

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年5月19日(19.05.2023)



(10) 国際公開番号

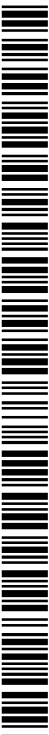
WO 2023/085320 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/13 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/041723
- (22) 国際出願日: 2022年11月9日(09.11.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-184126 2021年11月11日(11.11.2021) JP
- (71) 出願人: エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社 (EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川四丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 川勝 智生 (KAWAKATSU, Tomomi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目8番地2 株式会社カン研究所内 Hyogo (JP). 田原 和浩 (TAHARA, Kazuhiro); 〒3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 集田 和好 (SHUTA, Kazuyoshi); 〒3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 南条 雅裕, 外 (NANJO, Masahiro et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿1-1-7 コスモ新宿御苑ビル3階 特許業務法人 東京 A C T i 国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: ANTI-EPHA4 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗E p h A 4抗体

(57) Abstract: [Problem] To provide an antibody that can bind specifically to EphA4 and detect EphA4 at high detection sensitivity and a method and a kit for detecting or quantifying EphA4 characterized by the antibody. [Solution] Provided are an antibody having a specific heavy chain CDR sequence and light chain CDR sequence and an antigen-binding fragment thereof, and a method and kit characterized by the same. Specifically, an antibody according to the present invention or antigen-binding fragment thereof includes: (a) a heavy chain including a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 52, a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 53, and a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 54, and a light chain including a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 55, a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 56, and a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 57; (b) a heavy chain including a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 64, a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 65, and a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 66, and a light chain including a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 67, a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 68, and a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 69; or (c) a heavy chain including a heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 40, a heavy chain CDR2 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 41, and a heavy chain CDR3 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 42, and a light chain including a light chain CDR1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 43, a light chain CDR2 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 44, and a light chain CDR3 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 45.



WO 2023/085320 A1

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約：【課題】 特異的に E p h A 4 に結合し、高い検出感度で E p h A 4 を検出することが可能な抗体、ならびに当該抗体によって特徴付けられる E p h A 4 の検出または定量方法およびキットを提供すること。【解決手段】 特定の重鎖 C D R 配列および軽鎖 C D R 配列を有する抗体およびその抗原結合性断片、ならびにそれらによって特徴付けられる方法およびキットが提供される。具体的に、本発明に係る抗体またはその抗原結合性断片は、(a) 配列番号 5 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ; 配列番号 5 3 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および配列番号 5 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖 ; ならびに配列番号 5 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 5 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および配列番号 5 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖 ; (b) 配列番号 6 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 5 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および配列番号 6 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖 ; ならびに配列番号 6 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および配列番号 6 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖 ; または (c) 配列番号 4 0 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ; 配列番号 4 1 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および配列番号 4 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖 ; ならびに配列番号 4 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 4 4 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および配列番号 4 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖を含む。

明 細 書

発明の名称：抗E p h A 4 抗体

技術分野

[0001] 本開示は、E p h A 4 に結合する抗体、当該抗体をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを含む細胞、当該抗体の作製方法、および、当該抗体を用いたE p h A 4 の検出または定量方法、およびE p h A 4 を検出または定量するためのキットに関する。

背景技術

[0002] E p h A 4 は、レセプター型チロシンキナーゼファミリーの1つであり、樹状突起の上に存在する小さなとげ状の構造体であるスパインを制御している分子である。E p h r i n t y p e A および t y p e B が E p h A 4 のリガンドとして知られており、E p h A 4 とそのリガンドである e p h r i n が結合すると、脱接着シグナルが誘導され、スパインの退縮が引き起こされる。E p h A 4 は海馬や大脳皮質で多く発現しており、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) やADAM (a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e i n a s e) によって、その細胞外領域が切断される。この切断されたE p h A 4 の断片は、細胞外へ放出され、血漿中にも存在している (特許文献1)。

[0003] E p h A 4 は、これまでに、アルツハイマー病 (A l z h e i m e r ' s d i s e a s e、以下「AD」とも称する) の病態への関与が示唆されている (非特許文献1から4)。例えば、E p h A 4 は、AD患者やADモデルマウスにおいて活性化されることが知られており (非特許文献2から4)、また、ADにおいてはスパインの密度が減少し、その程度がADの臨床症状と関連していることから (非特許文献5)、異常なE p h A 4 の活性化がADの発症や病態進行の原因の一つではないかと考えられている (非特許文献6)。生体内におけるE p h A 4 は、AD等の所与の神経系疾患を検出し得るマーカーとしての可能性が示唆されており、従来の抗体よりも高い検出

感度で生体試料中のEphA4またはその細胞外断片を検出することができる抗体が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO2012/147798A1

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Rosenberger AF et al., Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 16;2:79

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

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

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

非特許文献5：Boros et al., Ann Neurol. 2017 Oct;82(4):602-614

非特許文献6：Vargas LM et al., Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Apr;1864:1148-1159

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本開示は、特異的にEphA4に結合し、高い検出感度でEphA4を検出することが可能な抗体を提供することを目的とする。

本開示はまた、前記抗体を用いた、EphA4を検出または定量する方法を提供することを目的とする。

本開示はさらに、高い検出感度で特異的に E p h A 4 を検出または定量することが可能な抗 E p h A 4 抗体を含むキットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために、ウサギ抗体ファージライブラリーのスクリーニングから得られた多数の s c F v から、特に高い検出感度で特異的に E p h A 4 に結合することが可能な抗体を組成できること見出し、抗 E p h A 4 抗体を完成するに至った。

[0008] したがって、本開示は以下の特徴を包含する。

[1] 抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体は、

(a) 配列番号 5 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ;

配列番号 5 3 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および

配列番号 5 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖

; ならびに

配列番号 5 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;

配列番号 5 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および

配列番号 5 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖

;

(b) 配列番号 6 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ;

配列番号 6 5 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および

配列番号 6 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖

; ならびに

配列番号 6 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;

配列番号 6 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および

配列番号 6 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖

; または

(c) 配列番号 4 0 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ;

配列番号 4 1 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および
配列番号 4 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖
; ならびに

配列番号 4 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;

配列番号 4 4 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および

配列番号 4 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖

;

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[0009] [2] [1] に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であ
って、

前記抗体は、

配列番号 5 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ;

配列番号 5 3 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および

配列番号 5 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖 ; な

らびに

配列番号 5 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;

配列番号 5 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および

配列番号 5 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖 ;

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[0010] [3] [2] に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であ
って、

前記抗体は、

配列番号 1 0 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、 および

配列番号 1 1 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[0011] [4] [2]に記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および

配列番号15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0012] [5] [1]に記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号64に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

配列番号65に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および

配列番号66に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；な

らびに

配列番号67に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

配列番号68に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

配列番号69に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖；

を含む、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0013] [6] [5]に記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および

配列番号19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0014] [7] [1]に記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号40に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

配列番号41に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および

配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；な
らびに

配列番号43に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

配列番号44に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

配列番号45に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖；

を含む、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0015] [8] [7]に記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片であ
って、

前記抗体は、

配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および

配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0016] [9] [1]から[8]のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体またはそ
の抗原結合性断片であって、

前記抗体の重鎖定常領域は、ウサギI g Gの定常領域である、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0017] [10] [9]に記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片で
あって、

前記ウサギI g Gの定常領域は、配列番号22に示すアミノ酸配列を含む

、

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。

[0018] [11] [1]から[10]のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体また
はその抗原結合性断片であって、

前記抗体の軽鎖定常領域は、ウサギ I g κ の定常領域である、
抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[0019] [1 2] [1 1] に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片
であって、

前記ウサギ I g κ の定常領域は、配列番号 2 3 に示すアミノ酸配列を含む
、
抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[0020] [1 3] 抗 E p h A 4 抗体であって、

前記抗体は、
配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列を含む重鎖、および
配列番号 2 5 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0021] [1 4] 抗 E p h A 4 抗体であって、

前記抗体は、
配列番号 2 8 に示すアミノ酸配列を含む重鎖、および
配列番号 2 9 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0022] [1 5] 抗 E p h A 4 抗体であって、

前記抗体は、
配列番号 3 2 に示すアミノ酸配列を含む重鎖、および
配列番号 3 3 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0023] [1 6] 抗 E p h A 4 抗体であって、

前記抗体は、
配列番号 3 6 に示すアミノ酸配列を含む重鎖、および

配列番号 37 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、
抗 E p h A 4 抗体。

[0024] [17] [1] から [16] のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体またはその抗原結合性断片が標識されている、
抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[0025] [18] [1] から [16] のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸。

[0026] [19] [18] に記載の核酸を含むベクター。

[0027] [20] [19] に記載のベクターを含む宿主細胞。

[0028] [21] [20] に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片の作製方法。

[0029] [22] [1] から [16] のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸を含む宿主細胞を培養する工程を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片の作製方法。

[0030] [23] 生体試料中のヒト E p h A 4 を検出または定量する方法であって、

前記生体試料と、 [1] から [16] のいずれかに記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片とを接触させることを含む、
方法。

[0031] [24] [23] に記載の方法であって、
前記ヒト E p h A 4 は、ヒト E p h A 4 の N 末端断片である、方法。

[0032] [25] [23] または [24] に記載の方法であって、
前記生体試料が、血液、血清、血漿、または脳脊髄液である、方法。

[0033] [26] [23] から [25] のいずれかに記載の方法であって、
前記方法が、E L I S A である、方法。

[0034] [27] [23] から [26] のいずれかに記載の方法であって、

前記方法が、サンドイッチELISAである、方法。

[0035] [28] [23] から [27] のいずれかに記載の方法であって、
さらに、前記生体試料と、[17] に記載の標識された抗EphA4抗体
またはその抗原結合性断片とを接触させることを含む、
方法。

[0036] [29] ヒトEphA4を検出または定量するためのキットであって、
[1] から [17] のいずれかに記載の抗EphA4抗体またはその抗原
結合性断片を含む、
キット。

[0037] [30] [29] に記載のキットであって、
前記キットは、サンドイッチELISAキットであり、
前記抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片を少なくとも2種類含む
、
キット。

[0038] [31] [29] または [30] に記載のキットであって、
配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号
15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗EphA4抗体ま
たはその抗原結合性断片、ならびに、
配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号
19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗EphA4抗体ま
たはその抗原結合性断片、
を含む、
キット。

[0039] [32] [29] または [30] に記載のキットであって、
配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号7
に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗EphA4抗体または
その抗原結合性断片、ならびに、
配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号

15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、
を含む、
キット。

[0040] [33] [29] または [30] に記載のキットであって、
配列番号10に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号11に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、ならびに、
配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、
を含む、
キット。

[0041] [34] [29] から [33] のいずれかに記載のキットであって、
前記ヒトE p h A 4は、ヒトE p h A 4のN末端断片である、
キット。

[0042] [35] [29] から [34] のいずれかに記載のキットであって、
前記キットは、ヒトE p h A 4のN末端断片を含む、
キット。

[0043] [36] 生体試料中のヒトE p h A 4を検出または定量するための、 [29] から [35] のいずれかに記載のキット。

[0044] [37] [36] に記載のキットであって、
前記生体試料が、血液、血清、血漿、または脳脊髄液である、キット。

[0045] [38] ヒトE p h A 4の検出または定量に使用するための、 [1] から [17] のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片。
。

[0046] [39] ヒトE p h A 4のN末端断片の検出または定量に使用するための、 [1] から [17] のいずれかに記載の抗E p h A 4抗体またはその抗

原結合性断片。

発明の効果

[0047] 本開示によれば、特異的にE p h A 4に結合し、高い検出感度でE p h A 4を検出することが可能な抗体が提供される。

本開示によればまた、高い検出感度で特異的にE p h A 4を検出することが可能な抗E p h A 4抗体を含むキットが提供される。

図面の簡単な説明

[0048] [図1]図1は、各ヒトE p h レセプターファミリーに対する、実施例1で作製した各抗ヒトE p h A 4モノクローナル抗体の結合活性の評価結果を示す。

[図2]図2は、各種E p h A 4に対する、実施例1で作製した各抗ヒトE p h A 4モノクローナル抗体の結合活性の評価結果を示す。

[図3]図3は、ヒトE p h A 4の各領域に対する、実施例1で作製した各抗ヒトE p h A 4モノクローナル抗体の結合活性の評価結果を示す。

[図4]図4は、ヒトE p h A 4細胞外領域に対する、実施例1で作製した抗ヒトE p h A 4モノクローナル抗体を組み合わせ用いたサンドイッチE L I S Aにおける、ヒトE p h A 4細胞外領域に対する評価結果S - N ((1 0 n g / m L の E p h A 4 細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) - (0 n g / m L の E p h A 4 細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)) を示す。

[図5]図5は、ヒトE p h A 4細胞外領域に対する、実施例1で作製した抗ヒトE p h A 4モノクローナル抗体を組み合わせ用いたサンドイッチE L I S Aにおける、ヒトE p h A 4細胞外領域に対する評価結果S / N ((1 0 n g / m L の E p h A 4 細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) / (0 n g / m L の E p h A 4 細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)) を示す。

[図6]図6は、ヒトE p h A 4細胞外領域に対する、実施例1で作製した抗ヒトE p h A 4モノクローナル抗体を組み合わせ用いたサンドイッチE L I S Aにおける、ヒトE p h A 4細胞外領域に対する評価結果S - N ((1 n

g/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) - (0 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))を示す。

[図7]図7は、ヒトEphA4細胞外領域に対する、実施例1で作製した抗ヒトEphA4モノクローナル抗体を組み合わせ用いたサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する評価結果S/N((1 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) / (0 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))を示す。

[図8]図8は、KPEP11_04、KPEP11_08、KPEP11_10およびKPEP11_18の各抗体のヒトEphA4に対する代表的な結合反応曲線を示す。

[図9]図9は、各ヒトEphレセプターファミリーに対する、KPEP11_04、KPEP11_08、KPEP11_10およびKPEP11_18の各抗体の結合特異性を示す。

[図10]図10は、マウス、ラット、ウサギ、サルおよびヒトEphA4に対する、KPEP11_04、KPEP11_08、KPEP11_10およびKPEP11_18の各抗体の反応性の結果を示す。

[図11]図11は、ヒトEphA4の細胞外領域(ECD)、リガンド結合ドメイン(LBD)、フィブロネクチンIII型ドメイン1(FN1)、フィブロネクチンIII型ドメイン2(FN2)、およびマルトース結合タンパク質(MBP)に対する、KPEP11_04、KPEP11_08、KPEP11_10およびKPEP11_18の各抗体の反応性の結果を示す。

[図12]図12は、抗体KPEP11_10とHRP標識抗体KPEP11_18を用いたサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性の結果を示す。

[図13]図13は、抗体KPEP11_10とHRP標識抗体KPEP11_18を用いたサンドイッチELISAにおける、脳脊髄液中のEphA4

N末端断片に対する反応性の結果を示す。

[図14]図14は、抗体KPEP11__18とHRP標識抗体KPEP11__10を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性の結果を示す。

[図15]図15は、抗体KPEP11__18とHRP標識抗体KPEP11__10を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性の結果を示す。

[図16]図16は、抗体KPEP11__10とHRP標識抗体KPEP11__04を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性の結果を示す。

[図17]図17は、抗体KPEP11__10とHRP標識抗体KPEP11__04を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性の結果を示す。

[図18]図18は、抗体KPEP11__18とHRP標識抗体KPEP11__08を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性の結果を示す。

[図19]図19は、抗体KPEP11__18とHRP標識抗体KPEP11__08を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性の結果を示す。

[図20]図20は、抗体KPEP11__10と、HRP標識抗体KPEP11__04、HRP標識抗体KPEP11__18、HRP標識EphA4抗体（SinoまたはR&D）を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果を示す。

[図21]図21は、抗体KPEP11__10と、HRP標識抗体KPEP11__04、HRP標識抗体KPEP11__18、HRP標識EphA4抗体（SinoまたはR&D）を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を示す。

[図22]図22は、抗体KPEP11__10と、HRP標識抗体KPEP11__04、HRP標識抗体KPEP11__18、HRP標識EphA4抗体（SinoまたはR&D）を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を示す。

[図23]図23は、抗体KPEP11__18と、HRP標識抗体KPEP11__08、HRP標識抗体KPEP11__10、HRP標識EphA4抗体（SinoまたはR&D）を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果を示す。

[図24]図24は、抗体KPEP11__18と、HRP標識抗体KPEP11__08、HRP標識抗体KPEP11__10、HRP標識EphA4抗体（SinoまたはR&D）を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を示す。

[図25]図25は、抗体KPEP11__18と、HRP標識抗体KPEP11__08、HRP標識抗体KPEP11__10、HRP標識EphA4抗体（SinoまたはR&D）を用いて構築したサンドイッチELISAにおける、ヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を示す。

[図26]図26は、LC-MSにて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果とELISA分析による定量解析1にて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果をもとに実施した相関解析の結果を示す。

[図27]図27は、LC-MSにて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果とELISA分析による定量解析2にて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果をもとに実施した相関解析の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0049] 本明細書で使用される配列番号によって特定またはコードされる領域は下記のとおりである：

SEQ No	配列領域	SEQ No	配列領域
1	tt EphA4 全長 (71/酸配列)	32	KPEP11_10 の重鎖全長 (71/酸配列)
2	tt EphA4 の細胞外領域 (71/酸配列)	33	KPEP11_10 の軽鎖全長 (71/酸配列)
3	tt EphA4 細胞外領域-SCAP-His タンパク質 (71/酸配列)	34	KPEP11_10 の重鎖全長 (核酸配列)
4	tt EphA4 細胞外領域-His タンパク質 (71/酸配列)	35	KPEP11_10 の軽鎖全長 (核酸配列)
5	tt EphA4 細胞外領域-EGF-His タンパク質 (71/酸配列)	36	KPEP11_18 の重鎖全長 (71/酸配列)
6	KPEP11_04 重鎖可変領域 (71/酸配列)	37	KPEP11_18 の軽鎖全長 (71/酸配列)
7	KPEP11_04 軽鎖可変領域 (71/酸配列)	38	KPEP11_18 の重鎖全長 (核酸配列)
8	KPEP11_04 重鎖可変領域 (核酸配列)	39	KPEP11_18 の軽鎖全長 (核酸配列)
9	KPEP11_04 軽鎖可変領域 (核酸配列)	40	KPEP11_04 重鎖 CDR1 (71/酸配列)
10	KPEP11_06 重鎖可変領域 (71/酸配列)	41	KPEP11_04 重鎖 CDR2 (71/酸配列)
11	KPEP11_06 軽鎖可変領域 (71/酸配列)	42	KPEP11_04 重鎖 CDR3 (71/酸配列)
12	KPEP11_06 重鎖可変領域 (核酸配列)	43	KPEP11_04 軽鎖 CDR1 (71/酸配列)
13	KPEP11_06 軽鎖可変領域 (核酸配列)	44	KPEP11_04 軽鎖 CDR2 (71/酸配列)
14	KPEP11_10 重鎖可変領域 (71/酸配列)	45	KPEP11_04 軽鎖 CDR3 (71/酸配列)
15	KPEP11_10 軽鎖可変領域 (71/酸配列)	46	KPEP11_04 重鎖 CDR1 (核酸配列)
16	KPEP11_10 重鎖可変領域 (核酸配列)	47	KPEP11_04 重鎖 CDR2 (核酸配列)
17	KPEP11_10 軽鎖可変領域 (核酸配列)	48	KPEP11_04 重鎖 CDR3 (核酸配列)
18	KPEP11_18 重鎖可変領域 (71/酸配列)	49	KPEP11_04 軽鎖 CDR1 (核酸配列)
19	KPEP11_18 軽鎖可変領域 (71/酸配列)	50	KPEP11_04 軽鎖 CDR2 (核酸配列)
20	KPEP11_18 重鎖可変領域 (核酸配列)	51	KPEP11_04 軽鎖 CDR3 (核酸配列)
21	KPEP11_18 軽鎖可変領域 (核酸配列)	52	KPEP11_06, KPEP11_10 重鎖 CDR1 (71/酸配列)
22	ウサギ IgG の定常領域 (71/酸配列)	53	KPEP11_06, KPEP11_10 重鎖 CDR2 (71/酸配列)
23	ウサギ IgG の定常領域 (71/酸配列)	54	KPEP11_06, KPEP11_10 重鎖 CDR3 (71/酸配列)
24	KPEP11_04 の重鎖全長 (71/酸配列)	55	KPEP11_06, KPEP11_10 軽鎖 CDR1 (71/酸配列)
25	KPEP11_04 の軽鎖全長 (71/酸配列)	56	KPEP11_06, KPEP11_10 軽鎖 CDR2 (71/酸配列)
26	KPEP11_04 の重鎖全長 (核酸配列)	57	KPEP11_06, KPEP11_10 軽鎖 CDR3 (71/酸配列)
27	KPEP11_04 の軽鎖全長 (核酸配列)	58	KPEP11_06, KPEP11_10 重鎖 CDR1 (核酸配列)
28	KPEP11_06 の重鎖全長 (71/酸配列)	59	KPEP11_06, KPEP11_10 重鎖 CDR2 (核酸配列)
29	KPEP11_06 の軽鎖全長 (71/酸配列)	60	KPEP11_06, KPEP11_10 重鎖 CDR3 (核酸配列)
30	KPEP11_06 の重鎖全長 (核酸配列)	61	KPEP11_06, KPEP11_10 軽鎖 CDR1 (核酸配列)
31	KPEP11_06 の軽鎖全長 (核酸配列)	62	KPEP11_06, KPEP11_10 軽鎖 CDR2 (核酸配列)

[0050]

SEQ No	配列領域	SEQ No	配列領域
63	KPEP11_08, KPEP11_10 の軽鎖 CDR3 (核酸配列)	95	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12 および KPEP11_13 の軽鎖 CDR1 (73/核酸配列)
64	KPEP11_18 の重鎖 CDR1 (73/核酸配列)	96	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12 および KPEP11_13 の軽鎖 CDR2 (73/核酸配列)
65	KPEP11_18 の重鎖 CDR2 (73/核酸配列)	97	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12 および KPEP11_13 の軽鎖 CDR3 (73/核酸配列)
66	KPEP11_18 の重鎖 CDR3 (73/核酸配列)	98	KPEP11_02, KPEP11_05 および KPEP11_07 の重鎖 CDR1 (73/核酸配列)
67	KPEP11_18 の軽鎖 CDR1 (73/核酸配列)	99	KPEP11_02 および KPEP11_05 の重鎖 CDR2 (73/核酸配列)
68	KPEP11_18 の軽鎖 CDR2 (73/核酸配列)	100	KPEP11_02 および KPEP11_05 の重鎖 CDR3 (73/核酸配列)
69	KPEP11_18 の軽鎖 CDR3 (73/核酸配列)	101	KPEP11_02, KPEP11_05 および KPEP11_07 の軽鎖 CDR1 (73/核酸配列)
70	KPEP11_18 の重鎖 CDR1 (核酸配列)	102	KPEP11_02, KPEP11_05 および KPEP11_07 の軽鎖 CDR2 (73/核酸配列)
71	KPEP11_18 の重鎖 CDR2 (核酸配列)	103	KPEP11_02, KPEP11_05 および KPEP11_07 の軽鎖 CDR3 (73/核酸配列)
72	KPEP11_18 の重鎖 CDR3 (核酸配列)	104	KPEP11_07 の重鎖 CDR2 (73/核酸配列)
73	KPEP11_18 の軽鎖 CDR1 (核酸配列)	105	KPEP11_07 の重鎖 CDR3 (73/核酸配列)
74	KPEP11_18 の軽鎖 CDR2 (核酸配列)	106	KPEP11_12, KPEP11_13 の重鎖 CDR2 (73/核酸配列)
75	KPEP11_18 の軽鎖 CDR3 (核酸配列)	107	KPEP11_20 の重鎖 CDR1 (73/核酸配列)
76	KPEP11_01 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	108	KPEP11_20 の重鎖 CDR2 (73/核酸配列)
77	KPEP11_01 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	109	KPEP11_20 の重鎖 CDR3 (73/核酸配列)
78	KPEP11_02 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	110	KPEP11_20 の軽鎖 CDR1 (73/核酸配列)
79	KPEP11_02 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	111	KPEP11_20 の軽鎖 CDR2 (73/核酸配列)
80	KPEP11_05 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	112	KPEP11_20 の軽鎖 CDR3 (73/核酸配列)
81	KPEP11_05 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	113	ヒト EphA4 全長 (73/核酸配列)
82	KPEP11_07 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	114	ヒト EphA4 細胞外領域 (73/核酸配列)
83	KPEP11_07 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	115	ウサギ EphA4 全長 (73/核酸配列)
84	KPEP11_09 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	116	ウサギ EphA4 細胞外領域 (73/核酸配列)
85	KPEP11_09 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	117	ラット EphA4 全長 (73/核酸配列)
86	KPEP11_12 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	118	ラット EphA4 細胞外領域 (73/核酸配列)
87	KPEP11_12 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	119	マウス EphA4 全長 (73/核酸配列)
88	KPEP11_13 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	120	マウス EphA4 細胞外領域 (73/核酸配列)
89	KPEP11_13 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	121	ヒト EphA4 シグナル配列 (73/核酸配列)
90	KPEP11_20 の重鎖可変領域 (73/核酸配列)	122	ブレイクポイントのシグナル配列 (73/核酸配列)
91	KPEP11_20 の軽鎖可変領域 (73/核酸配列)	123	ヒト EphA4 のシグナル結合ドメイン (73/核酸配列)
92	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12, KPEP11_13 の重鎖 CDR1 (73/核酸配列)	124	ヒト EphA4 のシグナル結合ドメイン I (73/核酸配列)
93	KPEP11_01, KPEP11_09 の重鎖 CDR2 (73/核酸配列)	125	ヒト EphA4 のシグナル結合ドメイン II
94	KPEP11_01, KPEP11_09, KPEP11_12 および KPEP11_13 の重鎖 CDR3 (73/核酸配列)	126	MRP-His タグ (73/核酸配列)

[0051] 本開示は、EphA4 に結合する抗EphA4 抗体に関する。

本開示に係る抗E p h A 4抗体は、E p h A 4を特異的に認識して結合することができる抗体である。抗E p h A 4抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは、E p h A 4との結合親和性を有する限り、合成抗体（例えば組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体等）であってもよい。本明細書において、E p h A 4は、ヒト、マウス、ラット、ウサギまたはサル由来のE p h A 4を指すものと理解することができる。ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル由来のE p h A 4は、米国生物工学情報センターが提供するG e n b a n k等、配列情報が登録された公共のデータベースから入手できるほか、近縁関係にある動物種のE p h A 4の塩基配列情報を元にプライマーを設計し、所望の動物種から抽出したRNAからクローニングすることで、E p h A 4遺伝子の配列情報を入手することが可能である。例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルのE p h A 4の塩基配列情報は、それぞれG e n b a n k A c c e s s i o n N o. NM_004438. 5、NM_007936. 3、NM_001162411. 1、XM_002712496. 3、NM_001260870. 1としてデータベース上に登録されている。

[0052] 本開示の一態様において、E p h A 4は、配列番号1に示すアミノ酸配列または当該アミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換・付加・欠失したアミノ酸配列を含む。ここで、「複数個」は、その元となる配列と同等の機能特性を保持する限り限定されないが、2個～100個、例えば2個～90個、2個～80個、2個～70個、2個～60個、2個～50個、2個～40個、2個～30個、2個～20個、2個～10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個または2個であるか、または、アミノ酸配列中のアミノ酸数の10%以内、例えば9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内または1%以内である。

[0053] 本開示において、「特異的な結合」という用語は、当該技術分野において当業者に周知の用語であり、抗体またはその抗原結合性断片の、抗原やエピトープに対する特異的な結合を決定するための方法も周知である。一実施形

態において、「特異的な結合」は、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片が、他の標的分子に結合するよりも、より大きな結合親和性、結合活性で、より迅速に、および／または、より長時間持続して、E p h A 4に免疫学的反応により結合可能であると理解される。別の実施形態において、「特異的な結合」は、E p h A 4に対して少なくとも約 10^{-7} M、または少なくとも約 10^{-8} M、または少なくとも約 10^{-9} M、または少なくとも 10^{-10} Mまたはそれ以下のKDを持つ抗体によって示されうる。また、さらに別の実施形態では、「特異的な結合」は、E p h A 4と免疫学的反応により結合するが、E p h レセプターの他のファミリー分子（例えばE p h A 1、E p h A 2、E p h A 3、E p h A 5、E p h A 6、E p h A 7、E p h A 8、E p h A 10、E p h B 1、E p h B 2、E p h B 3、E p h B 4、E p h B 6）とは実質的に結合しないと理解される。

[0054] 「抗原結合性断片」は、E p h A 4に対する特異的な結合性を維持する抗E p h A 4抗体の断片であれば特に限定されないが、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、s c F v等が挙げられる。

[0055] 抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の、抗原への結合特性（例えば、結合親和性および種交差反応性）を測定する方法は、当該技術分野において当業者に公知の方法を用いてよい。例えば、結合親和性は、B i a c o r e（登録商標）バイオセンサー、K i n E x Aバイオセンサー、シンチレーション近接アッセイ、E L I S A、O R I G E N免疫測定法（I G E N社）、フローサイトメトリー、蛍光消光、蛍光転移、酵母ディスプレイ、および／または、免疫染色を使用して測定してよいが、これらに限定されない。

[0056] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、I g G、I g AまたはI g M（またはこれらのサブクラス）等の任意のクラスであってよく、特定のクラスに限定されない。重鎖（H鎖と呼ぶこともある）の定常領域の抗体アミノ酸配列により、免疫グロブリンは、異なるクラスに分類される。5つの主な免疫グロブリンのクラス：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mがあり、これらの幾つかは、例えば、I g G₁、I g G₂、I

g G₃、I g G₄、ならびにI g A₁およびI g A₂というサブクラス（アイソタイプ）にさらに細分化され得る。異なるクラスの免疫グロブリンの対応する重鎖の定常領域は、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれている。また、抗体の軽鎖（L鎖と呼ぶこともある）の種類には λ 鎖および κ 鎖が存在する。

[0057] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、I g G抗体であってよく、また、本開示に係る抗E p h A 4抗体は、場合により、単量体、二量体または多量体の形態であってよい。

[0058] 本開示に係る抗体またはその抗原結合性断片の可変領域は、抗体軽鎖の可変領域および／または抗体重鎖の可変領域を意味してよく、抗体の定常領域は、抗体軽鎖の定常領域および／または抗体重鎖の定常領域を意味してよい。重鎖および軽鎖の可変領域は、それぞれ、相補性決定領域としても知られる3つのCDRにより連結される4つのフレームワーク領域（FR）からなる。各鎖におけるCDRは、FRにより、近傍に保持されており、他方の鎖におけるCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。CDRを決定するための技術としては、限定はされないが、例えば、（1）異種間配列可変性に基づくアプローチ（例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD）；および（2）抗原-抗体複合体の結晶構造学的研究に基づくアプローチ（Al-lazikani et al., 1997 J. Mol. Biol. 273:927-948）が挙げられる。これらのアプローチや、他のアプローチを組合せて用いてもよい。

[0059] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片において、例えばこれに限定されるものではないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギまたはサル由来の重鎖配列および／または軽鎖配列を用いることができる。一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は

、ウサギ由来の重鎖配列および軽鎖配列を有する。

[0060] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、所望により、修飾してもよい。抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の修飾は、(a) 例えばシートまたはヘリックスコンホメーション等の、修飾領域におけるアミノ酸配列の三次元的な構造；(b) 標的部位での分子の電荷または疎水性の状態；または、(c) 側鎖の容積の維持に対する修飾の効果、を変化させる修飾であってもよく、あるいはこれらの変化が明白に観察されないような修飾であってもよい。

[0061] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の修飾は、例えば、構成するアミノ酸残基の置換、欠失、付加等によって達成してよい。

[0062] 本明細書において、アミノ酸とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸、例えばセリン (S e r)、アスパラギン (A s n)、バリン (V a l)、ロイシン (L e u)、イソロイシン (I l e)、アラニン (A l a)、チロシン (T y r)、グリシン (G l y)、リシン (L y s)、アルギニン (A r g)、ヒスチジン (H i s)、アスパラギン酸 (A s p)、グルタミン酸 (G l u)、グルタミン (G l n)、スレオニン (T h r)、システイン (C y s)、メチオニン (M e t)、フェニルアラニン (P h e)、トリプトファン (T r p)、プロリン (P r o) のみならず、アミノ酸変異体および誘導体といった、非天然アミノ酸も含まれる。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えばL-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 β -アラニン、オルニチン等、生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸；および当業者に公知のアミノ酸の特性を有する、化学的に合成された化合物等が挙げられることを当然に理解する。非天然アミノ酸の例としては、 α -メチルアミノ酸 (α -メチルアラニン等)、D-アミノ酸 (D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸等)、ヒスチジン様アミノ酸 (2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジン、 α -メチル-ヒスチジン

等)、側鎖に余分なメチレンを有するアミノ酸(「ホモ」アミノ酸)および側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸(システイン酸等)等が挙げられる。

[0063] 天然に存在するアミノ酸残基は、例えば、一般的な側鎖特性に基づいて、次のグループに分類され得る:

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

[0064] 抗体を構成するアミノ酸配列の非保存的置換は、これらのグループの1つに属するアミノ酸を他のグループに属するアミノ酸と交換することにより行ってもよい。より保存的な置換は、これらのグループの1つに属するアミノ酸を同一グループの他のアミノ酸と交換することにより行ってもよい。同様に、アミノ酸配列の欠失または置換を適宜行ってもよい。

[0065] 抗体を構成するアミノ酸の修飾としては、例えば、糖によるグリコシル化、アセチル化またはリン酸化等の翻訳後修飾であってもよい。抗体は、その定常領域における保存された位置でグリコシル化され得る。抗体のグリコシル化は、通常、N-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖に対する糖質部分の結合を意味する。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-スレオニン、および、アスパラギン-X-システイン(式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖に対する糖質部分を酵素的に付加するための認識配列である。これらのトリペプチド配列のいずれかが抗体に存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が存在する。O-結合型グリコシル化は、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、または、キシロースのいずれかの、ヒドロキシアミノ酸(例えば、セリンまたはスレオニ

ン)への結合であってよく、場合により、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンへの結合であってもよい。グリコシル化の条件(グリコシル化を、生物学的手法を用いて行う場合には、例えば、宿主細胞や細胞培地の種類、pH等)を、当業者は目的に応じて適宜、選択することができる。

[0066] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、さらに、当業者に公知の技術常識に基づいて、その他の修飾方法により、単独または組み合わせて、修飾されてよい。

[0067] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、当業者に周知の方法によって産生することができる。例えば、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片をコードする核酸を発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターを宿主細胞に導入し、当該宿主細胞を培養することによって抗体またはその抗原結合性断片を産生させてもよい。したがって、本開示は、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを含む宿主細胞、および当該宿主細胞を培養する工程を含む抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の作製方法を包含する。

[0068] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片をコードする核酸は、シグナル配列をコードするDNAを有してもよく、重鎖可変領域をコードするDNA、および、軽鎖可変領域をコードするDNAの5'末端にシグナル配列をコードするDNAを有してもよい。シグナル配列は、分泌タンパク質や膜内在性タンパク質が、リボソーム上で合成された後に、脂質2重層を通り抜けるのに必要な、タンパク質のN末端に存在するアミノ酸残基であり、本開示においては、この機能を有する配列であれば特に限定されるものではない。本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片が含み得るシグナル配列としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ロバ、ヤギ、ウマ、トリ、イヌ、ネコ、酵母等に由来するシグナル配列が挙げられる。

[0069] 本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、当業者に公

知の方法に従って、単離または精製されたものであってよい。

[0070] 本明細書において、「単離された」または「精製された」は、自然の状態から、人為的に単離されたか、精製されたことを意味する。分子または組成物が自然に発生したものである場合、それが変化したかもしくは本来の環境から除去されたか、またはその両方であるとき、それは「単離された」かまたは「精製された」である。単離または精製の方法の例としては、電気泳動的、分子生物学的、免疫学的またはクロマトグラフィー的手法等が挙げられ、具体的には、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相HPLCクロマトグラフィー、等電点電気泳動、または、アルカリ抽出法等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0071] 一態様において、本開示に係る抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片は、以下のCDRを含んでいる：

配列番号40に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

配列番号41に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および

配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに

配列番号43に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

配列番号44に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

配列番号45に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖。

[0072] 別の態様において、本開示に係る抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片は、以下のCDRを含んでいる：

配列番号52に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

配列番号53に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および

配列番号54に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに

配列番号55に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

配列番号56に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

配列番号57に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖；

[0073] さらに別の態様において、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、以下のCDRを含んでいる：

配列番号64に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

配列番号65に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および

配列番号66に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに

配列番号67に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

配列番号68に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

配列番号69に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖。

[0074] 一実施形態において、前記抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

[0075] 一実施形態において、前記抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号10に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号11に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

[0076] 別の実施形態において、前記抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

[0077] さらに別の実施形態において、前記抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

[0078] 本開示において、重鎖の可変領域および／または軽鎖の可変領域は、元の配列に対して、1個または複数個のアミノ酸が置換、付加および／または欠失したアミノ酸配列を有してもよい。ここで、「複数個」は、E p h A 4に対する結合親和性を保持し、E p h A 4の切断を促進する限り限定されないが、2個～15個、または2個～10個、例えば、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個または2個であり、またはアミノ酸配列中のアミノ酸数の10%以内、例えば9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内

、4%以内、3%以内、2%以内または1%以内である。

- [0079] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖は、ウサギI g Gの定常領域を含んでいる。特定の実施形態において、ウサギI g Gの定常領域は、配列番号22のアミノ酸配列を含んでいる。
- [0080] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖は、ウサギI g κの定常領域を含んでいる。特定の実施形態において、ウサギI g κの定常領域は、配列番号23のアミノ酸配列を含んでいる。
- [0081] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号24に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号25に示すアミノ酸配列を含む。
- [0082] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号28に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号29に示すアミノ酸配列を含む。
- [0083] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号32に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号33に示すアミノ酸配列を含む。
- [0084] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体の重鎖は、配列番号36に示すアミノ酸配列を含み、かつ、抗E p h A 4抗体の軽鎖は、配列番号37に示すアミノ酸配列を含む。
- [0085] 一実施形態において、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、標識されている。本開示において、「標識」は、抗体またはその抗原結合性断片に直接的または間接的に結合される検出可能な化合物または組成物を意味する。標識は、それ自体が検出可能であってもよいし、別の特異的な結合ペアとの組み合わせによって検出可能であってもよく、例えば、酵素標識の場合は、基質化合物または組成物に作用または反応することで検出可能なシグナルを生じさせてもよい。

[0086] 別の実施形態において、例えば、抗体産生細胞により産生される抗体の不均一性を減少させる等の理由から（米国特許出願公開第2010/0297697号明細書やLiu H et al., MAbs, 2014 Sep-Oct; 6(5): 1145-1154）、抗EphA4抗体は、重鎖のC末端（カルボキシ末端）に位置するリシンが欠失されていてもよい。本開示において、重鎖のC末端リシンが欠失されている抗EphA4抗体には、重鎖のC末端リシンを遺伝子改変によって欠失させた抗EphA4抗体やカルボキシペプチダーゼ等によって翻訳後に重鎖のC末端リシンが切断された抗EphA4抗体等も含まれる。また、本開示において、重鎖のC末端リシンが欠失されている抗EphA4抗体には、両方の重鎖においてC末端リシンが欠失されている抗EphA4抗体だけでなく、片方のみの重鎖においてC末端リシンが欠失されている抗EphA4抗体も含まれる。

[0087] 一態様において、本開示は、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸に関する。抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸は、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖および／または軽鎖をコードする一以上の核酸分子を指す。一実施形態において、本開示に係る核酸は抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖をコードする。別の実施形態において、本開示に係る核酸は抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖をコードする。さらに別の実施形態において、本開示に係る核酸は、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする。本開示に係る核酸には、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖をコードする第一の核酸分子、および抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖をコードする第二の核酸分子も含まれる。

[0088] 別の態様において、本開示は、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸を含むベクターに関する。本開示に係るベクターは、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸を含む一以上のベクターを指す。一実施形態において、本開示に係る

ベクターは、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖をコードする核酸および抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖をコードする核酸を含むベクターである。別の実施形態において、本開示に係るベクターは、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸を含むベクターである。さらに別の実施形態において、本開示に係るベクターは、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の重鎖をコードする核酸を含む第一のベクター、および抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖をコードする核酸を含む第二のベクターを含む。本開示に係るベクターは、特にこれらに限定されるものではないが、プラスミド、コスミド、ウイルス、ファージ等であってよい。例えば、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたは単純ヘルペスウイルスベクター等も本開示に係るベクターに含まれる。

[0089] さらに別の態様において、本開示に係るベクターを含む宿主細胞、および当該宿主細胞を培養する工程を含む抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の作製方法も本開示に含まれる。本開示に係る宿主細胞は、特にこれらに限定されるものではないが、大腸菌細胞、サルC O S細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、N S O細胞等であってよい。一実施形態において、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片の作製方法は、宿主細胞を培養する工程、および当該宿主細胞（または宿主細胞の培養培地）から分泌された抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片を回収する工程を含む。

[0090] 上記C D Rによって特徴付けられる本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片は、E p h A 4のN末端の任意の領域に結合する。本開示において、E p h A 4の「N末端領域」とは、E p h A 4の細胞外領域（E C D）、またはE p h A 4がマトリックスメタロプロテアーゼ（M M P）もしくはA D A M（a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e i n a s e）により切断を受けた場合のN末端側の領域を指す。

なお、ヒト E p h A 4 における E C D は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、あるいは当該アミノ酸配列において、1 個または複数個のアミノ酸が置換、付加および／または欠失したアミノ酸配列を有するものとして定義される。ここで、「複数個」は、2 個～15 個、または 2 個～10 個、例えば、9 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個、3 個または 2 個であり、またはアミノ酸配列中のアミノ酸数の 10% 以内、例えば 9% 以内、8% 以内、7% 以内、6% 以内、5% 以内、4% 以内、3% 以内、2% 以内または 1% 以内である。

- [0091] 本開示に係る抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片は、特異的に E p h A 4 に結合し、高い検出感度で E p h A 4 を検出することができる。したがって、本開示は、別の態様において、本開示に係る抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片を用いた、生体試料中の E p h A 4 を検出または定量する方法（以下、本開示に係る方法とも称する）に関する。
- [0092] 本開示に係る方法において、測定対象となる「E p h A 4」には、全長 E p h A 4 のほか、E p h A 4 の N 末端領域からなる断片（本明細書中、単に「E p h A 4 N 末端断片」または「E p h A 4 の N 末端断片」とも称する）が含まれる。
- [0093] 本開示に係る方法において、生体試料は、全長 E p h A 4 または E p h A 4 N 末端断片を含みうる試料であれば特に制限されず、例えば、血液、血清、血漿、脳脊髄液（C S F）、尿、唾液、涙液、汗等の生体由来の液体成分（体液ともいう）等を挙げることができる。一実施形態において、生体試料は、血液、血清、血漿、または脳脊髄液である。また、生体試料は、ヒト由来の生体試料に限らず、ヒト以外の動物の生体試料も含まれる。そのような動物として、これに限定されるものではないが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、サル等を挙げることができる。
- [0094] 本開示に係る方法は、生体試料と、本開示に係る抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片とを接触させることを含む。E p h A 4 の検出または定量は、当該技術分野で周知のイムノアッセイを用いて実施することができる

- 。
- [0095] 本開示に係る方法は、生体試料と、本開示に係る抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片（第一の抗体）とを接触させた後に、さらに、当該生体試料と、標識された抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片（第二の抗体）とを接触させることを含むことができる。当該方法において、第一の抗体と標識された第二の抗体は、別の抗体が用いられる。
- [0096] イムノアッセイは、検出可能に標識した抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、または、検出可能に標識した抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片（二次抗体）を用いる。抗体の標識法により、エンザイムイムノアッセイ（E I AまたはE L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、蛍光イムノアッセイ（F I A）、蛍光偏光イムノアッセイ（F P I A）、化学発光イムノアッセイ（C L I A）、電気化学発光イムノアッセイ（E C L I A）等に分類され、これらのいずれも本開示に係る方法に用いることができる。
- [0097] E L I S A法では、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、R I A法では、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、F P I A法では、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリスリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、C L I A法では、ルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ等の酵素と各酵素で発光物質に変化する発光基質、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体を用いることができる。その他、金コロイド、量子ドット等のナノ粒子で標識した抗体を検出することもできる。
- [0098] また、イムノアッセイでは、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片をビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジンまたはストレプトアビジンを結合させて、E p h A 4を検出、測定することもできる。
- [0099] E L I S A法では、例えばサンドイッチ法を用いることができる。固相担体に抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片を固定し、適宜処理した生体試料を添加して反応させた後、さらに酵素で標識した別の抗E p h A 4抗

体またはその抗原結合性断片を添加して反応させる。洗浄後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定することにより、E p h A 4 または E p h A 4 の N 末端断片を定量することができる。

[0100] 酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、3, 3' -ジアミノベンジン (3, 3' -diaminobenzidine; DAB)、3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン (3, 3', 5, 5' -tetramethylbenzidine; TMB または TMBZ)、o-フェニレンジアミン (o-phenylenediamine; OPD) 等を用いることができ、アルカリホスファターゼの場合、p-ニトロフェニルホスフェート (p-nitrophenyl phosphate; NPP) 等を用いることができる。

[0101] また、上記イムノアッセイの中で、微量のタンパク質を簡便に検出できる方法として凝集法が挙げられる。凝集法としては、例えば、抗体にラテックス粒子を結合させたラテックス凝集法が挙げられる。

[0102] ラテックス粒子に抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片を結合させて生体試料に混合すると、E p h A 4 が存在すれば、抗体結合ラテックス粒子が凝集する。そこで、試料に近赤外光を照射して、吸光度の測定（比濁法）または散乱光の測定（比濁法）により凝集塊を定量し、抗原の濃度を求めることができる。

[0103] 一実施形態において、本開示に係る方法は、生体試料中のヒト E p h A 4 を検出または定量する方法である。

[0104] 一実施形態において、本開示に係る方法は、生体試料中のヒト E p h A 4 の N 末端断片を検出または定量する方法である。

[0105] 一実施形態において、本開示に係る方法は、ヒト E p h A 4 の検出または定量に、本開示に係る抗体またはその抗原結合性断片の組み合わせを用いたサンドイッチ E L I S A を用いる。

[0106] 本開示はまた、別の態様において、E p h A 4 を検出または定量するための、本開示に係る抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片を含むキット

(以下、本開示に係るキットとも称する)に関する。本開示に係るキットは、E p h A 4を検出または定量する際に用い得る任意の試薬もしくは器具、または当該キットを使用するための指示書を包含することができる。

- [0107] 本開示に係るキットにおいて、測定対象となる「E p h A 4」には、全長E p h A 4のほか、E p h A 4のN末端断片が含まれる。
- [0108] 一実施形態において、本開示に係るキットは、ヒトE p h A 4を検出または定量するためのキットに関する。
- [0109] 一実施形態において、本開示に係るキットは、ヒトE p h A 4のN末端断片を検出または定量するためのキットに関する。
- [0110] 本開示に係るキットは、一実施形態において、ヒトE p h A 4の検量線を作成する際のポジティブコントロールとして使用可能なヒト全長E p h A 4または当該全長E p h A 4の段階希釈液を含む。
- [0111] 本開示に係るキットは、一実施形態において、ヒトE p h A 4の検量線を作成する際のポジティブコントロールとして使用可能なヒトE p h A 4のN末端断片または当該断片の段階希釈液を含む。
- [0112] 本開示に係るキットは、一実施形態において、配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片；ならびに、配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片を含む。
- [0113] 本開示に係るキットは、別の実施形態において、配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片；ならびに、配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片を含む。
- [0114] 本開示に係るキットは、別の実施形態において、配列番号10に示すアミ

ノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 11 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片；
ならびに、配列番号 18 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 19 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片を含む。

[0115] 本開示に係るキットは、さらに別の実施形態において、配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片；
ならびに、配列番号 10 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 11 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片を含む。

[0116] 本開示に係る方法、特にサンドイッチ E L I S A において使用される、または本開示に係るキットに包含される抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片の具体的な組み合わせとして、以下を例示することができる：

(固相抗体)

配列番号 10 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 11 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0117] (固相抗体)

配列番号 14 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 15 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号

7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0118] (固相抗体)

配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号10に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号11に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0119] (固相抗体)

配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号10に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号11に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0120] (固相抗体)

配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0121] (固相抗体)

配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番

号 19 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号 14 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 15 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0122] (固相抗体)

配列番号 10 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 11 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号 18 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 19 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0123] (固相抗体)

配列番号 14 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 15 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

(標識抗体)

配列番号 18 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列番号 19 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

[0124] 技術的に矛盾しない限り、本明細書に記載の、あらゆる態様の任意の一または複数、を、適宜組み合わせ、本開示を実施してよいことを当業者は理解する。さらに、技術的に矛盾しない限り、本明細書に記載の、好ましいまたは有利なあらゆる態様を、適宜組み合わせ、本開示を実施することが好ましいであろうことを当業者は理解する。

[0125] 本明細書中に引用される文献は、参照により、それらのすべての開示が、

明確に本明細書に援用されているとみなされるべきであって、当業者は、本明細書の文脈に従って、本開示の精神および範囲を逸脱することなく、それらの文献における関連する開示内容を、本明細書の一部として援用して理解できる。

[0126] 本明細書中に引用される文献は、本出願の出願日前の関連技術の開示のみを目的として提供され、本発明者らが、先行発明または任意の他の理由によって、かかる開示に先行する権利を持たないことを自認するものとして解釈されてはならない。これらの文献のすべての記述は、本出願人が入手可能であった情報に基づいており、これらの記述内容が正確であるという自認を何ら構成しない。

[0127] 本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0128] 本明細書において用いられる「を含む (comprise)」という用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記載された事項（部材、ステップ、要素または数字等）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素または数字等）が存在することを排除しない。「からなる (consist of)」という用語は、「からなる (consist of)」および／または「実質的に～からなる (consist essentially of)」という用語で記載される態様を包含する。

[0129] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語および科学用語を含む。）は、本開示が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書および関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、または、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0130] 第1の、第2の等の用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はこれらの用語自身によって限定されるべきではないことが理解

される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第1の要素を第2の要素と記し、同様に、第2の要素は第1の要素と記すことは、本開示の範囲を逸脱することなく可能である。

[0131] 本明細書において、成分含有量や数値範囲等を示すのに用いられる数値は、特に明示がない限り、用語「約」で修飾されているものと理解されるべきである。例えば、「4℃」とは、特に明示がない限り、「約4℃」を意味するものと理解され、その程度を、当業者は技術常識と本明細書の文意に従って、合理的に理解できることは当然である。

[0132] 文脈上明白に他の意味を示す場合を除き、本明細書および請求の範囲で使用される場合、単数形で表される各態様は、技術的に矛盾しない限り、複数形であってもよいことが理解され、逆もまた真である。

[0133] 以下において、本開示を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本開示はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。関連技術分野の当業者は、本開示の精神または範囲を変更させることなく、様々な改変、付加、欠失、置換等を伴って本開示を実施できる。

実施例

[0134] 実施例1：抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体の作製

ヒトEphA4 (Genbank Accession No. NP_004429.1、配列番号1) に結合するモノクローナル抗体を作製するため、ヒトEphA4の細胞外領域(20~547位)(配列番号2)に分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)およびヒスチンタグを融合したタンパク質(以下、「ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質」という、配列番号3)、ヒトEphAの細胞外領域(20~547位)(配列番号2)にヒスチンタグを融合したタンパク質(以下、「ヒトEphA4細胞外領域-Hisタンパク質」という、配列番号4)、およびヒトEphA4の細胞外領域にマルトース結合タンパク質(MBP)およびヒス

チジンタグを融合したタンパク質（以下、「ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質」という、配列番号5）、を以下の工程により調製した。

- [0135] 最初に、pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクター、pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域-His発現ベクター、およびpcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域-MBP-His発現ベクターを構築した。SEAP-HisおよびヒトEphA4細胞外領域をコードする遺伝子の合成をGenscriptにて行った。まず、合成されたSEAP-Hisをコードする遺伝子断片を、pcDNA3.4ベクター（Invitrogen/LifeTechnologies）にクローニングした。構築したpcDNA3.4-SEAP-His発現ベクターに、合成されたヒトEphA4細胞外領域の遺伝子断片をクローニングし、ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターを構築した。pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域-His発現ベクターは、合成されたヒトEphA4細胞外領域の遺伝子断片を、ヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.4ベクター（Invitrogen/LifeTechnologies）にクローニングして構築した。pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域-MBP-His発現ベクターについては、ヒトEphA4のシグナル配列と細胞外領域をコードするDNA配列をPCRによって増幅し、MBPおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.4ベクター（Invitrogen/LifeTechnologies）にクローニングして、構築した。Expi293発現システム（Thermo SCIENTIFIC）を用いて、上記それぞれの発現ベクターをExpi293F細胞（Thermo SCIENTIFIC）へ形質移入した。培養液を回収し、細胞を除いて清澄化した。TALONレジン（TaKaRa）を用いて精製を行い、透析もしくは脱塩カラム（Thermo SCIENTIFIC）によりPBS（FUJIFILM Wako）にバッファー置換した。

[0136] 常法に従い、調製したヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質をアジュバントと共にウサギに免疫した(IBL)。免疫後、採取したリンパ節細胞から、RNeasy(QIAGEN)を用いて全RNAを調製し、DNase(QIAGEN, RNase free DNase set)で処理した。RNA PCRキット(TAKARA)を用いて、前記全RNAから逆転写産物を調製した。得られた逆転写産物を鋳型に用い、ウサギ抗体ファージライブラリーを構築した。ヒトEphA4タンパク質、ヒトEphA4抗体およびウサギ抗体ファージライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、ヒトEphA4と特異的に結合するウサギ抗体フラグメント(scFv)を得た。Dynabeads磁気ビーズ(Thermo SCIENTIFIC)を用いてヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質とヒトEphA4抗体をキャプチャーし、ウサギ抗体ファージライブラリーを添加して、1時間、あるいは2時間後に、未結合ファージをPBS-Tween(0.1%v/v)またはPBSを使用して一連の洗浄サイクルによって除去した。結合したファージ粒子を溶出させた後、大腸菌TG1宿主細胞に感染を介して増幅した。感染TG1細胞を回収し、プレート上にまき、30℃でインキュベートした。このパンニング処理を、増幅したファージを用いてさらに1回行った。

[0137] 2回のパンニング後、濃縮されたファージを感染させたTG1細胞から単一コロニーを用いて、96ウェルプレート中の培地に植菌した。IPTGの添加により、FLAGタグを付加したscFvの発現を誘導し、30℃で一晩振とう培養した。TG1細胞をスピンドウンし、scFvを含む大腸菌培養上清を用いて、ヒトEphA4に対する反応性を有するウェルをピックアップした。

[0138] ヒトのEphA4に対する反応性は、ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質を用い、以下の工程に従ってELISAにて評価した。抗FLAG抗体(SIGMA)を、96ウェルプレート(Thermo SCIENTIFIC)のウェル上にコートした。4℃にて一晩インキュベ

トした後、2%スキムミルク (BD) により、ウェルを室温にて2時間ブロッキングした。0.02% Tween 20/PBSで3回洗浄した後、各ウェルにヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質 (最終濃度20nM) と、scFvを含む大腸菌培養上清を各ウェルに添加し、室温にて2時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗His抗体 (MBL) を加え、室温にて1時間インキュベートした。5回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、15~20分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (Thermo SCIENTIFIC) により450nmの吸光度を読み取った。スクリーニングの結果、ヒトEphA4特異的なウサギ抗体フラグメントを選抜し、シーケンスを行って各フラグメントの遺伝子配列を決定した。

[0139] 得られたウサギ抗体フラグメント (scFv) の可変領域をコードするDNA配列を、それぞれ抗体重鎖および軽鎖定常領域を発現するベクターにサブクローニングすることによってクローンをscFvからIgG形式に変換した。抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体をコードする遺伝子配列を含む発現ベクター (pcDNA3.4) を作製した。KPEP11_04の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号6に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号7に示すアミノ酸配列である。KPEP11_04のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖可変領域については配列番号8に示す核酸配列を用い、軽鎖可変領域については配列番号9に示す核酸配列を用いた。KPEP11_08の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号10に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号11に示すアミノ酸配列である。KPEP11_08のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖可変領域については配列番号12に示す核酸配列を用い、軽鎖可変領域については配列番号13に示す核酸配列を用いた。KPEP11_10の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配

列番号14に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号15に示すアミノ酸配列である。KPEP11__10のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖可変領域については配列番号16に示す核酸配列を用い、軽鎖可変領域については配列番号17に示す核酸配列を用いた。KPEP11__18の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号18に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号19に示すアミノ酸配列である。KPEP11__18のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列として、重鎖可変領域については配列番号20に示す核酸配列を用い、軽鎖可変領域については配列番号21に示す核酸配列を用いた。KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10およびKPEP11__18の重鎖定常領域としては、ウサギIgGの定常領域（配列番号22）を用いた。KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10およびKPEP11__18の軽鎖定常領域としては、ウサギIgκ（配列番号23）を用いた。KPEP11__04の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は配列番号24に示すアミノ酸配列であり、軽鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は配列番号25に示すアミノ酸配列である。KPEP11__04の重鎖全長をコードする核酸配列は配列番号26に示す核酸配列であり、軽鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号27に示す核酸配列である。KPEP11__08の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号28に示すアミノ酸配列であり、軽鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号29に示すアミノ酸配列である。KPEP11__08の重鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号30に示す核酸配列であり、軽鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号31に示す核酸配列である。KPEP11__10の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号32に示すアミノ酸配列であり、軽鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号33に示すアミノ酸配列である。KPEP11__10の重鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号34に示す核酸配列であり、軽鎖全長をコード

する核酸配列は、配列番号35に示す核酸配列である。KPEP11_18の重鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号36に示すアミノ酸配列であり、軽鎖全長（シグナル配列は含まない）のアミノ酸配列は、配列番号37に示すアミノ酸配列である。KPEP11_18の重鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号38に示す核酸配列であり、軽鎖全長をコードする核酸配列は、配列番号39に示す核酸配列である。これらベクターをExp293F細胞（ThermoFisher）へ形質移入した。上清を回収し、MabSelect（登録商標）（Cytiva）、MabSelect SuRepc（Cytiva）またはAmsphereA3（JSR）を用いて抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体を得た。

[0140] KPEP11_04、KPEP11_08、KPEP11_10およびKPEP11_18のCDRは、CDRの同定のためのKabatの定義（Kabat definition）に従って決定した。KPEP11_04のCDRのアミノ酸配列と核酸配列をそれぞれ表1と表2に示す。KPEP11_08およびKPEP11_10のCDRのアミノ酸配列と核酸配列をそれぞれ表3と表4に示す。KPEP11_18のCDRのアミノ酸配列と核酸配列をそれぞれ表5と表6に示す。

[0141] [表1]

KPEP11_04のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYAMS（配列番号40）
重鎖CDR2	FIMMYGTYYSNARG（配列番号41）
重鎖CDR3	GGRSPDYDIVSGDI（配列番号42）
軽鎖CDR1	QASQNIYNSLA（配列番号43）
軽鎖CDR2	DASELAS（配列番号44）
軽鎖CDR3	QSSSAGDSYVGG（配列番号45）

[0142]

[表2]

KPEP11_04のCDRの核酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	AGCTATGCANTGAGC (配列番号46)
重鎖CDR2	TTCATTAATATGTATGGTACATACTACGCCAGCTGGCGAAAGGC (配列番号47)
重鎖CDR3	GGGGCAGGTCCTCTGATTATGATATTGTTAGTGGGACATC (配列番号48)
軽鎖CDR1	CAGGCCAGTCAGAACATTTACAACCTCTTAGCC (配列番号49)
軽鎖CDR2	GATGCATCGGAACCTGGCATCTG (配列番号50)
軽鎖CDR3	CAGCTAGTAGTGTGGTGATAGTTATGTTGGTGGT (配列番号51)

[0143] [表3]

KPEP11_08およびKPEP11_10のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYHMS (配列番号52)
重鎖CDR2	IYRSGNTYYANWARG (配列番号53)
重鎖CDR3	ESSTFYGMRL (配列番号54)
軽鎖CDR1	QASQSVYGNELA (配列番号55)
軽鎖CDR2	TASSLAS (配列番号56)
軽鎖CDR3	LGYSDBDYF (配列番号57)

[0144] [表4]

KPEP11_08およびKPEP11_10のCDRの核酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	AGCTACCACATGAGC (配列番号58)
重鎖CDR2	ATTATTTATAGGAGTGGTAATACATACTACGCCAAGCTGGCGAAAGGC (配列番号59)
重鎖CDR3	GAAAGTAGTACTTICTACGCCATGACCTC (配列番号60)
軽鎖CDR1	CAGGCCAGTCAGASTGTTTATGGTAACAACGAATTAGCC (配列番号61)
軽鎖CDR2	ACTGCATCCAGTCTGGCATCT (配列番号62)
軽鎖CDR3	CTAGGTTATAAAAGTGATGACTATACT (配列番号63)

[0145]

[表5]

KPEP11_18のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SFYIN (配列番号64)
重鎖CDR2	IHYFDIDATDYASWYEG (配列番号65)
重鎖CDR3	SIWDYYTIRLDL (配列番号66)
軽鎖CDR1	QSNRSVYSNWS (配列番号67)
軽鎖CDR2	GASTLAS (配列番号68)
軽鎖CDR3	LGGYRINSINA (配列番号69)

[0146] [表6]

KPEP11_18のCDRの核酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	AGCTTCTACATAAAC (配列番号70)
重鎖CDR2	ATCATTATCTCTGATATTGATGACACAGACTACGCGAGCTGGGTAAAGGC (配列番号71)
重鎖CDR3	AGTGATGTTGATTAATTATACAACCTCGGTTGGATCTC (配列番号72)
軽鎖CDR1	CAGTCCANTAAGAGTGTATTATAGTAACTGGTTATCC (配列番号73)
軽鎖CDR2	GGTGCATCCACTCTGGCATCT (配列番号74)
軽鎖CDR3	CTAGCGGTTATCTGTGATAANTAGTGATAANTGCT (配列番号75)

[0147] 上記の作製方法と同じ方法により抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体であるKPEP11_01、KPEP11_02、KPEP11_05、KPEP11_07、KPEP11_09、KPEP11_12、KPEP11_13およびKPEP11_20を作製した。KPEP11_01の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号76に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号77に示すアミノ酸配列である。KPEP11_02の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号78に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号79に示すアミノ酸配列である。KPEP11_05の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号80に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号81に示すアミノ酸配列である。KPEP11_07の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号82に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸

配列は配列番号83に示すアミノ酸配列である。KPEP11__09の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号84に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号85に示すアミノ酸配列である。KPEP11__12の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号86に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号87に示すアミノ酸配列である。KPEP11__13の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号88に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号89に示すアミノ酸配列である。KPEP11__20の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号90に示すアミノ酸配列であり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号91に示すアミノ酸配列である。これら抗体の重鎖定常領域としてはウサギIgGの定常領域（配列番号22）を用いた。また、これら抗体の軽鎖定常領域としてはウサギIgκ（配列番号23）を用いた。

[0148] 作製した各抗体のCDRは、CDRの同定のためのKabatの定義（Kabat definition）に従って決定した。各抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ表7～表11に示す。

[0149] [表7]

KPEP11__01およびKPEP11__09のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYIMS（配列番号92）
重鎖CDR2	LIYRSGNTYSANKAG（配列番号93）
重鎖CDR3	ESSTFYGMDL（配列番号94）
軽鎖CDR1	QASQSVYGNELA（配列番号95）
軽鎖CDR2	RASTLAS（配列番号96）
軽鎖CDR3	LGYSUDYT（配列番号97）

[0150]

[表8]

KPEP11_02およびKPEP11_05のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYAMS (配列番号98)
重鎖CDR2	FIANYGTYIASWAKG (配列番号99)
重鎖CDR3	GGRSPNYDIYSGDI (配列番号100)
軽鎖CDR1	QASQNIYNSLA (配列番号101)
軽鎖CDR2	DASELAS (配列番号102)
軽鎖CDR3	QSSSAGDSYVGG (配列番号103)

[0151] [表9]

KPEP11_07のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYAMS (配列番号98)
重鎖CDR2	FIANYGTYIASWAKG (配列番号104)
重鎖CDR3	GGRSPNYDIYSGDI (配列番号105)
軽鎖CDR1	QASQNIYNSLA (配列番号101)
軽鎖CDR2	DASELAS (配列番号102)
軽鎖CDR3	QSSSAGDSYVGG (配列番号103)

[0152] [表10]

KPEP11_12およびKPEP11_13のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	SYIMS (配列番号92)
重鎖CDR2	IIVRSQNTYYANWAKG (配列番号106)
重鎖CDR3	ESSTFYGMDL (配列番号94)
軽鎖CDR1	QASQSYVGNELA (配列番号95)
軽鎖CDR2	RASLAS (配列番号96)
軽鎖CDR3	LGYSDDVT (配列番号97)

[表11]

KPEP11__20のCDRのアミノ酸配列

名称	配列
重鎖CDR1	NYYN (配列番号107)
重鎖CDR2	IHYFDIDTIDYASRVRG (配列番号108)
重鎖CDR3	SDIDYYITRLDL (配列番号109)
軽鎖CDR1	SSPSVYNNWLS (配列番号110)
軽鎖CDR2	GATLAS (配列番号111)
軽鎖CDR3	AGGYDSNSITA (配列番号112)

[0153] 実施例2：抗ヒトEphA4モノクローナル抗体のヒトEphレセプターに対する選択性

実施例1で作製した抗ヒトEphA4モノクローナル抗体について、ヒトEphレセプターの結合活性の評価を、以下の工程に従って行った。マウス抗6-His抗体(R&D)を、96ウェルプレート(Thermo SCIENTIFIC)のウェル上にコートした。室温にて1時間インキュベートした後、1%ブロックエース(KAC)により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.02% Tween20/PBSで3回洗浄した後、各ウェルにヒトの各Ephレセプター細胞外領域-Hisタンパク質(Creative biomart、最終濃度1nM)を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体(10μg/mL)を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体(abcam)を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、KPL)溶液を加え、4分半室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液(2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako)を加え、マイクロプレートリーダー(Thermo SCIENTIFIC)により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0154] KPEP11__01、KPEP11__02、KPEP11__04、KPE

P11_05、KPEP11_07、KPEP11_08、KPEP11_09、KPEP11_10、KPEP11_12、KPEP11_13、KPEP11_18およびKPEP11_20は、ヒトEphレセプターファミリー間ではヒトEphA4に対して特異的に結合することが分かった（図1）。

[0155] 実施例3：抗ヒトEphA4モノクローナル抗体のマウス、ラット、ウサギ、サルおよびヒトEphA4に対する反応性

実施例1で作製した抗ヒトEphA4モノクローナル抗体について、各種EphA4との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。マウス抗6-His抗体（R&D）を、96ウェルプレート（Thermo SCIENTIFIC）のウェル上にコートした。室温にて1時間インキュベートした後、1%ブロッカー（KAC）により、ウェルを4℃にて一晩ブロッキングした。0.02% Tween 20/PBSで3回洗浄した後、ウェルにマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ラットEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ウサギEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、サルEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質またはSEAP-Hisタンパク質（最終濃度1nM）を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体（10μg/mL）を添加し、室温にて約1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体（abcam）を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、3分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako）を加え、マイクロプレートリーダー（Thermo SCIENTIFIC）により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0156] KPEP11_01、KPEP11_02、KPEP11_04、KPEP11_05、KPEP11_07、KPEP11_08、KPEP11_09、KPEP11_10、KPEP11_12、KPEP11_13、KPEP11_18およびKPEP11_20は、サルおよびヒトEphA4において結合活性を有していた（図2）。

[0157] 実施例4：抗ヒトEphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4細胞外領域、リガンド結合ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン1、フィブロネクチンIII型ドメイン2に対する反応性

実施例1で作製した抗ヒトEphA4モノクローナル抗体について、各種EphA4との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。マウス抗6-His抗体（R&D）を、96ウェルプレート（Thermo SCIENTIFIC）のウェル上にコートした。室温にて1時間インキュベートした後、1%ブロッカース（KAC）により、ウェルを室温にて1時間ブロッキングした。0.02% Tween20/PBSで3回洗浄した後、ウェルにヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4リガンド結合ドメイン-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質またはMBP-Hisタンパク質（最終濃度1nM）を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、抗ヒトEphA4ウサギモノクローナル抗体（10μg/mL）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体（abcam）を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、4分半室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako）を加え、マイクロプレートリーダー（Thermo SCIENTIFIC）により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0158] KPEP11__02、KPEP11__04、KPEP11__05、KPEP11__07、KPEP11__18およびKPEP11__20は、ヒトEphA4細胞外領域（ECD）およびリガンド結合ドメイン（LBD）に結合活性を有していた。KPEP11__01、KPEP11__08、KPEP11__09、KPEP11__10、KPEP11__12、およびKPEP11__13は、ヒトEphA4細胞外領域（ECD）に結合活性を有していた（図3）。

[0159] 実施例5：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域に対する反応性

実施例1で作製した抗ヒトEphA4モノクローナル抗体について、ヒトEphA4細胞外領域に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。各抗ヒトEphA4モノクローナル抗体を50mM Tris-HCl（pH7.5）/0.1% Sodium azideを用いてそれぞれ終濃度1μg/mLに調製し、96ウェルプレート（Nunc）のウェル上に100μLずつコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液（50mM Tris-HCl（pH7.5）/150mM NaCl/0.01% Tween20/5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。検出用抗体として各抗ヒトEphA4モノクローナル抗体をPeroxidase Labeling Kit-NH2（同仁化学研究所）を用いて、付属のマニュアルに従いそれぞれHRP（Horseradish Peroxidase）標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液（50mM Tris-HCl（pH7.5）/150mM NaCl/0.01% Tween20）で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液（50mM Tris-HCl（pH7.5）/150mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG6000/0.01% Tween20/0.2% Proclin150（シグマアルドリッチ）/5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））で系列希釈したヒトE

p h A 4 細胞外領域 (0、1、10 ng/mL) を播種し、室温にて2時間インキュベートした。3回洗浄した後、検体希釈液で1500倍希釈したHRP標識抗ヒトEphA4モノクローナル抗体をそれぞれ100 μLずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2 N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (Molecular Device) により450 nmおよび620 nmの吸光度を読み取った。

[0160] 各抗ヒトEphA4モノクローナル抗体の組み合わせによる反応性一覧を、(1) S-N ((10 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) - (0 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))、(2) S/N ((10 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) / (0 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))、(3) S-N ((1 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) - (0 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))、(4) S/N ((1 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル) / (0 ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)) として、それぞれ図4、図5、図6および図7に示す。EphA4細胞外領域に対して強い結合活性を示す抗ヒトEphA4モノクローナル抗体の組み合わせが複数得られた。

[0161] 実施例6：抗ヒトEphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4に対する結合親和性

KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10およびKPEP11__18のヒトEphA4に対する結合親和性をBiacore T200 (Cytiva) を用いた表面プラズモン共鳴法 (SPR法) により決定した。まず、抗His抗体 (Cytiva、28-9950-56)

を固定化用緩衝液（10 mM酢酸ナトリウム、pH 4.5）を用いて10 μ g/mLに希釈し、Biacore T200付属のプロトコルに従い、センサーチップCM5上に固定した。固定化は、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、および、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（EDC）を用いたアミンカップリング法にて行い、ブロッキングにはエタノールアミンを用いた（センサーチップや固定化用試薬は、全てCytiva社製）。ヒトEphA4細胞外領域-MBP-His10をランニング緩衝液HBS-EP+（Cytiva）を用いて希釈し、フローセル上に120秒間送液しキャプチャーさせた（3RU程度のキャプチャー量）。続いてHBS-EP+を用いて50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0 nMの範囲で系列希釈したKPEP11__04、KPEP11__08またはKPEP11__10と、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125、0 nMの範囲で系列希釈したKPEP11__18を120秒間センサーチップに添加し、添加時（結合相、120秒間）、および、添加終了後（解離相、300秒間）の結合反応曲線を順次観測した。各々の観測終了後に、10 mMグリシン塩酸pH 1.5（60秒間）および3M MgCl₂（30秒間）を添加してセンサーチップを再生した。得られた結合反応曲線に対して、システム付属ソフトBIA evaluationソフトを用いた1:1の結合モデルによるフィッティング解析を行い、ヒトのEphA4に対する結合親和性（ $KD = k_d / k_a$ ）を算出した。上述の実験を3回実施し、各パラメーターについて平均値を算出した。

[0162] KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10およびKPEP11__18のヒトEphA4に対する結合親和性（KD値）をそれぞれ表12、表13、表14および表15に示す。また、図8として代表的な結合反応曲線を示す。

[0163]

[表12]

KPEP11_04のキネティクスパラメーター

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
1 回目	2.332E+06	4.002E-03	1.716E-09	2.273	0.0038
2 回目	1.782E+06	3.783E-03	2.124E-09	2.270	0.0050
3 回目	2.078E+06	3.898E-03	1.871E-09	2.285	0.0044
平均値	2.06E+06	3.89E-03	1.90E-09	2.28	0.004

[0164] [表13]

KPEP11_08のキネティクスパラメーター

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
1 回目	1.419E+06	2.140E-03	1.508E-09	2.812	0.0029
2 回目	1.336E+06	2.225E-03	1.665E-09	2.578	0.0064
3 回目	1.579E+06	2.144E-03	1.358E-09	2.641	0.0035
平均値	1.44E+06	2.17E-03	1.51E-09	2.68	0.004

[0165] [表14]

KPEP11_10のキネティクスパラメーター

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
1 回目	1.440E+06	1.964E-03	1.364E-09	3.153	0.0039
2 回目	1.877E+06	1.936E-03	1.228E-09	2.894	0.0081
3 回目	1.530E+06	1.985E-03	1.298E-09	2.725	0.0043
平均値	1.52E+06	1.96E-03	1.30E-09	2.86	0.005

[0166] [表15]

KPEP11_18のキネティクスパラメーター

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
1 回目	3.445E+06	1.275E-03	3.700E-10	3.089	0.0090
2 回目	3.059E+06	1.274E-03	4.164E-10	2.650	0.0048
3 回目	3.318E+06	1.266E-03	3.817E-10	2.861	0.0111
平均値	3.27E+06	1.27E-03	3.89E-10	2.87	0.008

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

KPEP11_04、KPEP11_08、KPEP11_10、KPEP11_18および抗EphA4ポリクローナル抗体 (Sino Biol

ogical) について、ヒト Ephレセプターの結合活性の評価を、以下の工程に従って行った。マウス抗6-His抗体 (R&D) を、96ウェルプレート (Thermo SCIENTIFIC) のウェル上にコートした。室温にて1時間もしくは4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロッケース (KAC) により、ウェルを室温にて1時間もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。0.02% Tween 20/PBSで3回洗浄した後、各ウェルにヒトの各Ephレセプター細胞外領域-Hisタンパク質 (Creative biomart、最終濃度1nM) を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10、KPEP11__18または抗EphA4ポリクローナル抗体 (1μg/mL) を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体 (abcam) を加え、室温にて1時間インキュベートした。5回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、3~5分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (Thermo SCIENTIFIC) により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0168] KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10およびKPEP11__18は、ヒトEphレセプターファミリー間ではヒトEphA4に対して特異的に結合することが分かった (図9)。

[0169] 実施例8：抗ヒトEphA4モノクローナル抗体のマウス、ラット、ウサギ、サルおよびヒトEphA4に対する反応性

マウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ラットEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ウサギEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、サルEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質およびヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタ

ンパク質の作製は、以下の工程に従って行った。SEAP-Hisおよび、マウスEphA4細胞外領域、ラットEphA4細胞外領域、ウサギEphA4細胞外領域、サルEphA4細胞外領域およびヒトEphA4細胞外領域をコードする遺伝子の合成をGenscriptにて行った。まず、合成されたSEAP-Hisをコードする遺伝子断片を、pcDNA3.4ベクター(Invitrogen/LifeTechnologies)にクローニングした。構築したpcDNA3.4-SEAP-His発現ベクターに、合成されたマウスEphA4細胞外領域、ラットEphA4細胞外領域、ウサギEphA4細胞外領域、サルEphA4細胞外領域およびヒトEphA4細胞外領域の遺伝子断片をそれぞれクローニングし、マウスEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクター、ラットEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクター、ウサギEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクター、サルEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターおよびヒトEphA4細胞外領域-SEAP-His発現ベクターを構築した。ベクター構築において利用するヒトEphA4のアミノ酸配列を配列番号1、その細胞外領域は配列番号2、サルEphA4のアミノ酸配列を配列番号113、その細胞外領域は配列番号114、ウサギEphA4のアミノ酸配列を配列番号115、その細胞外領域は配列番号116、ラットEphA4のアミノ酸配列を配列番号117、その細胞外領域は配列番号118、マウスEphA4のアミノ酸配列を配列番号119、その細胞外領域は配列番号120として示す。ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター、サルEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター、ウサギEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクター、ラットEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクターおよびマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質発現ベクターを用いて、各種EphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質を調製した。Exp293発現システム(Thermo Scientific)を用いて、上記発現ベクターをExp

293F細胞 (Thermo SCIENTIFIC) へ形質移入した。4日後に培養液を回収し、細胞を除いて清澄化した。TALONレジン (Takara) を用いて精製を行い、透析によりPBS (FUJIFILM Wako) にバッファー置換した。

[0170] KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10、KPEP11__18およびEphA4ポリクローナル抗体 (Sino Biological) について、各種EphA4との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。マウス抗6-His抗体 (R&D) を、96ウェルプレート (Thermo SCIENTIFIC) のウェル上にコートした。室温にて1時間もしくは4℃にて一晩インキュベートした後、1%ブロックエース (KAC) により、ウェルを室温にて1時間もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。0.02% Tween 20/PBSで3回洗浄した後、ウェルにマウスEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ラットEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ウサギEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、サルEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質、ヒトEphA4細胞外領域-SEAP-Hisタンパク質またはSEAP-Hisタンパク質 (最終濃度1 nM) を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10、KPEP11__18またはEphA4ポリクローナル抗体 (0、 1.024×10^{-6} 、 0.00000512 、 0.0000256 、 0.000128 、 0.00064 、 0.0032 、 0.016 、 0.08 、 0.4 、 2 、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、室温にて約1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体 (abcam) を加え、室温にて1時間インキュベートした。5回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、3~5分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (T

hermo SCIENTIFIC) により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0171] KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10およびKPEP11__18は、サルおよびヒトEphA4において同等の結合活性を有していた(図10)。

[0172] 実施例9：抗ヒトEphA4モノクローナル抗体のヒトEphA4細胞外領域、リガンド結合ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン1、フィブロネクチンIII型ドメイン2に対する反応性

ヒトEphA4の細胞外領域(ECD)、リガンド結合ドメイン(LBD)、フィブロネクチンIII型ドメイン1(FN1)あるいはフィブロネクチンIII型ドメイン2(FN2)と、マルトース結合タンパク質(MBP)およびヒスチジンタグとを融合したタンパク質(以下、「ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質」、「ヒトEphA4リガンド結合ドメイン-MBP-Hisタンパク質」、「ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質」、および「ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質」という)の作製は、以下の工程に従って行った。最初に、pcDNA3.4-ヒトEphA4細胞外領域、リガンド結合ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン1、あるいはフィブロネクチンIII型ドメイン2-MBP-His発現ベクターを構築した。まず、ヒトEphA4のシグナル配列(配列番号121)あるいはプレプロトリプシンのシグナル配列(配列番号122)とヒトEphA4の各ドメインをコードするDNA配列をPCRによって増幅し、AAA、またはG4SのリンカーのついたMBPおよびヒスチジンタグをコードするDNA配列を有するpcDNA3.4ベクター(Invitrogen/LifeTechnologies)にクローニングして、ヒトEphA4細胞外領域-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4リガンド結合ドメイン-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質、およびヒトE

p h A 4 フィブロネクチン I I I 型ドメイン 2-MBP-H i s タンパク質の発現ベクターを構築した。ベクター構築において利用するヒト E p h A 4 のアミノ酸配列を配列番号 1、その細胞外領域は配列番号 2、リガンド結合ドメインは配列番号 1 2 3、フィブロネクチン I I I 型ドメイン 1 は配列番号 1 2 4、フィブロネクチン I I I 型ドメイン 2 は配列番号 1 2 5、MBP およびヒスチジンタグ (MBP-H i s タンパク質) は配列番号 1 2 6 として示す。E x p i 2 9 3 発現システム (T h e r m o S C I E N T I F I C) を用いて、上記発現ベクターを E x p i 2 9 3 F 細胞 (T h e r m o S C I E N T I F I C) へ形質移入した。4 日後に培養液を回収し、細胞を除いて清澄化した。ヒト E p h A 4 細胞外領域-MBP-H i s タンパク質、またはヒト E p h A 4 リガンド結合ドメイン-MBP-H i s タンパク質は T A L O N レジン (T a K a R a) を用いて精製を行い、透析により P B S (F U J I F I L M W a k o) にバッファー置換した。ヒト E p h A 4 フィブロネクチン I I I 型ドメイン 1-MBP-H i s タンパク質、およびヒト E p h A 4 フィブロネクチン I I I 型ドメイン 2-MBP-H i s タンパク質は A m y l o s e r e s i n (N E B) を用いて精製を行い、A K T A E x p l o r e 1 0 s / S u p e r d e x 2 0 0 1 0 / 3 0 0 G L (C y t i v a) にて単量体画分を分画精製した。

[0173] K P E P 1 1 _ 0 4、K P E P 1 1 _ 0 8、K P E P 1 1 _ 1 0、K P E P 1 1 _ 1 8 および E p h A 4 ポリクローナル抗体 (S i n o B i o l o g i c a l) について、各種 E p h A 4 との結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。マウス抗 6-H i s 抗体 (R & D) を、9 6 ウェルプレート (T h e r m o S C I E N T I F I C) のウェル上にコートした。室温にて 1 時間もしくは 4 °C にて一晩インキュベートした後、1 % ブロックエース (K A C) により、ウェルを室温にて 1 時間もしくは 4 °C にて一晩ブロッキングした。0. 0 2 % T w e e n 2 0 / P B S で 3 回洗浄した後、ウェルにヒト E p h A 4 細胞外領域-MBP-H i s タンパク質、ヒト E p h A 4 リガンド結合ドメイン-MBP-H i s タンパク質、ヒト E p h A 4 フィ

ブロンネクチンIII型ドメイン1-MBP-Hisタンパク質、ヒトEphA4フィブロネクチンIII型ドメイン2-MBP-Hisタンパク質またはMBP-Hisタンパク質（最終濃度1nM）を播種し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、KPEP11__04、KPEP11__08、KPEP11__10、KPEP11__18またはEphA4ポリクローナル抗体（10nM）を添加し、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体（abcam）を加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、3~5分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako）を加え、マイクロプレートリーダー（Thermo SCIENTIFIC）により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0174] KPEP11__04およびKPEP11__18は、ヒトEphA4細胞外領域（ECD）およびリガンド結合ドメイン（LBD）に結合活性を有していた。KPEP11__08およびKPEP11__10は、ヒトEphA4細胞外領域（ECD）に結合活性を有していた（図11）。

[0175] 実施例10：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性1

KPEP11__10、KPEP11__18およびEphA4抗体（R&D）について、ヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液（CSF）中のEphA4 N末端断片に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。KPEP11__10を50mM Tris-HCl（pH7.5）/0.1% Sodium azideを用いて終濃度1μg/mLに調製し、96ウェルプレート（Nunc）のウェル上に100μLずつコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液（50mM Tris-HCl（pH7.5）/150mM NaCl/0.01% Tween20/5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））により、ウ

エルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。KPEP11__18およびEphA4抗体(R&D)はPeroxidase Labeling Kit-NH2(同仁化学研究所)を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液(50mM Tris-HCl(pH7.5)/150mM NaCl/0.01% Tween20)で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液(50mM Tris-HCl(pH7.5)/150mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG6000/0.01% Tween20/0.2% Proclin150(シグマアルドリッチ)/5%スキムミルク(FUJIFILM Wako))で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域(0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、図中ではEphA4と表記)、または100倍希釈したサンプル(ヒト脳脊髄液)を播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で10000倍希釈したHRP標識KPEP11__18またはHRP標識EphA4抗体(R&D)を100μLずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、KPL)溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液(2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako)を加え、マイクロプレートリーダー(Molecular Device)により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

- [0176] ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果を図12に示す。KPEP11__10とHRP標識KPEP11__18を用いて構築したサンドイッチELISAでは、KPEP11__10とHRP標識EphA4抗体(R&D)を用いて構築した測定系と比較して、ヒトEphA4細胞外領域に対して非常に高い反応性を有していた。次に、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を図13に示す。KPEP11__10とHRP標識EphA4抗体(R&D)を用いて構築した測定系では

、ほとんど反応シグナルが得られないのに対し、KPEP11__10とHRP標識KPEP11__18を用いて構築した測定系では非常に高い反応性を示すことが分かった。

[0177] 実施例11：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性2

KPEP11__10、KPEP11__18およびEphA4抗体（R&D）について、ヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液（CSF）中のEphA4 N末端断片に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。KPEP11__18を50mM Tris-HCl（pH7.5）／0.1% Sodium azideを用いて終濃度1μg/mLに調製し、96ウェルプレート（Nunc）のウェル上に100μLずつコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液（50mM Tris-HCl（pH7.5）／150mM NaCl／0.01% Tween20／5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。KPEP11__10およびEphA4抗体（R&D）はPeroxidase Labeling Kit-NH₂（同仁化学研究所）を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液（50mM Tris-HCl（pH7.5）／150mM NaCl／0.01% Tween20）で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液（50mM Tris-HCl（pH7.5）／150mM NaCl／0.2% EDTA-3Na／4% PEG6000／0.01% Tween20／0.2% Proclin150（シグマアルドリッチ）／5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域（0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、図中ではEphA4と表記）、または100倍希釈したサンプル（ヒト脳脊髄液）を播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で10000倍希釈したHRP標識KPEP11__1

0またはHRP標識EphA4抗体(R&D)を100 μ Lずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、KPL)溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液(2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako)を加え、マイクロプレートリーダー(Molecular Device)により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

- [0178] ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果を図14に示す。KPEP11__18とHRP標識KPEP11__10を用いて構築したサンドイッチELISAでは、KPEP11__18とHRP標識EphA4抗体(R&D)を用いて構築した測定系と比較して、ヒトEphA4細胞外領域に対して非常に高い反応性を有していた。次に、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を図15に示す。KPEP11__18とHRP標識EphA4抗体(R&D)を用いて構築した測定系では、ほとんど反応シグナルが得られないのに対し、KPEP11__18とHRP標識KPEP11__10を用いて構築した測定系では非常に高い反応性を示すことが分かった。

- [0179] 実施例12：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性3

KPEP11__10、KPEP11__04およびEphA4抗体(R&D)について、ヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液(CSF)中のEphA4 N末端断片に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。KPEP11__10を50mM Tris-HCl(pH7.5)/0.1% Sodium azideを用いて終濃度1 μ g/mLに調製し、96ウェルプレート(Nunc)のウェル上に100 μ Lずつコートした。4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液(50mM Tris-HCl(pH7.5)/150mM NaCl/0.01% Tween20/5%スキムミルク(FUJIFILM Wako))により、ウ

エルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。KPEP11__04およびEphA4抗体(R&D)はPeroxidase Labeling Kit-NH2(同仁化学研究所)を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液(50mM Tris-HCl(pH7.5)/150mM NaCl/0.01% Tween20)で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液(50mM Tris-HCl(pH7.5)/150mM NaCl/0.2% EDTA-3Na/4% PEG6000/0.01% Tween20/0.2% Proclin150(シグマアルドリッチ)/5%スキムミルク(FUJIFILM Wako))で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域(0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、図中ではEphA4と表記)、または100倍希釈したサンプル(ヒト脳脊髄液)を播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で10000倍希釈したHRP標識KPEP11__04またはHRP標識EphA4抗体(R&D)を100μLずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、KPL)溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液(2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako)を加え、マイクロプレートリーダー(Molecular Device)により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0180] ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果を図16に示す。KPEP11__10とHRP標識KPEP11__04を用いて構築したサンドイッチELISAでは、KPEP11__10とHRP標識EphA4抗体(R&D)を用いて構築した測定系と比較して、ヒトEphA4細胞外領域に対して非常に高い反応性を有していた。次に、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を図17に示す。KPEP11__10とHRP標識EphA4抗体(R&D)を用いて構築した測定系では

、ほとんど反応シグナルが得られないのに対し、KPEP11__10とHRP標識KPEP11__04を用いて構築した測定系では非常に高い反応性を示すことが分かった。

[0181] 実施例13：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性4

KPEP11__08、KPEP11__18およびEphA4抗体（R&D）について、ヒトEphA4細胞外領域およびヒト脳脊髄液（CSF）中のEphA4 N末端断片に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。KPEP11__18を50mM Tris-HCl（pH7.5）／0.1% Sodium azideを用いて終濃度1μg/mLに調製し、96ウェルプレート（Nunc）のウェル上に100μLずつコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液（50mM Tris-HCl（pH7.5）／150mM NaCl／0.01% Tween20／5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。KPEP11__08およびEphA4抗体（R&D）はPeroxidase Labeling Kit-NH₂（同仁化学研究所）を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液（50mM Tris-HCl（pH7.5）／150mM NaCl／0.01% Tween20）で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液（50mM Tris-HCl（pH7.5）／150mM NaCl／0.2% EDTA-3Na／4% PEG6000／0.01% Tween20／0.2% Proclin150（シグマアルドリッチ）／5%スキムミルク（FUJIFILM Wako））で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域（0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、図中ではEphA4と表記）、または100倍希釈したサンプル（ヒト脳脊髄液）を播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で10000希釈したHRP標識KPEP11__08

またはHRP標識EphA4抗体（R&D）を100 μ Lずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako）を加え、マイクロプレートリーダー（Molecular Device）により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

- [0182] ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果を図18に示す。KPEP11__18とHRP標識KPEP11__08を用いて構築したサンドイッチELISAでは、KPEP11__18とHRP標識EphA4抗体（R&D）を用いて構築した測定系と比較して、ヒトEphA4細胞外領域に対して非常に高い反応性を有していた。次に、脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を図19に示す。KPEP11__18とHRP標識EphA4抗体（R&D）を用いて構築した測定系では、ほとんど反応シグナルが得られないのに対し、KPEP11__18とHRP標識KPEP11__08を用いて構築した測定系では非常に高い反応性を示すことが分かった。

- [0183] 実施例14：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片およびヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性5

KPEP11__04、KPEP11__10、KPEP11__18、EphA4抗体（Sino Biological、以下、「EphA4抗体（Sino）」と表記）およびEphA4抗体（R&D）について、ヒトEphA4細胞外領域、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片およびヒト脳脊髄液（CSF）中のEphA4 N末端断片に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。KPEP11__10を50mM Tris-HCl（pH7.5）/0.1% Sodium azideを用いて終濃度1 μ g/mLに調製し、96ウェルプレート（Nunc）のウェル上に100 μ L

ずつコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液（50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.01% Tween20 / 5% スキムミルク (FUJIFILM Wako)）により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。KPEP11__04、KPEP11__18、EphA4抗体 (Sino) およびEphA4抗体 (R&D) は Peroxidase Labeling Kit-NH2 (同仁化学研究所) を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液（50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.01% Tween20）で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液（50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.2% EDTA-3Na / 4% PEG6000 / 0.01% Tween20 / 0.2% Proclin150 (シグマアルドリッチ) / 5% スキムミルク (FUJIFILM Wako)）で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域（0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、図中ではEphA4と表記）、50倍希釈したヒト血漿液、または100倍希釈したヒト脳脊髄液をそれぞれ播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で50000倍希釈したHRP標識KPEP11__04、KPEP11__18、EphA4抗体 (Sino) またはEphA4抗体 (R&D) を100μLずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL）溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液（2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako）を加え、マイクロプレートリーダー (Molecular Device) により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0184] ヒトEphA4細胞外領域に対する反応性を評価した結果、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果およびヒト脳脊髄液

中のEphA4 N末端断片に対する反応性を評価した結果を図20、図21および図22に示す。KPEP11__10とHRP標識KPEP11__18を用いて構築したサンドイッチELISAは、ヒトEphA4細胞外領域、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片ならびにヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片のいずれに対しても非常に高い反応性を有していた。KPEP11__10とHRP標識KPEP11__04を用いて構築したサンドイッチELISAは、ヒトEphA4細胞外領域、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片ならびにヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片のいずれに対しても反応性を示した。

[0185] 実施例15：サンドイッチELISAによるヒトEphA4細胞外領域、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片およびヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片に対する反応性6

KPEP11__08、KPEP11__10、KPEP11__18、EphA4抗体(Sino)およびEphA4抗体(R&D)について、ヒトEphA4細胞外領域、ヒト血漿中のEphA4 N末端断片およびヒト脳脊髄液(CSF)中のEphA4 N末端断片に対する結合活性の評価は、以下の工程に従って行った。KPEP11__18を50mM Tris-HCl (pH7.5)/0.1% Sodium azideを用いて終濃度1μg/mLに調製し、96ウェルプレート(Nunc)のウェル上に100μLずつコートした。4℃にて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液(50mM Tris-HCl (pH7.5)/150mM NaCl/0.01% Tween20/5%スキムミルク(FUJIFILM Wako))により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4℃にて一晩ブロッキングした。KPEP11__08、KPEP11__10、EphA4抗体(Sino)およびEphA4抗体(R&D)はPeroxidase Labeling Kit-NH2(同仁化学研究所)を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液(50mM Tris-HCl (pH7.5)/150mM NaCl/0.01%

Tween 20) で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 150 mM NaCl / 0.2% EDTA-3Na / 4% PEG 6000 / 0.01% Tween 20 / 0.2% Proclin 150 (シグマアルドリッチ) / 5% スキムミルク (FUJIFILM Wako)) で系列希釈したヒト EphA4 細胞外領域 (0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10 ng/mL、図中では EphA4 と表記)、50 倍希釈したヒト血漿液、または 100 倍希釈したヒト脳脊髄液をそれぞれ播種し、室温にて 2 時間インキュベートした。5 回洗浄した後、検体希釈液で 50000 倍希釈した HRP 標識 KPEP11__08、KPEP11__10、EphA4 抗体 (Sino) または EphA4 抗体 (R&D) を 100 μ L ずつ加え、室温にて 1 時間インキュベートした。3 回洗浄した後、ウェルに TMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、30 分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2 N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (Molecular Device) により 450 nm および 650 nm の吸光度を読み取った。

[0186] ヒト EphA4 細胞外領域に対する反応性を評価した結果、ヒト血漿中の EphA4 N 末端断片に対する反応性を評価した結果およびヒト脳脊髄液中の EphA4 N 末端断片に対する反応性を評価した結果をそれぞれ、図 23、図 24 および図 25 に示す。KPEP11__18 と HRP 標識 KPEP11__08 を用いて構築したサンドイッチ ELISA ならびに KPEP11__18 と HRP 標識 KPEP11__10 を用いて構築したサンドイッチ ELISA は、ヒト EphA4 細胞外領域、ヒト血漿中の EphA4 N 末端断片ならびにヒト脳脊髄液中の EphA4 N 末端断片のいずれに対しても非常に高い反応性を有していた。

[0187] 実施例 16 : ELISA ならびに LC-MS を用いたヒト脳脊髄液中の EphA4 N 末端断片の定量解析ならびに相関解析

LC-MS分析による定量解析

試料調製については以下のように実施した。検量線用のサンプルとして、aCSF (Harvard Apparatus) を用いて終濃度 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したBSA (SIGMA) 溶液を用いて系列希釈したヒトEphA4細胞外領域(0、3、125、6、25、12、5、25、50、100、 $200\text{ng}/\text{mL}$)を各 $100\mu\text{L}$ 使用した。 $50\mu\text{L}$ の脳脊髄液(CSF)サンプルを、aCSF (Harvard Apparatus) を用いて終濃度 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したBSA (SIGMA) 溶液 $50\mu\text{L}$ と混合した後に以下の操作に供した。 $150\mu\text{L}$ の 50mM TEAB (Thermo Fisher) で溶解した 10M Urea溶液 $150\mu\text{L}$ 、さらに $25\mu\text{L}$ の 100mM DTT溶液を順次加えた。混合溶液を 37°C で 120 分間インキュベート後、 200mM ヨードアセトアミド (FUJIFILM Wako) を $25\mu\text{L}$ 加え、次に暗所下室温で 30 分間インキュベートした。つづいて、 $1250\mu\text{L}$ のEphA4-NTF-1S、 $10\mu\text{L}$ のトリプシン溶液($200\mu\text{g}/\text{mL}$)を順次加えて 37°C で 18 時間インキュベートした。 20% TFAを $80\mu\text{L}$ 加えトリプシン消化反応を停止した。試料の精製はOasis HLB 96-Well Plate (Waters) を用いて以下のように行った。プレートを $500\mu\text{L}$ のメタノール (FUJIFILM Wako) で洗浄後、 $500\mu\text{L}$ の 0.1% TFA (Thermo Fisher) で平衡化した。上記で調製したサンプルをアプライシカラムに吸着させたのち、 $500\mu\text{L}$ の 0.1% TFAで洗浄を行った。続いて $200\mu\text{L}$ の溶出液(0.1% TFA-水中の 80% アセトニトリル (FUJIFILM Wako)) 加えて溶出液を回収した。回収した溶出液をSpeed Vacシステム (Thermo Fisher) によって乾燥させ、続いて $30\mu\text{L}$ の 0.1% TFA-水中の 5% アセトニトリルを使用して最終的な再構成溶液を入手し、この溶液をLC-MS分析に供した。

[0188] ELISA分析による定量解析1

ヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量解析は、以下の工程に従って行った。KPEP11__10を50mM Tris-HCl (pH7.5) / 0.1% Sodium azideを用いて終濃度1 μ g/mLに調製し、96ウェルプレート (Nunc) のウェル上に100 μ Lずつコートした。4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液 (50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.01% Tween20 / 5%スキムミルク (FUJIFILM Wako)) により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4 $^{\circ}$ Cにて一晩ブロッキングした。KPEP11__18はPeroxidase Labeling Kit-NH2 (同仁化学研究所) を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液 (50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.01% Tween20) で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液 (50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.2% EDTA-3Na / 4% PEG6000 / 0.01% Tween20 / 0.2% Proclin150 (シグマアルドリッチ) / 5%スキムミルク (FUJIFILM Wako)) で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域 (0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、 \square 中ではEphA4と表記)、または100倍希釈したヒト脳脊髄液をそれぞれ播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で50000倍希釈したHRP標識KPEP11__18を100 μ Lずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (Molecular Device) により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0189] ELISA分析による定量解析2

ヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量解析は、以下の工程に従って行った。KPEP11__18を50mM Tris-HCl (pH7.5) / 0.1% Sodium azideを用いて終濃度1 μ g/mLに調製し、96ウェルプレート (Nunc) のウェル上に100 μ Lずつコートした。4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした後、ブロッキング溶液 (50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.01% Tween20 / 5%スキムミルク (FUJIFILM Wako)) により、ウェルを室温にて1時間以上もしくは4 $^{\circ}$ Cにて一晩ブロッキングした。KPEP11__10はPeroxidase Labeling Kit-NH₂ (同仁化学研究所) を用いて、付属のマニュアルに従いHRP標識を行った。ブロッキングしたプレートは洗浄液 (50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.01% Tween20) で3回洗浄した後、ウェルに検体希釈液 (50mM Tris-HCl (pH7.5) / 150mM NaCl / 0.2% EDTA-3Na / 4% PEG6000 / 0.01% Tween20 / 0.2% Proclin150 (シグマアルドリッチ) / 5%スキムミルク (FUJIFILM Wako)) で系列希釈したヒトEphA4細胞外領域 (0、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10ng/mL、 \square 中ではEphA4と表記)、または100倍希釈したヒト脳脊髄液をそれぞれ播種し、室温にて2時間インキュベートした。5回洗浄した後、検体希釈液で40000倍希釈したHRP標識KPEP11__10を100 μ Lずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ウェルにTMBZ (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、KPL) 溶液を加え、30分室温にてインキュベートした。ウェルに等量の反応停止溶液 (2N H₂SO₄、FUJIFILM Wako) を加え、マイクロプレートリーダー (Molecular Device) により450nmおよび650nmの吸光度を読み取った。

[0190] LC-MSにて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量

結果とELISA分析による定量解析1にて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果をもとに実施した相関解析の結果を図26に示す。LC-MSで定量したEphA4 N末端断片量とELISAで定量したEphA4 N末端断片量との間について、スピアマンの相関係数(r)を算出し、これらに有意な相関がみられたことを見出した($p < 0.0001$)。

[0191] LC-MSにて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果とELISA分析による定量解析2にて分析したヒト脳脊髄液中のEphA4 N末端断片の定量結果をもとに実施した相関解析の結果を図27に示す。LC-MSで定量したEphA4 N末端断片量とELISAで定量したEphA4 N末端断片量との間について、スピアマンの相関係数(r)を算出し、これらに有意な相関がみられたことを見出した($p < 0.0001$)。

請求の範囲

[請求項1]

抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片であって、
前記抗体は、

- (a) 配列番号52に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
配列番号53に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および
配列番号54に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに
配列番号55に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
配列番号56に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および
配列番号57に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖；
- (b) 配列番号64に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
配列番号65に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および
配列番号66に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに
配列番号67に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
配列番号68に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および
配列番号69に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖；または
- (c) 配列番号40に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
配列番号41に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および
配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに

配列番号 4 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;
配列番号 4 4 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および

配列番号 4 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖 ;
を含む、
抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項 2] 請求項 1 に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号 5 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ;
配列番号 5 3 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ; および
配列番号 5 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重鎖 ; ならびに

配列番号 5 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ;
配列番号 5 6 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ; および
配列番号 5 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖 ;

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項 3] 請求項 2 に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号 1 0 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、 および
配列番号 1 1 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項 4] 請求項 2 に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であ

って、

前記抗体は、

配列番号 1 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および

配列番号 1 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項5]

請求項 1 に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であ

って、

前記抗体は、

配列番号 6 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ；

配列番号 6 5 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ；および

配列番号 6 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含む重

鎖；ならびに

配列番号 6 7 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ；

配列番号 6 8 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ；および

配列番号 6 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含む軽

鎖；

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項6]

請求項 5 に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であ

って、

前記抗体は、

配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および

配列番号 1 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項7]

請求項 1 に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片であ

って、

前記抗体は、

配列番号40に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

配列番号41に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；および

配列番号42に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖；ならびに

配列番号43に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

配列番号44に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；および

配列番号45に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖；

を含む、

抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項8] 請求項7に記載の抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体は、

配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および

配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

を含む、

抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項9] 請求項1から8のいずれか1項に記載の抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片であって、

前記抗体またはその抗原結合性断片が標識されている、

抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片。

[請求項10] 請求項1から8のいずれか1項に記載の抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸を含む宿主細胞を培養する工程を含む、抗EphA4抗体またはその抗原結合性断片の作製方法。

[請求項11] 生体試料中のヒトEphA4を検出または定量する方法であって、前記生体試料と、請求項1から8のいずれか1項に記載の抗Eph

A 4 抗体またはその抗原結合性断片とを接触させることを含む、方法。

- [請求項12] 請求項 1 1 に記載の方法であって、
前記ヒト E p h A 4 は、ヒト E p h A 4 の N 末端断片である、方法。
。
- [請求項13] 請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法であって、
前記生体試料が、血液、血清、血漿、または脳脊髄液である、方法。
。
- [請求項14] 請求項 1 1 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法であって、
さらに、前記生体試料と、請求項 9 に記載の標識された抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片とを接触させることを含む、方法。
- [請求項15] ヒト E p h A 4 を検出または定量するためのキットであって、
請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片を含む、
キット。
- [請求項16] 請求項 1 5 に記載のキットであって、
前記ヒト E p h A 4 は、ヒト E p h A 4 の N 末端断片である、
キット。
- [請求項17] 請求項 1 5 または 1 6 に記載のキットであって、
配列番号 1 4 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 1 5 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片、ならびに、
配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号 1 9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗 E p h A 4 抗体またはその抗原結合性断片、
を含む、
キット。

- [請求項18] 請求項15または16に記載のキットであって、
配列番号6に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号7に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、ならびに、
配列番号14に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号15に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、
を含む、
キット。
- [請求項19] 請求項15または16に記載のキットであって、
配列番号10に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号11に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、ならびに、
配列番号18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および配列番号19に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗E p h A 4抗体またはその抗原結合性断片、
を含む、
キット。
- [請求項20] 請求項15から19のいずれか1項に記載のキットであって、
前記キットは、ヒトE p h A 4のN末端断片を含む、
キット。

[1]

	hEPA1-His	hEPA2-His	hEPA3-His	hEPA4-His	hEPA5-His	hEPA6-His	hEPA7-His	hEPA8-His	hEPA10-His	hEPA11-His	hEPA12-His	hEPA13-His	hEPA14-His	hEPA15-His
KPEP11_01	0.137	0.123	0.122	0.713	0.163	0.135	0.141	0.138	0.122	0.178	0.161	0.163	0.167	0.149
KPEP11_02	0.138	0.132	0.128	0.784	0.157	0.155	0.128	0.143	0.137	0.174	0.181	0.154	0.164	0.166
KPEP11_04	0.115	0.111	0.112	0.841	0.138	0.128	0.135	0.112	0.112	0.163	0.161	0.142	0.141	0.161
KPEP11_05	0.107	0.090	0.098	0.727	0.127	0.119	0.110	0.112	0.112	0.153	0.140	0.134	0.129	0.148
KPEP11_07	0.108	0.094	0.101	0.765	0.140	0.126	0.125	0.112	0.122	0.156	0.146	0.142	0.148	0.155
KPEP11_08	0.138	0.120	0.122	0.687	0.164	0.154	0.151	0.148	0.162	0.206	0.188	0.195	0.181	0.203
KPEP11_09	0.112	0.117	0.102	0.652	0.162	0.150	0.153	0.128	0.152	0.179	0.176	0.189	0.165	0.191
KPEP11_10	0.145	0.145	0.143	0.696	0.226	0.197	0.207	0.188	0.212	0.272	0.245	0.256	0.233	0.257
KPEP11_12	0.151	0.141	0.141	0.723	0.176	0.163	0.166	0.148	0.167	0.205	0.216	0.196	0.178	0.215
KPEP11_13	0.178	0.186	0.185	0.740	0.233	0.210	0.192	0.210	0.197	0.274	0.249	0.215	0.261	0.262
KPEP11_18	0.111	0.094	0.106	0.894	0.135	0.121	0.105	0.125	0.128	0.161	0.154	0.135	0.184	0.177
KPEP11_20	0.095	0.095	0.092	0.555	0.136	0.128	0.114	0.122	0.140	0.172	0.165	0.149	0.169	0.182

[図2]

	ヒト	サル	ウサギ	ラット	マウス	SEAP
KPEP11_01	1.207	1.183	0.045	0.042	0.049	0.052
KPEP11_02	1.255	1.199	0.040	0.048	0.048	0.071
KPEP11_04	1.264	1.211	0.039	0.044	0.044	0.050
KPEP11_05	1.226	1.240	0.035	0.043	0.045	0.043
KPEP11_07	1.224	1.180	0.036	0.044	0.045	0.050
KPEP11_08	1.151	1.169	0.057	0.065	0.071	0.072
KPEP11_09	1.135	1.148	0.061	0.064	0.079	0.070
KPEP11_10	1.171	1.109	0.091	0.087	0.108	0.087
KPEP11_12	1.219	1.194	0.055	0.054	0.059	0.067
KPEP11_13	1.176	1.172	0.083	0.086	0.082	0.099
KPEP11_18	1.230	1.179	0.059	0.067	0.064	0.054
KPEP11_20	1.158	1.146	0.046	0.062	0.052	0.067

[図3]

	ECD	LBD	FN1	FN2	MBP
KPEP11_01	1.299	0.236	0.228	0.235	0.231
KPEP11_02	1.354	1.321	0.213	0.227	0.268
KPEP11_04	1.413	1.329	0.225	0.227	0.267
KPEP11_05	1.428	1.323	0.213	0.225	0.239
KPEP11_07	1.422	1.389	0.226	0.220	0.240
KPEP11_08	1.310	0.292	0.283	0.265	0.300
KPEP11_09	1.240	0.265	0.240	0.242	0.291
KPEP11_10	1.346	0.340	0.329	0.325	0.334
KPEP11_12	1.290	0.283	0.255	0.258	0.302
KPEP11_13	1.315	0.348	0.318	0.360	0.402
KPEP11_18	1.421	1.428	0.222	0.245	0.281
KPEP11_20	1.265	1.415	0.207	0.238	0.274

[図4]

S-N((10ng/mLのEphA4細胞外領域を標識した時に得られたシグナル)ー(Ong/mLのEphA4細胞外領域を標識した時に得られたシグナル))

抗体ID	HRP標識抗体																							
	KPEP1_01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20
01	-	1.972	3.236	2.070	3.163	0.045	0.001	0.004	0.018	-0.019	3.025	2.060	-	1.972	3.236	2.070	3.163	0.045	0.001	0.004	0.018	-0.019	3.025	2.060
02	0.477	-	-0.015	-0.035	0.001	0.732	0.565	1.246	0.804	0.837	-0.001	0.008	0.477	-	-0.015	-0.035	0.001	0.732	0.565	1.246	0.804	0.837	-0.001	0.008
04	1.159	-0.032	-	-0.010	-0.013	1.708	1.247	2.146	1.172	1.352	-0.006	-0.005	1.159	-0.032	-	-0.010	-0.013	1.708	1.247	2.146	1.172	1.352	-0.006	-0.005
05	0.742	-0.019	0.002	-	-0.024	0.896	0.691	1.236	0.991	0.578	-0.009	0.000	0.742	-0.019	0.002	-	-0.024	0.896	0.691	1.236	0.991	0.578	-0.009	0.000
07	1.056	-0.031	-0.036	-0.021	-	1.464	0.688	1.701	1.292	1.102	-0.006	-0.007	1.056	-0.031	-0.036	-0.021	-	1.464	0.688	1.701	1.292	1.102	-0.006	-0.007
08	-0.007	2.260	3.252	1.916	3.289	-	0.016	0.030	0.012	0.071	3.357	1.382	-0.007	2.260	3.252	1.916	3.289	-	0.016	0.030	0.012	0.071	3.357	1.382
09	-0.022	1.734	2.739	1.613	2.654	-0.007	-	0.010	-0.027	0.081	2.516	1.502	-0.022	1.734	2.739	1.613	2.654	-0.007	-	0.010	-0.027	0.081	2.516	1.502
10	-0.005	2.437	3.241	2.089	3.193	-0.008	-0.018	-	0.000	0.068	3.263	1.971	-0.005	2.437	3.241	2.089	3.193	-0.008	-0.018	-	0.000	0.068	3.263	1.971
12	-0.063	2.333	3.314	2.099	3.209	-0.077	-0.007	-0.022	-	-0.058	3.030	1.793	-0.063	2.333	3.314	2.099	3.209	-0.077	-0.007	-0.022	-	-0.058	3.030	1.793
13	-0.014	1.997	2.924	1.790	3.066	-0.034	-0.037	-0.079	-0.057	-	2.971	1.277	-0.014	1.997	2.924	1.790	3.066	-0.034	-0.037	-0.079	-0.057	-	2.971	1.277
18	2.861	-0.029	-0.020	-0.018	-0.036	3.014	3.157	2.698	2.847	2.897	-	-0.013	2.861	-0.029	-0.020	-0.018	-0.036	3.014	3.157	2.698	2.847	2.897	-	-0.013
20	0.611	-0.007	-0.013	-0.027	-0.016	0.751	0.605	0.947	0.707	0.802	-0.008	-	0.611	-0.007	-0.013	-0.027	-0.016	0.751	0.605	0.947	0.707	0.802	-0.008	-

標識抗体

[図5]

S/N((10ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)/(0ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))

抗体ID	HRP標識抗体																			
	KPEP1	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20							
01	-	5.752	8.121	7.079	8.354	1.066	1.002	1.007	1.039	0.976	6.047	10.367								
02	2.098	-	0.955	0.862	1.003	2.492	2.435	2.699	2.648	2.372	0.997	1.045								
04	3.902	0.891	-	0.958	0.957	4.917	4.639	6.618	4.101	4.313	0.969	0.964								
05	2.384	0.945	1.005	-	0.939	2.557	2.496	2.412	2.796	1.895	0.966	1.001								
07	3.735	0.883	0.885	0.903	-	4.431	3.067	4.013	4.923	3.610	0.965	0.943								
08	0.968	9.858	14.001	9.477	14.199	-	1.083	1.092	1.035	1.109	13.088	14.557								
09	0.955	4.430	4.690	4.553	4.891	0.897	-	1.011	0.959	1.083	5.890	8.089								
10	0.978	8.893	9.037	8.584	8.758	0.990	0.935	-	0.999	1.083	9.064	16.266								
12	0.806	6.783	8.260	7.178	8.883	0.896	0.977	0.952	-	0.916	9.170	11.711								
13	0.946	7.944	10.650	7.482	10.335	0.950	0.873	0.850	0.848	-	8.677	9.500								
18	5.062	0.923	0.943	0.944	0.900	4.604	6.115	3.411	5.134	4.474	-	0.948								
20	2.410	0.979	0.968	0.917	0.959	2.338	2.309	2.187	2.349	2.256	0.975	-								

標識抗体

[図6]

S-N(1ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)ー(Ong/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)

抗体ID	HRP標識抗体																								
	01	02	04	05	07	08	08	09	10	12	13	18	20	01	02	04	05	07	08	08	09	10	12	13	18
KPEP11	-	0.067	0.418	0.100	0.381	0.044	0.016	0.021	0.014	0.007	0.748	0.089	0.014	-	-0.021	-0.020	0.022	0.051	0.052	0.115	0.029	0.033	-0.009	-0.001	
01	-	0.098	-0.020	-	0.014	-0.009	0.126	0.123	0.585	0.102	-0.007	-0.014	0.098	-0.020	-	0.014	-0.009	0.126	0.123	0.585	0.102	-0.007	-0.014		
02	0.014	-	-0.021	-0.020	0.022	0.051	0.052	0.115	0.029	0.033	-0.009	-0.001	0.014	-	-0.021	-0.020	0.022	0.051	0.052	0.115	0.029	0.033	-0.009	-0.001	
04	0.098	-0.020	-	0.014	-0.009	0.126	0.123	0.585	0.102	-0.007	-0.014	-0.014	0.098	-0.020	-	0.014	-0.009	0.126	0.123	0.585	0.102	-0.007	-0.014		
05	0.026	-0.051	-0.025	-	-0.015	0.097	0.032	0.242	0.080	0.161	-0.013	-0.008	0.026	-0.051	-0.025	-	-0.015	0.097	0.032	0.242	0.080	0.161	-0.013	-0.008	
07	0.075	-0.020	-0.001	0.006	-	0.145	0.106	0.175	0.125	0.091	-0.002	-0.011	0.075	-0.020	-0.001	0.006	-	0.145	0.106	0.175	0.125	0.091	-0.002	-0.011	
08	-0.052	0.046	0.347	0.094	0.284	-	0.022	0.027	0.006	0.028	0.555	0.039	-0.052	0.046	0.347	0.094	0.284	-	0.022	0.027	0.006	0.028	0.555	0.039	
09	-0.014	0.064	0.321	0.051	0.262	-0.001	-	-0.016	0.018	0.103	0.374	0.049	-0.014	0.064	0.321	0.051	0.262	-0.001	-	-0.016	0.018	0.103	0.374	0.049	
10	-0.013	0.116	0.507	0.096	0.354	-0.025	0.016	-	0.016	0.063	0.705	0.088	-0.013	0.116	0.507	0.096	0.354	-0.025	0.016	-	0.016	0.063	0.705	0.088	
12	-0.059	0.044	0.360	0.034	0.326	-0.064	-0.037	-0.037	-	0.004	0.478	0.054	-0.059	0.044	0.360	0.034	0.326	-0.064	-0.037	-0.037	-	0.004	0.478	0.054	
13	-0.027	0.099	0.293	0.077	0.310	0.028	-0.014	0.020	0.007	-	0.509	0.081	-0.027	0.099	0.293	0.077	0.310	0.028	-0.014	0.020	0.007	-	0.509	0.081	
18	0.664	-0.024	-0.010	0.007	-0.028	1.151	0.349	1.362	0.806	0.935	-	-0.027	0.664	-0.024	-0.010	0.007	-0.028	1.151	0.349	1.362	0.806	0.935	-	-0.027	
20	0.066	-0.017	0.013	-0.026	0.006	0.073	0.041	0.104	0.078	0.079	0.036	-	0.066	-0.017	0.013	-0.026	0.006	0.073	0.041	0.104	0.078	0.079	0.036	-	

抗体ID

[7]

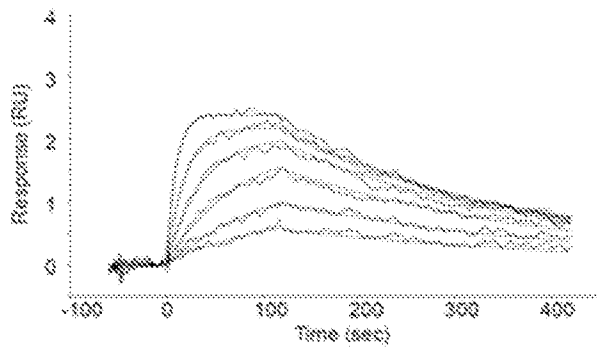
S/N((1ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル)/(0ng/mLのEphA4細胞外領域を播種した時に得られたシグナル))

抗体ID	HRP標識抗体																							
	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20	01	02	04	05	07	08	09	10	12	13	18	20
KPEP11_01	-	1.162	1.919	1.293	1.886	1.065	1.038	1.037	1.029	1.009	2.247	1.402	-	1.162	1.919	1.293	1.886	1.065	1.038	1.037	1.029	1.009	2.247	1.402
02	1.032	-	0.936	0.921	1.072	1.104	1.132	1.157	1.059	1.054	0.969	0.993	1.032	-	0.936	0.921	1.072	1.104	1.132	1.157	1.059	1.054	0.969	0.993
04	1.245	0.934	-	1.056	0.971	1.289	1.359	2.531	1.271	1.337	0.961	0.892	1.245	0.934	-	1.056	0.971	1.289	1.359	2.531	1.271	1.337	0.961	0.892
05	1.049	0.854	0.938	-	0.961	1.168	1.070	1.276	1.144	1.249	0.950	0.946	1.049	0.854	0.938	-	0.961	1.168	1.070	1.276	1.144	1.249	0.950	0.946
07	1.195	0.926	0.997	1.029	-	1.340	1.320	1.311	1.379	1.215	0.988	0.905	1.195	0.926	0.997	1.029	-	1.340	1.320	1.311	1.379	1.215	0.988	0.905
08	0.758	1.180	2.386	1.415	2.140	-	1.115	1.083	1.017	1.042	2.998	1.387	0.758	1.180	2.386	1.415	2.140	-	1.115	1.083	1.017	1.042	2.998	1.387
09	0.971	1.127	1.432	1.112	1.384	0.999	-	0.982	1.028	1.106	1.727	1.229	0.971	1.127	1.432	1.112	1.384	0.999	-	0.982	1.028	1.106	1.727	1.229
10	0.947	1.383	2.257	1.348	1.860	0.968	1.064	-	1.048	1.078	2.741	1.679	0.947	1.383	2.257	1.348	1.860	0.968	1.064	-	1.048	1.078	2.741	1.679
12	0.818	1.110	1.788	1.101	1.800	0.914	0.880	0.920	-	1.006	2.289	1.324	0.818	1.110	1.788	1.101	1.800	0.914	0.880	0.920	-	1.006	2.289	1.324
13	0.897	1.346	1.968	1.277	1.945	1.041	0.953	1.038	1.019	-	2.315	1.541	0.897	1.346	1.968	1.277	1.945	1.041	0.953	1.038	1.019	-	2.315	1.541
18	1.943	0.937	0.971	1.021	0.921	2.452	1.566	2.217	2.170	2.121	-	0.892	1.943	0.937	0.971	1.021	0.921	2.452	1.566	2.217	2.170	2.121	-	0.892
20	1.151	0.951	1.033	0.920	1.016	1.129	1.089	1.130	1.148	1.124	1.117	-	1.151	0.951	1.033	0.920	1.016	1.129	1.089	1.130	1.148	1.124	1.117	-

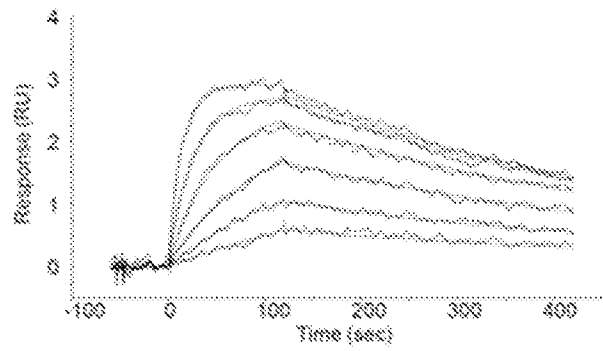
* 検出限界

[8]

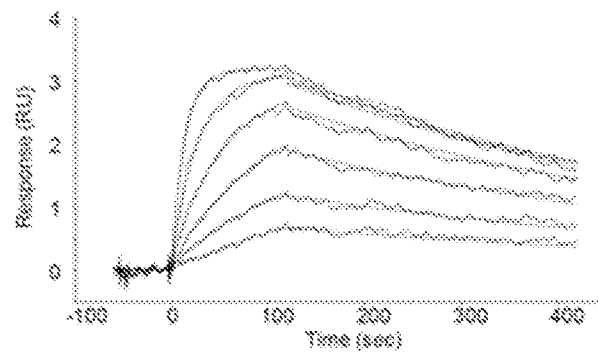
KPEP11_04



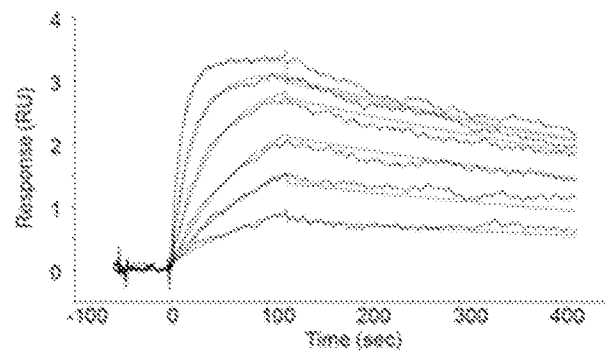
KPEP11_08



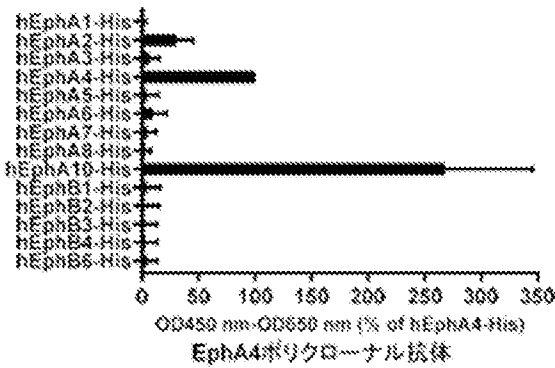
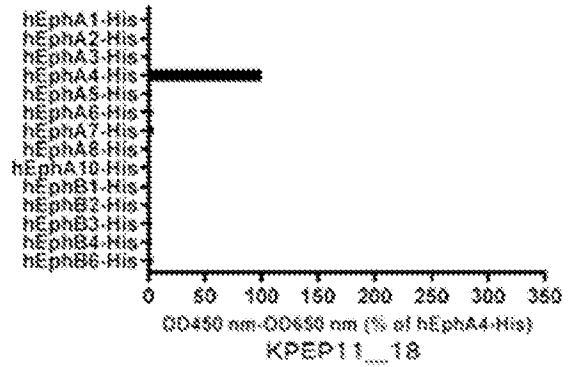
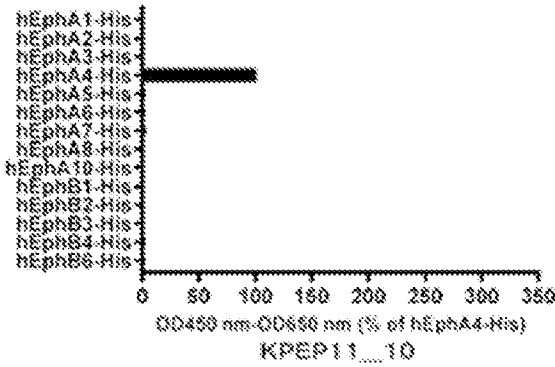
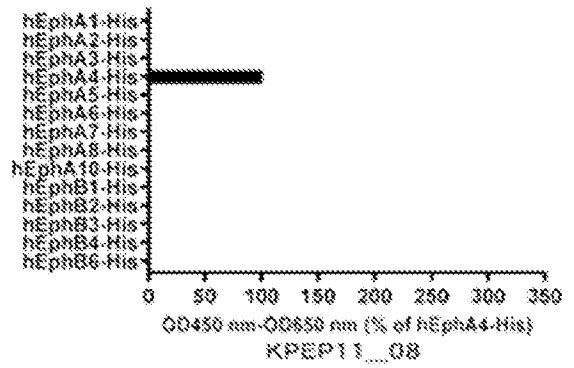
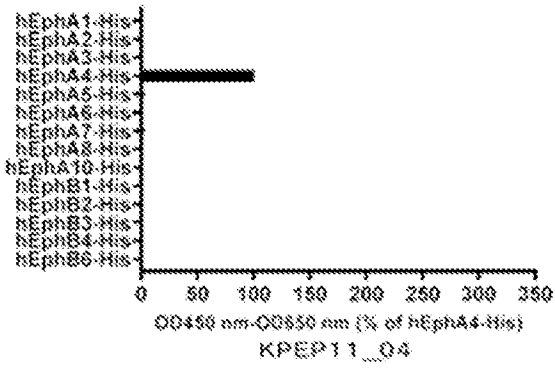
KPEP11_10



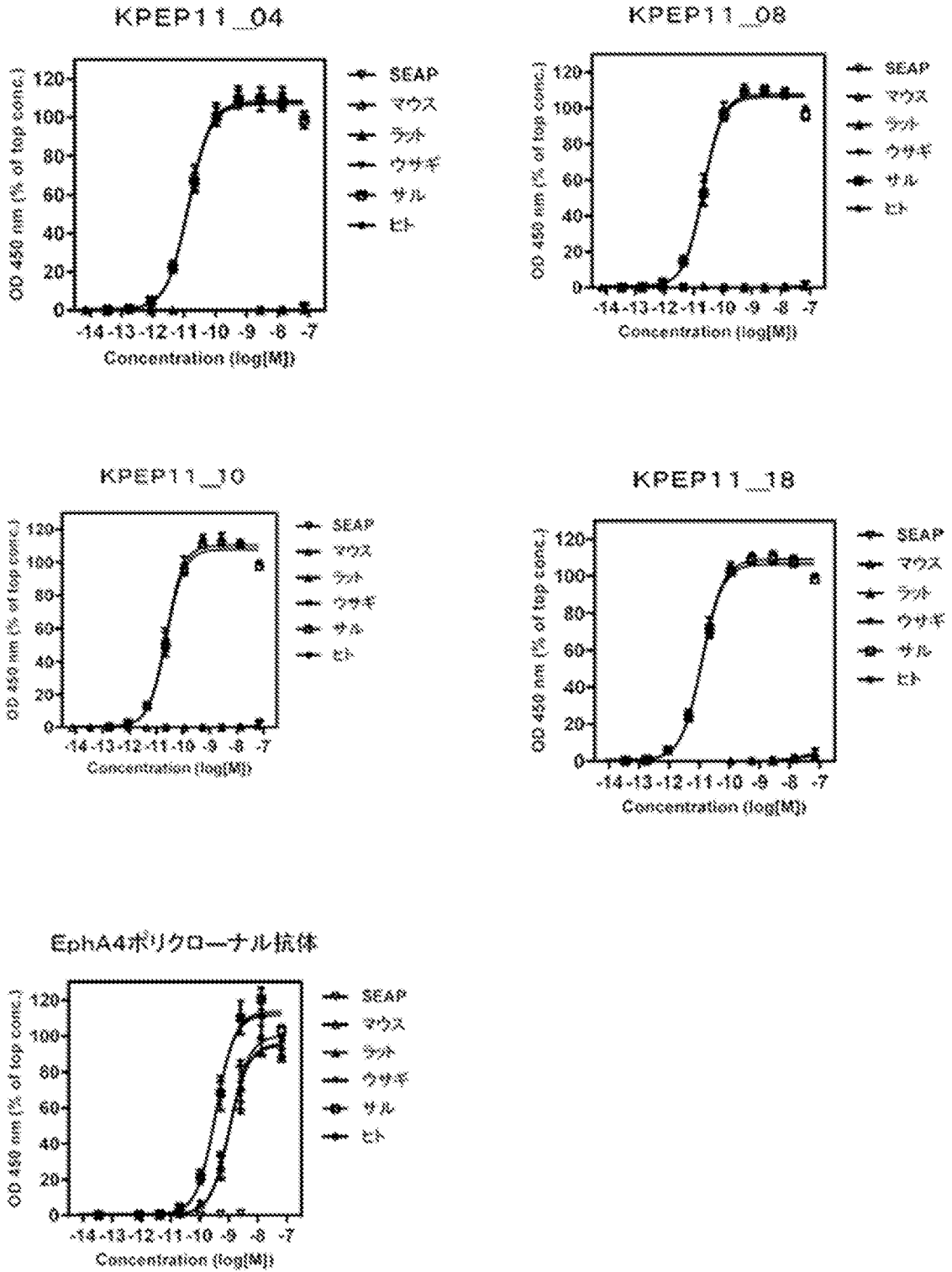
KPEP11_18



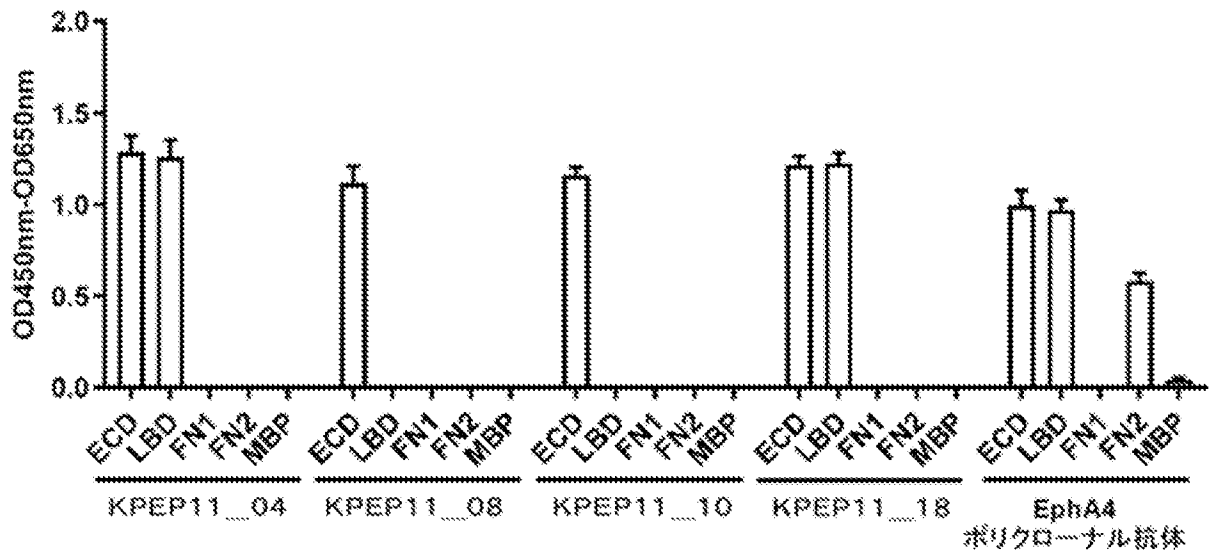
[図9]



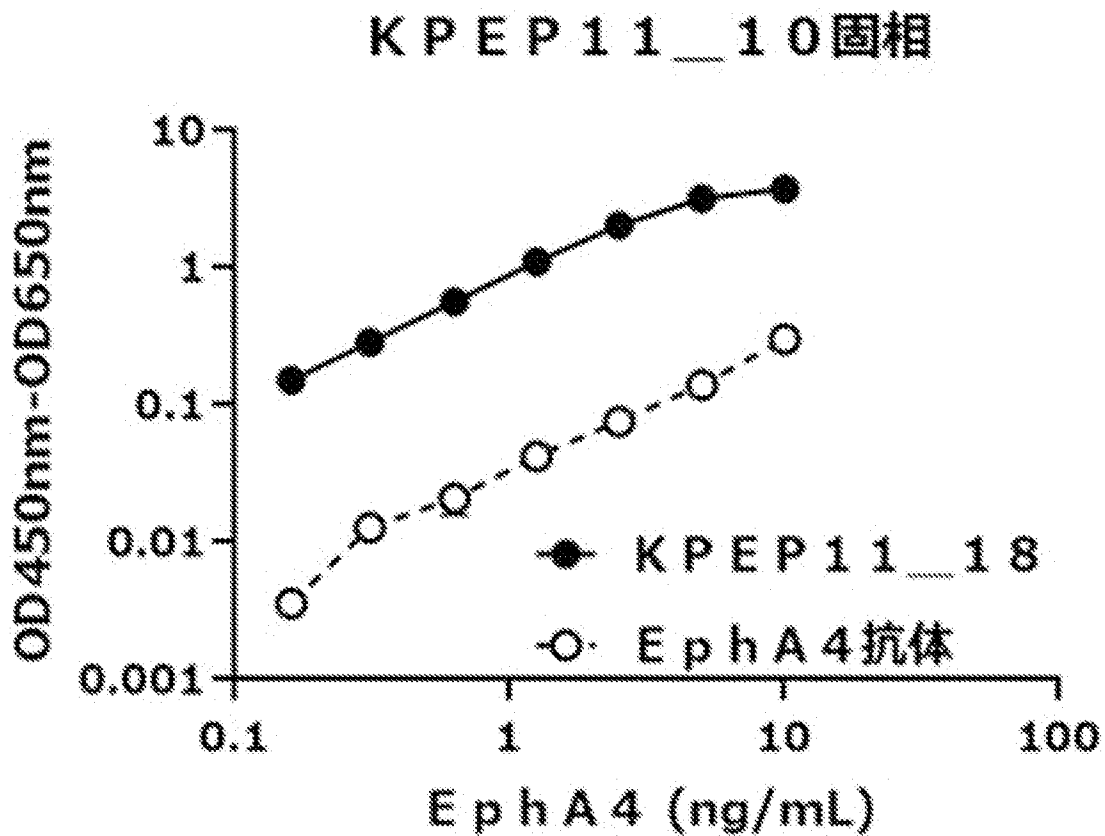
[図10]



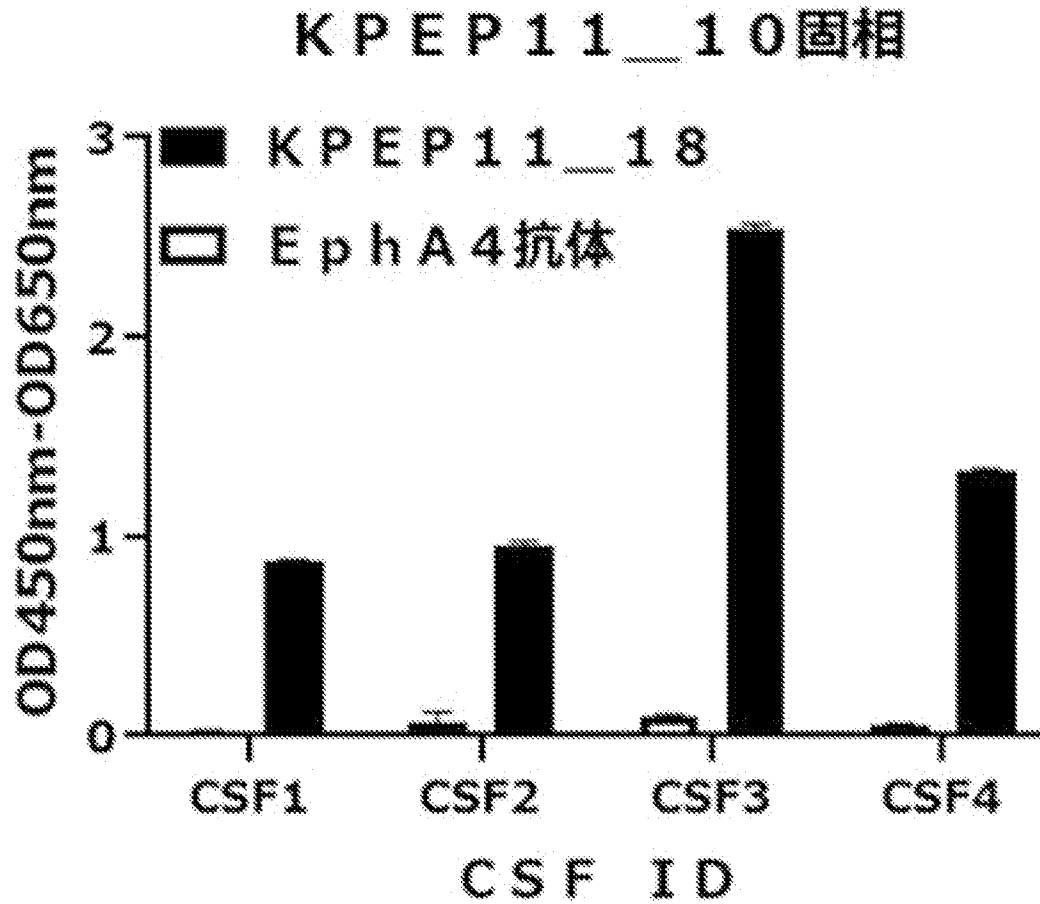
[図11]



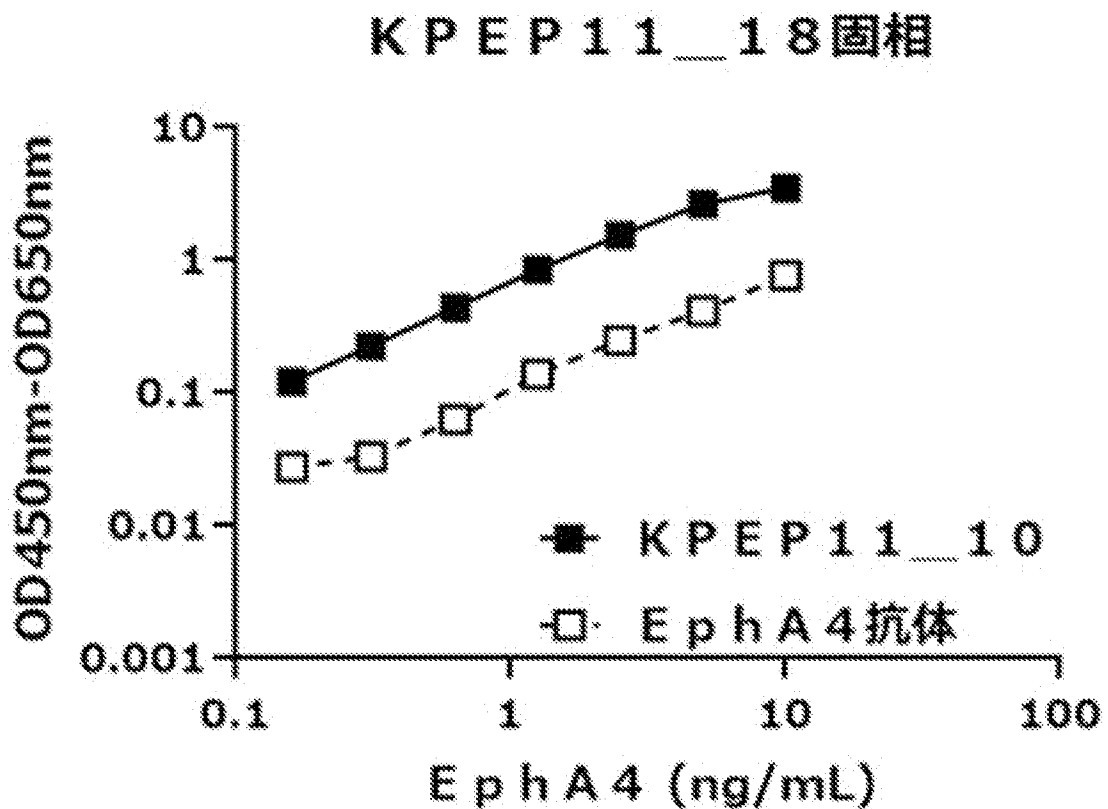
[図12]



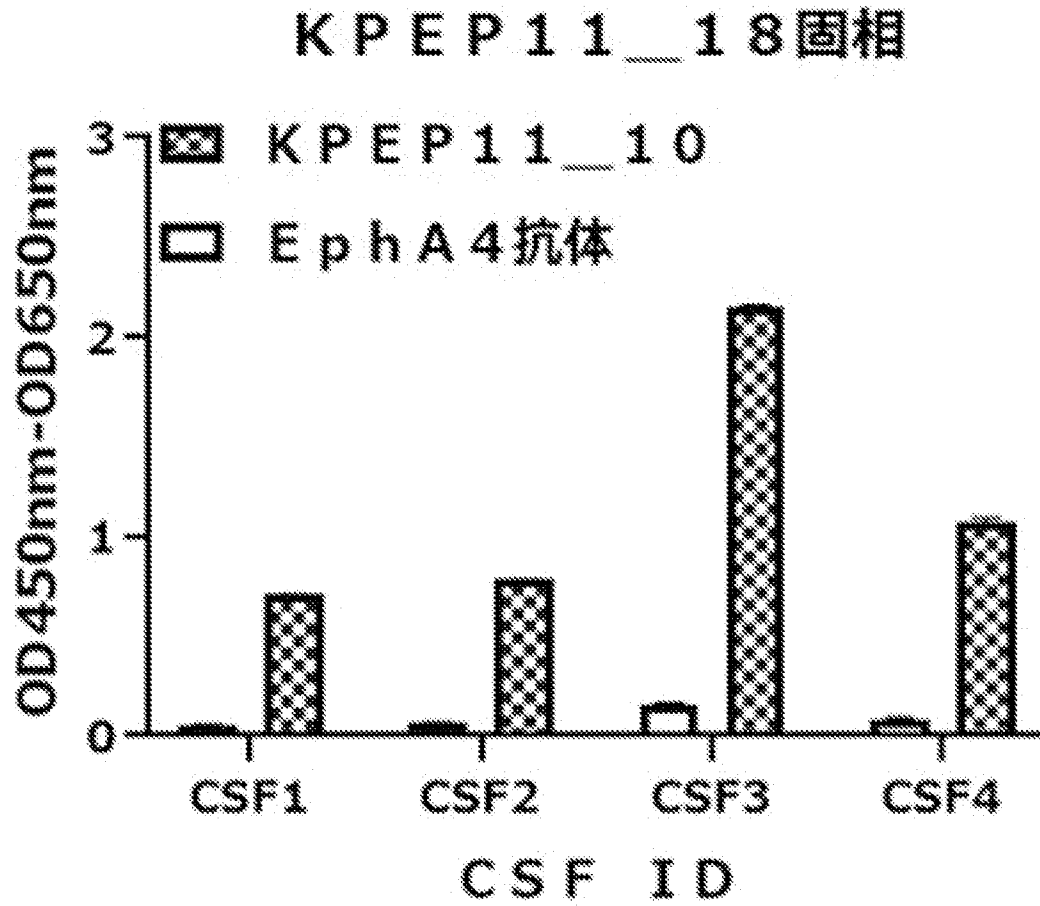
[圖13]



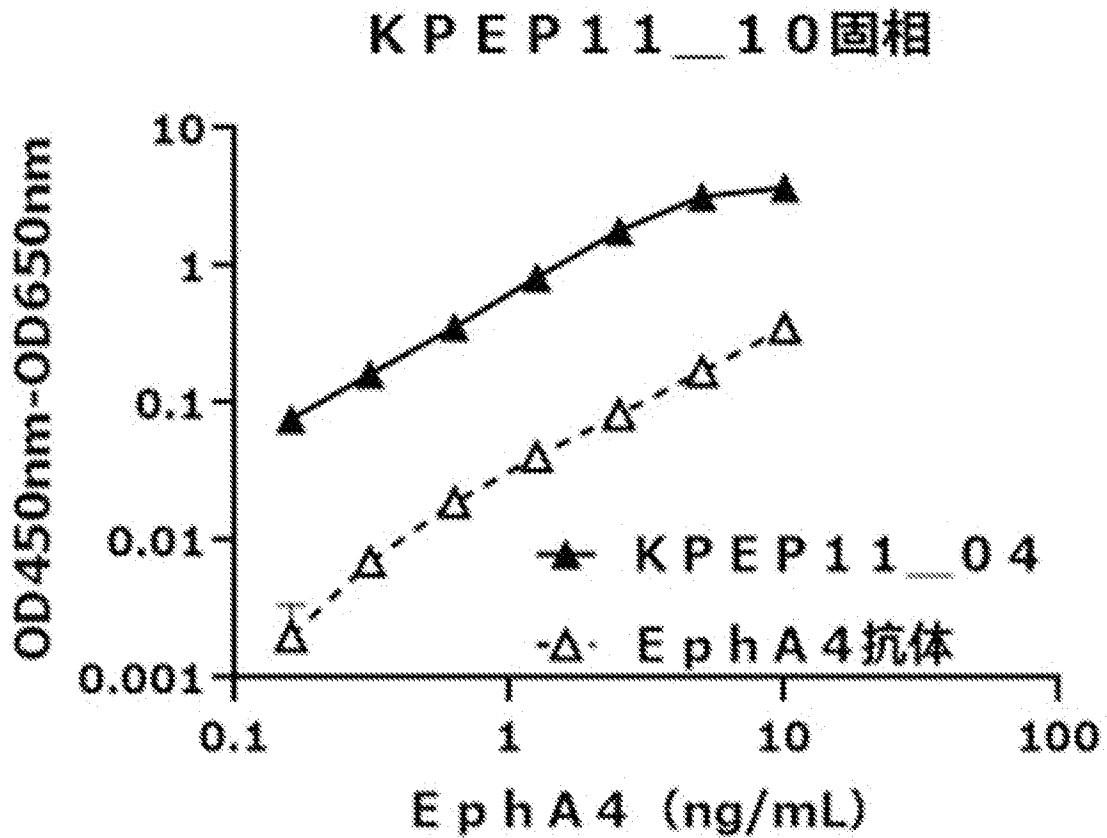
[圖14]



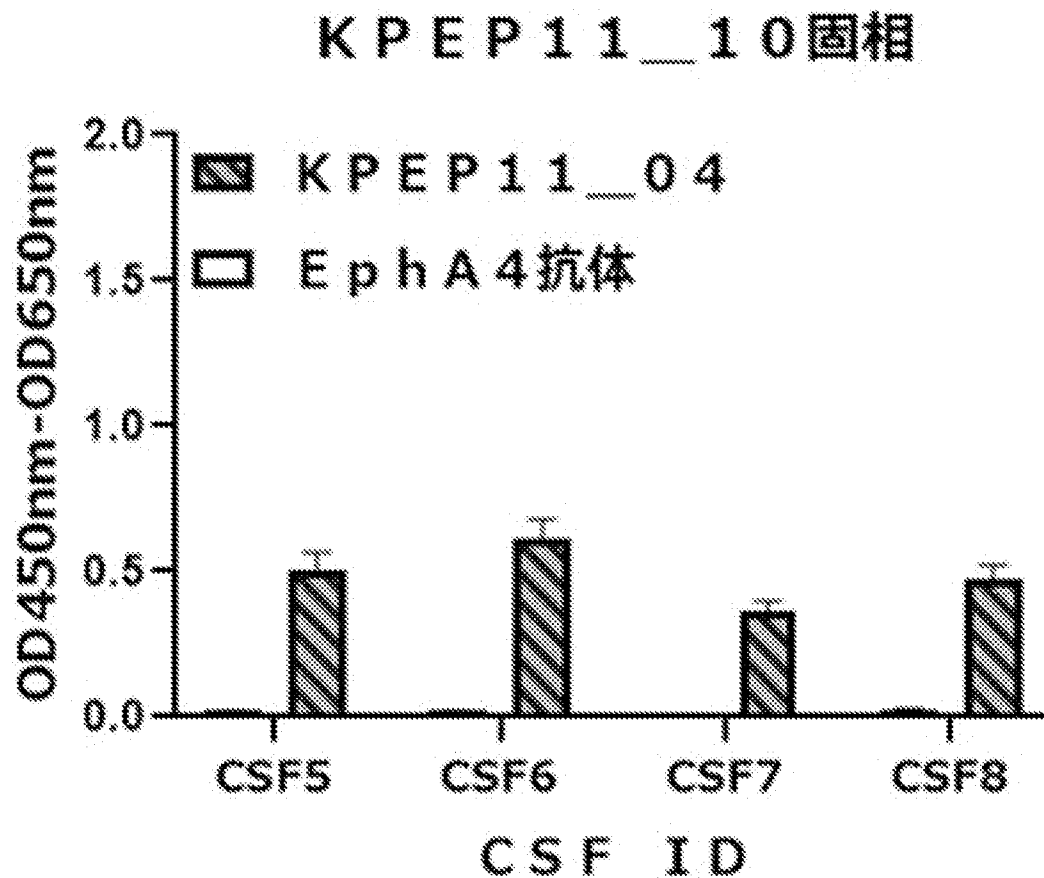
[図15]



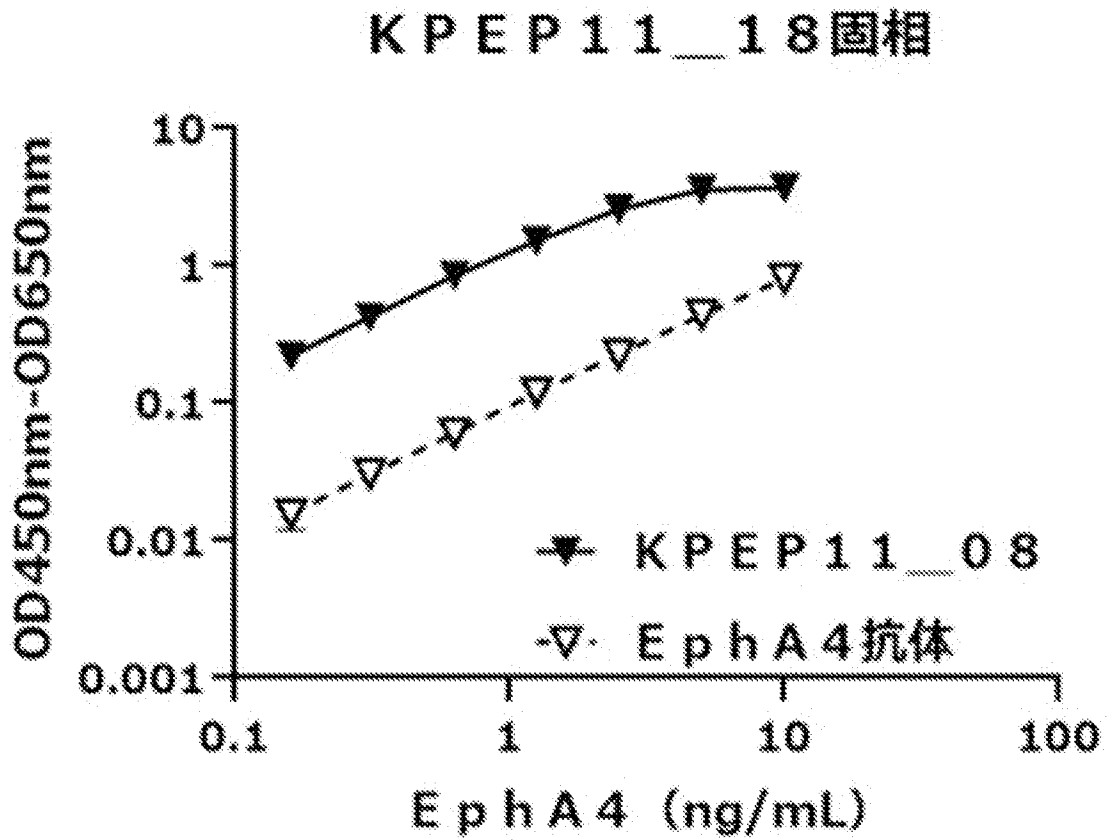
[図16]



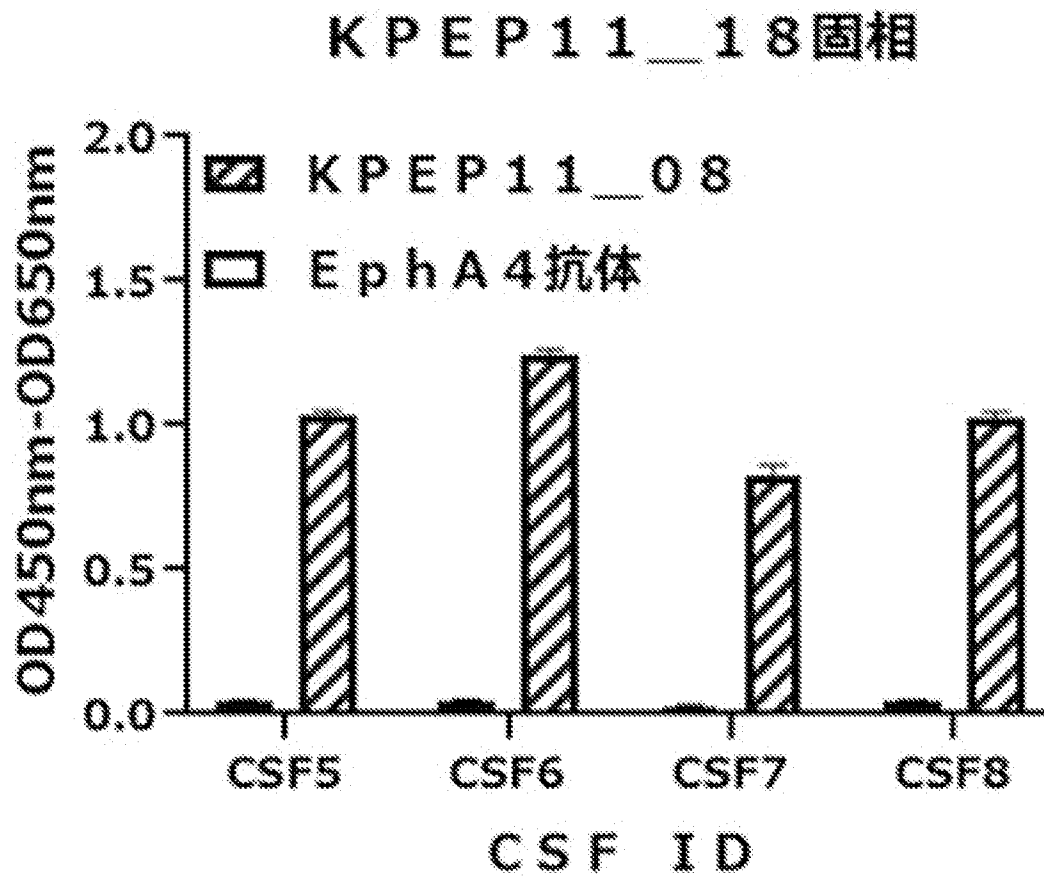
[図17]



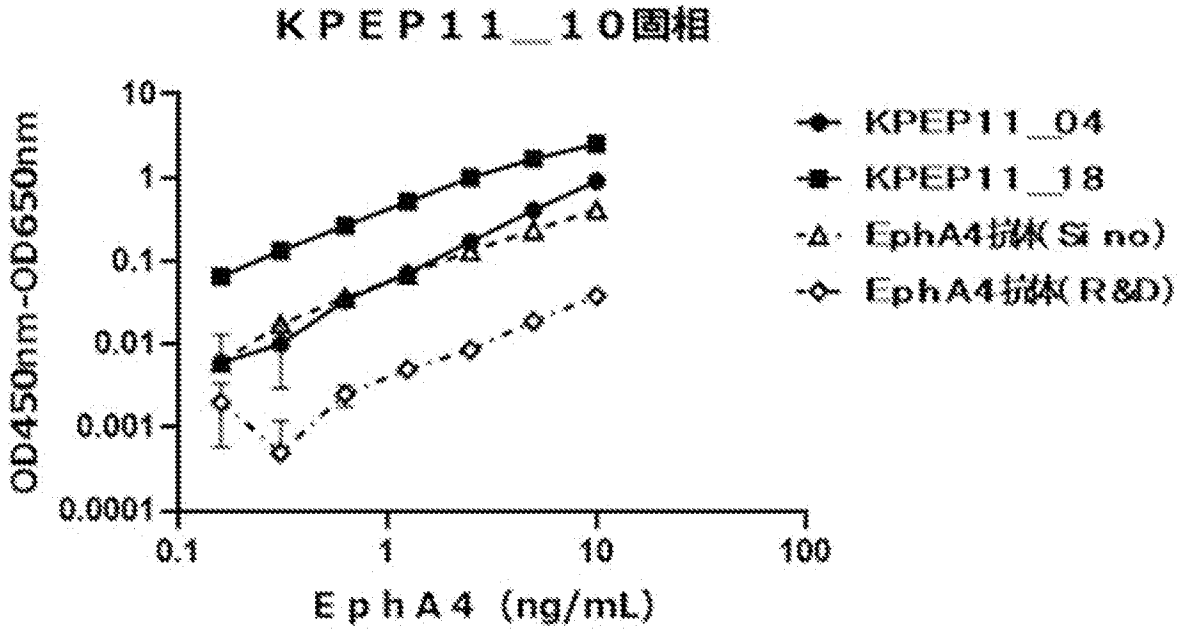
[図18]



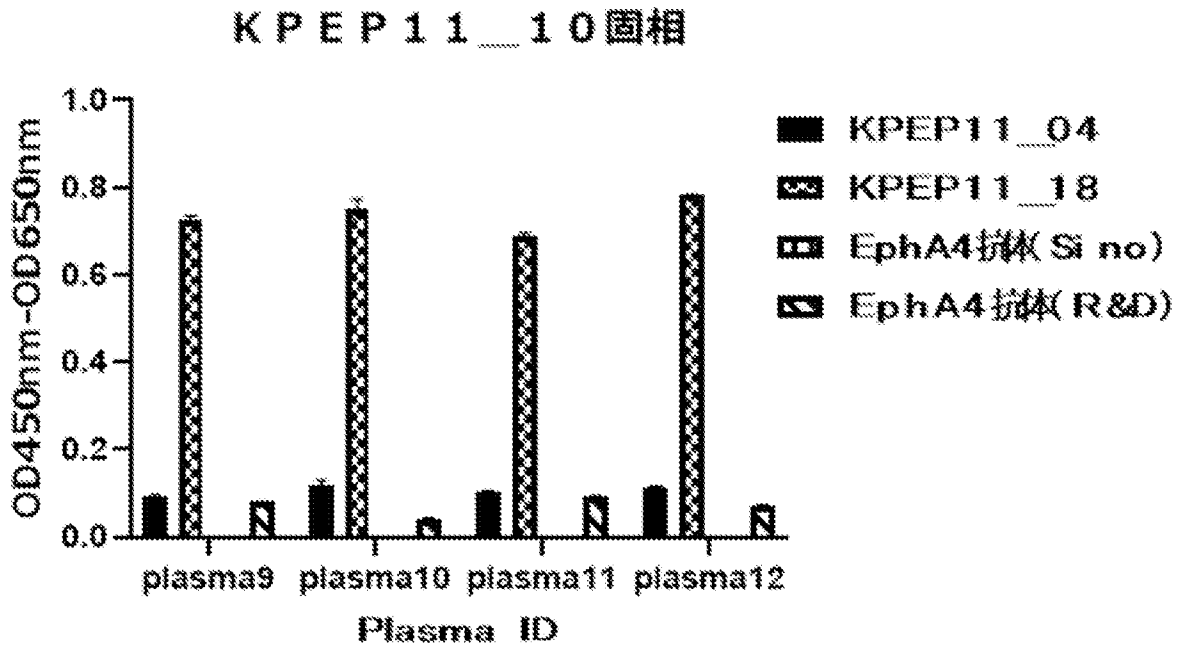
[図19]



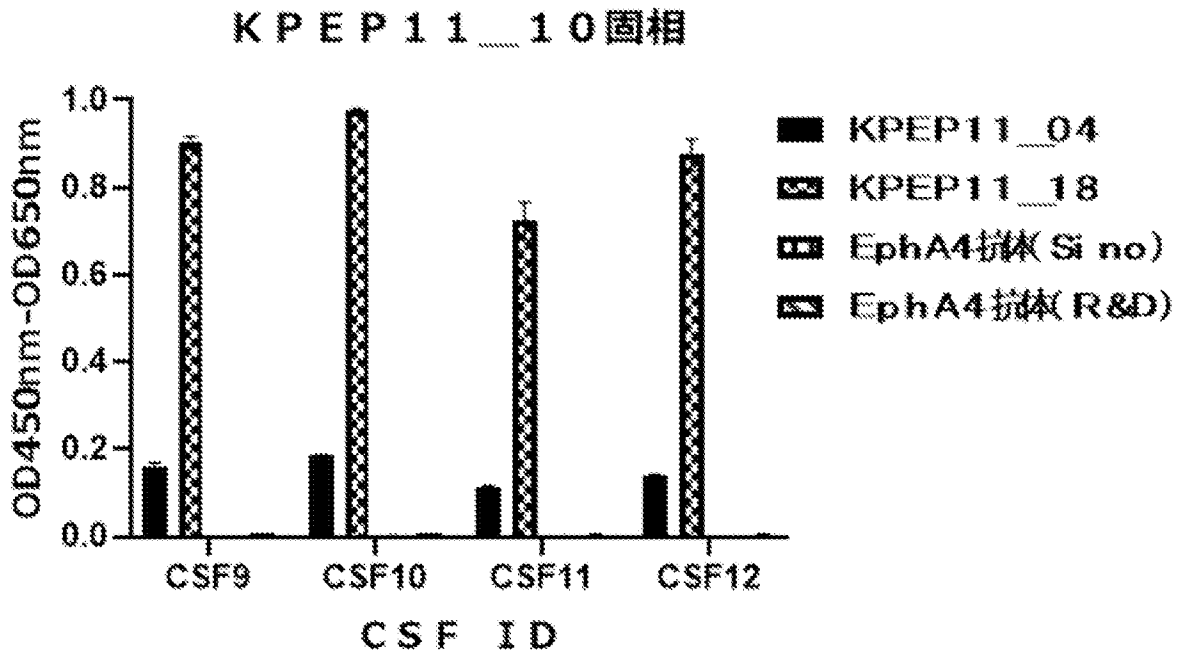
[圖20]



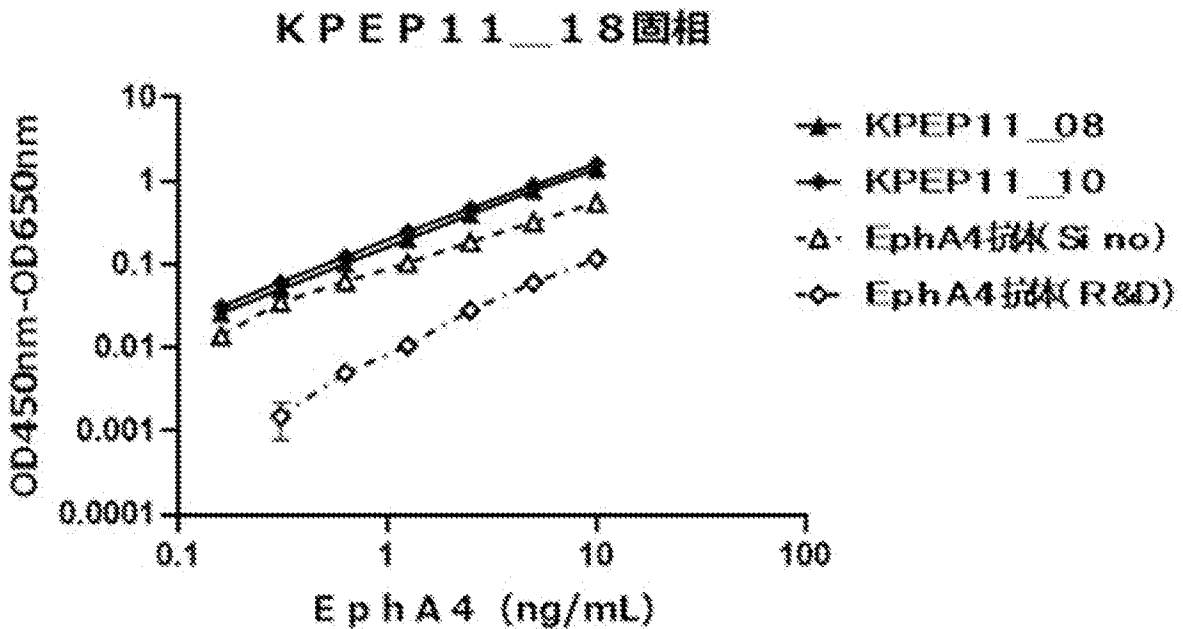
[圖21]



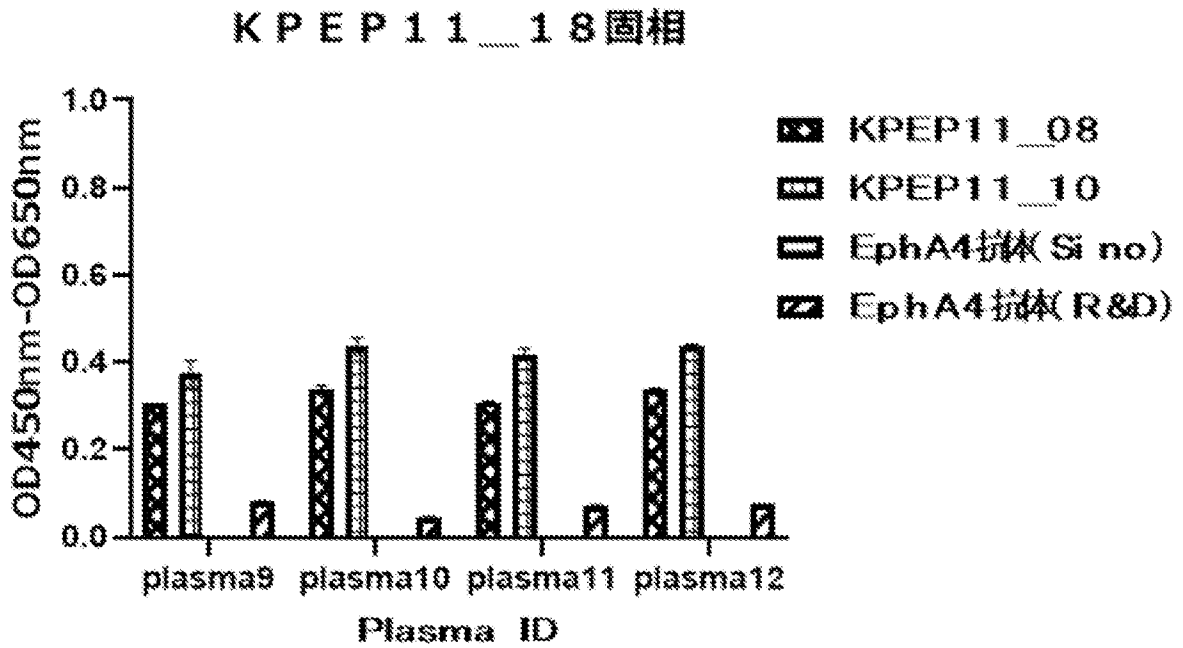
[図22]



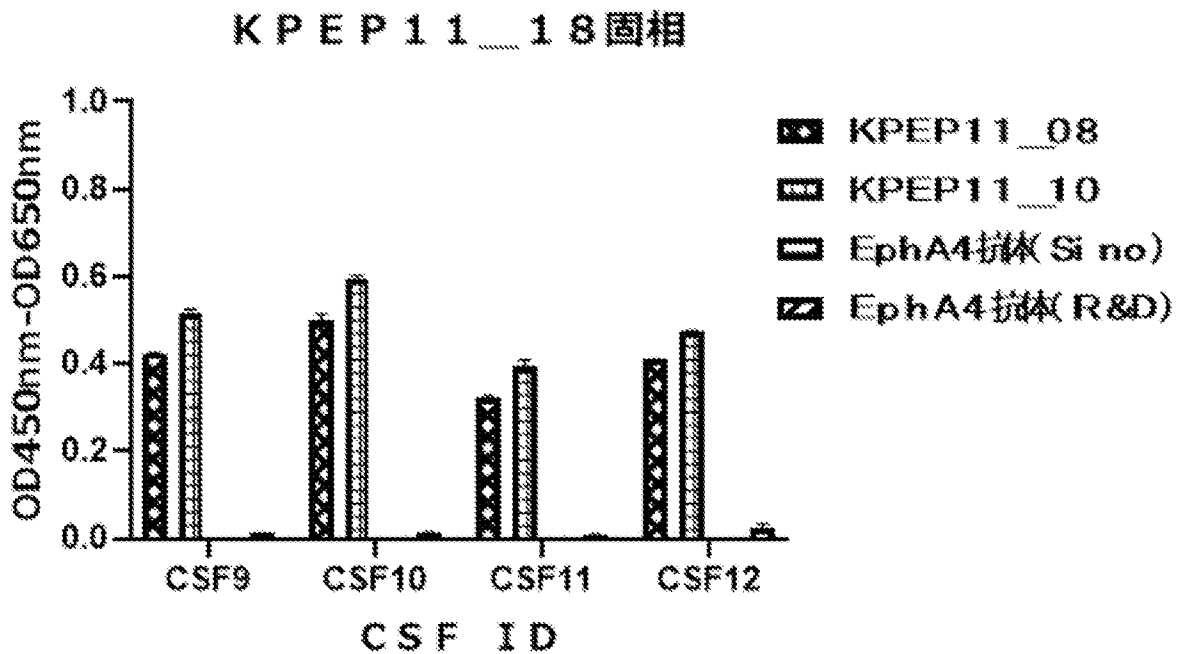
[図23]



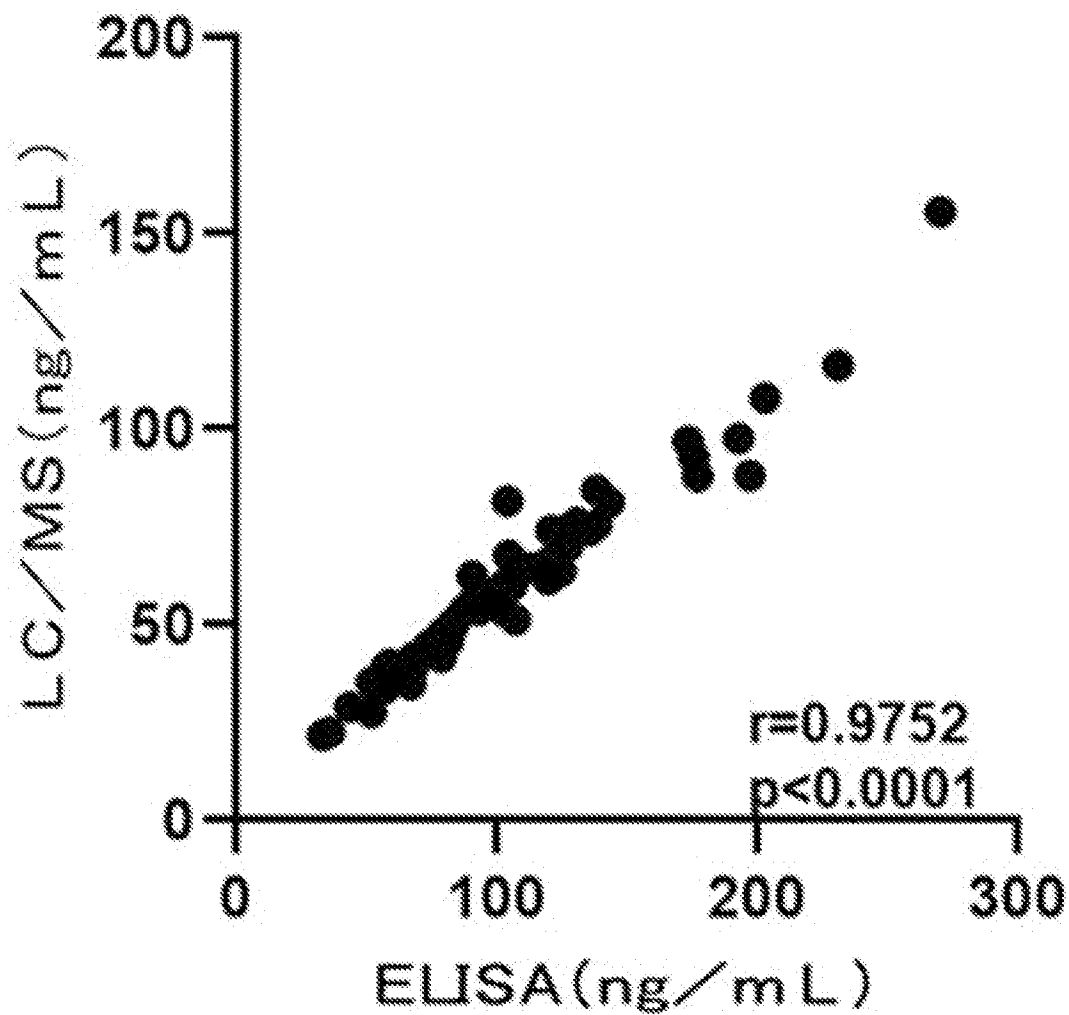
[図24]



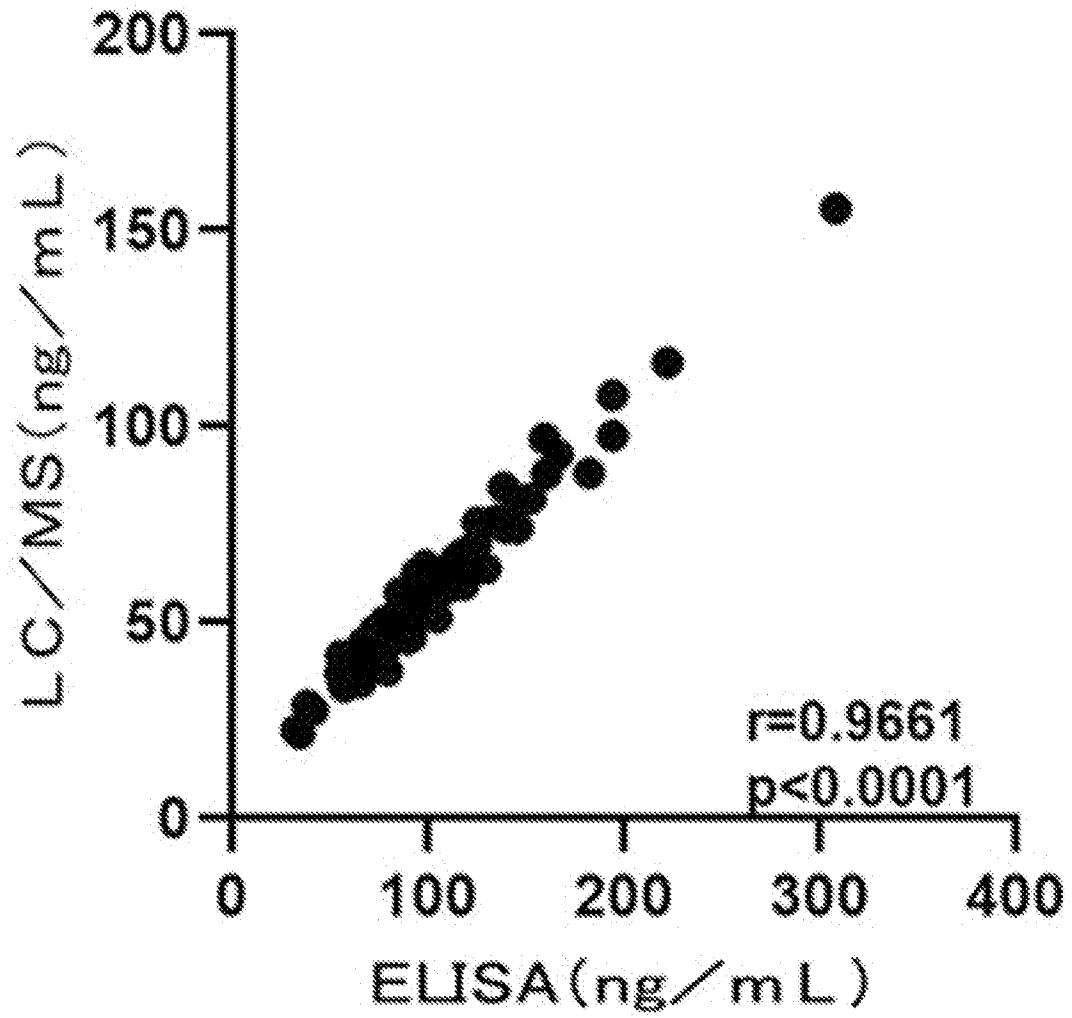
[図25]



[図26]



[図27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/041723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/13</i>(2006.01)i; <i>C07K 16/28</i>(2006.01)i; <i>C07K 16/40</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/15</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/19</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/21</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/63</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/08</i>(2006.01)i; <i>G01N 33/531</i>(2006.01)i; <i>G01N 33/573</i>(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/13; C07K16/28; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/08; G01N33/531 A; G01N33/573 A; C07K16/40 ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N15/13; C07K16/28; C07K16/40; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/63; C12P21/08; G01N33/531; G01N33/573		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2023</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2023</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/043466 A1 (EISAI R & D MANAGEMENT CO., LTD.) 16 March 2017 (2017-03-16) claims	1-20
A	WO 2021/002312 A1 (EISAI R & D MANAGEMENT CO., LTD.) 07 January 2021 (2021-01-07) claims	1-20
A	JP 2019-501112 A (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 17 January 2019 (2019-01-17) examples	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
06 January 2023		24 January 2023
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/041723

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2017/043466	A1	16 March 2017	US 2019/0077860 claims	A1
				EP 3381941	A1
				CN 107922499	A
				KR 10-2018-0041136	A
<hr/>					
WO	2021/002312	A1	07 January 2021	US 2021/0002378 claims	A1
				EP 3995582	A1
				CN 113906050	A
				KR 10-2022-0027825	A
<hr/>					
JP	2019-501112	A	17 January 2019	US 2018/0339020 examples	A1
				WO 2017/070738	A1
				EP 3368551	A1
				CN 108884135	A
<hr/>					

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/13(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; G01N 33/531(2006.01)i; G01N 33/573(2006.01)i FI: C12N15/13; C07K16/28; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/08; G01N33/531 A; G01N33/573 A; C07K16/40 ZNA</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/13; C07K16/28; C07K16/40; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/63; C12P21/08; G01N33/531; G01N33/573</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017/043466 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 16.03.2017 (2017 - 03 - 16) 特許請求の範囲</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021/002312 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 07.01.2021 (2021 - 01 - 07) 特許請求の範囲</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2019-501112 A (ザ ユニバーシティー オブ クイーンズランド) 17.01.2019 (2019 - 01 - 17) 実施例</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	WO 2017/043466 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 16.03.2017 (2017 - 03 - 16) 特許請求の範囲	1-20	A	WO 2021/002312 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 07.01.2021 (2021 - 01 - 07) 特許請求の範囲	1-20	A	JP 2019-501112 A (ザ ユニバーシティー オブ クイーンズランド) 17.01.2019 (2019 - 01 - 17) 実施例	1-20
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
A	WO 2017/043466 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 16.03.2017 (2017 - 03 - 16) 特許請求の範囲	1-20												
A	WO 2021/002312 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 07.01.2021 (2021 - 01 - 07) 特許請求の範囲	1-20												
A	JP 2019-501112 A (ザ ユニバーシティー オブ クイーンズランド) 17.01.2019 (2019 - 01 - 17) 実施例	1-20												
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>06.01.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>24.01.2023</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>井関 めぐみ 4B 5574</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>													

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/041723

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/043466	A1	16.03.2017	US	2019/0077860	A1	
				Claims			
				EP	3381941	A1	
				CN	107922499	A	
				KR	10-2018-0041136	A	

WO	2021/002312	A1	07.01.2021	US	2021/0002378	A1	
				Claims			
				EP	3995582	A1	
				CN	113906050	A	
				KR	10-2022-0027825	A	

JP	2019-501112	A	17.01.2019	US	2018/0339020	A1	
				EXAMPLES			
				WO	2017/070738	A1	
				EP	3368551	A1	
				CN	108884135	A	
