo, la información de la secuencia base de EphA4 de ser humano, ratón, rata, y mono está registrada en la base de datos como los Nos. de registro de Genbank NM_004438.5, NM_007936.3, NM_001162411.1, y NM_001260870.1, respectivamente.

[0050]

En un aspecto, el anticuerpo anti-EphA4 es un anticuerpo que se une específicamente a EphA4. La expresión "se une específicamente" es una expresión bien conocida por los expertos

en campo técnico pertinente, y también se conocen bien métodos para determinar la unión específica de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un antígeno o un epítipo. En una realización, "unión específica" se entiende que el anticuerpo anti-EphA4 puede unirse a EphA4 por reacción inmunológica con una mayor afinidad de unión y actividad de unión, más rápidamente, y/o durante un período de tiempo más largo en comparación con cuando se une con otras moléculas diana. Esto no significa que el anticuerpo que se une específicamente a EphA4 no se una a otras moléculas diana. En otra realización, la "unión específica" puede mostrarse mediante un anticuerpo que tiene una KD frente a EphA4 de al menos aproximadamente 10^{-7} M, o al menos aproximadamente 10^{-8} M, o al menos aproximadamente 10^{-9} M, o inferior. Además, en otra realización adicional, se entiende que "unión específica" se une a EphA4 por reacción inmunológica pero no se une sustancialmente a otras moléculas de la familia del receptor Eph.

[0051]

En un aspecto, el anticuerpo anti-EphA4 es un anticuerpo que se une a la región extracelular de EphA4. En una realización, el anticuerpo anti-EphA4 es un anticuerpo que se une al dominio de unión a ligando (LBD) entre las regiones extracelulares de EphA4.

[0052]

En una realización, el anticuerpo anti-EphA4 puede unirse específicamente a EphA4 y potenciar la escisión de EphA4. En una particular realización, el anticuerpo anti-EphA4 puede unirse específicamente a EphA4 y potenciar la escisión del dominio extracelular de EphA4 mediante metaloproteasa de la matriz (MMP) o ADAM (una desintegrina y metaloproteinasa).

[0053]

En una realización, el anticuerpo anti-EphA4 puede unirse específicamente a EphA4 y inhibir la unión entre EphA4 y efrina que es un ligando del mismo.

[0054]

En otra realización, el anticuerpo anti-EphA4 puede unirse

específicamente a EphA4 y aumentar el números de espinas en la neurona del hipocampo o estabilizar las espinas en la neurona del hipocampo.

[0055]

5 En una realización, la presente descripción abarca un anticuerpo anti-EphA4 que puede unirse específicamente a al menos uno de EphA4 de ser humano, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión con un ligando del mismo. En otra realización, la presente descripción abarca un anticuerpo anti-
10 EphA4 que puede unirse específicamente a dos o más de EphA4 de ser humano, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión con un ligando del mismo. En otra realización adicional, la presente descripción abarca un anticuerpo anti-EphA4 que puede unirse específicamente a todos de EphA4 de ser humano, EphA4 de
15 ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión con un ligando del mismo.

[0056]

Para el método para medir la propiedad de unión al antígeno (tal como afinidad de unión y reactividad entre especies) del
20 anticuerpo anti-EphA4, pueden emplearse métodos bien conocidos por los expertos en la técnica en el campo técnico pertinente. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir usando, sin carácter limitante, un biosensor Biacore™, biosensor KinExA, ensayo de centelleo por proximidad, ELISA, inmunoensayo ORIGEN
25 (IGEN), citometría de flujo, desactivación fluorescente, metástasis fluorescente, presentación en levaduras y/o inmunotinción. La actividad neutralizante del anticuerpo anti-EphA4 frente a la unión entre EphA4 y un ligando del mismo puede medirse usando, pero sin limitarse a, biosensor Biacore™, ELISA
30 y/o citometría de flujo.

[0057]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser un anticuerpo monoclonal siempre que se una a EphA4.

[0058]

35 El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser de cualquier clase tal como IgG, IgA, o IgM (o subclases

de los mismos), y no se limita a una clase particular. Las inmunoglobulinas se clasifican en diferentes clases dependiendo de la secuencia aminoacídica de la región constante de la cadena pesada (puede denominarse cadena H) del anticuerpo. Existen cinco
5 clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y algunas de estas pueden estar subdivididas además en subclases (isotipos) de por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Las regiones constantes de la cadena pesada correspondiente a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ ,
10 respectivamente. Además, los tipos de la cadena ligera (pueden denominarse cadena L) del anticuerpo son la cadena λ y la cadena κ . El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser un anticuerpo IgG, por ejemplo, puede ser un anticuerpo IgG₁ o un anticuerpo IgG₂, y similares. Además, el anticuerpo anti-
15 EphA4 según la presente descripción puede estar en algunos casos en forma de un monómero, un dímero, o un multímero.

[0059]

La región variable del anticuerpo según la presente descripción puede significar la región variable de la cadena
20 ligera del anticuerpo y/o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, y la región constante del anticuerpo puede significar la región constante de la cadena ligera del anticuerpo y/o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera están
25 constituidas cada una por cuatro regiones de armazón (FR, por sus siglas en inglés) conectadas por tres CDR, también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad. Las CDR en cada una de las cadenas se mantienen en proximidad mediante las FR y junto con las CDR en la otra cadena contribuyen a la formación
30 del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Las tecnologías para determinar CDR incluyen, sin carácter limitante, por ejemplo, (1) una estrategia basada en la variabilidad de la secuencia entre especies (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., 1991, National Institutes of
35 Health, Bethesda MD); y (2) una estrategia basada en estudios de la estructura cristalina de complejos antígeno-anticuerpo (Al-

lazikani et al., 1997 *J. Molec. Biol.* 273: 927-948). Estas y otras estrategias se pueden utilizar combinadas.

[0060]

En el presente documento un anticuerpo monoclonal se puede referir a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente uniforme. En otras palabras, los anticuerpos individuales contenidos en la población son idénticos excepto por los mutantes naturales que pueden estar presentes posiblemente en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales están frente a sitios antigénicos únicos, y son muy específicos. Además, a diferencia de un anticuerpo policlonal típico que ataca diferentes antígenos o diferentes epítomos, cada anticuerpo monoclonal ataca un único epítomo de un antígeno. El modificador "monoclonal" indica la propiedad de un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente uniforme y no se debe entender que se limita a requerir la producción del anticuerpo mediante un método particular.

[0061]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo quimérico es, por ejemplo, un anticuerpo donde la región variable de anticuerpo no humano (tal como de un ratón o una rata) se fusiona con la región constante de un anticuerpo humano y, por ejemplo, puede referirse a un anticuerpo donde la región variable procede de un anticuerpo no humano y la región constante procede de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es, por ejemplo, un anticuerpo donde una región determinante de la complementariedad (CDR (puede también denominarse como una región hipervariable de anticuerpo no humano se introduce en un anticuerpo humano y, por ejemplo, puede referirse a un anticuerpo donde la CDR procede de un anticuerpo no humano y las regiones restantes del anticuerpo restantes proceden de un anticuerpo humano. Nótese que no es necesario que el límite entre un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado sea claro, y un anticuerpo puede estar en un estado que se puede denominar un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Además, en un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, la región del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano (FR, región constante) no necesariamente tiene que estar compuesta de aminoácidos derivados de un anticuerpo humano, y puede comprender uno o múltiples aminoácidos derivado de un anticuerpo no humano, siempre que pueda usarse normalmente en un sujeto humano. Una realización de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo donde la CDR se deriva de un anticuerpo de roedor y las regiones restantes del anticuerpo se derivan de un anticuerpo humano. Una realización particular de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo donde la CDR se deriva de un anticuerpo de ratón y las regiones restantes del anticuerpo se derivan de un anticuerpo humano. En estas realizaciones, la CDR puede comprender uno o múltiples aminoácidos derivados de un anticuerpo de no roedor o uno o múltiples aminoácidos derivados de un anticuerpo de no ratón, y las regiones de anticuerpo distintas de la CDR puede comprender uno o múltiples aminoácidos derivados de un anticuerpo no humano. Aquí, "múltiple" es, pero no se limita a, 2 - 20, o 2 - 15, como 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2, o dentro del 10%, dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6%, dentro del 5%, dentro del 4%, dentro del 3%, dentro del 2% o dentro del 1% del número de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos. La humanización puede realizarse con un método de trasplante de CDR (Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001) y Tsurushita *et al.*, *Methods* 36: 69-83 (2005)), y además también puede realizarse sustituyendo la secuencia de CDR con una correspondiente secuencia en el anticuerpo humano con métodos bien conocidos en el campo técnico pertinente (véase por ejemplo, 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)).

[0062]

Con el fin de disminuir la antigenicidad, puede ser importante seleccionar el uso de regiones variables humanas tanto en cadenas ligeras como pesadas en la preparación del anticuerpo humanizado. Según el método de "ajuste óptimo", la secuencia de

región variable de el anticuerpo del roedor se selecciona frente a toda la biblioteca de secuencias de FR humanas conocidas. Después de esto, una secuencia de anticuerpo que sea la más cercana a la secuencia del anticuerpo de roedores se acepta como la FR humana 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 emplea un armazón particular procedente de una secuencia común en todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de la cadena ligera o pesada. Se puede emplear el mismo armazón para diferentes 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).

[0063]

Además, en general, es deseable que el anticuerpo humanizado mantenga la afinidad de unión elevada contra el antígeno y otras propiedades biológicas preferidas. Para este fin, según un método, se preparan anticuerpos humanizados por una etapa de análisis de la secuencia parental y diversos productos humanizados conceptuales empleando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. En general, se pueden disponer de modelos tridimensionales de inmunoglobulinas y es conocido por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar programas de ordenador que ilustren y presenten conformaciones tridimensionales prometedoras de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La investigación de estas presentaciones permitirá el análisis de posibles papeles de los residuos en las funciones de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de las inmunoglobulinas candidatas para unirse a sus antígenos. Con este método, los residuos de FR pueden seleccionarse del receptor y las secuencias importadas y usarse en combinación de modo que las propiedades del anticuerpo deseables tales como el aumento de la afinidad de unión a uno o varios antígenos diana (tal como EphA4 o un fragmento del mismo).

[0064]

Huelga decir que un anticuerpo con la alteración apropiada (tal como la modificación del anticuerpo, o la sustitución parcial, la adición y/o la delección de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo) en el anticuerpo quimérico o humanizado, ejemplificado anteriormente, conservando la función del anticuerpo (o con el fin de añadir o mejorar la función del anticuerpo) también se abarca en el anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción. Más específicamente, un anticuerpo que tiene alteración en la secuencia de aminoácidos de la región constante con el fin de modificar la función efectora del anticuerpo también se incluye en el alcance de la presente descripción. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene valina (Val) en la posición 234 (numeración Eu) del anticuerpo IgG₂ humano sustituido con alanina (Ala) y que tiene glicina (Gly) en la posición 237 sustituida con alanina (Ala) para reducir la célula dependiente de anticuerpos la actividad de citotoxicidad (ADCC) y/o la actividad de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), etc., también se incluye en el alcance de la presente descripción. Además, un anticuerpo biespecífico que tiene un sitio de unión a anticuerpo que tiene la secuencia de CDR del anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción junto con un sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno diferente (Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97) también se incluye en el alcance de la presente descripción.

[0065]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede modificarse según se desee. La modificación del anticuerpo anti-EphA4 puede ser una modificación que cambia (a) la estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos en la región que va a modificarse tal como una conformación en lámina o hélice etc.; (b) la carga o el estado hidrófobo de la molécula en el sitio diana; o (c) el efecto de la modificación en el mantenimiento del volumen de la cadena lateral, o puede ser una modificación mediante la cual no se observen claramente estos cambios.

[0066]

La modificación del anticuerpo anti-EphA4 según la presente

descripción puede conseguirse mediante, por ejemplo, sustitución, delección, adición, y similares de los residuos de aminoácidos constituyentes.

[0067]

5 En la presente, un aminoácido se utiliza en su sentido más amplio, e incluye no solo aminoácidos naturales tales como 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
 10 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. Los expertos en la técnica entenderán naturalmente a la luz de esta amplia definición que, por ejemplo,
 15 L-aminoácidos; D-aminoácidos; aminoácidos modificados químicamente tales como variantes de aminoácidos y derivados de aminoácidos; aminoácidos que no serán componentes proteicos en el cuerpo como norleucina, β -alanina y ornitina; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades de aminoácidos
 20 bien conocidas por los expertos en la técnica, y similares se incluyen como los aminoácidos de la presente memoria descriptiva. Los ejemplos de un aminoácido no natural pueden incluir α -metilaminoácidos (tales como α -metilalanina), D-aminoácidos (tales como ácido D-aspártico y ácido D-glutámico), aminoácidos
 25 similares a la histidina (tales como 2-aminohistidina, β -hidroxihistidina, homohistidina, α -fluorometilhistidina y α -metilhistidina), aminoácidos que tienen exceso de metileno en sus cadenas laterales (homoaminoácidos) y aminoácidos donde en el aminoácido el grupo funcional carboxilato en la cadena lateral es
 30 reemplazado por un grupo ácido sulfónico (tal como ácido cisteico).

[0068]

Los residuos aminoacídicos de origen natural se pueden clasificar en, por ejemplo, los grupos a continuación en función
 35 de las propiedades generales de la cadena lateral:

(1) Hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- (2) Hidrófilos neutros: Asn, Gln, Cys, Ser, Thr;
- (3) Ácidos: Asp, Glu;
- (4) Básicos: His, Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0069]

Se puede realizar sustitución no conservadora de la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo intercambiando un aminoácido que pertenece a uno de estos grupos por un aminoácido que pertenece a otro grupo. Se puede realizar una sustitución más conservadora intercambiando un aminoácido que pertenece a uno de estos grupos con otro aminoácido en el mismo grupo. De igual manera, se puede realizar de manera apropiada la

[0070]

La modificación de los aminoácidos que configuran el anticuerpo puede ser, por ejemplo, glicosilación por un hidrato de carbono o modificaciones postraduccionales tales como acetilación o fosforilación. El anticuerpo puede estar glicosilado en una posición conservada en su región constante. La glicosilación de un anticuerpo se produce habitualmente mediante la unión en N o unión en O. Unido a N significa la unión de un porción hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de 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 la porción hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Cuando una de estas secuencias de tripéptidos está presente en el anticuerpo, está presente un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O puede ser la unión de o bien N-acetilgalactosamina, galactosa o bien xilosa a un aminoácido con hidroxilo (tal como serina o treonina), y en algunos casos puede ser la unión a 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Los expertos en la técnica pueden seleccionar de manera apropiada la condición de

glicosilación (tal como el tipo de célula huésped o medio celular y pH etc., cuando se realiza la glicosilación con un medio biológico) según el objetivo.

[0071]

5 El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede modificarse adicionalmente por otros métodos de modificación, solo o en combinación, basándose en conocimientos técnicos comunes bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0072]

10 El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción se puede producir mediante un método con el que estén familiarizados los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede producirse integrando el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción en una vector
15 de expresión, introduciendo el vector de expresión en una célula huésped, y cultivando la célula huésped. Por consiguiente, la presente descripción abarca un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-EphA4, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula huésped que comprende el vector, y un método
20 de producir el anticuerpo anti-EphA4 que comprende una etapa de cultivar la célula huésped.

[0073]

El ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede tener ADN que codifica
25 para una secuencia señal, o puede tener ADN que codifica para una secuencia señal en el 5' terminal del ADN que codifica para la región variable de cadena pesada y el ADN que codifica para la región variable de cadena ligera. Una secuencia señal son los residuos de aminoácidos presentes en el terminal N de la proteína
30 que es necesaria para que una proteína secretora o una proteína de membrana integral pase a través de la bicapa lipídica después de ser sintetizada en un ribosoma, y en la presente descripción, no es particularmente limitado siempre que sea una secuencia que tenga esta función. La secuencia señal que puede estar contenida
35 en el anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción incluyen secuencias señal derivadas de ser humano, ratón, rata, conejo,

burro, cabra, caballo, pájaro, perro, gato, levaduras y similares. Específicamente, en la presente descripción, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 12 o 16 puede incluirse como una secuencia señal relacionada con la cadena pesada y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 14 o 18 puede incluirse como una secuencia señal relacionada a la cadena ligera. Además, siempre que sea funcionalmente equivalente, la secuencia señal puede tener sustitución, adición y/o delección de uno o múltiples aminoácidos (tal como 2, 3, 4, o 5) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 12 o 16 y la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 14 o 18.

[0074]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser el aislado o purificado según un método bien conocido por los expertos en la técnica.

[0075]

"Aislado" o "purificado" en el presente documento significa aislado o purificado de manera artificial de su estado natural. Si la molécula o composición se produce de manera natural, está "aislada" o "purificada" cuando se ha mudado o separado del entorno original, o ambos. Los ejemplos de un método de aislamiento o purificación incluyen, sin carácter limitante, medios por electroforesis, biología molecular, inmunología o cromatografía, y similares, específicamente, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de HPLC de fase inversa, enfoque isoelectrico, o método de extracción de álcali, y similares.

[0076]

En una realización, el anticuerpo anti-EphA4 comprende las siguientes CDR:

(a) una CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 44;

(b) una CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 27;

(c) una CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de

aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 28;

(d) una CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29;

(e) una CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 30; y

(f) una CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 31.

[0077]

En una realización, el anticuerpo anti-EphA4 es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, y en una realización particular de un anticuerpo humanizado.

[0078]

En otra realización, el anticuerpo anti-EphA4 comprende cadenas pesada y ligera, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 45, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 46. Obsérvese que en la realización, la región variable de la cadena pesada y/o la región variable de la cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene uno o múltiples aminoácidos sustituidos, añadidos, y/o delecionados en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 45 y/o la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 46. Aquí, "múltiple" no se limita siempre que mantiene la afinidad de unión hacia EphA4 y potencie la división de EphA4, y sea 2 - 15, o 2 - 10, como 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2, o dentro del 10%, como dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6%, dentro del 5%, dentro del 4%, dentro del 3%, dentro del 2% o dentro del 1% de la cantidad de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos.

[0079]

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA4 comprende la región constante de IgG₂ humano.

[0080]

En una realización particular, la región constante de IgG₂ humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 47.

[0081]

En una realización, la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA4 comprende la región constante de Igκ humano.

[0082]

En una realización particular, la región constante de Igκ humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 48.

[0083]

En una realización, el anticuerpo anti-EphA4 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 59 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 60.

[0084]

En otra realización, por ejemplo, por razones tales como la disminución de la falta de uniformidad de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos (Publicación de Solicitud de patente EE.UU. No. 2010/0297697 o Liu H *et al.*, MAb. 2014 sep-cct; 6 (5): 1145-1154), el anticuerpo anti-EphA4 tiene lisina posicionada en el C-terminal (terminal carboxilo) de la cadena pesada suprimida. En la presente descripción, un anticuerpo anti-EphA4 que tiene la lisina C-terminal de la cadena pesada eliminada también incluye un anticuerpo anti-EphA4 que tiene la lisina C-terminal de la cadena pesada eliminada por modificación genética o un anticuerpo anti-EphA4 que tiene el Lisina C-terminal de la cadena pesada escindida después de la traducción por carboxipeptidasa, etc., y similares. Además, en la presente descripción, un anticuerpo anti-EphA4 que tiene la lisina C-terminal de la cadena pesada suprimida incluye no solo un anticuerpo anti-EphA4 que tiene la lisina C-terminal suprimida en ambas cadenas pesadas, pero también un anticuerpo anti-EphA4 que tiene la lisina C-terminal suprimida en solo una cadena pesada.

[0085]

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo anti-EphA4. Un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo anti-EphA4 se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifica para la cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo anti-EphA4. En una realización, el ácido nucleico según la presente

descripción codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA4. En otra realización, el ácido nucleico según la presente descripción codifica para la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA4. En otra realización adicional, el ácido nucleico según la presente descripción codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-EphA4. El ácido nucleico según la presente descripción también incluye una primera molécula de ácido nucleico que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA4 y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica para la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA4.

[0086]

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo anti-EphA4. El vector según la presente descripción se refiere a uno o más vectores que comprende el ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo anti-EphA4. En una realización, el vector según la presente descripción es un vector que comprende el ácido nucleico que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA4 y el ácido nucleico que codifica para la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA4. En otra realización, el vector según la presente descripción es un vector que comprende el ácido nucleico que codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-EphA4. En otra realización adicional, el vector según la presente descripción comprende un primer vector que comprende el ácido nucleico que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA4 y un segundo vector que comprende el ácido nucleico que codifica para la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA4. El vector según la presente descripción puede ser, pero no se limita a, un plásmido, un cósmido, un virus, un fago, y similares. Por ejemplo, como vector viral, el vector retroviral, lentiviral, adenoviral, viral asociado a adeno o virus del herpes simple y similares también se incluyen en el vector según la presente descripción.

[0087]

Aún en otro aspecto, una célula huésped que comprende el vector según la presente descripción, y un método de producción

de un anticuerpo anti-EphA4 que comprende una etapa de cultivar la célula huésped también se incluyen en la presente descripción. La célula huésped según la presente descripción puede ser, pero no se limita a, células de E. coli, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, y similares. En una realización, el método de producción de un anticuerpo anti-EphA4 comprende una etapa de cultivar la célula huésped, y una etapa de recuperar el anticuerpo anti-EphA4 secretado de la célula huésped (o medio de cultivo de célula huésped).

10 [0088]

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-EphA4. La composición farmacéutica según la presente descripción puede fabricarse según métodos conocidos tales como los métodos descritos en la Farmacopea de Japón (JP), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), o la Farmacopea Europea (EP), y similares. [0089]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En otras palabras, en otros aspectos, la presente descripción abarca un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprende una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-EphA4 a un sujeto que tiene enfermedad de Alzheimer. Además, en otros aspectos, la presente descripción abarca el uso de un anticuerpo anti-EphA4 para la fabricación de un fármaco terapéutico para la enfermedad de Alzheimer. En otros aspectos, la presente descripción abarca un anticuerpo anti-EphA4 para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

30 [0090]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede ser útil para el tratamiento de tauopatía. En otras palabras, en otros aspectos, la presente descripción abarca un método para el tratamiento de tauopatía que comprende una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-EphA4 a un sujeto que tiene tauopatía. Además, en otros

aspectos, la presente descripción abarca el uso de un anticuerpo anti-EphA4 para fabricar un fármaco terapéutico para la tauopatía. En otros aspectos, la presente descripción abarca un anticuerpo anti-EphA4 para su uso en el tratamiento de tautopatía. Tauopatía de la presente descripción incluye enfermedad de Alzheimer o degeneración lobular frontotemporal con patología tau (FTLD-tau). Además, la degeneración lobular frontotemporal con patología tau incluye parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (CBD), demencia de granos argirófilos (AGD), demencia senil del tipo de ovillos neurofibrilares (SD-NFT), enfermedad de Pick (PiD), y similares.

[0091]

El anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede emplearse en el método terapéutico solo o en combinación con otros agentes o composiciones. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes que otro agente. Tal terapia de combinación incluye administración de combinación (dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulación independiente) y administración independiente (tal como simultánea o secuencial). Cuando se administran por separado dos o más agentes, la administración del anticuerpo anti-EphA4 según la presente descripción puede realizarse antes o después del método terapéutico que lo acompaña.

[0092]

El sujeto para la administración de la composición farmacéutica según la presente descripción no se limita, y puede emplearse para, por ejemplo, un mamífero humano o no humano (tal como mono, ratón, rata, conejo, vaca, caballo y cabra).

[0093]

El método de administración de la composición farmacéutica según la presente descripción a un sujeto (tal como vía de administración, dosificación, el número de administraciones al día, y momento de la administración) no está limitado, y puede decidirse de manera apropiada por los expertos en la técnica (tal como un médico) de acuerdo con el estado de salud del sujeto, la

gravedad de la enfermedad, el tipo de agente utilizado en la combinación y similares.

[0094]

Los expertos en la técnica reconocerán que, siempre que no sea técnicamente contradictorio, la presente invención puede llevarse a cabo en una combinación apropiada de uno o más de todos los aspectos descritos en el presente documento. Además, los expertos en la técnica reconocerán que, siempre que no sea técnicamente contradictorio, se prefiere que la presente invención se lleve a cabo en una combinación apropiada de cualquiera y todos de los aspectos preferidos o ventajosos descritos en el presente documento.

[0095]

Todas las descripciones de las bibliografías citadas en el presente documento se considerarán claramente citadas en el presente documento por referencia, y los expertos en la técnica pueden comprender el contenido de la descripción relacionado en estas bibliografías citándolas como parte de la presente memoria descriptiva según el contexto en el presente documento sin alejarse del espíritu y alcance de la presente invención.

[0096]

Los elementos en la bibliografía citados en la presente se proporcionan con el único propósito de divulgar la tecnología relacionada anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud, y no se deben considerar como una admisión por parte de los presentes inventores de que la presente invención no tiene el derecho de preceder a dichas divulgaciones debido a invenciones anteriores o por cualquier otra razón. Todas descripciones de todas estas bibliografías se basa en la información disponible para los presentes solicitantes, y no configuran de ninguna manera un reconocimiento de que estos contenidos de la descripción son precisos.

[0097]

Los términos utilizados en la presente se emplean para describir realizaciones particulares y no pretenden limitar la invención.

[0098]

La expresión "comprender", tal como se utiliza en la presente, a menos que el contenido indique claramente que se entienda de otro modo, pretende la presencia de los elementos descritos (tales como componentes, etapas, elementos o números) y no excluye la presencia de otros elementos (tales como componentes, etapas, elementos y números). La expresión "constituido por" engloba los aspectos descritos por las expresiones "constituido por" y/o "constituido esencialmente por".

[0099]

El término "actividad neutralizante" tal como se usa en el presente documento significa la actividad para inhibir la unión entre EphA4 y el ligando del mismo, y/o la actividad para inhibir la transducción de señales o la respuesta de expresión molecular o el cambio de funcionalidad de las células que son inducidas por EphA4 debido a la unión a un ligando de los mismos en el cuerpo humano.

[0100]

A menos que se definan de otra manera, todos los términos utilizados en la presente (incluidos términos científicos y técnicos) tienen el mismo significado reconocido ampliamente por los expertos en la técnica de la tecnología a la cual pertenece la presente invención. Los términos utilizados en la presente, a menos que se definan explícitamente de otro modo, han de interpretarse como que tienen significados consistentes con los significados en la presente y en campos técnicos relacionados, y no deben interpretarse como que tienen significados idealizados o excesivamente formales.

[0101]

Términos tales como primero y segundo se emplean a para expresar diversos elementos, y debe reconocerse que estos elementos no se han de limitar por estos términos per se. Estos términos se emplean únicamente con el propósito de discriminar un elemento de otro y, por ejemplo, es posible describir un primer elemento como un segundo elemento y, de manera similar, describir

un segundo elemento como un primer elemento sin apartarse del alcance de la presente invención.

[0102]

5 A menos que se indique de manera explícita, se debe interpretar que los valores numéricos empleados en la presente para indicar el contenido del componente o intervalo de valores numéricos y similares están modificados por el término "aproximadamente". Por ejemplo, "4°C," a menos que se indique explícitamente, se entiende que significa "aproximadamente 4°C",
10 y es obvio que los expertos en la materia pueden comprender racionalmente su alcance de acuerdo con el sentido técnico común y el significado de los pasajes en el presente documento.

[0103]

15 Se debe reconocer que a menos que se indique claramente que significa otra cosa en el contexto, cuando se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones en la presente, cada aspecto representado en forma singular también puede ser una forma plural siempre que esto no sea técnicamente contradictorio y viceversa.

20 [0104]

A continuación, la presente invención se describirá más detalladamente haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede estar materializada en diversos aspectos y no se interpretará que está limitada a los Ejemplos
25 descritos en la presente. Los expertos en la técnica de los campos técnicos relacionados llevarán a cabo la presente invención con varias modificaciones, adiciones, deleciones, sustituciones y similares sin alterar el espíritu y alcance de la presente invención.

30

Ejemplos

[0105]

Ejemplo de Referencia 1: Preparación de anticuerpo monoclonal anti-EphA4

35 (A) Preparación de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 de ratón

Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal que se une

a EphA4 de ratón (Nº Acceso Genbank NP_031962.2, SEQ ID NO: 1), una proteína que tiene una etiqueta secretora de fosfatasa alcalina (SEAP) e histidina fusionada con la región extracelular de EphA4 de ratón (posiciones 20-547) (SEQ ID NO. 2) (denominada a continuación en el presente documento "proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His", SEQ ID NO. 3) se preparó mediante las siguientes etapas.

[0106]

En primer lugar, las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal (SEQ ID NO. 4) y la región extracelular (SEQ ID NO. 2) de EphA4 de ratón se amplificaron por RT-PCR con ARN total derivado del cerebro de ratón, y se clonaron en el sitio Sal I/Not I del vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) que tiene la secuencia de ADN que codifica para SEAP y la etiqueta de histidina. A 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 pCDNA 3.1_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. Se transfectó el vector de expresión de la región extracelular de EphA4 PCDNA 3.1-de ratón-SEAP-His construido en células HEK293 EBNA (Invitrogen/LifeTechnologies) con TransIT-LT1 (TAKARA). Después de 6 días de incubación (5% de CO₂, 37°C), 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: 3) se purificó con columna Protino (MACHEREY-NAGEL).

[0107]

Veinte microgramos 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 GmbH), y se inyectó por vía subcutánea en la almohadilla plantar de ratones Balb/c. Proteína SEAP-His de la región extracelular de EphA4 de ratón luego se administró de manera similar los días 3, 7, y 10. Aquí, adyuvante TiterMax Gold

(TiterMax USA) se utilizó sólo para el día 10 y adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik GmbH) se utilizó los días 3, 7 y 10. Se sacrificaron los ratones el Día 13 y se recuperaron los ganglios linfáticos periféricos para preparar células de los ganglios linfáticos. Las células del nódulo linfático preparadas y las células mieloma P3U1 (dotadas de la Universidad de Kyoto) se condensaron a una proporción a la dosis de 5:1 en presencia de GenomONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.). Las células condensadas se cultivaron en una placa de plástico de 96 pocillos. Después de 7 días de incubación (5% de CO₂, 37°C), se recuperó el sobrenadante del cultivo.

[0108]

Empleando el sobrenadante de cultivo obtenido, se recogieron los pocillos con reactividad contra EphA4 de ratón, rata y humano.

[0109]

Se evaluó la reactividad frente a EphA4 de ratón, rata, y ser humano con ELISA con proteínas que tienen la región Fc de IgG₁ humano y etiqueta de histidina fusionada con la región extracelular de EphA4 de ratón, la región extracelular (posiciones 20-547) de EphA4 de rata (No. de registro de Genbank NP_001155883.1), o la región extracelular (posiciones 20-547) (SEQ ID NO. 6) de EphA4 humano (No. De registro de Genbank NP_004429.1, SEQ ID NO. 5) (a la que se alude en lo que sigue en esta memoria “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 humano-Fc-His”, respectivamente).

[0110]

La proteína de la región extracelular de EphA4 ratón, rata o humana-Fc-His se preparó mediante las siguientes etapas. Inicialmente se construyeron vectores de expresión pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana-Fc-His. Primero, las secuencias de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humana se amplificaron mediante RT-PCR con ARN total derivado de cerebro de

ratón, rata o humana y se clonó en el sitio Sal I/Not I de un vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) que tiene la secuencia de ADN que codifica Fc y la etiqueta de histidina. A continuación, las secuencias de ADN que codifican la secuencia
5 señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o ser humano, Fc y etiqueta de histidina se transfirieron a un vector pcDNA 3.1_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, rata
10 o ser humano-SEAP-His. Se transfectaron estos vectores de expresión contruidos en células HEK293 EBNA (Invitrogen/LifeTechnologies) con TransIT-LT1 (TAKARA). Después de 6 días de incubación (5% de CO₂, 37°C), se recuperó el sobrenadante del cultivo.

15 [0111]

Se realizó ELISA empleando proteínas de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano Fc-His siguiendo las etapas a continuación. Se cubrieron el anticuerpo IgG anti-humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de
20 una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con 1 x Block ACE (Dainippon Seiyaku). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.02%/PBS (Nacalai Tesque), se añadió un sobrenadante del cultivo que
25 comprende una proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata, o ser humano-Fc-His a cada pocillo (concentración final 1 nM), y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada uno de los pocillos el sobrenadante del cultivo de las células condensadas. Después
30 de incubar a temperatura ambiente durante una hora y de lavar tres veces, se añadió un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y esto se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces, se añadió disolución de TMBZ
35 (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a cada uno de los pocillos y se incubó esto a temperatura ambiente durante 5-20 minutos. Se

añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 2 N, Wako Pure Chemical) a cada pocillo, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0112]

5 Se clonaron los hibridomas de los pocillos recogidos a través de las etapas anteriores limitando el método de dilución, y finalmente se obtuvieron clones de hibridoma que expresan anticuerpo anti-EphA4 de ratón que tienen actividad de unión frente a EphA4 de ratón, rata y ser humano.

10 [0113]

Se cultivaron los clones de hibridoma obtenidos, y se purificó el anticuerpo monoclonal de anticuerpo anti-EphA4 de ratón del sobrenadante de cultivo con proteína A (GE Healthcare).

15 [0114]

(B) Evaluación de actividad de mejora de la escisión de EphA4

Se realizó la preparación de neuronas del hipocampo de ratas siguiendo las etapas a continuación. Se extrajeron fetos de una rata el día 18 de embarazo (Charles River Laboratories, Japón), y
20 se abrió la cabeza para extraer el cerebro. Se cortó la región del hipocampo bajo un microscopio estereoscópico, se colocó en la disolución de digestión (NaCl 137 mM (Wako Pure Chemical), KCl 5 mM (Wako Pure Chemical), Na_2HPO_4 7 mM (Wako Pure Chemical), Hepes 25 mM (DOJINDO), ADNasa 0.5 mg/mL (Sigma), y tripsina al 0.25%
25 (Life technologies)), y se agitó a 37°C durante 10 minutos. Se separó la disolución y se añadió un suero bovino fetal al 20%/tampón de Hanks (Sigma). Tras retirar la disolución y lavar dos veces en tampón de Hanks, se pipeteó el tejido del hipocampo en tampón de Hanks para preparar una suspensión celular. Se
30 sembraron las células en una placa de 96 pocillos (Falcon) recubierta con un fluido de cultivo que contenía poli-L-lisina (medio neurobasal (Life technologies), 1 x B-27 complemento (Life technologies), y L-glutamina 0.5 mM (Life technologies)).

[0115]

35 Se realizó la evaluación de la actividad de mejora de la escisión de EphA4 que emplea neuronas del hipocampo siguiendo las

etapas a continuación. Se trataron neuronas del hipocampo de rata sembradas en una placa de 96 pocillos (Falcon) con anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (67 nM) y γ fármaco inhibidor de la selectasa Compuesto E (50 nM, Enzo Life Sciences). Dieciséis horas después, esto se lavó con PBS (Wako Pure Chemical), tampón de muestra SDS (tampón de muestra Laemmli (Bio-Rad) y 2-mercaptoetanol al 5% (Bio-Rad)) se añadió para recuperar las células, y esto fue hervido por 5 minutos. Se realizó SDS-PAGE con esta muestra, se realizó transferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), se cuantificó la fuerza de la banda, y se calculó el valor del fragmento C-terminal de EphA4/EphA4 de longitud completa.

[0116]

Se obtuvo el anticuerpo monoclonal anti-EphA4 de ratón que tenía la actividad que potencia la escisión de EphA4 (anticuerpo A). El isotipo del anticuerpo A se determinó con un kit que isotipa anticuerpos monoclonales (Serotec) era IgG₁ para la cadena pesada y κ para la cadena ligera.

[0117]

(C) Análisis de la secuencia del anticuerpo A

La secuencia de ADN que codifica para la secuencia señal y la región variable de cadenas pesada y ligera del anticuerpo A se amplificó mediante 5'-RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc 5'). Se preparó el ARN total a partir del hibridoma utilizando el RNeasy (QIAGEN) y se trató con DNasa (QIAGEN, conjunto de DNasa exento de RNasa). Se preparó ADNc bicatenario a partir del ARN total con el Kit de Síntesis de ADNc (TAKARA). El adaptador 5' obtenido mediante hibridación del oligoADN ad29S (ACATCACTCCGT) (SEQ ID NO. 7) y el oligoADN ad29AS (ACGGAGTGATGTCCGTGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT) (SEQ ID NO. 8) se añadió al ADNc. El ADNc obtenido se amplificó por el cebador directo 5' (cebador 5'-PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG) (SEQ ID NO. 9) y el cebador inverso 3' (GCCAGTGGATAGACTGATGG (SEQ ID NO. 10) se empleó para la amplificación de la cadena pesada de IgG de ratón, y GATGGATACAGTTGGTGCAGC (SEQ ID NO. 11) se empleó para la

amplificación de la cadena ligera de Igκ de ratón). El ADNc amplificado se insertó en el vector pCR2.1 (Invitrogen/LifeTechnologies). La secuencia del gen del anticuerpo A se analizó con ABI 3130XL. Como las secuencias de aminoácidos codificadas por la secuencia del gen del anticuerpo A identificado por el presente análisis, la secuencia señal de la cadena pesada es la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO. 12, la región variable de la cadena pesada es la secuencia de muestra en SEQ ID NO: 13; la secuencia señal de la cadena ligera es la secuencia de muestra en SEQ ID NO: 14, y la región variable de cadena ligera es la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 15. Como las secuencias de nucleótidos que codifican para la secuencia de genes del anticuerpo A, la secuencia señal de la cadena pesada es la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 16, la región variable de la cadena pesada es la secuencia de muestra en SEQ ID NO: 17; la secuencia señal de la cadena ligera es la secuencia de muestra en SEQ ID NO: 18, y la región variable de cadena ligera es la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 19.

[0118]

Se obtuvieron las secuencias completas de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo A mediante los siguientes pasos. Se preparó el ARN total a partir del hibridoma utilizando el RNeasy (QIAGEN) y se trató con DNasa (QIAGEN, conjunto de DNasa exento de RNasa). Se prepararon los productos de transcripción inversa del ARN total con el kit de PCR de ARN (TAKARA). Empleando los productos de transcripción inversa obtenidos como molde, se amplificó la secuencia de genes que codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo A con PCR con cebador directo 5' (GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTGTCCTGGTGCTGCTCC (cebador ID 7455) (SEQ ID NO. 20) se usó para la amplificación de la cadena pesada, y GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTTCCTGCTCACG (cebador ID 7453) (SEQ ID NO. 21) se usó para la amplificación de la cadena ligera) y el cebador inverso 3' (GCGGAATTCATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC (cebador ID 7257) (SEQ ID NO. 22) se usó para la amplificación de la cadena pesada, y CGCGAATTCACCTAACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGAC (cebador ID 7249) (SEQ ID NO. 23) se usó para la amplificación de

la cadena ligera), y se clonó respectivamente en los vectores pEE6.4 y pEE12.4 (Lonza). Se analizó la secuencia del gen con ABI3130XL. Como las secuencias de aminoácidos codificadas por la secuencia de genes del anticuerpo A identificada por el presente análisis, la región constante de cadena pesada es la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 24, y la región constante de cadena ligera es la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 25.

[0119]

Se determinó la CDR del anticuerpo A con el siguiente método. Se numeró la secuencia de aminoácidos del anticuerpo A según el sistema de numeración Kabat con el software Abysis (UCL). Basándose en esta numeración, se tomó la decisión según la definición de Kabat para la identificación de CDR. Las secuencias de aminoácidos de CDR del anticuerpo A se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Secuencias de aminoácido de CDR del anticuerpo A

Nombre	Secuencia
CDR1 de cadena pesada	RYGVH (SEQ ID NO. 26)
CDR2 de cadena pesada	VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO. 27)
CDR3 de cadena pesada	ESLFGVYYDYGYYSMDY (SEQ ID NO. 28)
CDR1 de cadena ligera	RASQEISGYLS (SEQ ID NO. 29)
CDR2 de cadena ligera	AASTLDS (SEQ ID NO. 30)
CDR3 de cadena ligera	LQYASYPLT (SEQ ID NO. 31)

[0120]

Ejemplo de Referencia 2: Afinidad de unión de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 frente a EphA4 de ratón y ser humano

Se determinó la afinidad de unión del anticuerpo A frente a EphA4 de ratón y ser humano mediante resonancia de plasmones superficiales (método de SPR) empleando Biacore T200 (GE

Healthcare). En primer lugar, se fijó el anticuerpo anti-His (GE Healthcare, 28-9950-56) en un chip sensor CM5. Se realizó la fijación mediante un método de acoplamiento de amina que empleó clorhidrato de N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y se empleó etanolamina para el bloqueo (el chip sensor y los reactivos de fijación eran de GE Healthcare). Se diluyó esto a 3.5 µg/mL con el tampón de fijación (acetato de sodio 10 mM, pH 4.5), y se fijó en el chip sensor de acuerdo con el protocolo unido a Biacore T200. Se diluyó SEAP-His10 de la región extracelular de EphA4 de ratón o ser humano con el tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), y la disolución se envió a una célula de flujo durante 120 segundos para su captura (la cantidad capturada es de aproximadamente 10 RU). Posteriormente, se observó secuencialmente el anticuerpo A diluido en serie en el rango de 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6 y 0 nM con HBS-EP se añadió al chip sensor durante 120 segundos, y la curva de reacción de unión en el momento de la adición (fase de unión, 120 segundos) y una vez completada la adición (fase de disociación, 600 segundos). Tras completar cada observación, se añadió MgCl₂ 4 M (60 segundos, Wako Pure Chemical) para regenerar el chip sensor. El análisis de ajuste mediante un modelo de unión 1:1 que empleó el software de evaluación BIA adjunto al sistema se realizó sobre la curva de reacción de unión obtenida, y se calculó la afinidad de unión ($K_D = k_d/k_a$) frente a EphA4 de ratón y ser humano.

[0121]

La afinidad de unión del anticuerpo A frente a EphA4 de ratón y ser humano (valor de K_D) fue de 1.32×10^{-9} M y 1.19×10^{-9} M, respectivamente (Figura 1). Otros parámetros de unión frente a EphA4 de ratón y ser humano fueron casi en la misma medida. Por consiguiente, se cree que el anticuerpo A tiene el mismo grado de afinidad de unión hacia EphA4 de ratón y ser humano.

[0122]

Ejemplo de Referencia 3: Actividad de mejora de la escisión de EphA4 de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en neuronas del

hipocampo

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la actividad de mejora de la escisión de EphA4 empleando neuronas del hipocampo siguiendo las etapas a continuación. Se trataron 5 neuronas del hipocampo de rata sembradas en una placa de 96 pocillos (Falcon) con anticuerpo A (2.0, 6.7, y 20 nM) y fármaco inhibidor de la γ selectasa Compuesto E (50 nM, Enzo Life Sciences). Veinticuatro horas después, esto se lavó con PBS (Wako Pure Chemical), tampón de muestra SDS (tampón de muestra Laemmli (Bio- 10 Rad) y 2-mercaptoetanol al 5% (Bio-Rad)) se añadió para recuperar las células, y esto fue hervido por 5 minutos. Se realizó SDS-PAGE con esta muestra, se realizó transferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), se cuantificó la fuerza de la banda, y se calculó el valor del fragmento C-terminal 15 de EphA4/EphA4 de longitud completa.

[0123]

Reacción de escisión de EphA4 mejorada de forma dependiente de la concentración del anticuerpo A en las neuronas del hipocampo (Figura 2).

20

[0124]

Ejemplo de Referencia 4: Actividad inhibitoria de la unión EphA4 de ratón-ligando de ratón de anticuerpo monoclonal anti-EphA4

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la 25 actividad inhibitoria de la unión entre EphA4 de ratón y ligando de ratón siguiendo las etapas a continuación. Se cubrió el anticuerpo fosfatasa anti-alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los 30 pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.02%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se añadió una proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His a los pocillos (concentración final 10 nM), y se incubó esto a 35 temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron el ligando y el anticuerpo A (0, 0.003,

0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, y 3000 nM) a los pocillos. Obsérvese que se emplearon la quimera de Efrina A1-Fc de ratón biotinilada (R&D Systems, concentración final de 6 nM) y quimera de Efrina B2-Fc de ratón biotinilada (R&D Systems, concentración final 2.5 nM) como ligandos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y de lavar tres veces, se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y esto se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los uno de los pocillos y se incubó esto a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0125]

El anticuerpo A suprimió de manera dependiente de la concentración la unión entre EphA4 de ratón y ligando de ratón, y los valores de CI_{50} frente a la unión de Efrina A1 y Efrina B2 de ratón fueron aproximadamente 5,9 nM y 3,1 nM, respectivamente (Figura 3). Por consiguiente, se mostró que el anticuerpo A inhibe fuertemente la unión entre EphA4 de ratón y el ligando de ratón.

[0126]

Ejemplo de Referencia 5: Actividad inhibitoria de la unión EphA4 humano-ligando humano de anticuerpo monoclonal anti-EphA4

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria de la unión entre EphA4 humano y ligando humano siguiendo las etapas a continuación. Se cubrió el anticuerpo fosfatasa anti-alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se añadió una proteína de la región extracelular de EphA4 humano-SEAP-His a los pocillos (concentración final 10 nM), y se incubó esto a

temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a los pocillos el ligando y el 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). Obsérvese que se emplearon la quimera de Efrina A5-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final de 0.7 nM) y quimera de Efrina B3-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final 2.3 nM) como ligandos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y de lavar tres veces, se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y esto se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos y se incubó esto a temperatura ambiente durante 2-5 minutos. Se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

[0127]

El anticuerpo A suprimió de manera dependiente de la concentración la unión entre EphA4 humano y ligando humano, y los valores de CI₅₀ frente a la unión de Efrina A5 y Efrina B3 humana fueron aproximadamente 2,8 nM y 1,4 nM, respectivamente (Figura 4). Por consiguiente, se mostró que el anticuerpo A también inhibe fuertemente la unión entre EphA4 humano y el ligando humano.

[0128]

Ejemplo de Referencia 6: Selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 frente al receptor Eph humano

Siguiendo el método para preparar la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón -SEAP-His descrita en el Ejemplo de Referencia 1, se amplificaron las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de humanos (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) mediante RT-PCR con ARN total derivado de tejido, y se clonaron en el vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) que tiene la

secuencia de ADN que codifica para SEAP y etiqueta de histidina. A continuación, las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de humano, SEAP, y la etiqueta de histidina se transfirieron al
5 vector pCDNA 3.1_rfcB mediante LR reacción del Sistema Gateway (Invitrogen/LifeTechnologies) para construir vectores (denominados "vector de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor Eph-SEAP-His") que expresa una proteína que tiene SEAP y la etiqueta de His fusionada con la región
10 extracelular de cada receptor Eph de humano (denominado "proteína de la región extracelular del receptor Eph-SEAP-His").

[0129]

A continuación, cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor de Eph humana-
15 SEAP-His se introdujo en células Expi293F (Gibco/ThermoFisher) con el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Después de 5 días de cultivo (CO₂ al 5%, 37°C, 120 rpm), se recuperó el sobrenadante del cultivo, y se centrifugó esto a temperatura ambiente, a 1500 rpm, y durante 5 minutos. Se filtró el
20 sobrenadante centrifugado con un filtro de 0.45 µm (Millipore).

[0130]

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la actividad de unión del receptor Eph humano siguiendo las etapas a continuación.

25 Se cubrió el anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces
30 con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembró cada proteína de la región extracelular humana-SEAP-His del receptor Eph (concentración final 1 nM) en cada pocillo, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, solución de IgG humana (100 µg/mL, Mitsubishi Pharma
35 Corporation) y anticuerpo A (10 µg/mL) se añadieron a cada los pocillos y se incubó esto a la temperatura ambiente durante una

hora. Se añadió anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió la disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

10 [0131]

Entre la familia del receptor Eph humano, el anticuerpo A tenía actividad de unión específica solo hacia EphA4 humano (Figura 5).

15 [0132]

Ejemplo de Referencia 7: Selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 frente a receptor Eph de ratón

Siguiendo el método para preparar la proteína de la región extracelular de EphA4-Fc-His según el Ejemplo de Referencia 1, se amplificaron las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de ratón (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) mediante RT-PCR con ARN total derivado de tejido, y se clonaron en el vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) que tiene la secuencia de ADN que codifica para la región Fc de IgG₁ humano y etiqueta de histidina. A continuación, las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y región extracelular de cada receptor Eph de ratón, Fc, y etiqueta de histidina (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) se transfirieron al vector pcDNA 3.1_rfcB mediante reacción LR del Sistema Gateway (Invitrogen/LifeTechnologies) para construir la región extracelular de cada receptor Eph del vector de expresión de la proteína de ratón-Fc-His. En la construcción del vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA2 de ratón-Fc-His, las secuencias de ADN que codifican para

20
25
30
35

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

[0133]

A continuación, cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor de Eph de ratón-Fc-His se introdujo en células Expi293F (Gibco/ThermoFisher) con el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Después de 5 días de cultivo (CO₂ al 5%, 37°C, 120 rpm), se recuperó el sobrenadante del cultivo, y se centrifugó esto a temperatura ambiente, a 1500 rpm, y durante 5 minutos. Se filtró el sobrenadante centrifugado con un filtro de 0.45 µm (Millipore).

[0134]

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la actividad de unión del receptor Eph de ratón siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrió el anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembró cada proteína de la región extracelular de ratón-Fc-His del receptor Eph (concentración final 1 nM) en cada pocillo, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, solución de IgG humana (100 µg/mL, Sigma) y anticuerpo A (10 µg/mL) se añadieron a cada los pocillos y se incubó esto a la temperatura ambiente durante una hora. Se añadió anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió la disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos, y tras la confirmación

de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

5 [0135]

Entre la familia del receptor Eph de ratón, el anticuerpo A tenía actividad de unión específica solo hacia EphA4 de ratón (Figura 6).

10 [0136]

Ejemplo de Referencia 8: Reactividad de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 frente a EphA4 de ratón, rata, mono y humana

Se realizó la preparación de proteínas de las regiones extracelulares de EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano Fc-His
15 siguiendo las etapas a continuación. En primer lugar, siguiendo el método para preparar la proteína de la región extracelular de EphA4-Fc-His según el Ejemplo de Referencia 1, se construyó el vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de mono-Fc-His. La secuencia de aminoácidos de EphA4 de mono
20 utilizada en la construcción del vector se muestra como SEQ ID NO. 32, y la región extracelular del mismo se muestra como SEQ ID NO. 33. Se prepararon diversas proteínas de la región extracelular de EphA4-Fc-His empleando el vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de mono-Fc-His así como los
25 vectores de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata, y ser humano-Fc-His descritos en el Ejemplo de Referencia 1.

[0137]

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la
30 actividad de unión con diversas regiones extracelulares de EphA4 siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrieron el anticuerpo IgG anti-humano de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche,
35 se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar

durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembraron proteínas de las regiones extracelulares de EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano-Fc-His (concentración final 1 nM) en los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron disolución de IgG humano (100 µg/mL, Mitsubishi Pharma Corporation) y anticuerpo A (0, 0.00013, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, y 10 µg/mL) a los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió anticuerpo IgG anti-ratón de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió la disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0138]

El anticuerpo A tenía una actividad de unión equivalente en todas las EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano (Figura 7).

[0139]

Ejemplo de Referencia 9: Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 frente a la región extracelular de EphA4 humano, dominio de unión a ligando, dominio 1 de fibronectina tipo III, dominio 2 de fibronectina tipo III

Se realizó la preparación de proteínas que tienen la región extracelular (ECD), dominio de unión a ligando (LBD), dominio 1 de fibronectina tipo III (FN1), o dominio 2 de fibronectina tipo III (FN2) de EphA4 humano condensado con proteína de unión a maltosa (MBP) y etiqueta de histidina (a continuación en el presente documento "proteína de la región extracelular de EphA4 humano-MBP-His", "proteína del dominio de unión a ligando de EphA4 humano-MBP-His", "proteína del dominio 1 de fibronectina tipo III de EphA4 humano-MBP-His", y "proteína del dominio 2 de

fibronectina tipo III de EphA4 humano-MBP-His") siguiendo las etapas a continuación. Inicialmente, se construyeron los vectores de expresión de la región extracelular de EphA4 humano pcDNA 3.4, dominio de unión a ligando, dominio de fibronectina tipo III o dominio de fibronectina tipo III 2-MBP-His. En primer lugar, la secuencia señal de EphA4 humano (SEQ ID NO. 34) o la secuencia señal de preprotripsina (SEQ ID NO. 35) y se amplificaron las secuencias de ADN que codifican para cada dominio de EphA4 humano mediante PCR, y se clonaron en el vector pcDNA 3.4 que tenía la secuencia de ADN que codifica para MBP y etiqueta de histidina (Invitrogen/LifeTechnologies) para construir los vectores de expresión de la región extracelular de EphA4 humano-MBP-His, proteína del dominio de unión a ligando de EphA4 humano-MBP-His, proteína del dominio 1 de fibronectina tipo III de EphA4 humano-MBP-His, y proteína del dominio 2 de fibronectina tipo III de EphA4 humano-MBP-His. La secuencia de aminoácidos de EphA4 humano utilizada en la construcción del vector se muestra como SEQ ID NO. 5, la región extracelular del mismo como SEQ ID NO. 36, el dominio de unión a ligando como SEQ ID NO. 37, el dominio 1 de fibronectina tipo III como SEQ ID NO. 38, y el dominio 2 de fibronectina tipo III como SEQ ID NO. 39. Se transfirieron los vectores de expresión anteriores en células Expi293F (Thermo SCIENTIFIC) con el sistema de expresión Expi293 (Thermo SCIENTIFIC). Cuatro días después, se recuperó el sobrenadante del cultivo, y se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore). Se realizó la purificación bruta con resina de amilosa (NEB), y se sustituyó el tampón por PBS (Wako Pure Chemical) con columna de centrifugación y desalinización Zeba (Thermo SCIENTIFIC). Se purificó diferencialmente la fracción de monómero con Superdex 200 10/300 (GE Healthcare).

[0140]

Para el anticuerpo A, se realizó la evaluación de la actividad de unión con diversos dominios en EphA4 humano siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrió el anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc).

Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante dos veces con Tween 20 al 0.02%/PBS (Nacalai Tesque), se sembraron la proteína de la región extracelular de EphA4 humano-MBP-His, proteína de dominio de unión a ligando de EphA4 humano-MBP-His, proteína del dominio 1 de fibronectina tipo III-MBP-His de EphA4 humano, y proteína del dominio 2 de fibronectina tipo III-MBP-His de EphA4 humano (concentración final 10 nM) en los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió el anticuerpo A (final concentración 10 nM) a los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió anticuerpo del fragmento Fc γ de IgG anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante cinco veces, se añadió la disolución de TMB (KLP) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H₂SO₄ 2 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos. Se leyó la absorbancia a 450 nm y 650 nm por un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0141]

El anticuerpo A tenía la actividad de unión para la región extracelular de EphA4 humano (ECD) y dominio de unión a ligando (LBD) (Figura 8). No hubo reacción para el dominio 1 de fibronectina tipo III (FN1) y dominio 2 de fibronectina tipo III (FN2). Por consiguiente, se encontró que el anticuerpo A se une específicamente al dominio de unión a ligando de la región extracelular de EphA4 humano.

30

[0142]

Ejemplo de Referencia 10: Efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 sobre el aumento del número de espinas en la neurona del hipocampo

35

Se realizó la preparación de neuronas del hipocampo de rata tal como se describe en el Ejemplo de Referencia 1 anterior (B).

Se introdujeron neuronas del hipocampo de rata con el gen EGFP empleando Nucleofector (Lonza), se mezclaron con las neuronas del hipocampo de rata sin introducción de gen y se sembraron en una placa de 24 pocillos (Falcon) que contenía un cubreobjeto (Matsunami Glass Industries) recubierto con poli-L-lisina.

[0143]

El conteo de espinas empleando neuronas del hipocampo se realizó siguiendo las etapas a continuación. Las neuronas del hipocampo de rata introdujeron EGFP en el cultivo el día 13 sembrado en una placa de 24 pocillos (Falcon) que contenía una cubierta de vidrio (Matsunami Glass Industries) recubierta con poli-L-lisina y se trataron con anticuerpo de control (IgG₁ de ratón; BioLegend) o anticuerpo A (6,7 y 20 nM) durante 24 horas. Se transfirió el vidrio de cobertura a PFA al 2% (Wako Pure Chemical)/sacarosa al 4% (Wako Pure Chemical)/PBS, y esto se dejó en reposo durante 20 minutos para fijar las células. Después de eliminar la disolución de fijación y lavar las células tres veces con PBS, se añadió Tritón X-100 (Wako Pure Chemical)/PBS al 0,25%, y se realizó la permeabilización celular durante 15 minutos. Se retiró la disolución, se transfirió el vidrio de cobertura a BSA al 2% (Sigma)/Tritón X-100 al 0,25%/Opti-MEM (GIBCO) y se sometió a un bloqueo de una hora, después de lo cual se realizó el anticuerpo anti-GFP (Nacalai Tesque) se dejó reaccionar durante 1,5 horas. Después de retirar la disolución de anticuerpo primario y lavar tres veces con PBS, se permitió que el anticuerpo secundario reaccionara durante una hora. Después de eliminar la disolución de anticuerpo secundario y lavar tres veces con PBS, se añadió el reactivo Antifade Prolong Gold (sondas moleculares) para el montaje, y se realizó la observación con LSM800 (ZEISS). Se llevó a cabo el experimento descrito anteriormente tres veces, y para cada experimento, se extrajeron neuronas de dos cubreobjetos, se contaron las espinas en cada dendrita con el software de análisis de imágenes Imaris® (Bitplane), y se calculó el número de espinas por 10 µm para cada neurona.

[0144]

El anticuerpo A aumentó el número de espinas en la neurona

del hipocampo (Figura 9). Este resultado muestra que el anticuerpo A tiene la actividad para estabilizar espinas en neuronas del hipocampo.

5 [0145]

Ejemplo de Referencia 11: Efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 para suprimir la fosforilación tau *in vivo*

Se realizó la evaluación del efecto para suprimir la fosforilación tau *in vivo* empleando ratón transgénico tau
 10 (rTg4510) siguiendo las etapas a continuación. Se administraron por vía subcutánea los ratones transgénicos Tau (rTg4510) dos veces a la semana desde 20 hasta 26 semanas de edad con el anticuerpo A o el anticuerpo de control preparado mediante métodos convencionales inmunizando un ratón con dinitrofenol (anticuerpo
 15 anti-dinitrofenol de ratón) a una dosis de 100 mg/kg (10 ml/kg) cada uno. En 3,5 días después de la administración final, se realizó anestesia con isoflurano al 2% (Intervet) y una mezcla de tres tipos de fármacos anestésicos (4.0 mg/kg de Dormicum (Astellas Pharma), 0.3 mg/kg de Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo), y
 20 5.0 mg/kg de Vetorphale (Meiji Seika Pharma)), se realizó la perfusión con anestesia con PBS (Wako Pure Chemical) que contiene 3 unidades/mL de heparina (Ajinomoto) y cóctel de inhibidor de fosfatasa al 1% (Nacalai Tesque), y se resecó el hemisferio cerebral. Se fijó el hemisferio cerebral recogido a 4°C mientras
 25 que se agitaba durante la noche en paraformaldehído al 2% (TAAB)/tampón fosfato 0.1 M (Wako Pure Chemical). Se sustituyó el hemisferio cerebral con sacarosa al 20% (Wako Pure Chemical)/tampón fosfato 0.1 M (Wako Pure Chemical) y posteriormente sacarosa al 25%/tampón fosfato 0.1 M (Wako Pure
 30 Chemical), y luego se incrustó en Tissue-Tek O.C.T. Compuesto (Sakura Finetek Japón)/sacarosa al 25%, y congelado con nitrógeno líquido. Se crearon cortes a un espesor de 7 μ m con criostato CM1860 (Leica), se adhirieron a un vidrio deslizante (Muto Pure Chemicals), se secaron al aire con aire frío y luego se colocaron
 35 en una bolsa sellada y se almacenaron a -80°C. Se descongeló el portaobjetos de vidrio usado para la inmunotinción, se secó al

aire con aire frío y luego se lavó con PBS (Wako Pure Chemical), se sumergió en BSA al 1% (Sigma)/suero de burro normal al 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories)/disolución de Tritón X-100 al 0,5% (Wako Pure Chemical)/PBS, y se sometió a una hora de bloqueo, después de lo cual se dejó reaccionar el anticuerpo tau anti-fosforilado AT8 (Fujirebio Europe NV) durante la noche a temperaturas habituales. Después de lavar tres veces con PBS, se permitió que el anticuerpo secundario reaccionara durante una hora. Después de lavar durante tres veces con PBS, se colocó el reactivo Prolong Gold Antifade (sondas moleculares) en el corte y se montó, y se realizó observación con LSM700 (ZEISS). Se midió el área positiva para la señal de AT8 en el estrato radiado del hipocampo CA1 con el software de análisis de imágenes ImageJ, y se calculó la proporción del área de señal positiva de AT8 frente al área total.

[0146]

El anticuerpo A disminuyó la señal de tau fosforilado en la región del hipocampo CA1 (Figura 10). Este resultado muestra que el anticuerpo A tiene la actividad para suprimir la progresión de la patología de tau en ratón transgénico tau (rTg4510).

[0147]

Ejemplo de Referencia 12: Mapeo de epítomos de dominio de unión a ligando de EphA4 (EphA4-LBD) mediante análisis de estructura cristalina de rayos X

La preparación de anticuerpo A-Fab se realizó siguiendo las etapas a continuación. Se disolvió el anticuerpo A a 101.1 mg en tampón fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.0) que comprendía L-cisteína 30 mM y EDTA 2 mM a una concentración de 15 mg/mL. A esta disolución de anticuerpo, se le añadió papaína (Sigma) a cantidad de 1/200 al anticuerpo, y se realizó la digestión enzimática a 37°C durante 18 horas. Se dializó el jugo de la digestión enzimática del anticuerpo A frente a PBS, y se eliminó el precipitado por centrifugación (se redisolvió el precipitado producido en PBS y se mezcló con el sobrenadante de centrifugación). A continuación, se realizaron los siguientes

pasos con el propósito de eliminar las impurezas que no sean el anticuerpo A-Fab.

1) Purificación por columna de proteína A

Se aplicó esta disolución de digestión enzimática a 2 ml de ProSep vA de alta capacidad (Millipore) equilibrada con PBS, y se recuperaron la fracción de paso y la fracción de lavado de PBS.

2) Purificación por afinidad que emplea el anticuerpo anti-IgG Fc γ humano

Se preparó una columna de afinidad que tenía el anticuerpo anti-IgG Fc γ humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories) unido covalentemente a Sepharose 4FF (GE Healthcare) activado por NHS según el manual de esta Sepharose. Se cargó la disolución recuperada en el 1) anterior en esta columna de afinidad, y se recuperaron la disolución de paso y la disolución de lavado PBS de la misma.

3) Purificación mediante filtración en gel

Se concentró la fracción de paso obtenida en el 2) anterior con una membrana de ultrafiltración. Se equilibró Superose 12 (GE Healthcare) con PBS, se aplicó la muestra concentrada y se separó y se purificó. Se analizó una parte de la fracción separada y purificada con SDS-PAGE, y se recuperó la fracción que comprende el A-Fab del anticuerpo con alta pureza y se combinó. Se estableció la muestra purificada de esta manera como anticuerpo A-Fab.

[0148]

Se preparó EphA4-LBD con el fin de preparar un complejo de anticuerpo A-Fab y el antígeno EphA4-LBD (Qin H. *et al.*, J. Biol. Chem., 283: 29473-29484 (2008)). Se mezclaron EphA4-LBD a 0.68 μ mol (200 μ M, 3.4 mL) y anticuerpo A-Fab a 0.45 μ mol (300 μ M, 1.5 mL) de modo que EphA4-LBD tendrá una razón molar de aproximadamente 1.5 veces frente al anticuerpo A-Fab. A continuación, la disolución mixta se aplicó a HILOAD 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare), y se eluyó con el tampón para cromatografía (Tris/HCl 25 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM). Se analizó la fracción que comprende el complejo con SDS PAGE, se reunieron las fracciones de alta pureza y se concentraron a

aproximadamente 40,8 mg/ml, y se empleó esto para la cristalización.

[0149]

La cristalización del complejo se realizó mediante método
5 de difusión de vapor de gota colgante con un dispositivo de auto
cristalización Hydra II Plus One System (Matrix Technologies Corp.,
Ltd.). Se usó MRC-2 (Dimensiones moleculares) como placa. La
composición de la disolución del depósito fue HEPES 100 mM (pH
7,5), polietilenglicol 8000 al 10%, y etilenglicol al 8%, y se
10 mezclaron esta disolución de depósito y la disolución del complejo
anterior de manera que la relación de volumen fue 1:1 para generar
gotas de cristalización. Se dejó la placa de cristalización
generada en reposo a 20°C.

[0150]

15 Tras la cristalización en la condición anterior, se
obtuvieron cristales que tienen el grupo espacial P212121,
parámetros de red $a = 71.0 \text{ \AA}$, $b = 84.5 \text{ \AA}$, y $c = 116.1 \text{ \AA}$. Se incide
la radiación de rayos X de luz ($1,0 \text{ \AA}$) en los cristales obtenidos
para obtener datos de difracción de $1,79 \text{ \AA}$. Los datos de difracción
20 se procesaron por HKL2000 (HKL Research Inc.) y la determinación
de fases se realizó por método de sustitución molecular. El
programa PHASER (versión 2.5.0, McCoy A. J. *et al.*, J. Appl. Cryst.
40: 658-674 (2007)) incluido en CCP4 Software Suite (Proyecto
computacional colaborativo número 4, [CCP4] versión 6.5.0, Acta
25 Cryst. D 67: 235-242 (2011)) se empleó para el método de
sustitución molecular. Se emplearon la estructura cristalina de
EphA4-LBD (PDBID:3CKH) y la estructura cristalina de la región
Fab de IgG (PDBID:2VXT (cadena L) y 1FGN (cadena H)) como el
modelo de búsqueda del método de sustitución molecular. Se
30 construyó un modelo molecular con el programa COOT (Emsley P. *et al.*, Acta Cryst. D 60: 2126-2132n (2004)) para ajustarse a la
densidad electrónica obtenida de la fase determinada, y el
refinamiento de la estructura se realizó con el programa REFMAC
(Murshudov G.N., Acta Cryst. D 53: 240-255 (1997)).

Se obtuvo la estructura cristalina del complejo de la resolución de 2.0 Å mediante el cálculo estructural ($R = 0.212$, $R_{\text{libre}} = 0.258$).

[0151]

5 Se analizó la estructura cristalina del complejo de A-Fab/EphA4-LBD del anticuerpo obtenido con la herramienta de detección de la interacción equipada en el sistema químico computacional MOE 2018.0101 (Chemical Computing Group Inc.), y se identificaron los residuos aminoácidos en EphA4-LBD que están en
10 contacto directo con A-Fab anticuerpo (Figura 11A). Los residuos aminoácidos identificados son Glu51, Gly52, Ile59, Gln71, Cys73, Asn74, Val75, Met76, Glu77, Thr104, Arg106, Leu111, Pro112, Met115, Arg162, Met164, Cys191, Ala193, y Val195. La figura 11B muestra la estructura de la superficie de EphA4-LBD generada con Maestro
15 (versión 11.0, Schrodinger). Como resultado, los presentes inventores concluyeron que la región donde están presentes estos residuos aminoácidos es la región de unión del anticuerpo A-Fab en EphA4-LBD.

20 [0152]

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo humanizado de anticuerpo A Preparación de anticuerpo anti-EphA4 humanizado

Se diseñó la región variable del anticuerpo humanizado. Basándose en la elevada homología frente a la región de
25 armazón(FR) del anticuerpo A, entre las FR del anticuerpo humano, IGHV3-33*03 (SEQ ID NO. 42) y JH6 (SEQ ID NO. 43) para la cadena pesada y IGKV1-17*01 (SEQ ID NO. 40) y JK4 (SEQ ID NO. 41) para la cadena ligera se seleccionaron como las FR para el anticuerpo humanizado. Los aminoácidos en el FR que interactúan con los
30 aminoácidos de la CDR se predijeron empleando un modelo de predicción de estructura 3D del anticuerpo de ratón A, estos se trasplantaron junto con la CDR del anticuerpo A que tiene la mutación Y32F en la CDR1 de la cadena pesada (SEQ ID NO. 44, 27, 28, y 29-31), y HK2-42 (SEQ ID NO. 45) se diseñó como la región
35 variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado y L1-8 (SEQ ID NO. 46) se diseñó as la región variable de cadena ligera del

anticuerpo humanizado. Las secuencias de aminoácidos de la CDR trasplantada se muestran en la tabla 2, y las secuencias de ácido nucleico se muestran en la tabla 3.

[0153]

5 La región constante de IgG₂ humano (SEQ ID NO. 47) se empleó como la región constante de cadena pesada. Igk humano (SEQ ID NO. 48) se empleó como la región constante de cadena ligera. Se transfectó un vector de expresión (pcDNA 3.4) que comprende la

10 del anticuerpo humanizado en células Expi293F (Gibco/ThermoFisher) con el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Como la secuencia del gen que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado, la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 55 se empleó as región

15 variable de cadena pesada, la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 56 se empleó as región variable de cadena ligera, la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 57 se empleó como la región constante de cadena pesada, y la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 58 se empleó como la región

20 constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la longitud completa de la cadena pesada (no incluyendo la secuencia señal) del anticuerpo humanizado es la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 59, la secuencia de aminoácidos de la longitud completa de la cadena ligera (no

25 incluyendo la secuencia señal) es la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 60. La secuencia de ácido nucleico que codifica para la longitud completa de la cadena pesada del anticuerpo humanizado es la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 61, y la secuencia de ácido nucleico que codifica

30 para la longitud completa de la cadena ligera es la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 62. Se recuperó el sobrenadante, y se purificó el anticuerpo humanizado del anticuerpo A (anticuerpo B) con MabSelectSuRe (GE Healthcare).

[0154]

35 [Tabla 2]

Secuencias de aminoácidos de CDR del anticuerpo B

Nombre	Secuencia
CDR1 de cadena pesada	RFGVH (SEQ ID NO. 44)
CDR2 de cadena pesada	VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO. 27)
CDR3 de cadena pesada	ESLFGVYYDYGYYSDY (SEQ ID NO. 28)
CDR1 de cadena ligera	RASQEISGYLS (SEQ ID NO. 29)
CDR2 de cadena ligera	AASTLDS (SEQ ID NO. 30)
CDR3 de cadena ligera	LQYASYPLT (SEQ ID NO. 31)

[Tabla 3]

Secuencias de ácido nucleico de CDR del anticuerpo B

Nombre	Secuencia
CDR1 de cadena pesada	AGATTTGGAGTGCAT (SEQ ID NO. 49)
CDR2 de cadena pesada	GTGATCTGGAGGGGAGGATCCACCGACTACAACGCTGCTTTTATGAGC (SEQ ID NO. 50)
CDR3 de cadena pesada	GAGAGCCTGTTCGGCGTGTACTATGACTACGGCTACTATTCTATGGAT TAT (SEQ ID NO. 51)
CDR1 de cadena ligera	CGCGCCTCCCAGGAGATCTCTGGCTACCTGTCC (SEQ ID NO. 52)
CDR2 de cadena ligera	GCTGCCTCCACCCTGGACTCT (SEQ ID NO. 53)
CDR3 de cadena ligera	CTGCAGTACGCTTCCTATCCACTGACC (SEQ ID NO. 54)

5 [0155]

Ejemplo 2: Afinidad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado frente a EphA4 humano

Se determinó la afinidad de unión del anticuerpo B obtenido en el Ejemplo 1 frente a EphA4 humano mediante resonancia de plasmones superficiales (método SPR) empleando Biacore T200 (GE

10

Healthcare). En primer lugar, se fijó el anticuerpo anti-His (GE Healthcare, 28-9950-56) en un chip sensor CM5. Se realizó la fijación mediante un método de acoplamiento de amina que empleó clorhidrato de N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y se empleó etanolamina para el bloqueo (el chip sensor y los reactivos de fijación eran de GE Healthcare). Se diluyó esto a 3.5 µg/mL con el tampón de fijación (acetato de sodio 10 mM, pH 4.5), y se fijó en el chip sensor de acuerdo con el protocolo unido a Biacore T200. Se diluyó SEAP-His10 de la región extracelular de EphA4 humano con el tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), y la disolución se envió a una célula de flujo durante 120 segundos para su captura (la cantidad capturada es de aproximadamente 10 RU). Posteriormente, se observó secuencialmente el anticuerpo B diluido en serie en el rango de 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6 y 0 nM con HBS-EP se añadió al chip sensor durante 120 segundos, y la curva de reacción de unión en el momento de la adición (fase de unión, 120 segundos) y una vez completada la adición (fase de disociación, 600 segundos). Tras completar cada observación, se añadió MgCl₂ 4 M (60 segundos, Wako Pure Chemical) para regenerar el chip sensor. El análisis de ajuste mediante un modelo de unión 1:1 que empleó el software de evaluación BIA adjunto al sistema se realizó sobre la curva de reacción de unión obtenida, y se calculó la afinidad ($K_D = k_d/k_a$) frente a EphA4 humano.

[0156]

La afinidad de unión del anticuerpo B frente a EphA4 humano (valor de K_D) fue 1.34×10^{-9} M (Figura 12). Se mostró que el anticuerpo B muestra una afinidad casi equivalente como el anticuerpo A que es el anticuerpo antes de la humanización.

[0157]

Ejemplo 3: Actividad de mejora de la escisión de EphA4 de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado en neuronas del hipocampo

Para el anticuerpo B obtenido en el Ejemplo 1, se realizó la evaluación de actividad de mejora de la escisión de EphA4

empleando neuronas del hipocampo siguiendo las etapas a continuación.

Se trataron neuronas del hipocampo de rata sembradas en una placa de 96 pocillos (Falcon) con anticuerpo B (2.0, 6.7, y 20 nM) y fármaco inhibidor de la γ selectasa Compuesto E (50 nM, Enzo Life Sciences). Veinticuatro horas después, esto se lavó con PBS (Wako Pure Chemical), tampón de muestra SDS (tampón de muestra Laemmli (Bio-Rad) y 2-mercaptoetanol al 5% (Bio-Rad)) se añadió para recuperar las células, y esto fue hervido por 5 minutos. Se realizó SDS-PAGE con esta muestra, se realizó transferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), se cuantificó la fuerza de la banda, y se calculó el valor del fragmento C-terminal de EphA4/EphA4 de longitud completa.

[0158]

Reacción de escisión de EphA4 mejorada de forma dependiente de la concentración del anticuerpo B en las neuronas del hipocampo (Figura 13).

[0159]

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

Para el anticuerpo b obtenido en el Ejemplo 1, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria de la unión entre EphA4 humano y ligando humano siguiendo las etapas a continuación. Se cubrió el anticuerpo fosfatasa anti-alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembró la proteína de la región extracelular -SEAP-His (concentración final 10 nM) en los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a los pocillos el ligando y el anticuerpo B diluido en serie (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, y 3000 nM) . Obsérvese que se emplearon la quimera

de Efrina A5-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final de 0.7 nM) y quimera de Efrina B3-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final 2.3 nM) como ligandos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y de lavar tres veces, se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y esto se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos y se incubó esto a temperatura ambiente durante 2-5 minutos. Se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

[0160]

El anticuerpo B suprimió de manera dependiente de la concentración la unión entre EphA4 humano y ligando humano, y los valores de CI₅₀ frente a la unión de Efrina A5 y Efrina B3 humana fueron aproximadamente 4,9 nM y 1,6 nM, respectivamente. Por consiguiente, se encontró que el anticuerpo B inhibe fuertemente la unión entre EphA4 humano y el ligando humano, y muestra una actividad inhibitoria casi equivalente como el anticuerpo A que es el anticuerpo antes de la humanización (Figura 14).

[0161]

Ejemplo 5: Actividad inhibidora de la unión EphA4 de ratón-ligando de ratón de anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4

Para el anticuerpo B obtenido en el Ejemplo 1, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria de la unión entre EphA4 de ratón y ligando de ratón siguiendo las etapas a continuación. Se cubrió el anticuerpo fosfatasa anti-alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.02%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se añadió una proteína de la región extracelular de EphA4 de

ratón-SEAP-His a los pocillos (concentración final 10 nM), y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron a los pocillos el ligando y el anticuerpo B diluido en serie (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, y 3000 nM) . Obsérvese que se emplearon la quimera de Efrina A1-Fc de ratón biotinilada (R&D Systems, concentración final de 6 nM) y quimera de Efrina B2-Fc de ratón biotinilada (R&D Systems, concentración final 2.5 nM) como ligandos. Después de incubar a temperatura ambiente durante una hora y de lavar tres veces, se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y esto se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces, se añadió disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los uno de los pocillos y se incubó esto a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

[0162]

El anticuerpo B suprimió de manera dependiente de la concentración la unión entre EphA4 de ratón y ligando de ratón, y los valores de CI₅₀ frente a la unión de Efrina A1 y Efrina B2 de ratón fueron aproximadamente 8,7 nM y 4,2 nM, respectivamente. Por consiguiente, se encontró que el anticuerpo B inhibe fuertemente la unión entre EphA4 de ratón y el ligando de ratón, y muestra una actividad inhibitoria casi equivalente como el anticuerpo A que es el anticuerpo antes de la humanización (Figura 15).

[0163]

Ejemplo 6: Selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado frente al receptor Eph humano

De manera similar al método para preparar la proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón -SEAP-His descrita en el Ejemplo de Referencia 1, se amplificaron las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de

cada receptor Eph de humanos (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) mediante RT-PCR con ARN total derivado de tejido, y se clonaron en el vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) que tiene la
5 secuencia de ADN que codifica para SEAP y etiqueta de histidina. A continuación, las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de humano, proteína SEAP, y la etiqueta de histidina se transfirieron al vector pcDNA 3.1_rfcB mediante LR reacción de Gateway System
10 (Invitrogen/LifeTechnologies) para construir vectores (denominados "vector de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor Eph-SEAP-His") que expresa una proteína que tiene proteína SEAP y la etiqueta de His fusionada con la región extracelular de cada receptor Eph de humano (denominado
15 "proteína de la región extracelular del receptor Eph-SEAP-His").
[0164]

A continuación, se introdujo cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor Eph humano-SEAP-His en células Expi293F (Gibco/ThermoFisher) con
20 el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Después de cinco días de incubación (CO₂ al 5%, 37°C), se recuperó el sobrenadante del cultivo, y se centrifugó esto a temperatura ambiente, a 1500 rpm, y durante 5 minutos. Se filtró el sobrenadante centrifugado con un filtro de 0.45 µm (Millipore).
25 [0165]

Para el anticuerpo B obtenido en el Ejemplo 1, se realizó la evaluación de la actividad de unión del receptor Eph humano siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrió el anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl
30 Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembró cada una
35 de las proteínas de la región extracelular del receptor Eph humano-SEAP-His (concentración final 1 nM) en cada pocillo, y se

incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, solución de IgG humana (100 µg/mL, Mitsubishi Pharma Corporation) y anticuerpo B (10 µg/mL) se añadieron a cada los pocillos y se incubó esto a la temperatura ambiente durante B hora. Se añadió anticuerpo IgG anti-humano de burro marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió la disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0166]

Se encontró que el anticuerpo B, de manera similar al anticuerpo A que es el anticuerpo antes de la humanización, se une específicamente a EphA4 humano entre la familia del receptor Eph humano (Figura 16).

[0167]

Ejemplo 7: Selectividad de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado frente al receptor Eph de ratón

Siguiendo el método para preparar la proteína de la región extracelular de EphA4-Fc-His según el Ejemplo de Referencia 1, se amplificaron las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de ratón (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) mediante RT-PCR con ARN total derivado de tejido, y se clonaron en el vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) que tiene la secuencia de ADN que codifica para la región Fc de IgG₁ humano y etiqueta de histidina. A continuación, las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y región extracelular de cada receptor Eph (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) de ratón, Fc, y etiqueta de histidina se

transfirieron al vector pcDNA 3.1_rfcB mediante reacción LR del Sistema Gateway (Invitrogen/LifeTechnologies) para construir cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor Eph de ratón-Fc-His. En la construcción del vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA2 de ratón-Fc-His, las secuencias de ADN que codifican para la secuencia señal y la región extracelular de EphA2 de ratón se amplificaron mediante RT-PCR con ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pcDNA3.1 que tiene la secuencia de ADN que codifica para Fc y etiqueta de histidina para construir un vector de expresión de la proteína de la región extracelular de EphA2 de ratón-Fc-His.

[0168]

A continuación, se introdujo cada uno de los vectores de expresión de la proteína de la región extracelular del receptor Eph de ratón-Fc-His en células Expi293F (Gibco/ThermoFisher) con el sistema de expresión Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Después de 5 días de cultivo (CO₂ al 5%, 37°C, 120 rpm), se recuperó el sobrenadante del cultivo, y se centrifugó esto a temperatura ambiente, a 1500 rpm, y durante 5 minutos. Se filtró el sobrenadante centrifugado con un filtro de 0.45 µm (Millipore).

[0169]

Para el anticuerpo B, se realizó la evaluación de la actividad de unión de receptor Eph de ratón siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrió el anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembró cada una de las proteínas de la región extracelular del receptor Eph de ratón Fc-His (concentración final 1 nM) en cada pocillo, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, solución de IgG humana (100 µg/mL, Sigma) y anticuerpo B (10 µg/mL) se añadieron a cada los pocillos

y se incubó esto a la temperatura ambiente durante 8 hora. Se añadió anticuerpo de cadena ligera (IBL) anti-humano de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió la disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0170]

Entre la familia del receptor Eph de ratón, el anticuerpo B tenía actividad de unión específica solo hacia EphA4 de ratón (Figura 17).

[0171]

Ejemplo 8: Reactividad de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado frente a EphA4 de ratón, rata, mono y humana

[0172]

Para el anticuerpo B, se realizó la evaluación de la actividad de unión con diversas EphA4 siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrió el anticuerpo fosfatasa anti-alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante tres veces con Tween 20 al 0.05%/PBS (Thermo SCIENTIFIC), se sembraron proteínas de la región extracelular de EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano-SEAP-His (concentración final 1 nM) en los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadieron disolución de IgG humano (100 µg/mL, Mitsubishi Pharma Corporation) y anticuerpo B (0, 0.00013, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, y 10 µg/mL) a los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió anticuerpo IgG anti-humano de burro

marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió la disolución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos, y se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0173]

El anticuerpo B tenía una actividad de unión equivalente en todas las EphA4 de ratón, rata, mono y ser humano (Figura 18).

[0174]

Ejemplo 9: Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado frente a la región extracelular de EphA4 humano, dominio de unión a ligando, dominio 1 de fibronectina tipo III, dominio 2 de fibronectina tipo III

Para el anticuerpo B obtenido en el Ejemplo 1, se realizó la evaluación de la actividad de unión con diversos dominios en EphA4 humano siguiendo las etapas a continuación.

Se cubrió el anticuerpo anti-6-His de conejo (Bethyl Laboratories) en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc). Después de la incubación a 4°C durante la noche, se bloquearon los pocillos a temperatura ambiente durante una hora con Block ACE al 1% (DS Pharma Biomedical). Después de lavar durante dos veces con Tween 20 al 0.02%/PBS (Nacalai Tesque), se sembraron la proteína de la región extracelular de EphA4 humano-MBP-His, proteína de dominio de unión a ligando de EphA4 humano-MBP-His, proteína del dominio 1 de fibronectina tipo III-MBP-His de EphA4 humano, y proteína del dominio 2 de fibronectina tipo III-MBP-His de EphA4 humano (concentración final 10 nM) en los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante tres veces, se añadió el anticuerpo B (final concentración 10 nM) a los pocillos, y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió anticuerpo del fragmento $\text{Fc}\gamma$ de IgG anti-humano de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante

(Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar durante cinco veces, se añadió la disolución de TMB (KLP) a los pocillos, y tras la confirmación de una cantidad moderada de coloración, se
5 añadió una cantidad igual de la disolución de detención (H_2SO_4 2 N, Wako Pure Chemical) a los pocillos. Se leyó la absorbancia a 450 nm y 650 nm por un lector de microplacas (PerkinElmer).

[0175]

El anticuerpo B tenía la actividad de unión para la región
10 extracelular de EphA4 humano (ECD) y dominio de unión a ligando (LBD) (Figura 19). No hubo reacción para el dominio 1 de fibronectina tipo III (FN1) y dominio 2 de fibronectina tipo III (FN2). Por consiguiente, se encontró que el anticuerpo B se une específicamente al dominio de unión a ligando de la región
15 extracelular de EphA4 humano.

[0176]

Ejemplo 10: Efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado sobre el aumento del número de espinas en la neurona del hipocampo

20 Se realizó la preparación de neuronas del hipocampo de rata tal como se describe en el Ejemplo de Referencia 1 (B). Se introdujeron neuronas del hipocampo de rata con el gen EGFP empleando Nucleofector (Lonza), y se sembraron en una placa de 24 pocillos (Falcon) que contenía un cubreobjeto (Matsunami Glass
25 Industries) recubierto con poli-L-lisina.

[0177]

El conteo de espinas empleando neuronas del hipocampo se realizó siguiendo las etapas a continuación. Las neuronas del hipocampo de rata introdujeron EGFP en el cultivo el día 13
30 sembrado en una placa de 24 pocillos (Falcon) que contenía una cubierta de vidrio (Matsunami Glass Industries) recubierta con poli-L-lisina y se trataron con anticuerpo de control (IgG_2 humano; Sigma) o anticuerpo A (6,7 y 20 nM) durante 24 horas. Se transfirió el vidrio de cobertura a PFA al 2% (Wako Pure Chemical)/sacarosa
35 al 4% (Wako Pure Chemical)/PBS, y esto se dejó en reposo durante 20 minutos para fijar las células. Después de eliminar la

disolución de fijación y lavar las células tres veces con PBS, se añadió Tritón X-100 (Wako Pure Chemical)/PBS al 0,25%, y se realizó la permeabilización celular durante 15 minutos. Se retiró la disolución, se transfirió el vidrio de cobertura a BSA al 2% (Sigma)/Tritón X-100 al 0,25%/OPTI-MEM (GIBCO) y se sometió a un bloqueo de una hora, después de lo cual se realizó el anticuerpo anti-GFP (Nacalai Tesque) se dejó reaccionar durante 1,5 horas. Después de retirar la disolución de anticuerpo primario y lavar tres veces con PBS, se permitió que el anticuerpo secundario reaccionara durante una hora. Después de eliminar la disolución de anticuerpo secundario y lavar tres veces con PBS, se añadió el reactivo Antifade Prolong Gold (sondas moleculares) para el montaje, y se realizó la observación con LSM800 (ZEISS). Se llevó a cabo el experimento descrito anteriormente tres veces, y para cada experimento, se extrajeron neuronas de dos cubreobjetos, se contaron las espinas en cada dendrita con el software de análisis de imágenes Imaris® (Bitplane), y se calculó el número de espinas por 10 μm para cada neurona.

[0178]

El anticuerpo B aumentó el número de espinas en la neurona del hipocampo (Figura 20). Este resultado muestra que el anticuerpo B tiene la actividad para estabilizar espinas en neuronas del hipocampo.

[0179]

Ejemplo 11: Actividad de mejora de la escisión de EphA4 humano de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado

Para el anticuerpo B obtenido en el Ejemplo 1, se realizó la evaluación de la actividad de mejora de la escisión en EphA4 humano siguiendo las etapas a continuación.

Se realizó la preparación de neuronas del hipocampo de rata tal como se describe en el Ejemplo de Referencia 1 (B). Se introdujeron neuronas del hipocampo de rata con un vector de expresión de proteína EphA4-HA humano empleando Nucleofector (Lonza), y se sembraron en una placa de 96 pocillos (Falcon) se recubrieron con poli-L-lisina. Se trataron las neuronas del

hipocampo de rata sembradas en el anticuerpo B (6.7, 20, y 67 nM) y γ fármaco inhibidor de la selectasa Compuesto E (50 nM, Enzo Life Sciences). Aproximadamente veinticuatro horas después, esto se lavó con PBS (Wako Pure Chemical), tampón de muestra SDS (tampón de muestra Laemmli (Bio-Rad) y 2-mercaptoetanol al 5% (Bio-Rad)) se añadió para recuperar las células, y esto fue hervido por 5 minutos. Se realizó SDS-PAGE con esta muestra, se realizó transferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal anti-HA de rata (Roche), se cuantificó la fuerza de la banda, y se calculó el valor del fragmento C-terminal de EphA4/EphA4 de longitud completa.

[0180]

El anticuerpo B potenció la reacción de escisión de EphA4 humano en neuronas del hipocampo (Figura 21).

[0181]

Ejemplo 12: Implicación de MMP y ADAM frente al efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado sobre el aumento del número de espinas en la neurona del hipocampo

Se realizó la preparación de neuronas del hipocampo de rata tal como se describe en el Ejemplo de Referencia 1 (B). Se introdujo una parte de neuronas del hipocampo de rata con el gen EGFP empleando Nucleofector (Lonza), y se sembraron en una placa de 24 pocillos (Falcon) que contenía un cubreobjeto (Matsunami Glass Industries) recubierto con poli-L-lisina.

[0182]

El conteo de espinas empleando neuronas del hipocampo se realizó siguiendo las etapas a continuación. Las neuronas del hipocampo de rata introducidas con EGFP en el cultivo el día 13 sembrado en una placa de 24 pocillos (Falcon) que contenía una cubierta de vidrio (Matsunami Glass Industries) recubierta con poli-L-lisina y se trataron con anticuerpo de control (IgG₂ humano; Sigma) o anticuerpo B (20 nM), así como DMSO (Sigma) o inhibidor GM6001 de MMP y ADAM (2.5 μ M, MedChemExpress) durante 24 horas. Se transfirió el vidrio de cobertura a PFA al 2% (Wako Pure Chemical)/sacarosa al 4% (Wako Pure Chemical)/PBS, y esto se dejó

en reposo durante 20 minutos para fijar las células. Después de eliminar la disolución de fijación y lavar las células tres veces con PBS, se añadió Tritón X-100 (Wako Pure Chemical)/PBS al 0,25%, y se realizó la permeabilización celular durante 15 minutos. Se retiró Tritón X-100 al 0.25%/PBS, se transfirió el cubreobjeto a BSA al 2% (Sigma)/Tritón X-100 al 0.25%/OPTI-MEM (GIBCO) y se sometió a una hora de bloqueo, después de lo cual el anticuerpo anti-GFP (Nacalai Tesque) se dejó reaccionar durante 1.5 horas. Después de retirar la disolución de anticuerpo primario y lavar tres veces con PBS, se permitió que el anticuerpo secundario reaccionara durante una hora. Después de eliminar la disolución de anticuerpo secundario y lavar tres veces con PBS, se añadió el reactivo Antifade Prolong Gold (sondas moleculares) para el montaje, y se realizó la observación con LSM800 (ZEISS). Se llevó a cabo el experimento descrito anteriormente tres veces, y para cada experimento, se extrajeron neuronas de dos cubreobjetos, se contaron las espinas en cada dendrita con el software de análisis de imágenes Imaris® (Bitplane), y se calculó el número de espinas por 10 μm para cada neurona.

[0183]

Se inhibió el aumento en el número de espinas en la neurona del hipocampo mediante anticuerpo B mediante tratamiento simultáneo con GM6001 (Figura 22). Este resultado muestra que el anticuerpo B tiene una actividad de estabilización de espina a través de MMP y ADAM en neuronas del hipocampo.

[0184]

Ejemplo 13: Efecto del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado para suprimir la fosforilación tau *in vivo*

Se realizó la evaluación del efecto para suprimir la fosforilación tau *in vivo* empleando ratón transgénico tau (rTg4510) siguiendo las etapas a continuación. Se administraron por vía subcutánea los ratones transgénicos Tau (rTg4510) dos veces a la semana de 20 a 26 semanas de edad con anticuerpo B a una dosis de 100 mg/kg (10 ml/kg). Se administró por vía subcutánea PBS (Wako Pure Chemical) a 10 ml/kg para el grupo de control. En

3,5 días después de la administración final, se anestesiaron los ratones con fármaco anestésico por inhalación isoflurano al 2-2.5% (Intervet) y una mezcla de tres tipos de fármacos anestésicos (4.0 mg/kg de Dormicum (Astellas Pharma), 0.3 mg/kg de Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo), y 5.0 mg/kg de Vetorphale (Meiji Seika Pharma)), se realizó la perfusión con anestesia con PBS (Wako Pure Chemical) que contiene 3 unidades/mL de heparina (Ajinomoto) y cóctel de inhibidor de fosfatasa al 1% (Nacalai Tesque), y se resecó el hemisferio cerebral de ratón. Se fijó el hemisferio cerebral recogido a 4°C mientras que se agitaba durante la noche se sumergió en paraformaldehído al 2% (TAAB)/tampón fosfato 0.1 M (Wako Pure Chemical). Se sustituyó el hemisferio cerebral con sacarosa al 10% (Wako Pure Chemical)/tampón fosfato 0.1 M (Wako Pure Chemical) y posteriormente sacarosa al 20%/tampón fosfato 0.1 M (Wako Pure Chemical), y luego se incrustó en Tissue-Tek O.C.T. El compuesto (Sakura Finetek Japón)/sacarosa al 20%, se congeló empleando un bloque de aluminio enfriado con nitrógeno líquido. Se crearon cortes del hemisferio cerebral con un espesor de 7 μ m con criostato CM1860 (Leica). Se adhirieron los cortes en un portaobjetos de vidrio recubierto con silano (Muto Pure Chemicals), se secaron al aire con aire frío, y luego se colocaron en una bolsa sellada y se almacenaron a -80°C. Se llevó el portaobjetos de vidrio usado para la inmunotinción hasta -80°C, se secó al aire con aire frío y luego se lavó con PBS (Wako Pure Chemical), se sumergió en BSA al 1% (Sigma)/suero de burro normal al 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories)/disolución de Tritón X-100 al 0,5% (Wako Pure Chemical)/PBS, y se sometió a una hora de bloqueo, después de lo cual se dejó reaccionar el anticuerpo tau anti-fosforilado AT8 (Fujirebio Europe NV) durante la noche a temperaturas habituales. Después de lavar tres veces con PBS, se permitió que el anticuerpo secundario reaccionara durante una hora. Después de lavar durante tres veces con PBS, se colocó el reactivo Prolong Gold Antifade (sondas moleculares) en el corte y se montó, y se realizó observación con LSM700 (ZEISS). Se midió el área positiva para la señal de AT8 en el estrato radiado del hipocampo CA1 con el software de análisis de imágenes Metamorph, y se calculó

la proporción del área de señal positiva de AT8 frente al área total.

[0185]

5 El anticuerpo B disminuyó la señal de tau fosforilado en la región del hipocampo CA1 (Figura 23). Este resultado muestra que el anticuerpo B tiene la actividad para suprimir la progresión de la patología de tau en ratón transgénico tau (rTg4510).