

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6372040号  
(P6372040)

(45) 発行日 平成30年8月15日(2018.8.15)

(24) 登録日 平成30年7月27日(2018.7.27)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C07K</b>	<b>16/18</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K	16/18	ZNA
<b>A61K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K	39/395	N
<b>A61P</b>	<b>25/28</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	25/28	
<b>A61P</b>	<b>25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	25/00	
<b>A61P</b>	<b>37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	37/02	

請求項の数 24 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-560799 (P2014-560799)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月6日(2014.2.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/052758  
 (87) 国際公開番号 W02014/123186  
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日(2014.8.14)  
 審査請求日 平成29年2月6日(2017.2.6)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-21309 (P2013-21309)  
 (32) 優先日 平成25年2月6日(2013.2.6)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 505155528  
 公立大学法人横浜市立大学  
 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号  
 (73) 特許権者 505368531  
 株式会社カイオム・バイオサイエンス  
 東京都渋谷区本町三丁目1番1号  
 (74) 代理人 100124431  
 弁理士 田中 順也  
 (74) 代理人 100156845  
 弁理士 山田 威一郎  
 (74) 代理人 100124039  
 弁理士 立花 顕治  
 (74) 代理人 100112896  
 弁理士 松井 宏記

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗セマフォリン3A抗体、並びにこれを用いたアルツハイマー病及び免疫・炎症性疾患の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、抗セマフォリン3A抗体、又はその抗原結合領域を含む抗体断片：

配列番号1に示すアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号2に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号3に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号4に示すアミノ酸配列CDR1；配列番号5に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号6に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変領域。

【請求項2】

下記(B)~(E)のいずれか示される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、抗セマフォリン3A抗体、又はその抗原結合領域を含む抗体断片：

(B) 配列番号60に示すアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号61に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号62に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号64に示すアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号65に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号66に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変領域；

(C) 配列番号68に示すアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号69に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号70に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖

可変領域、並びに

配列番号 7 2 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 配列番号 7 3 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び配列番号 7 4 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する軽鎖可変領域 ;

( D ) 配列番号 7 6 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 配列番号 7 7 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び配列番号 7 8 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号 8 0 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 配列番号 8 1 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び配列番号 8 2 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する軽鎖可変領域 ;

( E ) 配列番号 8 4 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 配列番号 8 5 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び配列番号 8 6 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号 8 8 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1 ; 配列番号 8 9 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2 ; 及び配列番号 9 0 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する軽鎖可変領域。

## 【請求項 3】

キメラ抗体、ヒト化抗体、又はこれらの抗体断片である、請求項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を含有する、医薬組成物。

## 【請求項 5】

神経再生促進用である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

アルツハイマー病の予防及び / 又は治療用である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

敗血症の予防及び / 又は治療用である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

がんの予防及び / 又は治療用である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

がんが、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、又は喉頭癌である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

播種性血管内凝固症候群の予防及び / 又は治療用である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

播種性血管内凝固症候群が、敗血症、急性白血病、固形がん、常位胎盤早期剥離、羊水塞栓、外傷、熱傷、膠原病、ショック、大動脈瘤、劇症肝炎、肝硬変、急性膵炎、横紋筋融解、血栓症、及び重症感染症よりなる群から選択される少なくとも 1 種を伴っている、請求項 10 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 12】

中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、及びアレルギー性疾患よりなる群から選択される少なくとも 1 種の疾患の予防及び / 又は治療用である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 13】

中枢又は末梢神経系疾患が、神経障害性の疼痛、脊髄損傷、又は神経変性疾患である、請求項 12 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、黒質線状体変性症、シャイ・ドレーガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、又は脊髄小脳変性症である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 15】

自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、全身性エリテマトーデス、又は多発性硬化症である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

炎症性疾患が、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、喘息、関節炎、肝炎、脊椎関節炎、又はシェーグレン症候群である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 17】

感染症が、細菌感染症、脳炎、髄膜炎、心内膜炎、C型肝炎、インフルエンザ、重症急性呼吸器症候群、肺炎、敗血症、火傷性、又は外傷性感染症である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 18】

アレルギー性疾患が、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、又は食物アレルギーである、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 19】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片を用いて免疫測定により検体中の S e m a 3 A タンパク質を測定する工程を含む、S e m a 3 A タンパク質の測定方法。

20

## 【請求項 20】

サンドイッチ法によって S e m a 3 A タンパク質を免疫測定する方法であり、  
キャプチャー抗体として、請求項 1 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を使用し、  
一次抗体として、請求項 2 に記載の ( B ) 又は ( C ) に示す抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を使用する、請求項 1 9 に記載の測定方法。

## 【請求項 21】

サンドイッチ法によって S e m a 3 A タンパク質を免疫測定する方法であり、  
キャプチャー抗体として、請求項 2 に記載の ( D ) 又は ( E ) に示す抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を使用し、  
一次抗体として、請求項 1 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を使用する、請求項 1 9 に記載の測定方法。

30

## 【請求項 22】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片を含む、S e m a 3 A タンパク質の測定用キット。

## 【請求項 23】

サンドイッチ法による免疫測定に使用される、S e m a 3 A タンパク質の測定用キットであって、  
キャプチャー抗体として、請求項 1 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を含み、  
一次抗体として、請求項 2 に記載の ( B ) 又は ( C ) に示す抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を含む、請求項 2 2 に記載の測定用キット。

40

## 【請求項 24】

サンドイッチ法による免疫測定に使用される、S e m a 3 A タンパク質の測定用キットであって、  
キャプチャー抗体として、請求項 2 に記載の ( D ) 又は ( E ) に示す抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を含み、  
一次抗体として、請求項 1 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又はその抗体断片を含む、請求項 2 2 に記載の測定用キット。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、セマフォリン3Aタンパク質が関与する疾患の予防及び/又は治療に有効である抗セマフォリン3A抗体又はその抗体断片に関する。更に、本発明は、当該抗セマフォリン3A抗体又はその抗体断片を利用した医薬組成物に関する。更に、本発明は、抗セマフォリン3A抗体又はその抗体断片を利用したセマフォリン3Aタンパク質の測定方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アルツハイマー病(AD)は高齢者における痴呆(記憶の喪失)の最も一般的な形態である。現在使用されているアルツハイマー病の治療薬は、コリンエステラーゼ阻害薬による中枢神経系内におけるコリン作動性神経伝達の改善、あるいは -メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)グルタミン酸受容体阻害薬による興奮毒性の抑制をその作用機序としているが、いずれも軽度の症状改善が認められるにとどまっている。原因となる神経変性の進行を抑制し、また改善できるような、根本的な治療法の開発が待たれている。

## 【0003】

脳中で見出されるADの主たる病理学的傷害は、斑及び血管障害の形態のアミロイドタンパク質の細胞外沈着物、並びに凝集型の過剰リン酸化されたタンパク質の細胞内神経原線維変化に起因している。最近の証拠は、脳中の上昇されたアミロイドレベルがの病態に先行するのみならず、認識低下ともまた相関することを示している。最近の研究では、ADにおけるアミロイドの原因としての役割をさらに示唆しており、凝集型アミロイドが細胞培養物中のニューロンに対し毒性を示すことが明らかにされている。

## 【0004】

アミロイドタンパク質は、主として39~42アミノ酸のペプチドから構成され、プロテアーゼ、及び -分泌酵素の連続的作用により、アミロイド前駆体タンパク質(APP)と呼ばれるより大きな前駆体タンパク質から産生される。稀とは言え、早期発症のADの症例は、全アミロイドタンパク質若しくはそのアイソフォームのいずれかの過剰産生につながるAPPの遺伝子突然変異に起因している。さらに、ダウン症を伴う人は、APPをコードする遺伝子を含有する余分な染色体を所有し、アミロイドレベルが上昇しており、かつ加齢によって必ずADを発症する。

## 【0005】

一方、セマフォリンは、神経成長円錐を退縮させ軸索の伸長を抑制する因子として同定された内因性のタンパク質である。セマフォリン遺伝子は、その構造に基づいて8つの遺伝子サブファミリー、クラス、に分類されており、これまでに約20種の分子種が知られている(非特許文献1)。しかしながら、多くのセマフォリンファミリーの大部分の機能について詳しいことはわかっていない。最も良く研究されているのがクラス3型と呼ばれるサブファミリーの遺伝子群であり、中でも最も良く研究されているのがセマフォリン3A(Sema3A)(非特許文献2、3)である。Sema3Aタンパク質は10pMという低濃度で短時間のうちに培養神経細胞の成長円錐退縮を誘発し、神経再生伸長を阻害することが知られている。

## 【0006】

近年、樹状細胞がSema3Aタンパク質を感知してリンパ管に入り、リンパ節に移動していくことも報告されており、自己免疫疾患に関与していること(例えば、非特許文献4参照)や、Sema3Aタンパク質とその受容体であるPlexin-A4を介したシグナルが敗血症の発症において重要であることも明らかにされており(例えば、非特許文献6参照)、免疫・感染症等の病態形成においても深く関与していることが知られている。更に、Sema3Aタンパク質は、がん細胞・組織から分泌され、分裂促進因子活性化タンパク質(MAP)キナーゼのシグナル経路を阻止してT細胞の活性化を抑制することや、膵癌患者の癌組織でSema3A発現の高い患者群では予後が不良であることも報告

10

20

30

40

50

されており、がんの悪性化に関与していることも明らかにされている（例えば、非特許文献5、7参照）。

【0007】

また、播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation：DIC）は、基礎疾患の悪化に伴って全身性かつ持続性の著しい凝固活性化が起こる重篤な病態である。主な症状は出血症状と臓器症状であるが、臨床症状が出現すると予後は極めて不良となることが知られている。DICの誘因となる基礎疾患としては、敗血症、急性白血病、固形がん、常位胎盤早期剥離、羊水塞栓、外傷、熱傷、膠原病、ショック、大動脈瘤、劇症肝炎、肝硬変、急性膵炎、横紋筋融解、血栓症、重症感染症などが知られているが、Sema3Aとの関連については明らかにされていない。

10

【0008】

従来、Sema3Aタンパク質に対する抗体についても報告されている。例えば、抗Sema3A抗体等Sema3Aタンパク質活性阻害物質が、アルツハイマーやパーキンソン病の治療に有効であること（特許文献1参照）や、免疫疾患や炎症性疾患の治療に有効であること（特許文献2参照）が報告されている。しかしながら、Sema3Aタンパク質が関与する疾患について、抗Sema3A抗体を用いて予防及び/又は治療する際に、その薬効をより高めて発揮させるには如何なる構造の抗Sema3A抗体が有効であるかについては明らかにされていない。

【0009】

また、このようにSema3Aタンパク質が様々な病態に関与していることが知られており、その病態の解明や治療薬の開発をする上で、Sema3Aタンパク質を高精度に測定する技術も不可欠となっている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Cell 97, 551, 1999

【非特許文献2】Cell 75, 217, 1993

【非特許文献3】Cell 75, 1389, 1993

【非特許文献4】Nature Immunology 11, 594 - 600, 2010

30

【非特許文献5】Blood 107, 3321 - 3329, 2006

【非特許文献6】Journal of Experimental Medicine 207, 2943, 2010

【非特許文献7】International Journal of Cancer 121, 2421 - 2433, 2007

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO03/007803号パンフレット

【特許文献2】WO2011/066284号パンフレット

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、神経変性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、がん、感染症等のSema3Aタンパク質が関与する疾患、及び播種性血管内凝固症候群を効果的に予防及び/又は治療できるSema3Aタンパク質に対する抗体を提供することを課題とする。また、本発明は、Sema3Aタンパク質が関与する疾患の予防及び/又は治療、並びに当該疾患に伴う症状の緩和を可能にする医薬組成物を提供することを課題とする。更に、本発明は、Sema3Aタンパク質の測定に有効なSema3Aタンパク質に対する抗体、及び当該抗体を用いてSema3Aタンパク質を測定する方法を提供することも課題とする。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、特定のアミノ酸配列を有する相補性決定領域 (Complementary Determining Region: CDR) を備えた抗Sema3A抗体は、アルツハイマー病等の神経変性疾患を効果的に予防及び/又は治療でき、当該神経変性疾患に伴う症状が顕著に改善されることを見出した。また、致死的な敗血症病態モデルにおいて、前記抗Sema3A抗体が劇的な生存率の改善、及び生存期間延長効果を示した。加えて、前記抗Sema3A抗体が、播種性血管内凝固症候群の増悪因子の一つである血中Plasminogen activator inhibitor - 1 (PAI - 1) を減少させることを見出した。更に、癌細胞の遊走・浸潤や薬剤抵抗性がSema3Aにより誘導されるが、前記抗Sema3A抗体によって癌細胞の遊走・浸潤や薬剤抵抗性を抑制できることから、がんの悪性を抑えることもできることを見出した。

10

## 【0014】

また、特定のアミノ酸配列を有するCDRを備えた抗Sema3A抗体を利用したELISAによって、Sema3Aタンパク質の測定が可能になることを見出した。

## 【0015】

本発明はこのような知見に基づき、さらに研究を重ねた結果完成されたものである。即ち、本発明は、以下の態様の発明を提供する。

項1. 下記(A)~(E)のいずれか示される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、抗セマフォリン3A抗体、又はその抗原結合領域を含む抗体断片：

20

(A) 配列番号1に示すアミノ酸配列、或いは配列番号1に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号2に示すアミノ酸配列、或いは配列番号2に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号3に示すアミノ酸配列、或いは配列番号3に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号4に示すアミノ酸配列、或いは配列番号4に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号5に示すアミノ酸配列、或いは配列番号5に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号6に示すアミノ酸配列、或いは配列番号6に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変領域；

30

(B) 配列番号60に示すアミノ酸配列、或いは配列番号60に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号61に示すアミノ酸配列、或いは配列番号61に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列に示すアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号62に示すアミノ酸配列、或いは配列番号62に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖可変領域、並びに

40

配列番号64に示すアミノ酸配列、或いは配列番号64に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号65に示すアミノ酸配列、或いは配列番号65に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号66に示すアミノ酸配列、或いは配列番号66に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変領域；

(C) 配列番号68に示すアミノ酸配列、或いは配列番号68に示すアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含むCDR1；

50

配列番号 69 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 69 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列に示すアミノ酸配列を含む CDR2 ; 及び配列番号 70 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 70 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR3 を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号 72 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 72 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR1 ; 配列番号 73 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 73 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR2 ; 及び配列番号 74 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 74 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR3 を有する軽鎖可変領域 ;

(D) 配列番号 76 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 76 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR1 ; 配列番号 77 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 77 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列に示すアミノ酸配列を含む CDR2 ; 及び配列番号 78 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 78 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR3 を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号 80 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 80 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR1 ; 配列番号 81 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 81 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR2 ; 及び配列番号 82 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 82 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR3 を有する軽鎖可変領域 ;

(E) 配列番号 84 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 84 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR1 ; 配列番号 85 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 85 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列に示すアミノ酸配列を含む CDR2 ; 及び配列番号 86 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 86 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR3 を有する重鎖可変領域、並びに

配列番号 88 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 88 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR1 ; 配列番号 89 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 89 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR2 ; 及び配列番号 90 に示すアミノ酸配列、或いは配列番号 90 に示すアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列を含む CDR3 を有する軽鎖可変領域。

項 2 . キメラ抗体、ヒト化抗体、又はこれらの抗体断片である、項 1 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

項 3 . 神経再生促進のために使用される、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

項 4 . アルツハイマー病の予防及び / 又は治療のために使用される、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

項 5 . 敗血症の予防及び / 又は治療のために使用される、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

項 6 . がんの予防及び / 又は治療のために使用される、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

10

20

30

40

50

項 7 . 播種性血管内凝固症候群の予防及び / 又は治療剤の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

項 8 . 中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、及びアレルギー性疾患よりなる群から選択される少なくとも 1 種の疾患の予防及び / 又は治療のために使用される、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片。

項 9 . 項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を含有する、医薬組成物。

項 10 . 神経再生促進用である、項 9 に記載の医薬組成物。

項 11 . アルツハイマー病の予防及び / 又は治療用である、項 9 に記載の医薬組成物。

項 12 . 敗血症の予防及び / 又は治療用である、項 9 に記載の医薬組成物。

10

項 13 . がんの予防及び / 又は治療用である、項 9 に記載の医薬組成物。

項 14 . がんが、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、又は喉頭癌である、項 13 に記載の医薬組成物。

項 15 . 播種性血管内凝固症候群の予防及び / 又は治療用である、項 9 に記載の医薬組成物。

項 16 . 播種性血管内凝固症候群が、敗血症、急性白血病、固形がん、常位胎盤早期剥離、羊水塞栓、外傷、熱傷、膠原病、ショック、大動脈瘤、劇症肝炎、肝硬変、急性膵炎、横紋筋融解、血栓症、及び重症感染症よりなる群から選択される少なくとも 1 種を伴っている、項 15 に記載の医薬組成物。

20

項 17 . 中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、及びアレルギー性疾患よりなる群から選択される少なくとも 1 種の疾患の予防及び / 又は治療用である、項 9 に記載の医薬組成物。

項 18 . 中枢又は末梢神経系疾患が、神経障害性の疼痛、脊髄損傷、又は神経変性疾患である、項 17 に記載の医薬組成物。

項 19 . 神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、黒質線状体変性症、シャイ・ドレーガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、又は脊髄小脳変性症である、項 18 に記載の医薬組成物。

項 20 . 自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、全身性エリテマトーデス、又は多発性硬化症である、項 17 に記載の医薬組成物。

30

項 21 . 炎症性疾患が、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、喘息、関節炎、肝炎、脊椎関節炎、又はシェーグレン症候群である、項 17 に記載の医薬組成物。

項 22 . 感染症が、細菌感染症、脳炎、髄膜炎、心内膜炎、C型肝炎、インフルエンザ、重症急性呼吸器症候群、肺炎、敗血症、火傷性、又は外傷性感染症である、項 17 に記載の医薬組成物。

項 23 . アレルギー性疾患が、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、又は食物アレルギーである、項 17 に記載の医薬組成物。

項 24 . 神経再生が求められる患者に対して、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を投与する工程を含む、神経再生方法。

40

項 25 . アルツハイマー病を罹患している患者に対して、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を投与する工程を含む、アルツハイマー病の治療方法。

項 26 . 敗血症を罹患している患者に対して、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を投与する工程を含む、敗血症の治療方法。

項 27 . がんを罹患している患者に対して、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を投与する工程を含む、癌の治療方法。

項 28 . がんが、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、又は喉頭癌である、項 27 に記載の治療方法。

50

項 29 . 播種性血管内凝固症候群を罹患している患者に対して、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を投与する工程を含む、播種性血管内凝固症候群の治療方法。

項 30 . 播種性血管内凝固症候群が、敗血症、急性白血病、固形がん、常位胎盤早期剥離、羊水塞栓、外傷、熱傷、膠原病、ショック、大動脈瘤、劇症肝炎、肝硬変、急性膵炎、横紋筋融解、血栓症、及び重症感染症よりなる群から選択される少なくとも 1 種を伴っている、項 29 に記載の播種性血管内凝固症候群の治療方法。

項 30 . 中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、及びアレルギー性疾患よりなる群から選択される少なくとも 1 種の疾患を罹患している患者に対して、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片を投与する工程を含む、前記疾患の治療方法。

10

項 31 . 神経再生用の医薬の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

項 32 . アルツハイマー病の予防及び / 又は治療剤の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

項 33 . 敗血症の予防及び / 又は治療剤の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

項

項 34 . がんの予防及び / 又は治療剤の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

20

項 35 . 播種性血管内凝固症候群の予防及び / 又は治療剤の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

項 36 . 中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、及びアレルギー性疾患よりなる群から選択される少なくとも 1 種の疾患の予防及び / 又は治療剤の製造のための、項 1 又は 2 に記載の抗セマフォリン 3 A 抗体又は抗体断片の使用。

項 37 . 項 1 又は 2 に記載の抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片を用いて免疫測定により検体中の S e m a 3 A タンパク質を測定する工程を含む、S e m a 3 A タンパク質の測定方法。

項 38 . 項 1 又は 2 に記載の抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片を含む、S e m a 3 A タンパク質の測定用キット。

30

【発明の効果】

【0016】

本発明の抗 S e m a 3 A 抗体によれば、アルツハイマー病等の神経変性疾患を効果的に予防及び / 又は治療でき、当該神経変性疾患に伴う症状の緩和が顕著に改善することができる。本発明の抗 S e m a 3 A 抗体の作用機序について限定的な解釈を望むものではないが、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体は、S e m a 3 A タンパク質の機能を効果的に阻害することにより S e m a 3 A のシグナル伝達を阻害し、その結果、神経原線維変化における、リン酸化型 C o l l a p s i n R e s p o n s e M e d i a t o r P r o t e i n ( C R M P ) の蓄積が阻害されるからであると考えられる。更に、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体によれば、神経変性疾患以外の中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、及びアレルギー性疾患等の予防及び / 又は治療にも有効であり、とりわけ、敗血症のように感染や強い炎症誘発刺激により免疫機構が破綻した炎症性疾患に対して卓越した予防及び / 又は治療効果を示すことができる。また、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体によれば、S e m a 3 A により誘導される癌細胞の遊走・浸潤活性を効果的に抑制でき、S e m a 3 A により誘導される抗がん剤不応答性を解除し、薬剤感受性を回復できるので、がんの予防及び / 又は治療にも有効である。更に、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体は、血中 P A I - 1 量の増加を抑制する作用があり、播種性血管内凝固症候群の予防及び / 又は治療にも有効である。

40

【0017】

また、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体は、S e m a 3 A タンパク質の測定にも使用するこ

50

とができる。とりわけ、本発明の抗Sema3A抗体を使用することにより、血清存在下でもSema3Aタンパク質を高精度に測定でき、生体由来検体中のSema3Aタンパク質を測定することも可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、実施例1において、13株の抗Sema3A抗体産生クローンが得られたことを示すグラフである。

【図2】図2は、実施例1で作製した抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体のSema3Aタンパク質に対する結合特異性を評価した結果を示すグラフである。

【図3】図3には、抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体、抗Sema3Aヒト化抗体、及び抗Sema3Aトリ-ヒトキメラ抗体を電気泳動してCBB染色した結果を示す。

【図4】図4には、抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体、抗Sema3Aヒト化抗体、及びトリ-ヒトキメラ抗Sema3A抗体について、ヒトSema3AとマウスSema3A抗原に対する反応性を試験した結果を示す。

【図5】図5には、抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体、抗Sema3Aヒト化抗体、及びトリ-ヒトキメラ抗Sema3A抗体について、競合ELISA法により、Sema3Aタンパク質に対する親和性を測定した結果を示す。

【図6】図6には、実施例2~4で作製した抗Sema3A抗体を用いて、血清を含まない試験サンプル中のSema3AをサンドイッチELISAにて測定した結果を示す。

【図7】図7には、実施例2で作製した抗Sema3A抗体を用いて、血清を含む試験サンプル中のSema3AをサンドイッチELISAにて測定した結果を示す。

【図8】図8には、ニワトリ由来Sema3Aタンパク質とトリ抗Sema3A抗体を使用して退縮アッセイを行った結果を示す。

【図9】図9には、ニワトリ由来Sema3Aタンパク質と抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体を使用して退縮アッセイを行った結果を示す。

【図10】図10には、ニワトリ由来Sema3Aタンパク質とトリ抗Sema3A抗体を使用して退縮アッセイを行った結果を示す。

【図11】図11には、ニワトリ由来Sema3Aタンパク質と抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体を使用して退縮アッセイを行った結果を示す。

【図12】図12には、トリ抗Sema3A抗体について、ヒト由来Sema3Aタンパク質に対する結合アッセイを行った結果を示す。

【図13】図13には、抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体について、ヒト由来Sema3Aタンパク質に対する結合アッセイを行った結果を示す。

【図14】図14には、トリ抗Sema3A抗体について、ヒト由来Sema3Fタンパク質に対する結合アッセイを行った結果を示す。

【図15】図15は、実施例10の結果を示す図である。図15Aは、Novel Object Recognition Taskの獲得試行時における、物体Bに対するアクセス率の結果を示すグラフである。図15Bは、Novel Object Recognition Taskのテスト試行時における、物体Cに対するアクセス率の結果を示すグラフである。

【図16】図16は実施例15の結果を示す図である。抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体を投与した3試験を併合し、その生存率曲線をKaplan-Meier法によりプロットした図である。

【図17】図17は実施例17の結果を示す図である。Lipopolysaccharideをマウスに接種し、炎症病態を惹起した後、1時間後に抗Sema3Aヒト化抗体500µgを投与した群と陰性対照群の生存率曲線をKaplan-Meier法によりプロットした図である。

【図18】図18は実施例18の結果を示す図である。播種性血管内凝固症候群モデルマウスに与える抗Sema3Aヒト化抗体の影響を確認するため、マウスのPlasminogen activator inhibitor-1血中濃度を測定した結果を示す

10

20

30

40

50

図である。

【図 19】図 19 は実施例 19 の結果を示す図である。ヒト膀胱癌細胞 (M I A P a C a - 2) に対する細胞遊走能について、S e m a 3 A タンパク質及び/又は抗 S e m a 3 A ヒト化抗体が及ぼす影響を分析した結果である。

【図 20】図 20 は実施例 20 の結果を示す図である。ヒト膀胱癌細胞株 (M I A P a C a - 2) を用いて細胞浸潤アッセイを行った結果を示す図である。

【図 21】図 21 は実施例 20 の結果を示す図である。ヒト膠芽腫細胞株 (U 8 7 M G) を用いて細胞浸潤アッセイを行った結果を示す図である。

【図 22】図 22 は実施例 20 の結果を示す図である。マウス由来肺癌細胞株 (3 L L) を用いて細胞浸潤アッセイを行った結果を示す図である。

【図 23】図 23 は実施例 20 の結果を示す図である。マウス由来肺癌細胞株 (3 L L) を用いて細胞浸潤アッセイを行い、染色した浸潤細胞を顕微鏡観察した像である。

【図 24】図 24 は実施例 21 の結果を示す図である。ヒト膀胱癌細胞 (M I A P a C a - 2) におけるゲムシタピン塩酸塩の感受性について、S e m a 3 A タンパク質及び/又は抗 S e m a 3 A ヒト化抗体が及ぼす影響を分析した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

#### 1. 抗 S e m a 3 A 抗体及びその抗体断片

本発明の抗 S e m a 3 A 抗体は、C D R 1 ~ C D R 3 が特定のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び C D R 1 ~ C D R 3 が特定のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むことを特徴とする。

【0020】

本発明の抗 S e m a 3 A 抗体は、S e m a 3 A タンパク質に特異的に結合し、当該タンパク質の機能を効果的に阻害することができる。S e m a 3 A タンパク質は、セマフォリンのクラス 3 型サブファミリーに属する遺伝子にコードされており、神経成長円錐を退縮させ軸索の伸長を抑制する因子として同定された内因性のタンパク質である。S e m a 3 A タンパク質のアミノ酸配列は公知である (G e n B a n k のアクセッション番号; ヒト由来は N P \_ 0 0 6 0 7 1 . 1、マウス由来は N P \_ 0 3 3 1 7 8 . 2)。

【0021】

本発明の抗 S e m a 3 A 抗体の好適な一態様として、以下の (A) ~ (E) に示す重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むものが挙げられる。

(A) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する重鎖可変領域; 並びに配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する軽鎖可変領域。

(B) 配列番号 60 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 61 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 62 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する重鎖可変領域; 並びに配列番号 64 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 65 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 66 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する軽鎖可変領域。

(C) 配列番号 68 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 69 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 70 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する重鎖可変領域; 並びに配列番号 72 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1; 配列番号 73 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 74 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する軽鎖可変領域。

(D) 配列番号 76 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 77 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 78 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有する重鎖可変領域; 並びに配列番号 80 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1; 配列番号 81 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、及び配列番号 82 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を有

10

20

30

40

50

する軽鎖可変領域。

(E) 配列番号84に示すアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号85に示すアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号86に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖可変領域；並びに配列番号88に示すアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号89に示すアミノ酸配列を含むCDR2、及び配列番号90に示すアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変領域。

【0022】

また、本発明の抗Sema3A抗体は、重鎖及び軽鎖におけるCDR1～3のアミノ酸配列（配列番号1～6、60～62、64～66、68～70、72～74、76～78、80～82、84～86及び88～90）は、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されていてもよい。1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び/又は挿入されたCDR配列を含む抗Sema3A抗体は、Sema3Aタンパク質に対する結合活性が変更前のCDR配列を含む抗Sema3A抗体と同等又同等以上であることが望ましい。置換、欠失、付加及び/又は挿入されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1つのCDRにつき1～3個、更に好ましくは1～2個、特に好ましくは1個が挙げられる。また、本発明の抗Sema3A抗体において、重鎖及び軽鎖におけるCDR1～3のアミノ酸配列の中で、1つのアミノ酸配列に対して置換、欠失、付加及び/又は挿入されていてもよく、2以上のアミノ酸配列に対して置換、欠失、付加及び/又は挿入されてもよい。

【0023】

また、前記CDRのアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換に関しては、類似アミノ酸による置換（即ち保存的アミノ酸置換）は、抗体の結合活性に変化をもたらさないことが予測されるため好適である。具体的には、アミノ酸側鎖の性質に基づいて、次のような分類が確立している。

塩基性アミノ酸：リジン、アルギニン、ヒスチジン

酸性アミノ酸：グルタミン酸、アスパラギン酸

中性アミノ酸：グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、グルタミン、アスパラギン、プロリン

更に、前記中性アミノ酸は、極性側鎖を有するもの（アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するもの（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、アミド含有側鎖を有するもの（アスパラギン、グルタミン）、硫黄含有側鎖を有するもの（メチオニン、システイン）、芳香族側鎖を有するもの（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）、水酸基含有側鎖を有するもの（セリン、トレオニン、チロシン）、脂肪族側鎖を有するもの（アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン）等に分類することもできる。

【0024】

1又は数個のアミノ酸残基を目的の他のアミノ酸に置換する方法については、例えば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh T. et al., Gene, Vol. 152, p. 271-275 (1995); Zoller MJ. et al., Methods Enzymol. Vol. 100, p. 468-500 (1983); Kramer W. et al., Nucleic Acids Res. Vol. 12, p. 9441-9456 (1984); Kramer W. et al., Methods. Enzymol. Vol. 154, p. 350-367 (1987); Kunkel T.A., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 82, p. 488-492 (1985)等）が知られており、当該部位特異的変異誘発法を用いてCDRのアミノ酸配列にアミノ酸置換を行うことができる。また、他のアミノ酸に置換する方法としては、WO2005/080432に記載されているライブラリー技術が挙げられる。

## 【 0 0 2 5 】

本発明の抗 S e m a 3 A 抗体において、可変領域中のフレームワーク領域、及び定常領域のアミノ酸配列は、S e m a 3 A タンパク質に対する結合活性に実質的な影響を及ぼさない限り、特に限定されない。

## 【 0 0 2 6 】

前記 C D R 1 ~ 3 のアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 6、6 0 ~ 6 2、6 4 ~ 6 6、6 8 ~ 7 0、7 2 ~ 7 4、7 6 ~ 7 8、8 0 ~ 8 2、8 4 ~ 8 6 及び 8 8 ~ 9 0）は、トリ抗体由来であり、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体は、トリ抗体であってもよいが、好ましくはキメラ抗体及びヒト化抗体が挙げられる。

## 【 0 0 2 7 】

キメラ抗体とは、互いに由来の異なる領域同士を連結した抗体である。本発明の抗 S e m a 3 A 抗体をキメラ抗体にする場合、医薬組成物や各種疾患の治療剤として用いる場合には、トリ抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域から構成されるトリ - ヒトキメラ抗体ないしはトリ抗体由来の可変領域とマウス抗体由来の定常領域から構成されるトリ - マウスキメラ抗体であることが望ましく、トリ - ヒトキメラ抗体がより好ましい。また、S e m a 3 A タンパク質の免疫測定及び測定用キットに用いる場合には、トリ - ヒトキメラ抗体、トリ - マウスキメラ抗体の他、トリ抗体由来の可変領域とウサギ抗体由来の定常領域から構成されるトリ - ウサギキメラ抗体やトリ抗体由来の可変領域とヤギ抗体由来の定常領域から構成されるトリ - ヤギキメラ抗体も使用できる。トリ - ヒトキメラ抗体、トリ - マウスキメラ抗体、トリ - ウサギキメラ抗体又はトリ - ウサギキメラ抗体に用いられる重鎖可変領域のアミノ酸配列の一例としては配列番号 7、8、5 9、6 7、7 5、及び 8 3 に示すアミノ酸配列が挙げられる。また、トリ - ヒトキメラ抗体、トリ - マウスキメラ抗体、トリ - ウサギキメラ抗体又はトリ - ウサギキメラ抗体に用いられる軽鎖可変領域のアミノ酸配列の一例としては配列番号 9 及び 1 0、6 3、7 1、7 9、8 7 に示すアミノ酸配列が挙げられる。これらの可変領域のアミノ酸配列（配列番号 7 ~ 1 0、5 9、6 3、6 7、7 1、7 5、7 9、8 3、及び 8 7）は、S e m a 3 A タンパク質に対する結合活性が改変前と同等又は同等以上であれば、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されていてもよい。置換、欠失、付加及び / 又は挿入されるアミノ酸の数は特に限定されないが、例えば、重鎖可変領域（配列番号 7、8、5 9、6 7、7 5、8 3）及び / 又は軽鎖可変領域（配列番号 9、1 0、6 3、7 1、7 9、8 7）において、1 ~ 2 1 個、好ましくは 1 ~ 1 4 個、更に好ましくは 1 ~ 3 個が挙げられる。なお、重鎖可変領域（配列番号 7、8、5 9、6 7、7 5、8 3）及び / 又は軽鎖可変領域（配列番号 9、1 0、6 3、7 1、7 9、8 7）において、置換、欠失、付加及び / 又は挿入されるアミノ酸は、前記 C D R 1 ~ 3 のアミノ酸配列以外の領域であることが望ましい。また、重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換は、前記する保存的アミノ酸置換であることが望ましい。

## 【 0 0 2 8 】

また、ヒト化抗体とは、非ヒト由来の C D R 配列をヒト抗体のフレームワーク領域上に移植したものであり、非ヒト由来抗体の C D R とヒト抗体由来のフレームワーク領域とヒト抗体由来の定常領域とから構成される抗体である。ヒト化抗体は、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の抗 S e m a 3 A 抗体を医薬用途に使用する場合に好適である。ヒト化抗体に用いられる重鎖可変領域のアミノ酸配列の一例としては配列番号 1 1 に示すアミノ酸配列が挙げられる。また、ヒト化抗体に用いられる軽鎖可変領域のアミノ酸配列の一例としては配列番号 1 2 及び 1 3 に示すアミノ酸配列が挙げられる。これらの可変領域のアミノ酸配列（配列番号 1 1 ~ 1 3）は、S e m a 3 A タンパク質に対する結合活性が改変前と同等であれば、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されていてもよい。置換、欠失、付加及び / 又は挿入されるアミノ酸の数は特に限定されないが、例えば、重鎖可変領域（配列番号 1 1）及び / 又は軽鎖可変領域（配列番号 1 2、1 3）において、1 ~ 2 1 個、好ましくは 1 ~ 1 4 個、更に好ましくは 1 ~ 3 個が挙げられる。なお、重鎖可変領域（配列番号 1 1）及び / 又は軽鎖可変領域（配列番号 1

10

20

30

40

50

2、13)において、置換、欠失、付加及び/又は挿入されるアミノ酸は、前記CDR1~3のアミノ酸配列以外の領域であることが望ましい。また、重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換は、前記する保存的アミノ酸置換であることが望ましい。

【0029】

キメラ抗体は、例えば、前記各CDR1~3のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有するトリ抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域に置換することにより作製することができる(例えば、Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, p. 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature, Vol. 312, p. 604-608 (1984); Takeda et al., Nature, Vol. 314, p. 452-454 (1985)等)。トリ-ヒトキメラ抗体に用いられる重鎖可変領域のアミノ酸配列である配列番号7、8、59、67、75、及び83をコードするDNAの塩基配列を、配列番号14、15、103、111、119、及び127にそれぞれ示す。また、トリ-ヒトキメラ抗体に用いられる軽鎖可変領域のアミノ酸配列である配列番号9、10、63、71、79、及び87をコードするDNAの塩基配列を、配列番号16、17、104、112、120、及び128にそれぞれに示す。ヒト抗体の定常領域については公知のものを用いることができる。具体的には、以下の方法により、トリ-ヒトキメラ抗体を作製することができる。

【0030】

まず、所定のアミノ酸配列を有するCDRを含むトリ重鎖可変領域をコードするDNAを、化学合成、生化学的切断、再結合等により作製する。得られた重鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト重鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組込むことにより重鎖発現ベクターを作製する。同様の方法で、軽鎖発現ベクターを作製する。得られた重鎖発現ベクター及び軽鎖発現ベクターを用いて、HEK293細胞株、CHO細胞、SP2/0細胞等の宿主細胞を共形質転換する。形質転換体を培養した後、形質転換体の培養液から目的のキメラ抗体を分離する。また、トリ-ヒトキメラ抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域中のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Research, Vol. 53, p. 851-856 (1993))。

【0031】

また、ヒト化抗体は、例えば、前記各アミノ酸配列を含むCDR1~3をヒト抗体のフレームワーク領域上に移植することにより作製できる(例えば、Jones et al., Nature, Vol. 321, p. 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, Vol. 332, p. 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, Vol. 239, p. 1534-1536 (1988))。重鎖CDR1(配列番号1、60、68、76、及び84)をコードするDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号18、97、105、113、及び121に示す。重鎖CDR2(配列番号2、61、69、77、及び85)をコードするDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号19、98、106、114、及び122に示す。重鎖CDR3(配列番号3、62、70、78、及び86)をコードするDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号20、99、107、115、及び123に示す。軽鎖CDR1(配列番号4、64、72、80及び88)をコードするDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号21、100、108、116、及び124に示す。軽鎖CDR2(配列番号5、65、73、81、及び89)をコードするDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号22、101、109、117、及び125に示す。軽鎖CDR3(配列番号6、66、74、82、及び90)をコードするDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号23、102、110、118、及び126に示す。具体的には、以下の方法により、ヒト化抗体を作製することができる。

【0032】

所定のアミノ酸配列を有するCDR1~3と、4つのヒト抗体由来のフレームワーク領域を所定の順に連結した重鎖可変領域をコードするDNAを、化学合成、生化学的切断、再結合等により作製する。ここで、ヒト化抗体の各CDRが適切な抗原結合部位を形成できるようにフレームワーク領域のアミノ酸を置換、欠失及び/又は付加等の変異を加えていてもよい(Sato, K. et al., Cancer Research, Vol. 53, p. 851-856 (1993))。得られた重鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト重鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組み込むことにより重鎖発現ベクターを作製する。同様に、軽鎖重鎖発現ベクターを作製する。得られた重鎖発現ベクター及び軽鎖発現ベクターを用いて、FreeStyle293細胞株(Life Technologies社)、CHO細胞、SP2/0細胞等の宿主細胞を共形質転換する。形質転換体を培養した後、形質転換体の培養液から目的のヒト化抗体を分離する。ヒト化抗体に用いられる重鎖可変領域である配列番号11のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を配列番号24に示す。また、ヒト化抗体に用いられる軽鎖可変領域のアミノ酸配列である配列番号12及び13のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を配列番号25及び26にそれぞれ示す。ヒト抗体の定常領域については公知のものを用いることができる。

10

#### 【0033】

また、本発明の抗Sema3A抗体のアイソタイプについては、特に制限されないが、例えば、IgG(IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>)、IgA(IgA<sub>1</sub>、IgA<sub>2</sub>)、IgM、IgD、及びIgEが挙げられる。これらの中でも、IgGが好適である。

20

#### 【0034】

また、本発明では、前記抗Sema3A抗体の抗原結合領域を含む限り、その抗体断片を使用することもできる。このような抗体断片として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv等が挙げられる。これらの抗体断片は、従来公知の方法に従って作製することができる。

#### 【0035】

本発明の抗Sema3A抗体又はその抗体断片は、ポリエチレングリコール、放射性物質、トキシン等の各種化合物と結合したコンジュゲート抗体又はコンジュゲート抗体断片であってもよい。また、本発明の抗Sema3A抗体又はその抗体断片は、必要に応じて、結合している糖鎖を改変したり、他のタンパク質が融合していてもよい。

30

#### 【0036】

### 2. 医薬組成物

本発明は、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、抗Sema3A抗体又は抗体断片によって、Sema3Aタンパク質の機能を効果的に阻害することができ、各種薬理効果を奏することができる。

#### 【0037】

本発明の医薬組成物において、有効成分として含有する抗Sema3A抗体又は抗体断片は、前記(A)~(E)の態様のいずれであってもよいが、Sema3Aタンパク質の機能をより一層効果的に阻害させて卓越した薬効を奏させるという観点から、好ましくは前記(A)の態様の抗Sema3A抗体又は抗体断片が挙げられる。

40

#### 【0038】

本発明の医薬組成物は、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片を有効量含んでさえあればよく、その他に、医薬的に許容される担体又は添加剤を含むものであってもよい。このような担体又は添加剤としては、例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着色料、保存料、安定剤、緩衝剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤、矯味剤等が挙げられる。更にこれらに制限されず、その他に、医薬組成物において一般的に使用されている担体又は添加剤が適宜使用できる。

#### 【0039】

また、本発明の医薬組成物の投与形態については、経口的又は非経口的のいずれであってもよく、具体的には、経口投与；静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与、経

50

鼻投与、経肺投与、経皮投与、経粘膜投与、眼内投与等の非経口投与が挙げられる。

【0040】

本発明の医薬組成物の製剤形態については、採用する投与形態に応じて、その製剤形態を適宜設定することができる。例えば、経口投与で使用される場合には、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の製剤形態に調製すればよく、非経口投与で使用される場合には、液剤、懸濁液、エマルジョン、スプレー剤、坐剤、点眼剤等の製剤形態に調製すればよい。

【0041】

本発明の医薬組成物は、上記抗Sema3A抗体又は抗体断片の作用により、Sema3Aタンパク質の機能を効果的に阻害できるので、Sema3Aタンパク質が関与する疾患の予防及び/又は治療に有用である。Sema3Aタンパク質が関与する疾患としては、例えば、中枢又は末梢神経系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、アレルギー性疾患、がん等が挙げられる。中枢又は末梢神経系疾患としては、具体的には、神経障害性の疼痛、脊髄損傷、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、黒質線状体変性症、シャイ・ドレーガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、脊髄小脳変性症等）等が挙げられる。自己免疫疾患としては、具体的には、慢性関節リウマチ、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症等が挙げられる。炎症性疾患としては、具体的には、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、喘息、関節炎、肝炎、脊椎関節炎、シェーグレン症候群等が挙げられる。感染症としては、具体的には、細菌感染症、脳炎/髄膜炎、心内膜炎、C型肝炎、インフルエンザ/重症急性呼吸器症候群(SARS)、肺炎、敗血症、火傷性、外傷性感染症等が挙げられる。アレルギー性疾患としては、具体的には、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、食物アレルギー等が挙げられる。がんとしては、具体的には、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌等が挙げられる。

【0042】

特に、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片は、Sema3Aタンパク質の神経再生阻害能を効果的に抑制でき、神経の再生及び伸長を促進することが可能であることから、本発明の医薬組成物は、神経再生伸長を目的とした医薬組成物（即ち、神経再生伸長用医薬組成物）として有用である。また、本発明の医薬組成物は、上記抗Sema3A抗体又は抗体断片によって神経そのものを再生及び伸長させることが可能であるので、神経変性疾患の予防及び/又は治療用の医薬組成物として特に有用である。

【0043】

更に、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片は、敗血症や、他のサイトカインストームを伴う疾患、例えば移植片対宿主病(GVHD)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、トリインフルエンザ、天然痘、全身性炎症症候群(SIRS)、薬物誘発性サイトカインストーム等、感染や強い炎症誘発刺激によって免疫機構が破綻する炎症性疾患に対して卓越した予防及び/又は治療効果を示すので、これらの疾患の予防及び/又は治療用の医薬組成物としての有用性も高い。

【0044】

また、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片は、Sema3Aにより誘導される癌細胞の遊走・浸潤活性を効果的に抑制する作用を発揮し、癌の憎悪・進展に関する病態に対して卓越した予防及び/又は治療効果を示すので、癌の疾患の予防及び/又は治療用の医薬組成物としての有用性も高い。また、本発明の医薬組成物を癌の予防及び/又は治療用途に使用する場合には、他の抗癌剤と併用してもよい。特に、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片は、Sema3Aにより誘導されるがん細胞の抗がん剤不応答性を解除し、薬剤感受性を回復できるので、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片を他の抗がん剤と併用することによって卓越したがんの予防及び/又は治療効果を示すことができる。前記抗Sema

10

20

30

40

50

ma3A抗体又は抗体断片を他の抗がん剤と併用する場合、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片と他の抗がん剤を同一の医薬組成物に含有させて製剤化してもよく、また前記抗Sema3A抗体又は抗体断片と他の抗がん剤を別々の医薬組成物に含有させて製剤化してもよい。

【0045】

また、本発明の医薬組成物は、上記抗Sema3A抗体又は抗体断片の作用により、血中PAI-1量の増加を抑制できるので、播種性血管内凝固症候群の予防及び/又は治療にも有効である。播種性血管内凝固症候群を伴う基礎疾患としては、敗血症、急性白血病、固形がん、常位胎盤早期剥離、羊水塞栓、外傷、熱傷、膠原病、ショック、大動脈瘤、劇症肝炎、肝硬変、急性膵炎、血栓症、重症感染症等が挙げられる。

10

【0046】

本発明の医薬組成物の投与量及び投与回数は、投与形態、患者の年齢や体重、疾患の種類や症状の程度等によって異なり、一律に規定することはできないが、神経の再生には通常数日から数ヶ月以上の期間を要することから、その間セマフォリンの活性を抑制するために必要な回数投与することが好ましい。例えば、1回の投与当たり、上記抗Sema3A抗体又は抗体断片の重量換算で0.1mg~1000mg、好ましくは1mg~500mgに相当する量を、1~30日に1回程度の頻度で投与すればよい。なお、投与回数を減らすために徐放性製剤を用いたり、オスモティックポンプ等で長期間にわたって少量ずつ投与することもできる。そして、これらのいずれの投与方法においても、作用部位においてSema3Aタンパク質の活性を十分に阻害する濃度になるような投与経路、投与方法を採用することが好ましい。

20

【0047】

3. Sema3Aタンパク質の測定方法及び測定キット

本発明は、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片を利用したSema3Aタンパク質の測定方法を提供する。本発明の測定方法では、前記抗Sema3A抗体又は抗体断片と、検体中のSema3Aとの抗原抗体反応を利用して検体中のSema3Aを免疫測定する。

【0048】

本発明の測定方法では、検体中のSema3Aと反応させる抗Sema3A抗体又は抗体断片は、前記(A)~(E)の態様のいずれであってもよいが、より高精度にSema3Aタンパク質を測定するという観点から、好ましくは前記(A)の態様の抗Sema3A抗体又は抗体断片が挙げられる。

30

【0049】

検体としては、Sema3Aの測定が求められるものであることを限度として特に制限されないが、例えば、血液、血清、血漿、尿、髄液、関節液、リンパ液、羊水、乳汁、各種組織液、海馬抽出液、各種組織抽出液等の生体由来検体が挙げられる。

【0050】

本発明の測定方法は、サンドイッチ法、競合法、凝集法等のいずれの免疫測定を採用してもよい。サンドイッチ法では、抗原を捕獲するキャプチャー抗体と、当該キャプチャー抗体に結合した抗原に対して結合する一次抗体を使用するが、本発明の測定方法において、サンドイッチ法を採用する場合には、前記(A)~(E)の態様の抗Sema3A抗体又は抗体断片の中から、1つの態様のものをキャプチャー抗体として使用し、他の態様のものを一次抗体として使用すればよい。サンドイッチ法を採用する場合、前記(A)の態様の抗Sema3A抗体又は抗体断片をキャプチャー抗体として使用し、前記(B)又は(C)の態様の抗Sema3A抗体又は抗体断片を一次抗体として使用すると、より一層高精度なSema3Aタンパク質の測定、とりわけ血清存在下でのSema3Aタンパク質の高精度な測定が可能になるため、特に好適である。

40

【0051】

また、免疫測定は、標識の種類に応じて、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光免疫測定法、放射性同位体免疫測定法等があるが、本発明の測定方法では、これらのいずれを使

50

用してもよい。測定の簡易性や迅速性の観点から、好ましくは酵素免疫測定法が挙げられる。

【0052】

抗原抗体反応を利用した免疫測定自体は公知であり、本発明の測定方法は、免疫測定の測定原理や標識の種類に応じた公知の手法で行うことができる。

【0053】

更に、本発明は、前記測定方法に使用される測定キットについても提供する。本発明の測定キットには、前記抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片が含まれる。

【0054】

また、本発明の測定キットには、前記抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片以外に、更に免疫測定の測定原理や標識の種類に応じて、他の試薬や器具が含まれていてもよい。例えば、酵素免疫測定法を選択する場合、前記抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片以外に、測定プレート、色原性基質溶液、反応停止液、洗浄液、標準溶液等が含まれていてもよい。また、サンドイッチ法を採用する場合には、キャプチャー抗体として使用される前記抗 S e m a 3 A 抗体又は抗体断片は、固相に固定化された状態で提供されてもよい。

10

【実施例】

【0055】

以下に本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されて解釈されるものではない。

【0056】

20

実施例1：抗 S e m a 3 A 抗体（トリ抗体、トリ - マウスキメラ抗体）の作製

1) 細胞培養

ニワトリ B 細胞由来の D T 4 0 細胞の細胞培養を以下の方法で行った。培養機は C O<sub>2</sub> 恒温槽を用い、5%の C O<sub>2</sub> 存在下で 39.5 で培養した。培地は、I M D M 培地 ( L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を用い、10容量% F B S、1容量%ニワトリ血清、ペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン100 μg/mL、2-メルカプトエタノール55 μMを加えて使用した。また、トリコスタチンA (和光純薬) は、D M S O に 5 m g / m L に溶解したものをストックとし、最終濃度が 1.25 n g / m L 又は 2.5 n g / m L となるように、適宜培地で希釈して用いた。

【0057】

30

2) 抗 S e m a 3 A 抗体産生細胞取得

横浜市立大学医学部分子薬理神経生物学教室で所有しているマウス S e m a 3 A タンパク質発現株を用いて作製したマウス S e m a 3 A タンパク質を抗原として、A u t o n o m o u s l y D i v e r s i f y i n g L i b r a r y ( A D L i b ) システム (カイオム・バイオサイエンス社) を用いて抗体産生細胞を得た。具体的には以下の実験プロセスを経ている。

【0058】

2-1) 抗原固定磁気ビーズの作製

H i s - t a g 用磁気ビーズへのマウス S e m a 3 A タンパク質の固定は、以下の手順に従って実施した。磁気ビーズは D y n a b e a d s T A L O N ( L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を、磁気スタンドは D y n a l M P C ( L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を用いた。

40

【0059】

ビーズ 22.5 μL を 45 μL の P B S 緩衝液で 3 回洗った後、P B S 緩衝液中で 6.1 μg のマウス S e m a 3 A タンパク質と 4 で 10 分間、回転により攪拌しながら反応させた。その後 45 μL の B u f f e r C ( 0.1% B S A を含む P B S 緩衝液) で 4 回洗浄した後、B u f f e r C 45 μL に懸濁した。

【0060】

2-2) 抗原固定磁気ビーズによる抗体産生クローンの選択

トリコスタチン A 1.25 n g / m L 又は 2.5 n g / m L を含む I M D M 培地で 5 週

50

間以上培養した野生型DT40細胞約 $8 \times 10^8$ 個を $1 \times 10^8$ 個ずつ8分割し、それぞれを洗浄液(1重量%BSAを含むPBS緩衝液)10mLで1回、更に同洗浄液1mLで1回洗浄した後、1mLの洗浄液中において2-1)で作製した抗原固定磁気ビーズ $5 \times 10^6$ 個とそれぞれ混合し、4で30分間、穏やかに回転させつつインキュベートした。その後King Fisher mL(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を使用して、1.7mLの洗浄液で3分、3回洗浄した。最後に、抗原固定磁気ビーズに結合した細胞を500 $\mu$ L培地に懸濁し、これを20mLの培地に加えたのち、96穴プレートに200 $\mu$ Lずつ分注し、39.5で培養した。この作業以降の培地は、IMDM培地(Life Technologies社)に、10容量%FBS、ペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン100 $\mu$ g/mL、2-メルカプトエタノール55 $\mu$ Mを加えたものを使用した。

10

## 【0061】

## 2-3)抗Sema3A抗体産生クローンのスクリーニング

ELISAは直接固相法で、以下の手順に従って行った。前記2-2)のステップの6日後、マウスSema3Aタンパク質を2.5 $\mu$ g/mLで384well Maxisorp(Nunc社)に20 $\mu$ Lずつ分注し一晩放置した。なお、抗体の特異性を検討するために、ネガティブコントロールとして、オボアルブミン(OA)、ウサギIgG(rIgG)も同様にプレートに固定した。翌日プレートの中身を捨て、ブロッキング液(1%BSAを含むPBS緩衝液)45 $\mu$ Lを入れ、室温で1時間インキュベートした。ELISA洗浄バッファー(0.05重量%Tween20を含むPBS)120 $\mu$ Lで5回洗浄し、前記2-2)で選別して生じたコロニー由来の培養上清それぞれ25 $\mu$ Lを入れ、室温で1時間インキュベートした。ELISA洗浄液120 $\mu$ Lで5回洗浄したのち、二次抗体をブロッキングバッファーで2000倍に希釈したものを25 $\mu$ L入れ、室温で45分インキュベートした。なお、二次抗体はanti-chicken IgM-HRP(BETHYL社)を使用した。ELISA洗浄液120 $\mu$ Lで5回洗浄したのち、TMB+(Dako社)を25 $\mu$ L入れ、30分インキュベートした。その後反応を1Nの硫酸25 $\mu$ Lで停止し、450nmの吸光度を測定した。

20

## 【0062】

この結果、図1に示すように、抗原固定磁気ビーズへの直接固定法セレクションにより、直接固相ELISAで、抗Sema3A抗体産生陽性を示すクローン13株が得られた。

30

## 【0063】

得られた陽性クローンの内、No.4及びNo.6株について限界希釈法により抗体産生細胞のクローニングを以下のように行った。

## 【0064】

各株の各々を細胞 $1 \times 10^3$ 個/mLに調製し、その150 $\mu$ Lを60mLの培地に加え、200 $\mu$ L/wellで96well plate(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)3枚に撒きこみ、7日間静置培養を行った。各株より細胞コロニーが確認できた20クローンについて2-3)の欄に記載の方法でマウスSema3A抗体産生クローンのスクリーニングを実施した。各株について、マウスSema3A抗体産生が陽性を示すクローンから2クローンずつ選択し、高密度培養を行った。

40

## 【0065】

高密度培養は、各クローンを拡大培養し、細胞数が $4 \times 10^7$ 個になるまで増殖させた。十分な細胞数にまで増殖したことを確認し、20容量%ニワトリ血清成分入りAIM-V培地(Life Technologies社)を使用して、CELLline CL-1000(BD社)での培養を行った。ニワトリ血清成分は、抗体除去ニワトリ血清のことである。作製方法は、ニワトリ血清(Life Technologies社)から50%飽和硫酸によりイムノグロブリンを沈殿として除去し、上清をPBS緩衝液に透析し、透析により生じた体積増加をCentri Prep(Amicon社)による濃縮で補正した。約96時間程度培養後、細胞の生存率を測定しながら、生存率が50%以下に

50

なるまで培養を継続した。生存率が50%以下になった時点で、培養上清を回収した。

【0066】

### 3) ELISA用培養上清の作製

ELISAにより力価を解析した培養上清は、血清由来のIgM等を除去するため、以下のようにして調製した。ニワトリ血清成分をAIM-V無血清培地(Life Technologies社)に3%の濃度で加えた。ここに約 $1 \times 10^6$ 個/mLの濃度になるように細胞を加え、2日培養して、培養上清を取得した。

【0067】

### 4) 抗Sema3A抗体産生クローンの選択

前記3)で得られたELISA用培養上清について、ELISAにより抗Sema3A抗体濃度の測定を行い、抗Sema3A抗体産生能が高いクローンNo.4-2株を得た。

10

【0068】

### 5) 抗Sema3Aトリ抗体(IgM)を含む培養上清の調製

前記4)で得られた抗Sema3Aトリ抗体産生クローンNo.4-2株を用いて、IMDM培地で5%CO<sub>2</sub>存在下、39.5℃でCO<sub>2</sub>恒温槽を用いて培養し、その培養上清を回収した。

【0069】

### 6) 抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体(IgG)の作製

前記4)で得た抗Sema3A抗体産生クローンNo.4-2株から全RNAを抽出し、逆転写酵素(SuperScriptII、Life Technologies社)及びoligo(dT)プライマーを用いた逆転写反応によりcDNAの合成を行った。このcDNAを鋳型とし、トリ抗体軽鎖可変領域の配列を含むセンスプライマー(プライマー1:GAAGATCTAAGCTTGCCATGGCCTGGGCTCCTCTCCTCCT(配列番号27))、トリ抗体軽鎖可変領域の配列とマウス抗体軽鎖定常領域の配列を含むアンチセンスプライマー(プライマー2:TGGCGAAGACTTCGGCTGGCCTAGGAC(配列番号28))を用いたPCRにより、軽鎖可変領域遺伝子を増幅した。その一方で、トリ抗体重鎖可変領域の配列を含むセンスプライマー(プライマー3:GAAGATCTAAGCTTACCATGAGCCCACTCG(配列番号29))、トリ抗体重鎖可変領域の領域とマウスIgG2a抗体定常領域を含むアンチセンスプライマー(プライマー4:CGATGGGGCTGTTGTTTTGGCGGAGGAGACGATGACTTC(配列番号30))を用いたPCRにより、重鎖可変領域遺伝子を増幅した。一方、マウス抗体軽鎖定常領域のDNA配列を鋳型とし、トリ抗体軽鎖可変領域のセンスプライマー配列とマウス抗体軽鎖定常領域の配列を含むセンスプライマー(プライマー5:AAGTCTTCGCCATCAGTCAACCCTGT T T C C A (配列番号31))、及びアンチセンスプライマー(プライマー6:TATGCGGCCGCTTACTAGGAACAGTCA(配列番号32))を用いたPCRにより、マウス軽鎖定常領域遺伝子を増幅した。さらにマウスIgG2a抗体重鎖定常領域のcDNA配列を鋳型とし、トリ抗体重鎖可変領域のセンスプライマー配列とマウスIgG2a抗体重鎖定常領域の配列を含むセンスプライマー(プライマー7:GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCT(配列番号33))、及びアンチセンスプライマー(プライマー8:AGATAGCGGCCGCTTATCATTTACCCGG(配列番号34))を用いたPCRにより、マウス重鎖定常領域遺伝子を増幅した。

20

30

40

【0070】

増幅された軽鎖可変領域断片と軽鎖定常領域断片を鋳型とし、プライマー1及びプライマー6を用いたPCRにより、トリ-マウスキメラ抗体軽鎖遺伝子を増幅した。さらに、増幅された重鎖可変領域断片と重鎖定常領域断片を鋳型とし、プライマー3及びプライマー8を用いたPCRにより、トリ-マウスキメラ抗体重鎖遺伝子を増幅した。

【0071】

50

トリ - マウスキメラ抗体軽鎖遺伝子とトリ - マウスキメラ抗体重鎖遺伝子をそれぞれ制限酵素HindIII及びNotIで処理した後、哺乳細胞発現用プラスミドpCEP4 (Life Technologies社)のHindIII - NotIサイトにそれぞれクローニングした。クローニングした抗体遺伝子配列はDNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。決定された塩基配列をもとに、トリ - マウスキメラ抗体軽鎖とトリ - マウスキメラ抗体重鎖のアミノ酸配列を翻訳した。最終的に決定されたトリ - マウスキメラ抗体重鎖のアミノ酸配列を配列番号35に、最終的に決定されたトリ - マウスキメラ抗体軽鎖のアミノ酸配列を配列番号36に示す。

#### 【0072】

上記にて作製したプラスミドを、FreeStyle293細胞株(Life Technologies社)へポリエチレンイミンを用いたトランスフェクションにより導入し、37℃、8%CO<sub>2</sub>、135回転/分の振とう培養で7日間培養した培養上清を回収した。

#### 【0073】

培養上清中に含まれる抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体(IgG)の濃度はELISAで定量した。この培養上清から、Poly-Prep Chromatography Columns (BIO-RAD社)にProtein G Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケア社)を充填して作製したカラムを用いて、抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体を精製した。PD-10カラム(GEヘルスケア社)を用いて溶媒をPBS緩衝液に置換した。

#### 【0074】

精製した抗体の抗原に対する特異性の測定は、PBS緩衝液を用いたELISAにより行った。2.5µg/mLの抗原を96Well Maxi Sorp Plate (Nunc社)に分注し4℃で一晩反応させ、抗原(マウスSema3Aタンパク質)によるプレートのコートを行った。なお、抗体の特異性を検討するために、ネガティブコントロールとして、別途、オボアルブミン、ウサギIgG、スキムミルクも同様にプレートに固定した。翌日、洗浄液(0.05%Tween20を含むPBS)200µLで3回洗浄し、ブロッキング液(0.5%スキムミルクを含むPBS)200µLを加え、30分反応させた。洗浄液200µLで3回洗浄し、抗体を含む培養上清を100µL加え、1時間反応させた。洗浄液200µLで5回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗マウスIgG2aヤギ抗体(BETHYL社)をPBS緩衝液で2000倍に希釈したものを100µL加え、一時間反応させた。洗浄液200µLで5回洗浄し、TMB+(Dako社)100µLを加え、5分発色反応させ、1M硫酸100µLを加えて反応を停止させた。µQuantBiomolecular Spectrometer (Bio-Tek Instruments社)を用いて、450nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。

#### 【0075】

7) 抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体の可変領域におけるCDR配列の決定

上記で得られた抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体について、CDR配列の決定を行った。CDR配列の決定は、Kabatraによる方法(Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH publication, 91-3242)に従って行った。その結果、重鎖及び軽鎖のCDR1~3のアミノ酸配列として、下記配列が特定された。

#### 【0076】

10

20

30

40

【表 1】

抗Sema3Aトリーマウスキメラ抗体 (クローンNo. 4-2由来)	
重鎖CDR1	SYPMG (配列番号1) (配列番号35の第31番目から第35番目に対応)
重鎖CDR2	GIDDDGDS DTRYAPAVKG (配列番号2) (配列番号35の第50番目から第67番目に対応)
重鎖CDR3	HTGIGANSAGSIDA (配列番号3) (配列番号35の第100番目から第113番目に対応)
軽鎖CDR1	SGGGSYTG SYYG (配列番号4) (配列番号36の第21番目から第33番目に対応)
軽鎖CDR2	YNNKRPS (配列番号5) (配列番号36の第50番目から第56番目に対応)
軽鎖CDR3	GSADNSGDA (配列番号6) (配列番号36の第89番目から第97番目に対応)

10

## 【0077】

## 実施例2：抗Sema3A抗体(ヒト化抗体、トリ-ヒトキメラ抗体)の作製

1) ヒト化抗体 (Humanized-1、Humanized-2) 遺伝子の構築  
前記実施例1の4) で得たクローンNo. 4-2株が産生する抗Sema3A抗体の可変領域のフレームワーク領域を、ヒト抗体のフレームワーク領域のアミノ酸に変更することにより2種のヒト化抗体 (Humanized-1及びHumanized-2) の設計を行なった。

20

## 【0078】

設計された重鎖 (Humanized-1、2共通) 及びHumanized-1の軽鎖アミノ酸配列をコードする遺伝子を、ヒト細胞で発現させるためのコドン最適化を考慮して、それぞれ合成した。一方、Humanized-2の軽鎖は、Humanized-1の軽鎖遺伝子配列を鋳型として、センスプライマー (プライマーA : GAAGATCTAAGCTTCCACCATGGCAT (配列番号37)) とアンチセンスプライマー (プライマーB : TTGTAATAGATCACTGTCACGGGA (配列番号38)) でPCR増幅した産物と、センスプライマー (プライマーC : TCCCGTGACAGTGATCTATTACAA (配列番号39)) とアンチセンスプライマー (プライマーD : AGATAGCGGCCGCTTAGGAACATTC (配列番号40)) でPCR増幅した産物を、センスプライマーA とアンチセンスプライマーD でアセンブルPCRすることで合成した。

30

## 【0079】

## 2) トリ ヒトキメラ抗体遺伝子の構築

トリ ヒトキメラ抗体遺伝子を次のように構築した。前記実施例1の4) で得たクローンNo. 4-2株のcDNAを鋳型とし、トリ抗体 軽鎖可変領域の配列を含むセンスプライマー (プライマーE : GAAGATCTAAGCTTCCACCATGGCCTGGGCTCCTCT (配列番号41)) 及びトリ抗体 軽鎖可変領域の配列とヒト抗体 軽鎖定常領域の配列を含むアンチセンスプライマー (プライマーF : CTTTGGGCTGGCCTAGGACGGTCAGGGTTGT (配列番号42)) を用いたPCRにより、軽鎖可変領域遺伝子を増幅した。また、トリ抗体重鎖可変領域の配列を含むセンスプライマー (プライマーG : GAAGATCTAAGCTTCCACCATGAGCCCACTCG (配列番号43))、トリ抗体重鎖可変領域の領域とヒト抗体IgG1定常領域を含むアンチセンスプライマー (プライマーH : GCCCCTTTGTACTAGCGGAGGAGACGATGACTTC (配列番号44)) を用いたPCRにより、重鎖可変領域遺伝子を増幅した。一方、合成したHumanized-1のヒト抗体

40

50

軽鎖定常領域のDNA配列を鋳型とし、ヒト抗体 軽鎖定常領域の配列を含むセンスプライマー（プライマーI : GGCCAGCCCAAGCCACCCCTACCGTG（配列番号45））、及びアンチセンスプライマー（プライマーJ : AGATAGCGGCCGCTTATTAGGAACATTCGGTT（配列番号46））を用いたPCRにより、ヒト 軽鎖定常領域遺伝子を増幅した。さらに合成したHumanized-1のヒトIgG1抗体重鎖定常領域のDNA配列を鋳型とし、ヒトIgG1抗体重鎖定常領域の配列を含むセンスプライマー（プライマーK : GCTAGTACAAAGGGGCCCTCAGTGTTCCCACTG（配列番号47））、及びアンチセンスプライマー（プライマーL : AGATAGCGGCCGCTTATTATTTTCCAGGTGACAG（配列番号48））を用いたPCRにより、ヒトIgG1重鎖定常領域遺伝子を増幅した。

10

## 【0080】

増幅された軽鎖可変領域断片と軽鎖定常領域断片を鋳型とし、プライマーE及びプライマーJを用いたPCRにより、トリ-ヒトキメラ抗体軽鎖遺伝子を増幅した。更に、増幅された重鎖可変領域断片と重鎖定常領域断片を鋳型とし、プライマーG及びプライマーLを用いたPCRにより、トリ-ヒトキメラ抗体重鎖遺伝子を増幅した。

## 【0081】

## 3) 発現ベクターの構築とタンパク質発現、精製、濃度測定

合成したHumanized-1の軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子、Humanized-2の軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子、並びにトリ ヒトキメラ抗体の軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子を、制限酵素HindIII及びNotIで処理した後、哺乳細胞発現用プラスミドpCEP4(Life Technologies社)のHindIII-NotIサイトにそれぞれクローニングした。クローニングされた抗体遺伝子配列はDNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。決定された塩基配列をもとに、ヒト化抗体(Humanized-1及びHumanized-2)とトリ ヒトキメラ抗体の重鎖と軽鎖のアミノ酸配列を翻訳した。

20

## 【0082】

最終的に決定されたヒト化抗体(Humanized-1及びHumanized-2)の重鎖のアミノ酸配列を配列番号49に示し、当該アミノ酸配列をコードしている塩基配列を配列番号50に示す。当該重鎖のアミノ酸配列(配列番号49)には、配列番号11に示す可変領域のアミノ酸配列が含まれている。また、最終的に決定されたヒト化抗体(Humanized-1)の軽鎖のアミノ酸配列を配列番号51に示し、当該アミノ酸配列をコードしている塩基配列を配列番号52に示す。当該軽鎖のアミノ酸配列(配列番号51)には、配列番号12に示す可変領域のアミノ酸配列が含まれている。また、最終的に決定されたヒト化抗体(Humanized-2)の軽鎖のアミノ酸配列を配列番号53に示し、当該アミノ酸配列をコードしている塩基配列を配列番号54に示す。当該軽鎖のアミノ酸配列(配列番号53)には、配列番号13に示す可変領域のアミノ酸配列が含まれている。

30

## 【0083】

また、最終的に決定されたトリ-ヒトキメラ抗体(クローンNo.4-2由来)の重鎖のアミノ酸配列を配列番号55に示し、当該アミノ酸配列をコードしている塩基配列を配列番号56に示す。当該重鎖のアミノ酸配列(配列番号55)には、配列番号8に示す可変領域のアミノ酸配列が含まれている。また、最終的に決定されたトリ-ヒトキメラ抗体(クローンNo.4-2由来)の軽鎖のアミノ酸配列を配列番号57に示し、当該アミノ酸配列をコードしている塩基配列を配列番号58に示す。当該軽鎖のアミノ酸配列(配列番号57)には、配列番号10に示す可変領域のアミノ酸配列が含まれている。

40

## 【0084】

上記にて作製した発現プラスミドを、FreeStyle293細胞株(Life Technologies社)にポリエチレンイミンを用いたトランスフェクションにより導入し、37℃、8%CO<sub>2</sub>、135回転/分の振とう培養で7日間培養した後、培養上

50

清を回収した。

【0085】

この培養上清から、Poly - Prep Chromatography Columns (BIO - RAD社)にProtein A Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケア社)を充填して作製したカラムを用いて、抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized - 1及びHumanized - 2)、及びトリ - ヒトキメラ抗体を精製した。PD - 10カラム(GEヘルスケア社)を用いて溶媒をPBS緩衝液に置換した。

【0086】

精製した抗体のアミノ酸組成より分子吸光係数を算出し、紫外吸光法により濃度を決定した。精製した抗体500ngを還元又は非還元の状態で電気泳動し、ゲルをCBB(Coomassie Brilliant Blue)染色した。結果を図3に示す。なお、図3には、実施例1で得られたトリ - マウス抗体、及びCL18M(+ )トリ - マウスキメラ抗体(コントロール)について、同様に電気泳動してCBB染色した結果も併せて示す。

10

【0087】

実施例3：抗Sema3A抗体(トリ - マウスキメラ抗体)の作製

ヒトSema3Aタンパク質を抗原とし、ニワトリIgMの定常領域をマウスIgGに置換したDT40細胞を用いたこと以外は、実施例1に記載の1)及び2)と同様の手法で抗体のスクリーニングを行い、抗Sema3A抗体産生陽性を示すクローン8株を得た。抗Sema3A抗体産生陽性を示すクローンの中の165株及び582株を使用し、抗Sema3A抗体の製造及び精製を行うことにより、抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体(IgG)(クローンNo.165株由来及びクローンNo.582株由来)を得た。各抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域及びCDR配列の決定を行った。CDR配列の決定は、Kabataらによる方法(Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH publication, 91 - 3242)に従って行った。得られた結果を表2及び3に示す。

20

【0088】

【表 2】

抗Sema3Aトリーマウスキメラ抗体 (クローンNo. 165株由来)	
重鎖可変領域	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFS SYEMQWVRQAPGKGLEWVAGIYTGSTWYGA AVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTA IYYCAKSGIGVNSAAFIDAWGHGTEVIVSS (配列番号59)
重鎖CDR1	SYEMQ (配列番号60) (配列番号59の31番目から35番目に対応)
重鎖CDR2	G I Y T G S T W Y G A A V K G (配列番号61) (配列番号59の50番目から64番目に対応)
重鎖CDR3	S G I G V N S A A F I D A (配列番号62) (配列番号59の97番目から109番目に対応)
軽鎖可変領域	ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSY YYGWYQQKAPGSAPVTVIYNNNKRPSNIPS RFSGSLSGSTNTLITGVRADDEAVYFCGS ADNSGTAFGAGTTLTVL (配列番号63)
軽鎖CDR1	SGGGSYGGSYYYG (配列番号64) (配列番号63の21番目から33番目に対応)
軽鎖CDR2	NNNKRPS (配列番号65) (配列番号63の50番目から56番目に対応)
軽鎖CDR3	GSADNSGTA (配列番号66) (配列番号63の89番目から97番目に対応)

10

20

【0089】

30

【表 3】

抗Sema3Aトリーマウスキメラ抗体 (クローンNo. 582株由来)	
重鎖可変領域	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTMS SYEMQWVRQAPGKGLEWVAAIYTRSTWYGA AVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTG TYECAKSGIGLNSAAFIDAWGHGTEVIVSS (配列番号67)
重鎖CDR1	SYEMQ (配列番号68) (配列番号67の31番目から35番目に対応)
重鎖CDR2	AIYTRSTWYGAAVKG (配列番号69) (配列番号67の50番目から64番目に対応)
重鎖CDR3	SGIGLNSAAFIDA (配列番号70) (配列番号67の97番目から109番目に対応)
軽鎖可変領域	ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSY YYGWYQQKAPGSAPVTVIYTNNKRPSNIP RFSGLSGSTNTLITGVRADDEAVYFCGS ADNSGTAFGAGTTLTVL (配列番号71)
軽鎖CDR1	SGGGSYGGSYYYG (配列番号72) (配列番号71の21番目から33番目に対応)
軽鎖CDR2	TNNKRPS (配列番号73) (配列番号71の50番目から56番目に対応)
軽鎖CDR3	GSADNSGTA (配列番号74) (配列番号71の89番目から97番目に対応)

10

20

## 【0090】

## 実施例4：抗Sema3A抗体(トリ抗体、トリ-ヒトキメラ抗体)の作製

30

## 1) トリ抗体(IgM)の作製

マウスSema3Aタンパク質を抗原として、実施例1に記載の1)及び2)と同様の手法で抗体のスクリーニングを行い、抗Sema3A抗体産生陽性を示すクローンを得て、その中の240-40株及び255-72株を使用し、抗Sema3A抗体の製造及び精製を行うことにより、抗Sema3Aトリ抗体(クローンNo. 240-40株由来及びクローンNo. 255-72株由来)を得た。各抗Sema3Aトリ抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域及びCDR配列の決定を行った。CDR配列の決定は、Kabatraによる方法(Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH publication, 91-3242)に従って行った。得られた結果を表4及び5に示す。

40

## 【0091】

【表4】

抗Sema3Aトリ抗体（クローンNo. 240-40株由来）	
重鎖可変領域	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSS YDMNWVRQAPGKGLEWVAGIYSGSSTYYGAA VKGRATISRDNQSTLRLQLNNLRAEDTGIY YCAKSAIPVNSAGSIDAWGHGTEVIVSS（配列 番号75）
重鎖CDR1	SYDMN（配列番号76） （配列番号75の31番目から35番目に対応）
重鎖CDR2	GIYSGSSTYYGAAVKG（配列番号77） （配列番号75の50番目から65番目に対応）
重鎖CDR3	SAIPVNSAGSIDA（配列番号78） （配列番号75の98番目から110番目に対応）
軽鎖可変領域	ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYGGSY YSWHQKSPGSALVTVIYNNKRPSDIPSRF SGSLSGSTNTLITGVRADDEAVYFCGSADT SGTAFGAGTTLTVL（配列番号79）
軽鎖CDR1	SGGGSYGGSYYS（配列番号80） （配列番号79の21番目から33番目に対応）
軽鎖CDR2	YNNKRPS（配列番号81） （配列番号79の50番目から56番目に対応）
軽鎖CDR3	GSADTSGTA（配列番号82） （配列番号79の89番目から97番目に対応）

10

20

【0092】

30

【表 5】

抗Sema3Aトリ抗体 (クローンNo. 255-72株由来)	
重鎖可変領域	AVTLDES G G G L Q T P G G A L S L V C K A S G F T F S S Y E M Q W V R Q A P G K G L E W V A G I Y S G S T W Y G A A V K G R A T I S R D N G Q S T V R L Q L N N L R A E D T G T Y Y C A K S G I G F N S A G S I D A W G H G T E V I V S S (配列番号83)
重鎖CDR1	S Y E M Q (配列番号84) (配列番号83の31番目から35番目に対応)
重鎖CDR2	G I Y S G S T W Y G A A V K G (配列番号85) (配列番号83の50番目から64番目に対応)
重鎖CDR3	S G I G F N S A G S I D A (配列番号86) (配列番号83の97番目から109番目に対応)
軽鎖可変領域	A L T Q P A S V S A N P G E T V K I T C S G G G S Y G G S Y Y Y S W H Q Q K S P G S A L V T V I Y Y N N K R P S D I P S R F S G S L S G S T N T L T I T G V R A D D E A V Y F C G S A D N S G S A F G A G T T L T V L (配列番号87)
軽鎖CDR1	S G G G S Y G G S Y Y Y S (配列番号88) (配列番号87の21番目から33番目に対応)
軽鎖CDR2	Y N N K R P S (配列番号89) (配列番号87の50番目から56番目に対応)
軽鎖CDR3	G S A D N S G S A (配列番号90) (配列番号87の89番目から97番目に対応)

10

20

## 【0093】

## 2) トリ-ヒトキメラ抗体 (I g G 1) の作製

抗Sema3A抗体産生クローン240-40株及び255-72株から全RNAを抽出し、逆転写酵素 (SuperScript II、Life Technologies社) を用いた逆転写反応によりcDNAの合成を行った。このcDNAを鋳型とし、トリ抗体 軽鎖可変領域の配列を含むセンスプライマー (プライマーM : A G C T T G C T A G C G G C C A C C A T G G C C T G G G C T C C T C T C (配列番号91))、及びアンチセンスプライマー (プライマーN : T C T G G C G G C C G C T A G A C T C A C C T A G G A C G G T C A G G G T T G T C (配列番号92)) を用いたPCRにより、軽鎖可変領域遺伝子を増幅した。その一方で、トリ抗体重鎖可変領域の配列を含むセンスプライマー (プライマーO : A G C T T G C T A G C G G C C A C C A T G A G C C C A C T C G T C T C C (配列番号93))、及びアンチセンスプライマー (プライマーP : T C T G G C G G C C G C T A G A C T C A C C G G A G G A G A C G A T G A C T T C (配列番号94)) を用いたPCRにより、重鎖可変領域遺伝子を増幅した。

30

40

## 【0094】

また、重鎖定常領域については配列番号95、軽鎖定常領域については配列番号96のDNA配列を遺伝子全合成によって作製し、いずれもNot I処理およびEag I処理を行った後、ベクターpCEP4 (Life Technologies社) のNot Iサイトに接続した。

## 【0095】

上記のように作製した定常領域を含むベクターに対して、上記で増幅した可変領域の配列をクローニングした。具体的には、重鎖定常領域ベクター、軽鎖定常領域ベクターをい

50

ずれもNotI処理し、それぞれ重鎖可変領域cDNA、軽鎖可変領域cDNAをIn-fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社)を用いて接続した。

【0096】

上記にて作製したプラスミドを、FreeStyle 293細胞株(Life Technologies社)へポリエチレンイミンを用いたトランスフェクションにより導入し、37℃、8%CO<sub>2</sub>、135回転/分の振とう培養し、培養上清を回収し、Protein Aによる精製を行うことにより、抗Sema3Aトリ-ヒトキメラ抗体(IgG1)(クローンNo.240-40株由来及びクローンNo.255-72株由来)を得た。

【0097】

#### 実施例5：抗原に対する特異性の測定

実施例1で得られたトリ-マウスキメラ抗体、並びに実施例2で得られたヒト化抗体(Humanized-1及びHumanized-2)及びトリ-ヒトキメラ抗体について、抗原に対する特異性をPBS緩衝液を用いた抗原固相ELISAによって測定した。また、実施例1で得られたトリ-マウスキメラ抗体をビオチン標識したものについても、同様に、抗原に対する特異性を測定した。更に、ネガティブコントロールとしてCL18M(+)トリ-マウスキメラ抗体についても、同様に、抗原に対する特異性を測定した。具体的測定条件は、以下の通りである。

【0098】

まず、2.5µg/mLの抗原(マウス及びヒトSema3Aタンパク質)を384Well Maxi Sorp Plate(Nunc社)に分注し4℃で一晩反応させ、抗原によるプレートのコートを行った。なお、抗体の特異性を検討するために、ネガティブコントロールとして、別途、オボアルブミン(OVA)、牛血清アルブミン(BSA)も同様にプレートに固定した。反応後、洗浄液(0.05%Tween20を含むPBS)50µLで3回洗浄し、ブロッキング液(1%牛血清アルブミンを含むPBS)25µLを加え、30分反応させた。洗浄液50µLで3回洗浄し、各抗体を20µL加え、1時間反応させた。洗浄液50µLで5回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗ヒト軽鎖ヤギ抗体(Southern Biotech社)をPBS緩衝液で4000倍に希釈したもの、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗マウスIgG2aヤギ抗体(BETHYL社)をPBS緩衝液で2000倍に希釈したもの、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識されたストレプトアビジン(Thermo社)をPBS緩衝液で10000倍に希釈したものを20µL加え、一時間反応させた。洗浄液50µLで5回洗浄し、TMB+(Dako社)20µLを加え、20分発色反応させ、1M硫酸20µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000(TECAN社)を用いて、450nmの吸光度を測定した。

【0099】

結果を図4に示す。図4から明らかなように、実施例1及び2で得られた各抗体は、ヒトSema3AとマウスSema3A抗原に対する反応性が確認され、陰性抗原として用いられたオボアルブミンやBSAには反応が認められなかった。この結果、実施例1及び2で得られた各抗体は、Sema3Aに対して特異的に交差性を示すことが確認された。

【0100】

#### 実施例6：抗原に対する親和性の測定 - 1

実施例1で得られたクローンNo.4-2由来のトリ-マウスキメラ抗体、並びに実施例2で得られたヒト化抗体(Humanized-1及びHumanized-2)及びトリ-ヒトキメラ抗体について、抗原に対する親和性の評価を競合ELISAにより行った。また、ネガティブコントロールとしてCL18M(+)トリ-マウス抗体についても、同様に、抗原に対する親和性を測定した。具体的測定条件は、以下の通りである。

【0101】

まず、2.5µg/mLの抗原(マウス及びヒトSema3Aタンパク質)を384Well Maxi Sorp Plate(Nunc社)に分注し4℃で一晩反応させ、

10

20

30

40

50

抗原によるプレートのコートを行った。翌日、洗浄液（0.05% Tween 20を含むPBS）50  $\mu$ Lで3回洗浄し、ブロッキング液（1%牛血清アルブミンを含むPBS）25  $\mu$ Lを加え、30分反応させた。ヒト化抗体（Humanized-1及びHumanized-2）、トリ-ヒトキメラ抗体、及びトリ-マウスキメラ抗体をそれぞれ2倍連続希釈し、ピオチン標識した抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体を最終濃度が60 ng/mLになるように混合し、洗浄液50  $\mu$ Lで3回洗浄した抗原固相プレートと1時間反応させた。洗浄液50  $\mu$ Lで5回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識されたストレプトアビジン（Thermo社）をPBS緩衝液で10000倍に希釈したものを20  $\mu$ L加え、30分反応させた。洗浄液50  $\mu$ Lで5回洗浄し、TMB+（Dako社）20  $\mu$ Lを加え、20分発色反応させ、1M硫酸20  $\mu$ Lを加えて反応を停止させた。Infinite M1000（TECAN社）を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

【0102】

得られた結果を図5に示す。また、各抗体について抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体の抗原抗体反応に対する50%阻害濃度 $IC_{50}$ （ $\mu$ g/mL）を算出した結果を表6に示す。その結果、ヒト化抗体（Humanized-1及びHumanized-2）、トリ-ヒトキメラ抗体、及びトリ-マウスキメラ抗体の親和性はほぼ同等であり、ヒト化による親和性の大きな変化は認められなかった。

【0103】

【表6】

クローンNo. 4-2由来の抗体	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	
	ヒトSema3A抗原	マウスSema3A抗原
ヒト化抗体 (Humanized-1)	0.071	0.120
ヒト化抗体 (Humanized-2)	0.101	0.157
トリ-ヒトキメラ抗体	0.054	0.112
トリ-マウスキメラ抗体	0.074	0.147
CL18M (+) トリ-マウス抗体 (ネガティブコントロール)	N. D.	N. D.

【0104】

実施例7：抗原に対する親和性の測定 - 2

実施例1で得られたクローンNo. 4-2由来のトリ-マウスキメラ抗体、並びに実施例2で得られたヒト化抗体（Humanized-1及びHumanized-2）及びトリ-ヒトキメラ抗体について、BIACORE（GEヘルスケア社）を用いて抗原に対する親和性の評価を行った。具体的条件は、以下の通りである。

【0105】

センサーチップCM5（GEヘルスケア社）をEDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）とNHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）にて活性化し、Acetate 5.0（GEヘルスケア社）で50  $\mu$ g/mLに希釈されたProtein A（ナカライテスク社）を反応、センサーとアミンカップリングした。キャプチャー量が約200 RUになる抗体濃度で各抗体を反応させて、抗原（マウス及びヒトSema3Aタンパク質）を100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nMの濃度で反応させた。結合時間は3分で乖離時間を4分とし、反応により得られたセンサグラムをLangmuir binding model（BIAevaluation Version 4.1）（GEヘルスケア社）にて解析してKD値（解離定数）を算出した。

【0106】

その結果、ヒトSema3Aに対するKD値は、ヒト化抗体（Humanized-1及びHumanized-2）では3~4 nM、トリ-ヒトキメラ抗体及びトリ-マウス

10

20

30

40

50

キメラ抗体では14～15 nMであった。また、マウスSema3Aに対するKD値は、ヒト化抗体(Humanized-1及びHumanized-2)では4～5 nM、トリ-ヒトキメラ抗体及びトリ-マウスキメラ抗体では17～18 nMであった。Humanized-1及びHumanized-2のいずれのヒト化抗体も、キメラ抗体に比べてSema3Aに対するKD値は低く、ヒト化により親和性が向上していることが分かった。

【0107】

実施例8：サンドイッチELISAによるヒトSema3Aの測定

実施例2～4で得られた抗Sema3A抗体を用いて、サンドイッチELISAによるヒトSema3Aの測定を行った。具体的条件は、以下の通りである。

10

【0108】

先ず、表7に示すキャプチャー抗体を1/2000に希釈して、384 Well Maxi Sorp Plate (Nunc社)に分注し4で一晩反応させ、キャプチャー抗体によるプレートのコートを行った。反応後、各ウェルを洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で3回洗浄し、ブロッキング液(1%牛血清アルブミンを含むPBS、pH7.2)45 µLを加え、室温で2時間反応させた。次いで、洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で3回洗浄し、各抗体を20 µL加え、1時間反応させた。その後、各ウェルに試験サンプルを25 µL添加し、室温で1時間反応させた。なお、試験サンプルとしては、組換えヒトSema3A-Fcキメラタンパク質(R&D systems, #1250-S3-02J)をPBSで段階希釈したもの、又は組換えヒトSema3A-Fcキメラタンパク質(R&D systems, #1250-S3-02J)を、PBSで5倍希釈したヒト血清type AB (Sigma, #H4522)で段階希釈したものを使用した。次いで、洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で3回洗浄し、表7に示す一次抗体(濃度0.1 µg/mL、1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH7.2)で希釈)を各ウェルに25 µL添加し、室温で1時間反応させた。洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で5回洗浄した後に、以下の方法で二次抗体の反応及び検出を行った。

20

【0109】

(条件1、2及び5～8の場合)

西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗マウスIgG抗体(GE #NA931; 1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH7.2)で1/1000に希釈)を各ウェルに25 µL添加し、室温で1時間反応させた後に、洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で5回洗浄した。その後、TMB(Dako, #S1599)20 µLを加え、20分発色反応させ、1N硫酸20 µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000(TECAN社)を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

30

【0110】

(条件3及び4の場合)

ビオチン標識されたマウス抗トリIgM抗体(Beckman Coulter #733087; 1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH7.2)で1/20000に希釈)を各ウェルに25 µL添加し、室温で1時間反応させた後に、洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で5回洗浄した。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識されたストレプトアビジン(Thermo 21130; 1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH7.2)で10000倍希釈)を各ウェルに25 µL添加し、室温で1時間反応させた後に、洗浄液(0.05% Tween 20を含むPBS、pH7.2)で5回洗浄した。その後、TMB(Dako, #S1599)20 µLを加え、20分発色反応させ、1N硫酸20 µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000(TECAN社)を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

40

【0111】

50

(条件9の場合)

西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗ヤギIgG抗体(BETHYL社 #A50; 1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH7.2)で1/10000に希釈)を各ウェルに25µL添加し、室温で1時間反応させた後に、洗浄液(0.05%Tween20を含むPBS、pH7.2)で5回洗浄した。その後、TMB(Dako、#S1599)20µLを加え、20分発色反応させ、1N硫酸20µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000(TECAN社)を用いて、450nmの吸光度を測定した。

【0112】

得られた結果を表7、図6及び7に示す。なお、図6には、条件1~4及び8で血清を含まない試験サンプルを測定した結果として、抗原(Sema3A)とOD450(450nmの吸光度)値の関係を示す。また、図7には、条件1及び2で血清を含む試験サンプルを測定した結果として、抗原(Sema3A)とOD450(450nmの吸光度)値の関係を示す。これらの結果から、実施例1~4で得られた抗Sema3A抗体を使用することによって、ELISAにてSema3Aを測定できることが明らかとなった。また、キャプチャー抗体として実施例2で得られたヒト化抗体(Humanized-2)を使用し、一次抗体として実施例3で得られたトリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来及びクローンNo.582株由来)を使用した場合(条件1及び2)には、血清中のSema3Aについても高精度な測定ができ、生体由来の検体中のSema3Aを測定可能であることも確認された。一方、市販されている抗Sema3A抗体を使用した場合(条件9)では、Sema3Aの検出はできなかった。

【0113】

10

20

【表7】

試験条件	試験結果 試験サンプル (血清を含む場合)	試験サンプル (血清を含む場合)	試験サンプル (血清を含む場合)
条件1	一次抗体	0.706	検出可
条件2	二次抗体	1.799	検出可
条件3	三次抗体	0.191	実施せず
条件4	四次抗体	0.174	実施せず
条件5	五次抗体	3.403	実施せず
条件6	六次抗体	2.916	実施せず
条件7	七次抗体	3.288	実施せず
条件8	八次抗体	1.889	実施せず
条件9	九次抗体	-	実施せず

10

20

30

40

【0114】

実施例9：退縮アッセイ (collapse assay) - 1

1) 試験方法

ニワトリ7日胚の後根神経節 (DRG) を摘出した。摘出したDRGをNGF含有培地 250 μL入りのPLL・ラミニンコートした24ウェルディッシュにて、37 °Cで16

50

~ 20時間静置培養し、NGF感受性DRGニューロンが伸長しているのを確認した。別途、ニワトリ由来Sema3Aタンパク質(3nM)と、実施例1で得られた抗Sema3Aトリマウスキメラ抗体(培養上清)(抗体濃度として10µg/mL)又は抗Sema3Aトリマウスキメラ抗体(10µg/mL)とを含む混合液を氷上で30分間プレインキュベートした。この混合液を、ニワトリ由来Sema3Aタンパク質の最終濃度が、0、0.1、0.3nMになるように、前記24ウェルディッシュに添加し、37℃で30分間静置培養した。次いで、3.7%ホルマリン溶液で固定後、Alexa488-conjugated Phalloidinにて、培養ニューロンの軸索先端に形成される成長円錐の可視化を行った。蛍光顕微鏡下にて、全NGF感受性DRGニューロンのうち、成長円錐が退縮(collapse)しているニューロンの割合(%)を求めた。また、コントロールとして、抗Sema3Aトリ抗体又は抗Sema3Aトリマウスキメラ抗体の代わりに、抗ウサギIgG抗体又はマウスIgGを使用して、上記と同様に退縮アッセイを行った。

10

【0115】

## 2) 結果

抗Sema3Aトリ抗体を使用した退縮アッセイの結果を図8に、抗Sema3Aトリマウスキメラ抗体を使用した退縮アッセイの結果を図9に示す。図8及び9から明らかなように、抗Sema3Aトリ抗体及び抗Sema3Aトリマウスキメラ抗体には、Sema3Aタンパク質によって成長円錐が退縮するのを抑制する作用があることが認められた。即ち、特定のアミノ酸配列のCDR1~3を有する抗Sema3A抗体は、Sema3Aタンパク質による成長円錐の退縮誘導能を効果的に抑制できることが明らかとなった。

20

【0116】

実施例10：退縮アッセイ(collapse assay) - 2

## 1) 試験方法

ニワトリ由来Sema3Aタンパク質の代わりにヒト由来Sema3Aタンパク質を使用したこと以外は、上記実施例9と同様の手法で、退縮アッセイを行った。

【0117】

## 2) 結果

抗Sema3Aトリ抗体を使用した退縮アッセイの結果を図10に示す。図10から分かるように、抗Sema3Aトリ抗体がヒト由来Sema3Aタンパク質の機能を効果的に抑制し、成長円錐の退縮を抑制できていた。即ち、特定のアミノ酸配列のCDR1~3を有する抗Sema3A抗体は、ヒトにおいても、Sema3Aタンパク質による成長円錐の退縮誘導能を効果的に抑制できることが明らかとなった。

30

【0118】

実施例11：退縮アッセイ(collapse assay) - 3

## 1) 試験方法

ニワトリ7日胚の後根神経節(DRG)を摘出した。摘出したDRGをNGF含有培地250µL入りのPLL・ラミニンコートした24ウェルディッシュにて、37℃で16~20時間静置培養し、NGF感受性DRGニューロンが伸長しているのを確認した。別途、ヒト由来Sema3Aタンパク質(3nM)と、実施例2で得られた抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized-2)(培養上清)(抗体濃度として100µg/mL)とを含む混合液を氷上で30分間プレインキュベートした。この混合液を、ヒト由来Sema3Aタンパク質の最終濃度が、0、0.05、0.1、0.3nMになるように、前記24ウェルディッシュに添加し、37℃で30分間静置培養した。次いで、3.7%ホルマリン溶液で固定後、Alexa488-conjugated Phalloidinにて、培養ニューロンの軸索先端に形成される成長円錐の可視化を行った。蛍光顕微鏡下にて、全NGF感受性DRGニューロンのうち、成長円錐が退縮(collapse)しているニューロンの割合(%)を求めた。また、コントロールとして、抗Sema3Aヒト化抗体の代わりに、Human IgG-lambdaを使用して、上記と同様に

40

50

退縮アッセイを行った。

【0119】

2) 結果

抗Sema3Aヒト化抗体を使用した退縮アッセイの結果を図11に示す。図11から明らかなように、抗Sema3Aヒト化抗体には、Sema3Aタンパク質によって成長円錐が退縮するのを抑制する作用があることが認められた。即ち、特定のアミノ酸配列のCDR1~3を有する抗Sema3A抗体は、ヒト化した場合にもSema3Aタンパク質による成長円錐の退縮誘導能を効果的に抑制できることが明らかとなった。

【0120】

実施例12：ヒトSema3Aに対する結合アッセイ

10

1) 試験方法

野生型COS-7細胞、又はEGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)融合NRP1(Neuropilin-1)を発現するように形質転換させたCOS-7細胞(NRP1発現COS-7細胞)を準備した。別途、アルカリフォスファターゼ結合ヒト由来Sema3Aタンパク質(0.1nM)と、実施例1で得られたトリ抗Sema3A抗体(培養上清)(抗体濃度として10µg/mL)又は抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体(10µg/mL)とを含むDMEM培地を氷上で30分間プレインキュベートしておき、この培地500µLを、予めHBHバッファ(20mM sodium HEPES, pH7.00, 0.05容量%BSA, 及び10容量%FBSを含むハンクス平衡塩類溶液)でブロッキングしておいた野生型COS-7細胞又はNRP1発現COS-7細胞に添加して、氷上で1時間静置した。次いで、HBHバッファを用いて細胞を4回洗浄した後、4%ホルムアルデヒドを用いて細胞の固定化を行った。固定化された細胞をHHバッファ(20mM sodium HEPES, pH7.00を含むハンクス平衡塩類溶液)で1回洗浄した後、500µLのアルカリフォスファターゼ基質(NBT/BCIP:nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt)を添加して、室温で一晩静置した。その後、顕微鏡にて細胞の発色の程度を観察した。また、コントロールとして、アルカリフォスファターゼ結合ヒト由来Sema3Aタンパク質を添加しなかったこと、或いは抗Sema3Aトリ抗体又は抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体の代わりにウサギIgGを使用したこと以外は、上記と同様の手法で、結合アッセイを行った。なお、本試験に供したNRP1発現COS-7細胞において、NRP1発現量に差がないことは、細胞から発せられるEGFPの蛍光強度から確認している。

20

30

【0121】

2) 結果

抗Sema3Aトリ抗体を使用した結合アッセイの結果を図12に、抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体を使用した結合アッセイの結果を図13に示す。図12及び13から明らかなように、トリ抗Sema3A抗体又は抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体と、ヒト由来Sema3Aタンパク質との混合物を添加した場合には、NRP1発現COS-7細胞へのヒト由来Sema3Aタンパク質の結合が阻害された。即ち、本結果から、特定のアミノ酸配列のCDR1~3を有する抗Sema3A抗体は、ヒト由来Sema3Aタンパク質に結合し、ヒト由来Sema3Aタンパク質とNRP1との結合を阻害できることが明らかとなった。

40

【0122】

実施例13：ヒトSema3Fに対する結合アッセイ

1) 試験方法

NRP1発現COS-7細胞の代わりに、EGFP融合NRP2(Neuropilin-2)を発現するように形質転換したCOS-7細胞(NRP2発現COS-7細胞)を使用し、且つアルカリフォスファターゼ結合ヒト由来Sema3Aタンパク質の代わりにアルカリフォスファターゼ結合ヒト由来Sema3Fタンパク質を使用したこと以外は

50

、上記実施例 1 2 と同様の手法で、結合アッセイを行った。

【 0 1 2 3 】

2 ) 結果

抗 S e m a 3 A トリ抗体を使用した結合アッセイの結果を図 1 4 に示す。図 1 4 から分かるように、抗 S e m a 3 A トリ抗体と、ヒト由来 S e m a 3 F タンパク質との混合物を添加した場合でも、ヒト由来 S e m a 3 F タンパク質の N R P 2 発現 C O S - 7 細胞への結合は阻害されなかった。即ち、本結果から、特定のアミノ酸配列の C D R 1 ~ 3 を有する抗 S e m a 3 A 抗体は、S e m a 3 A タンパク質と相同性の高いサブファミリー分子である S e m a 3 F タンパク質には結合せず、S e m a 3 A タンパク質に対して特異的に結合する可能性が示唆された。

10

【 0 1 2 4 】

実施例 1 4 : 抗 S e m a 3 A 抗体が認知機能に与える影響の分析

1 ) 試験材料

1 - 1 ) A ( 2 5 - 3 5 ) 及び A ( 3 5 - 2 5 )

A ( 2 5 - 3 5 ) ( A m y l o i d - P r o t e i n ( 2 5 - 3 5 ) ) ( B a c h e m , # H - 1 1 9 2 ) 及び A ( 3 5 - 2 5 ) ( A m y l o i d - P r o t e i n ( 3 5 - 2 5 ) ) ( B a c h e m , # H - 2 9 6 4 ) を蒸留水にて 1 m g / m L に調製した後、3 7 °C にて 4 日間インキュベートし、A ( 2 5 - 3 5 ) 溶液及び A ( 3 5 - 2 5 ) 溶液を調製した。この操作により、A ( 2 5 - 3 5 ) は凝集し、細胞毒性を獲得するようになる。また、A ( 3 5 - 2 5 ) は、活性型である A ( 2 5 - 3 5 ) のアミノ酸配列を逆転させた不活性型の A ( 3 5 - 2 5 ) であり、上記操作後でも細胞毒性を発揮しない。A ( 3 5 - 2 5 ) は、ネガティブコントロールとして使用した。

20

【 0 1 2 5 】

1 - 2 ) 抗 S e m a 3 A 抗体

前記実施例 1 で作製した抗 S e m a 3 A トリ - マウスキメラ抗体を生理食塩水にて 1 m g / m L に調製し、抗 S e m a 3 A 抗体溶液を調製した。

【 0 1 2 6 】

1 - 4 ) n o r m a l I g G

1 m g / m L の n o r m a l m o u s e I g G ( C a l b i o c h e m より入手) を n o r m a l I g G 溶液として用いた。

30

【 0 1 2 7 】

1 - 5 ) マウス

日本チャールス・リバー社より購入した 3 週齢のマウス ( C 5 7 B L / 6 J ) を使用した。

【 0 1 2 8 】

2 ) 試験方法

N o v e l O b j e c t R e c o g n i t i o n T a s k ( N O R T ) を以下の方法に従って行った。

まず、3 週齢のマウスを用意し、マウスが実験者に慣れるよう、2 週間の間、一日 1 0 分間、実験者の手の上にマウスをのせるという、ハンドリング作業を行った。次に、マウスを表 8 に示す 5 群に分けて、表 8 に示す条件で A ( 2 5 - 3 5 ) 及び抗体を脳室内に投与した。これらの溶液は、b r e g m a から右下 1 m m に投与した。投与には、マイクロシリンジの針先にテフロンチューブ ( エイコム ) を連結させ、その先端に針先 3 . 3 m m の部分を直角にした 2 7 G の注射針 ( テルモ ) を挿入したものをを用いた。

40

【 0 1 2 9 】

【表 8】

群	投与条件
I n t a c t 群 (N=24)	無処置 (Aβ 及び抗体の投与なし)
Aβ (35-25) 投与群 (N=34)	Aβ (35-25) 溶液 3 μ L を脳室内投与
Aβ (25-35) 投与群 (N=43)	Aβ (25-35) 溶液 3 μ L を脳室内投与
Aβ (25-35) + n o r m a l I g G 投与群 (N=22)	Aβ (25-35) 溶液 3 μ L と n o r m a l I g G 溶液 3 μ L を脳室内に同時投与
Aβ (25-35) + 抗 S e m a 3 A 抗体投与群 (N=22)	Aβ (25-35) 溶液 3 μ L と 抗 S e m a 3 A 抗体溶液 3 μ L を脳室内に同時投与

10

【0130】

脳室内投与から3日後、マウスを35cm×35cm×35cmのテストケージに移し、10分間テストケージに慣れさせた。翌日(投与4日後)、テストケージの所定の位置に物体Aと物体Bを設置して10分間の間にそれぞれの物体にアクセスした時間を測定した(獲得試行)。この時、物体と鼻先との距離が1cm以下になった時間をアクセス時間として測定した。さらに翌日(投与5日後)、物体Bを新規物体Cに替えて10分間の試行中のアクセス時間を測定した(テスト試行)。

【0131】

なお、物体A、B、及びCは、それぞれ形状及び色が異なるものを使用した。物体A、B、及びCの具体的な形状・色は以下の通りである。

20

物体A：水平方向に延びる基部(緑色)と、その中央から垂直に伸びる延長部(緑色)とで構成され、正面視T字型に形成されている。当該基部と延長部の形状は、共に直方体である。

物体B：基部が黄色、延長部が円柱形状で赤色であること以外は、上記物体Aと同様である。

物体C：基部が黄色、延長部が側面の正面視で円弧状にくり抜かれた形状で黄色であること以外は、上記物体Aと同様である。

物体A、B、及びCの基部をテストケージの底面に配置し、延長部が上方に延びるように設置した。

30

【0132】

3) 統計解析

獲得試行において、物体A及び物体Bへの合計アクセス時間に対する、物体Bへのアクセス時間の割合(物体Bに対するアクセス率)を算出した。獲得試行時は物体A及び物体B共に、新規物体であるので、どちらも同程度にアクセスすることが見込まれる。この時どちらかの物体に偏ったアクセスを示した場合は、薬物投与によって、認知機能等が障害された可能性があるため、本実験では評価できないということになる。更に、テスト試行において、物体A及び物体Cへの合計アクセス時間に対する、物体Cへのアクセス時間の割合(物体Cに対するアクセス率)を算出した。テスト試行時は物体Cのみが新規物体であるため、もし物体Aについての記憶を獲得していれば、物体Cに偏ったアクセスが見込まれる。以上から算出した物体Bに対するアクセス率、物体Cに対するアクセス率を、それぞれ一元配置分散分析を用いて統計解析を行った。群間比較はT u k e y - K r a m e r のH S D検定により行った。

40

【0133】

4) 結果

得られた結果を図15A(獲得試行)及び15B(テスト試行)に示す。

【0134】

図15Aから明らかなように、獲得試行時は全ての群の物体Bに対するアクセス率がほぼ約50%で、どの群間も有意な差は認められなかった。従って、認知機能等の障害が認められず、本実験での記憶獲得に対する評価が可能であることが示された。一方、図15

50

Bに示されるように、テスト試行において、Intact群及びA (35 - 25)投与群(ネガティブコントロール)では、物体Cに対するアクセス率75%程度であった。一方、A (25 - 35)投与群では、物体Cに対するアクセス率が50%程度に止まり、Intact群と比べて物体Cに対する嗜好性の減少が有意差を持って認められた( $p < 0.0001$ , 対Intact群)。この結果は、A (25 - 35)投与による記憶障害により、物体Aに対する記憶を獲得しなかったことを示している。

【0135】

一方、図15Bから明らかなように、A (25 - 35) + 抗Sema3A抗体投与群では、物体Cに対するアクセス率が75%程度であり、A (25 - 35)投与群、及びA (25 - 35) + normal IgG投与群と比べ、有意差を持った回復を示した( $p < 0.0001$ , 対A (25 - 35)投与群ないしはA (25 - 35) + normal IgG投与群)。

10

【0136】

以上の結果から、特定のアミノ酸配列のCDRを有する抗Sema3A抗体には、Aにより惹起される記憶障害誘導を阻害する効果が確認された。既に、Sema3Aタンパクの発現上昇がアルツハイマー病患者の死後脳において認められていること、またSema3Aシグナル伝達経路においてリン酸化修飾を受けるCollapsin Response Mediator Protein (CRMP)が、アルツハイマー病変の一つである神経原線維変化にて、高度にリン酸化CRMPされていることが知られている。従って、このような薬理効果は、上記抗Sema3A抗体が、Sema3A - CRMPシグナルを遮断したものであると考察される。

20

【0137】

実施例15：抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体が免疫・炎症性疾患に与える影響の分析

実施例2で得られたトリ - マウスキメラ抗体について、敗血症の疑似病態モデルとされるLipopolysaccharide接種モデルを用い、致死的炎症病態に対する影響を分析した。

【0138】

1) 試験材料

1-1) Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (以下LPS、Sigma社、Lot番号：032M4082V)を生理食塩水にて6mg/mLの濃度に調製した。

30

【0139】

1-2) トリ - マウス抗Sema3A抗体

実施例2で作製した抗Sema3Aトリ - マウスキメラ抗体を生理食塩水にて5mg/mLに希釈し、抗Sema3A抗体溶液とした。

【0140】

1-3) 陰性対照用キメラ抗体

ニワトリB細胞由来のDT40細胞によって構築される抗体ライブラリーを用いて作製された非特異的トリ - マウスキメラ抗体(IgG)(陰性対照用キメラ抗体)を、生理食塩水にて5mg/mLに希釈し、陰性対照用キメラ抗体溶液とした。

40

【0141】

1-4) マウス

日本チャールス・リバー社より購入した雄性6週齢のマウス(C57BL/6J)を使用した。

【0142】

2) 試験方法

入荷後、飼育室で馴化させたC57BL/6Jマウスを1群5匹に分けて、表9に示す試験群を設定した。各抗体を尾静脈より投与した後、30分後にLPSを腹腔内に接種した。これらの処置を施した日をDay0とし、Day4までの各個体の生死を観察し、効

50

力判定の指標とした。同一の試験を計3回実施し再現性の確認を行った。

【0143】

3試験間の非解離性を確認したうえで、これらの結果を併合しDay 4における生存率改善効果とその有効性を判定した。また、Kaplan-Meier法により生存率曲線を作成し、生存期間延長効果を判定した。

【0144】

【表9】

群	投与条件
陰性対照群 (N=5)	陰性対照用キメラ抗体溶液0.1mL (陰性対照用キメラ抗体の用量500 $\mu$ g)を尾静脈より投与した後、30分後にLPSを60mg/kgの用量となるよう腹腔より接種した。
抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体投与群 (N=5)	抗Sema3A抗体溶液0.1mL (抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体の用量500 $\mu$ g)を尾静脈より投与した後、30分後にLPSを60mg/kgの用量となるよう腹腔より接種した。

10

【0145】

3) 統計解析

投与4日以前の死亡例を生存期間の延長なし(無効)とし、4日まで生存した例を生存期間の延長有り(有効)と判定した。これらの2値化データについて、Breslow-Day検定を用いて3試験間の同一性を判定した上で、Cochran-Mantel-Haenzel検定により3試験を併合した有効率の差を判定した。生存期間延長効果はlog-rank検定を適用し判定した。

20

【0146】

4) 結果

得られた結果を表10に示す。表10から明らかなように、3試験すべてにおいて抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体投与群の生存率が、陰性対照である非特異配列キメラ抗体投与群に比べ優れていた。これらの試験間での非乖離性を確認するため実施したBreslow-Day検定が有意ではないことから3試験間に乖離はないと判断した( $p=0.6202$ )。そのうえで3試験の結果を併合し、Cochran-Mantel-Haenzel検定を実施したところ、 $p=0.0364$ となり、陰性対照群と抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体群間の生存率には有意水準5%で統計的有意差が認められた。これらの結果から抗Sema3Aトリ-マウスキメラ抗体は、致命的炎症病態を有するモデル動物において生存率を改善する効果を示し、かつその効果には再現性のあることが明らかとなった。

30

【0147】

【表10】

	群	個体数	死亡	生存	生存率
実験I	陰性対照	N=5	3	2	40%
	抗Sema3Aキメラ抗体	N=5	2	3	60%
実験II	陰性対照	N=5	4	1	20%
	抗Sema3Aキメラ抗体	N=5	1	4	80%
実験III	陰性対照	N=5	4	1	20%
	抗Sema3Aキメラ抗体	N=5	2	3	60%
3実験併合	陰性対照	N=15	11	4	26.7%
	抗Sema3Aキメラ抗体	N=15	5	10	66.7%

40

【0148】

併合した3試験についてKaplan-Meier法により生存率曲線を作成し、その有意性を検討するためlog-rank検定を実施した。その結果を図16に示す。図16に示す如く、生存期間分析においても $p=0.0115$ という有意性を示し、抗Sema

50

a 3 A トリ - マウスキメラ抗体には生存期間延長効果のあることが明らかとなった。

【 0 1 4 9 】

実施例 1 6 : 抗 S e m a 3 A ヒト化抗体が免疫・炎症性疾患に与える影響の分析

実施例 2 で得られた抗 S e m a 3 A ヒト化抗体についても、実施例 1 2 と同様に L P S 誘発炎症疾患モデルに対する影響を分析した。

【 0 1 5 0 】

1 ) 試験材料

1 - 1 ) L P S

L P S の調製は実施例 1 5 と同様に行った。

【 0 1 5 1 】

1 - 2 ) 抗 S e m a 3 A ヒト化抗体

実施例 2 で作製した抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 ( H u m a n i z e d - 2 ) を生理食塩水にて希釈し、抗 S e m a 3 A ヒト化抗体溶液とした。抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 5 0 0 μ g 投与群では、抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 ( H u m a n i z e d - 2 ) を 5 m g / m L の濃度に調製したものを、抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 1 0 0 μ g 投与群では、抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 ( H u m a n i z e d - 2 ) を 1 m g / m L の濃度に調製したものを

10

【 0 1 5 2 】

1 - 3 ) 陰性対照群用ヒト抗体

非特異的なヒトポリクローナル抗体 ( h u m a n I g G P O L Y C L O N A L I s o t y p e C o n t r o l ; B i o X C e l l 社、# B E 0 0 9 2 ) を、生理食塩水にて 5 m g / m L に希釈し、陰性対照用ヒト抗体溶液とした。

20

【 0 1 5 3 】

1 - 4 ) マウス

日本チャールス・リバー社より購入した雄性 6 週齢のマウス ( C 5 7 B L / 6 J ) を使用した。

【 0 1 5 4 】

2 ) 試験方法

入荷後、飼育室で馴化させた C 5 7 B L / 6 J マウスを 1 群 1 0 匹に分けて、表 1 1 に示す試験群を設定した。各抗体を尾静脈より投与した後、3 0 分後に L P S を腹腔内に接種した。これらの処置を施した日を D a y 0 とし、D a y 4 までの各個体の生死を観察し、効力判定の指標とした。

30

【 0 1 5 5 】

【表 1 1】

群	投与条件
陰性対照群 ( N = 1 0 )	陰性対照用ヒト抗体溶液 0. 1 m L ( 陰性対照用ヒト抗体の用量 5 0 0 μ g ) を尾静脈より投与した後、3 0 分後に L P S を 6 0 m g / k g の用量となるよう腹腔より接種した。
抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 1 0 0 μ g 投与群 ( N = 1 0 )	抗 S e m a 3 A ヒト化抗体溶液 0. 1 m L ( 抗 S e m a 3 A ヒト化抗体の用量 1 0 0 μ g ) を尾静脈より投与した後、3 0 分後に L P S を 6 0 m g / k g の用量となるよう腹腔より接種した。
抗 S e m a 3 A ヒト化抗体 5 0 0 μ g 投与群 ( N = 1 0 )	抗 S e m a 3 A ヒト化抗体溶液 0. 1 m L ( 抗 S e m a 3 A ヒト化抗体の用量 5 0 0 μ g ) を尾静脈より投与した後、3 0 分後に L P S を 6 0 m g / k g の用量となるよう腹腔より接種した。

40

【 0 1 5 6 】

3 ) 統計解析

実施例 1 2 と同様に無効及び有効の 2 値化した生存割合に対し、片側による C o c h r a n - A r m i t a g e 検定を用い、想定される 3 種類の用量反応型、即ち直線的増加、

50

低用量飽和、及び高用量立ち上がり型の対比を設定して生存率改善効果の用量反応性を判定した。また、生存期間延長効果は  $\log$ -rank 検定を適用し判定した。

【0157】

#### 4) 結果

表12に各群の生存率を示す。抗Sema3Aヒト化抗体投与100 $\mu$ g投与群では、陰性対照群(30%)の2倍の生存率(60%)となり、更に500 $\mu$ g投与群は、100 $\mu$ g投与群の結果を上回る生存率(80%)が観察された。抗Sema3Aヒト化抗体両用量において生存率が改善され、かつ用量依存傾向が認められた。

【0158】

【表12】

群	個体数	死亡	生存	生存率
陰性対照群	N=10	7	3	30%
抗Sema3Aヒト化抗体100 $\mu$ g投与群	N=10	4	6	60%
抗Sema3Aヒト化抗体500 $\mu$ g投与群	N=10	2	8	80%

10

【0159】

以上の結果は、抗Sema3Aヒト化抗体も、実施例15で示した抗Sema3Aトリマウスキメラ抗体と同様に、LPS誘発性の致死的炎症病態を抑え、生存率を改善し得る効果を有することを明瞭に示している。

【0160】

20

#### 実施例17：抗Sema3Aヒト化抗体が病態誘発後の致死的炎症性疾患に与える影響の分析

実施例16で得られた結果をもとに、抗Sema3Aヒト化抗体の効果について、LPSを先に接種し、病態を誘発した後からの処置による影響を判定した。

【0161】

#### 1) 試験材料

##### 1-1) LPS

LPSの調製は実施例15と同様に行った。

【0162】

##### 1-2) 抗Sema3Aヒト化抗体

30

実施例2で作製した抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized-2)を生理食塩水にて希釈し、抗Sema3Aヒト化抗体溶液とした。抗Sema3Aヒト化抗体500 $\mu$ g、250 $\mu$ g、125 $\mu$ g投与群では、抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized-2)をそれぞれ5、2.5、1.25mg/mLの濃度に調製したものをを用いた。

【0163】

##### 1-3) 陰性対照群用ヒト抗体

実施例16と同様の方法で、陰性対照用ヒト抗体溶液を調製した。

【0164】

##### 1-4) マウス

日本チャールス・リバー社より購入した雄性6週齢のマウス(C57BL/6J)を使用した。

40

【0165】

#### 2) 試験方法

入荷後、飼育室で馴化させたC57BL/6Jマウスを1群10匹に分けて、表13に示す試験群を設定した。本試験では実施例15及び16と異なり、実医療に則した使用を想定し、既に炎症が惹起された後からの投与による効力判定を行った。まずLPSを腹腔内に接種し炎症反応を惹起した。各抗体はLPS腹腔内接種1時間後に尾静脈より投与した。これらの処置を施した日をDay0とし、Day4までの各個体の生死を観察し、効力判定の指標とした。

【0166】

50

【表 1 3】

群	投与条件
陰性対照群 (N=10)	LPSを60mg/kgの用量となるよう腹腔より接種し、1時間後、陰性対照用ヒト抗体溶液0.1mL (陰性対照用ヒト抗体の用量500μg)を尾静脈より投与した。
抗Sema3Aヒト化抗体125μg投与群 (N=10)	LPSを60mg/kgの用量となるよう腹腔より接種し、1時間後、抗Sema3Aヒト化抗体溶液0.1mL (抗Sema3Aヒト化抗体の用量125μg)を尾静脈より投与した。
抗Sema3Aヒト化抗体250μg投与群 (N=10)	LPSを60mg/kgの用量となるよう腹腔より接種し、1時間後、抗Sema3Aヒト化抗体溶液0.1mL (抗Sema3Aヒト化抗体の用量250μg)を尾静脈より投与した。
抗Sema3Aヒト化抗体500μg投与群 (N=10)	LPSを60mg/kgの用量となるよう腹腔より接種し、1時間後、抗Sema3Aヒト化抗体溶液0.1mL (抗Sema3Aヒト化抗体の用量500μg)を尾静脈より投与した。

10

20

## 【0167】

## 3) 統計解析

陰性対照群を含む4群がとり得る用量反応型として、(1)実用量の直線回帰、(2)直線増加、(3)中用量立上り、(4)高用量立上り、(5)中用量飽和、(6)低用量飽和、及び(7)中用量立上り飽和型、の7つのタイプが想定される。この計7種の反応パターンに対しCochran-Armitage検定を用い、並べ替え再抽出法で多重調整したp値を算出したうえで、そのp値が最小となる対比反応型を適切な用量反応型として採択することとした。また、生存期間延長効果はlog-rank検定を適用し判定

30

## 【0168】

## 4) 結果

表14に投与4日後の各群の生存率を示す。陰性対照群の生存率は10%であったが、LPS接種後1時間に抗Sema3Aヒト化抗体125、250、及び500μgを投与した各群の生存率はそれぞれ、30、40、100%であり、用量増加に伴い生存率も上がる傾向が観察された。特に、抗Sema3Aヒト化抗体500μg投与群ではマウス10匹全個体が生存するという特筆すべき効果が確認された。

## 【0169】

## 【表 1 4】

群	個体数	死亡	生存	生存率
陰性対照群	N=10	9	1	10%
抗Sema3Aヒト化抗体125μg投与群	N=10	7	3	30%
抗Sema3Aヒト化抗体250μg投与群	N=10	6	4	40%
抗Sema3Aヒト化抗体500μg投与群	N=10	0	10	100%

40

## 【0170】

2値化した生存率がとり得る7種の用量反応型を設定し、並べ替え再抽出法による多重調整Cochran-Armitage検定を実施した。そのp値の計算結果を表15に

50

示す。なお、p 値の序列を示すため、表示桁数は不必要に多くしてある。

【0171】

【表15】

用量反応パターン	多重調整後 p 値
実用量直線回帰型	0.00001790
直線増加型	0.00004540
中用量立上り型	0.00005730
高用量立上り型	0.00008040
中用量飽和型	0.00133730
中用量立上り飽和型	0.00252090
低用量飽和型	0.01135610

10

【0172】

解析の結果、想定した全ての用量反応型において、有意性を示す結果が得られた。もっとも小さな p 値を示した用量反応型は実用量直線増加型 ( $p = 0.00001790$ ) で、次いで直線増加型 ( $p = 0.0000454$ )、中用量立上り型 ( $p = 0.00005730$ )、高用量立上り型 ( $p = 0.00008040$ ) の順であった。これらの結果は、本試験における生存率改善効果には明瞭な用量依存性があったことを科学的に示していると同時に、抗 Sema3A ヒト化抗体が致死性炎症病態を制御し、生存率を改善し得る効力を有していることを示すものである。

【0173】

20

全例が生存し明瞭な生存率改善効果の認められた抗 Sema3A ヒト化抗体  $500 \mu\text{g}$  投与群の生存率曲線を図17に示す。log-rank 検定では  $p < 0.0001$  となり有意水準を満たす結果が得られた。抗 Sema3A ヒト化抗体は致死性炎症病態発症後も、その病態を制御し生存期間延長効果を示すことが明瞭となった。

【0174】

実施例18：播種性血管内凝固症候群モデルマウスに与える抗 Sema3A ヒト化抗体の影響

敗血症や固形腫瘍等に伴う播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation、以下DIC) では、血中 Plasminogen activator inhibitor - 1 (以下PAI-1) が増加し、線溶系を抑制することから多臓器不全を起し重篤化する。血中 PAI-1 量の増加を抑制できれば播種性血管内凝固症候群の進行を阻止できると考えられることから、抗 Sema3A ヒト化抗体の血中 PAI-1 量変動への影響を検討した。

30

【0175】

1) 試験材料

1-1) LPS

LPS (Sigma社、Lot番号: 102M4017V) を生理食塩水にて  $1.5 \text{ mg/mL}$  の濃度に調製した。

【0176】

1-2) 抗 Sema3A ヒト化抗体

40

実施例2で作製した抗 Sema3A ヒト化抗体 (Humanized-2) を生理食塩水にて  $5 \text{ mg/mL}$  の濃度に調製した。

【0177】

1-3) マウス

日本チャールス・リバー社より購入した雄性6週齢のマウス (C57BL/6J) を使用した。

【0178】

2) 試験方法

2-1) 群構成

入荷後、飼育室で馴化させた C57BL/6J マウスを1群5匹に分けて、表16に示

50

す試験群を設定した。

【0179】

2-2) LPS接種と抗体投与

LPSは15mg/kgの接種量となるよう腹腔内に接種した。抗体溶液は500μg/マウスの接種量となるよう、5mg/mL溶液を0.1mL尾静脈より投与した。なお、LPS非接種の条件1群には生理食塩水を腹腔内接種した。

【0180】

2-3) マウスPAI-1の測定

LPS接種から1.5、3、及び9時間後に血漿を採取し、マウスPAI-1 ELISA kit (Innovative Research社) を用い処置動物の血中PAI-1濃度を測定した。

【0181】

【表16】

	LPS (mg/kg)	抗体投与 (500μg)	採血時間
条件1	—	—	試験開始時
条件2	15	—	LPS接種1.5時間後
条件3	15	LPS接種30分前	LPS接種1.5時間後
条件4	15	LPS接種1時間後	LPS接種1.5時間後
条件5	15	—	LPS接種3時間後
条件6	15	LPS接種30分前	LPS接種3時間後
条件7	15	LPS接種1時間後	LPS接種3時間後
条件8	15	—	LPS接種9時間後
条件9	15	LPS接種30分前	LPS接種9時間後
条件10	15	LPS接種1時間後	LPS接種9時間後

【0182】

3) 統計解析

抗体非投与群に対する抗体投与群について両側Studentのt検定によりp値を算出し、有意水準5%以内の場合、統計有意性があるものと判断した。

【0183】

4) 結果

図18に血中PAI-1濃度の測定結果を示す。LPS非処置群(条件1)では血中PAI-1量はごくわずかであったが、LPS接種後の血中PAI-1量は1.5時間から増加傾向を示し、3時間後及び9時間後ではLPS非処置動物に比べ著しく増加していた(条件2、5及び8)。

【0184】

LPS接種後3時間の抗体投与群ではLPS前投与群(条件6、 $p = 0.0027$ )、LPS後投与群(条件7、 $p = 0.0051$ )のいずれの群においても抗体非投与群に比べ血中PAI-1量の増加が抑制されていた。この抗Sema3Aヒト化抗体によるPAI-1増加抑制効果は、LPS接種後9時間においても持続し、LPS後3時間の結果と同様にLPS前投与群(条件9、 $p < 0.0001$ )、LPS後投与群(条件10、 $p = 0.0029$ )いずれの抗体投与群においても血中PAI-1量の増加が抑制されていた。

【0185】

以上の結果から、実施例2で作製した抗Sema3Aヒト化抗体(humanized-2)は、DICの増悪因子の一つである血中PAI-1量の増加を抑制する作用を有していることが明らかとなった。

【0186】

実施例19: 抗Sema3Aヒト化抗体の癌細胞遊走能に与える影響

外科治療、又は化学療法寛解導入後に起こる播種性転移や遠隔転移により、癌患者の生

10

20

30

40

50

存率が大きく低下することが知られている。癌細胞の遊走能の活性化は、癌細胞が原発巣から離脱し、播種性転移や遠隔転移につながることから、Sema3Aによって誘導されるがんの悪性化に対する抗Sema3Aヒト化抗体の影響を確認した。

【0187】

1) 試験方法

実施例2で作製した抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized-2)を用い、Sema3Aにより誘導される癌細胞遊走能に与える影響について評価した。ここでは、Sema3A高発現患者の予後が不良とされている膵癌の細胞を用いてその効果を検討した。具体的な実験手法は以下の通りである。

【0188】

フィブロネクチンをPBS緩衝液で0.1mg/mLに希釈してフィブロネクチン希釈液を調製し、このフィブロネクチン希釈液10μLを、24穴用チャンバー(クラボウ・ケモタキセルチャンバー、8μm孔)のフィルター下面に塗布し、室温で約1時間静置し乾燥させ、マイグレーションチャンバーを作製した。

【0189】

次いで、前記で調製したマイグレーションチャンバーを24穴プレートにセットし、外層に0.1%牛胎児血清を含むDMEM培地600μLを添加した。また、チャンバー内層には、 $2 \times 10^5$  cells/mLのヒト膵癌細胞株(MIAPaCa-2)と表17に示す各添加成分を含む無血清DMEM培地200μLとを添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で4時間培養を行った。その後チャンバーを取り出して、チャンバー内層の癌細胞を吸引除去し、さらにPBS緩衝液で湿らせた綿棒でチャンバー内に残留した細胞を除去した。次いで、チャンバーを細胞染色液(Diff-Quick、国際試薬)に10分以上浸した後に、超純水で洗浄を2回行って乾燥させた。乾燥後に、チャンバーのフィルター下面に遊走した細胞数を顕微鏡で計測した。

【0190】

【表17】

	チャンバー内層中の各添加成分の最終濃度		
	ヒトSema3A/Fc (ng/mL)	実施例2で得られた抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized-2) (μg/mL)	陰性対照ヒト抗体(μg/mL)
条件1	—	—	—
条件2	100	—	—
条件3	100	0.1	—
条件4	100	1	—
条件5	100	10	—
条件6	100	—	0.1
条件7	100	—	1
条件8	100	—	10

【0191】

2) 統計解析

多重性を考慮し、条件2に対する条件3~5、及び条件6~8について両側Dunnett検定によりp値を算出し、有意水準5%以内の場合、統計有意性があるものと判断した。

【0192】

3) 試験結果

得られた結果を図19に示す。ヒトSema3Aの刺激により膵癌細胞MIAPaCa-2の遊走活性は2倍以上亢進した(条件2)。しかし、抗Sema3Aヒト化抗体存在

10

20

30

40

50

下では、Sema3Aにより誘導される膵癌細胞の遊走活性が抑制された(条件3~5)。抗Sema3A抗体1 $\mu$ g/mL処置群(P=0.0031)と10 $\mu$ g/mL処置群(P<0.001)では、Sema3A非処置群(条件1)と同程度にまで癌細胞の遊走が抑制されていた。一方、陰性対照群では、Sema3Aによる癌細胞遊走を抑制しなかった(条件6~8)。即ち、本結果から、特定のアミノ酸配列のCDRを有する抗Sema3A抗体は、Sema3Aにより誘導される膵癌細胞の遊走を特異的に抑制することが明らかとなった。

【0193】

#### 実施例20：抗Sema3Aヒト化抗体の癌細胞浸潤能に与える影響

遊走能が活性化された癌細胞は周辺の細胞外基質を融解・浸潤し、基底膜を破壊して血管やリンパ管に移行し、やがて遠隔臓器へと転移する。癌細胞の浸潤・転移能の抑制は、転移性再発の抑止につながり、癌患者の生存率を改善する上で有用と考えられている。実施例19で検討したSema3A誘導性遊走能亢進に対する抑制効果に加え、癌細胞浸潤能に対する抗Sema3Aヒト化抗体の効果についても検討した。

【0194】

##### 1) 試験方法

増殖因子を除去した細胞外基質(BD社、Matrigel™ Growth Factor Reduced)を内層に充填したインベージョンチャンバー(BD社、BioCoat™ 8 $\mu$ m孔、#354483)を用いてSema3A誘導性の癌細胞浸潤能に対する抗Sema3Aヒト化抗体が与える影響について評価した。具体的な実験手法は以下の通りである。

【0195】

癌細胞は、ヒト膵癌細胞株(MIAPaCa-2)、ヒト神経膠芽腫細胞株(U87MG)、及びマウス由来肺癌細胞株(3LL)を使用した。まず、インベージョンチャンバー内に充填された細胞外基質に膨潤処置を施した後、そのインベージョンチャンバーを24穴プレートにセットし、外層に0.1%ウシ胎児血清(3LL細胞の場合は1%ウシ胎児血清)を含むDMEM培地を0.75mL添加し、内層に $2 \times 10^5$  cells/mLの癌細胞と表18に示す各濃度の添加成分を含む無血清DMEM培地を125 $\mu$ L添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で24時間培養を行った。その後、インベージョンチャンバーを取り出し、実施例19と同様にインベージョンチャンバー内層の残留細胞を除去した後、フィルター下面に移動した浸潤細胞数を顕微鏡で計測した。

【0196】

10

20

30

【表 18】

	インベーションチャンバーの内層に添加した成分		
	ヒト Sema3A (g/mL)	実施例2で得られた抗Sema3Aヒト化抗体(Humanized-2) (μg/mL)	陰性対照ヒト抗体 (μg/mL)
条件1	—	—	—
条件2	—	0.1	—
条件3	—	1.0	—
条件4	—	10.0	—
条件5	100	—	—
条件6	100	0.1	—
条件7	100	1.0	—
条件8	100	10.0	—
条件9	100	—	0.1
条件10	100	—	1.0
条件11	100	—	10.0

10

20

## 【0197】

## 2) 統計解析

Sema3A誘導性の浸潤活性に対する阻害作用について、多重性を考慮し、条件5に対する条件6～8および条件9～10についてそれぞれ両側Dunnett検定によりp値を算出し、有意水準5%以内の場合、統計有意性があるものと判断した。p値一覧を表19に示す。

## 【0198】

## 3) 試験結果

図20にMIA PaCa-2細胞を用いた場合、図21にU87MG細胞を用いた場合、及び図22に3LL細胞を用いた場合について、各条件での浸潤細胞を計測した結果を示す。Sema3Aを添加した場合(条件5)、いずれの細胞株においてもSema3A非刺激群(条件1)に比べ癌細胞の浸潤能が明らかに亢進していた。そして、ヒトSema3Aと共に抗Sema3Aヒト化抗体を添加した場合、いずれの癌細胞株においてもSema3A非刺激と同程度にまで癌細胞の浸潤が抑制されていた(条件6～8)。Sema3A非刺激条件下では、3LLを除いて特筆すべき浸潤抑制作用は観察されなかった(条件1～4)。一方、陰性対照抗体添加群ではSema3Aによる癌細胞浸潤能の亢進をほとんど抑制しなかった(条件9～11)。また、図23には浸潤した3LL細胞の顕微鏡下撮影像を示す。Sema3A非添加の条件1に対し、Sema3Aを添加した条件5において癌細胞浸潤が顕著であること、Sema3A存在下で抗Sema3Aヒト化抗体を処置した条件7および条件8において、Sema3Aによって誘導される癌細胞の浸潤活性が明らかに抑制されていることが可視的にも確認できる。これらの結果から明らかのように、特定のアミノ酸配列のCDRを有する抗Sema3A抗体は、Sema3Aによって誘導される癌細胞の浸潤活性をSema3A非刺激と同程度にまで抑制する作用を有することが明らかとなった。

30

40

## 【0199】

【表 19】

	Dunnett's test結果		
	MIAPaCa-2	U87MG	3LL
条件6	p=0.4339	p<0.001	p=0.3278
条件7	p=0.0012	p<0.001	p=0.0091
条件8	p<0.001	p<0.001	p=0.0022
条件9	p=0.952	p=0.8182	p=0.302
条件10	p=0.920	p=0.8676	p=0.142
条件11	p=0.987	p=0.0046	p=0.903

10

## 【0200】

## 実施例 21：Sema3A により誘導される抗がん剤不応答性に対する抗 Sema3A ヒト化抗体の影響

膵癌は、がんの中でも5年生存率が非常に低いことが知られている。その原因として、膵癌組織は乏血管性の状態となっているが、このような栄養飢餓状態でも癌細胞の増殖・進展が起こり、しばしばゲムシタピン塩酸塩（以下GEM）等の抗がん剤に対し耐性を示すことが挙げられる。即ち、膵癌治療において、抗がん剤不応答性の克服は重要な課題となっていることから、栄養飢餓条件におけるSema3Aの薬剤耐性誘導と抗Sema3Aヒト化抗体によるその解除作用について評価した。

## 【0201】

20

## 1) 試験方法

膵癌の特徴である栄養飢餓条件において、Sema3Aにより誘導されるGEM不応答性に対するヒト化抗Sema3A抗体（実施例2で作製したhumanized-2）が与える影響について評価した。具体的な実験手法は以下の通りである。

## 【0202】

$4 \times 10^4$  cells/mLのヒト膵癌細胞（MIAPaCa-2）を10%ウシ胎児血清含有DMEM培地に浮遊させた細胞浮遊液を96穴プレートの各穴に100 $\mu$ L播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>存在下で24時間培養を行った後に、培地を0.1%ウシ胎児血清含有DMEM培地100 $\mu$ Lに交換し、更に24時間培養を行った。次いで、表20に示す各成分を所定量含有させた0.1%ウシ胎児血清含有DMEM培地100 $\mu$ Lを各穴に添加して、2日間培養を行った。その後、各穴から培養上清を100 $\mu$ L除去して、CellTiter試薬（CellTiter Aqueous One Solution Proliferation Assay; Promega）20 $\mu$ Lを添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>存在下で1時間培養した後、490nmの吸光度を測定した。

30

## 【0203】

## 【表 20】

	各穴中の各成分の最終濃度			
	ヒトSema3A /Fc (ng/mL)	ゲムシタピン塩酸塩 (nM)	実施例2で得られた抗Sema3Aヒト化抗体 (Humanized-2) ( $\mu$ g/mL)	陰性対照ヒト抗体 ( $\mu$ g/mL)
条件1	—	—	—	—
条件2	—	10	—	—
条件3	100	10	—	—
条件4	100	10	0.1	—
条件5	100	10	1	—
条件6	100	10	10	—
条件7	100	10	—	0.1
条件8	100	10	—	1
条件9	100	10	—	10

40

50

【 0 2 0 4 】

2 ) 統計解析

条件 3 に対する条件 4 ~ 6、及び条件 7 ~ 9 について多重性を考慮し、両側 Dunnett 検定を実施しにより p 値を算出し、有意水準 5 % 以内の場合、統計有意性があるものと判断した。p 値を表 2 1 に示す。

【 0 2 0 5 】

3 ) 試験結果

図 2 4 に膵癌細胞増殖判定試験の結果を示す。GEM により膵癌細胞の増殖は抑制されたが (条件 1 に対し条件 2)、ヒト Sema3A は、GEM に対する感受性を減弱させ薬剤不応答性を誘導した (条件 2 に対し条件 3)。この Sema3A により誘導される GEM 抵抗性は、抗 Sema3A ヒト化抗体 1 ないし 10 μg/mL 処置により解除され、Sema3A 非存在条件と同程度にまで GEM 感受性を回復させることが示された (条件 3 に対し条件 4 ~ 6)。一方、陰性対照ヒト抗体添加群では、Sema3A 非存在条件と同程度までの GEM 感受性を回復することはできなかった (条件 7 ~ 9)。本結果から、実施例 2 によって作製したヒト化抗 Sema3A 抗体には、膵癌組織のような栄養飢餓条件において、Sema3A により誘導される抗がん剤抵抗性を解除する作用も有していることが明らかとなった。

10

【 0 2 0 6 】

【表 2 1】

抗体濃度 (μg/mL)	Dunnett's test 結果	
	抗 Sema3A ヒト化抗体	陰性対照ヒト抗体
0.1	p = 0.0150	p = 0.0414
1	p < 0.001	p = 0.0179
10	p < 0.001	p = 0.0147

20

【配列表フリーテキスト】

【 0 2 0 7 】

配列番号 1 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖 CDR 1 のアミノ酸配列である。

配列番号 2 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖 CDR 2 のアミノ酸配列である。

30

配列番号 3 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖 CDR 3 のアミノ酸配列である。

配列番号 4 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖 CDR 1 のアミノ酸配列である。

配列番号 5 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖 CDR 2 のアミノ酸配列である。

配列番号 6 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖 CDR 3 のアミノ酸配列である。

配列番号 7 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

40

配列番号 8 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 9 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 10 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 11 は、ヒト化抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 12 は、ヒト化抗体 (Humanized - 1) (クローン No. 4 - 2 株

50

由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号13は、ヒト化抗体(Humanized-2)(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号14は、トリ-ヒトキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号7)をコードしている塩基配列である。

配列番号15は、トリ-ヒトキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号8)をコードしている塩基配列である。

配列番号16は、トリ-ヒトキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号9)をコードしている塩基配列である。

配列番号17は、トリ-ヒトキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号10)をコードしている塩基配列である。

10

配列番号18は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖CD R1のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号19は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖CD R2のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号20は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖CD R3のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号21は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖CD R1のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号22は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖CD R2のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

20

配列番号23は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖CD R3のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号24は、ヒト化抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号11)をコードしている塩基配列である。

配列番号25は、ヒト化抗体(Humanized-1)(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号12)をコードしている塩基配列である。

配列番号26は、ヒト化抗体(Humanized-2)(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号13)をコードしている塩基配列である。

30

配列番号27は、前記プライマー1の塩基配列である。

配列番号28は、前記プライマー2の塩基配列である。

配列番号29は、前記プライマー3の塩基配列である。

配列番号30は、前記プライマー4の塩基配列である。

配列番号31は、前記プライマー5の塩基配列である。

配列番号32は、前記プライマー6の塩基配列である。

配列番号33は、前記プライマー7の塩基配列である。

配列番号34は、前記プライマー8の塩基配列である。

配列番号35は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の重鎖のアミノ酸配列である。

40

配列番号36は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.4-2株由来)の軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号37は、前記プライマーAの塩基配列である。

配列番号38は、前記プライマーBの塩基配列である。

配列番号39は、前記プライマーCの塩基配列である。

配列番号40は、前記プライマーDの塩基配列である。

配列番号41は、前記プライマーEの塩基配列である。

配列番号42は、前記プライマーFの塩基配列である。

配列番号43は、前記プライマーGの塩基配列である。

50

配列番号 44 は、前記プライマー H の塩基配列である。

配列番号 45 は、前記プライマー I の塩基配列である。

配列番号 46 は、前記プライマー J の塩基配列である。

配列番号 47 は、前記プライマー K の塩基配列である。

配列番号 48 は、前記プライマー L の塩基配列である。

配列番号 49 は、ヒト化抗体 (Humanized - 1 及び Humanized - 2) (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号 50 は、ヒト化抗体 (Humanized - 1 及び Humanized - 2) (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

10

配列番号 51 は、ヒト化抗体 (Humanized - 1) (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号 52 は、ヒト化抗体 (Humanized - 1) (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号 53 は、ヒト化抗体 (Humanized - 2) (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号 54 は、ヒト化抗体 (Humanized - 2) (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号 55 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖のアミノ酸配列である。

20

配列番号 56 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の重鎖のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号 57 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号 58 は、トリ - ヒトキメラ抗体 (クローン No. 4 - 2 株由来) の軽鎖のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号 59 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 60 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CD R 1 のアミノ酸配列である。

30

配列番号 61 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CD R 2 のアミノ酸配列である。

配列番号 62 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CD R 3 のアミノ酸配列である。

配列番号 63 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 64 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の軽鎖 CD R 1 のアミノ酸配列である。

配列番号 65 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の軽鎖 CD R 2 のアミノ酸配列である。

40

配列番号 66 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の軽鎖 CD R 3 のアミノ酸配列である。

配列番号 67 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 582 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 68 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CD R 1 のアミノ酸配列である。

配列番号 69 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CD R 2 のアミノ酸配列である。

配列番号 70 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CD R 3 のアミノ酸配列である。

50

配列番号 71 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 582 株由来) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 72 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 582 株由来) の軽鎖 CDR1 のアミノ酸配列である。

配列番号 73 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 582 株由来) の軽鎖 CDR2 のアミノ酸配列である。

配列番号 74 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 582 株由来) の軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列である。

配列番号 75 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

10

配列番号 76 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の重鎖 CDR1 のアミノ酸配列である。

配列番号 77 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の重鎖 CDR2 のアミノ酸配列である。

配列番号 78 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の重鎖 CDR3 のアミノ酸配列である。

配列番号 79 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 80 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の軽鎖 CDR1 のアミノ酸配列である。

20

配列番号 81 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の軽鎖 CDR2 のアミノ酸配列である。

配列番号 82 は、トリ抗体 (クローン No. 240 - 40 株由来) の軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列である。

配列番号 83 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 84 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の重鎖 CDR1 のアミノ酸配列である。

配列番号 85 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の重鎖 CDR2 のアミノ酸配列である。

30

配列番号 86 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の重鎖 CDR3 のアミノ酸配列である。

配列番号 87 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号 88 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の軽鎖 CDR1 のアミノ酸配列である。

配列番号 89 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の軽鎖 CDR2 のアミノ酸配列である。

配列番号 90 は、トリ抗体 (クローン No. 255 - 72 株由来) の軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列である。

40

配列番号 91 は、前記プライマー M の塩基配列である。

配列番号 92 は、前記プライマー N の塩基配列である。

配列番号 93 は、前記プライマー O の塩基配列である。

配列番号 94 は、前記プライマー P の塩基配列である。

配列番号 95 は、ヒト化抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号 96 は、ヒト化抗体の軽鎖定常領域のアミノ酸配列をコードしている塩基配列である。

配列番号 97 は、トリ - マウスキメラ抗体 (クローン No. 165 株由来) の重鎖 CDR1 のアミノ酸配列 (配列番号 60) をコードしている塩基配列である。

50

配列番号98は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の重鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号61)をコードしている塩基配列である。

配列番号99は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の重鎖CD R3のアミノ酸配列(配列番号62)をコードしている塩基配列である。

配列番号100は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の軽鎖CD R1のアミノ酸配列(配列番号64)をコードしている塩基配列である。

配列番号101は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の軽鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号65)をコードしている塩基配列である。

配列番号102は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の軽鎖CD R3のアミノ酸配列(配列番号66)をコードしている塩基配列である。

配列番号103は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号59)をコードしている塩基配列である。

配列番号104は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.165株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号63)をコードしている塩基配列である。

配列番号105は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の重鎖CD R1のアミノ酸配列(配列番号68)をコードしている塩基配列である。

配列番号106は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の重鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号69)をコードしている塩基配列である。

配列番号107は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の重鎖CD R3のアミノ酸配列(配列番号70)をコードしている塩基配列である。

配列番号108は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の軽鎖CD R1のアミノ酸配列(配列番号72)をコードしている塩基配列である。

配列番号109は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の軽鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号73)をコードしている塩基配列である。

配列番号110は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の軽鎖CD R3のアミノ酸配列(配列番号74)をコードしている塩基配列である。

配列番号111は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号67)をコードしている塩基配列である。

配列番号112は、トリ-マウスキメラ抗体(クローンNo.582株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号71)をコードしている塩基配列である。

配列番号113は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の重鎖CD R1のアミノ酸配列(配列番号76)をコードしている塩基配列である。

配列番号114は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の重鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号77)をコードしている塩基配列である。

配列番号115は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の重鎖CD R3のアミノ酸配列(配列番号78)をコードしている塩基配列である。

配列番号116は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の軽鎖CD R1のアミノ酸配列(配列番号80)をコードしている塩基配列である。

配列番号117は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の軽鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号81)をコードしている塩基配列である。

配列番号118は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の軽鎖CD R3のアミノ酸配列(配列番号82)をコードしている塩基配列である。

配列番号119は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号75)をコードしている塩基配列である。

配列番号120は、トリ抗体(クローンNo.240-40株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号79)をコードしている塩基配列である。

配列番号121は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の重鎖CD R1のアミノ酸配列(配列番号84)をコードしている塩基配列である。

配列番号122は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の重鎖CD R2のアミノ酸配列(配列番号85)をコードしている塩基配列である。

10

20

30

40

50

配列番号D123は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の重鎖CDR3のアミノ酸配列(配列番号86)をコードしている塩基配列である。

配列番号124は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の軽鎖CDR1のアミノ酸配列(配列番号88)をコードしている塩基配列である。

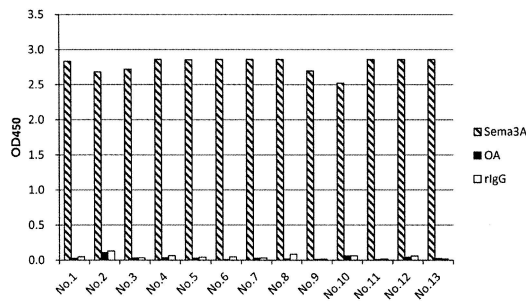
配列番号125は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の軽鎖CDR2のアミノ酸配列(配列番号89)をコードしている塩基配列である。

配列番号126は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の軽鎖CDR3のアミノ酸配列(配列番号90)をコードしている塩基配列である。

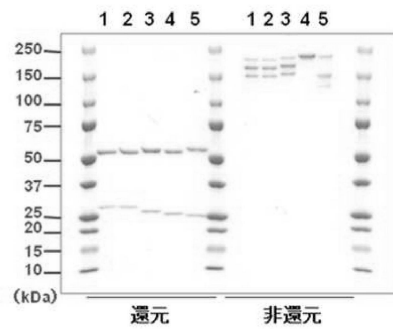
配列番号127は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号83)をコードしている塩基配列である。

配列番号128は、トリ抗体(クローンNo.255-72株由来)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号87)をコードしている塩基配列である。

【図1】

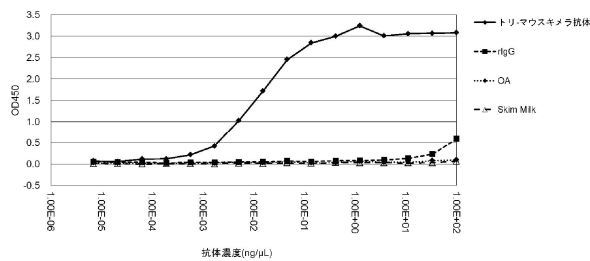


【図3】

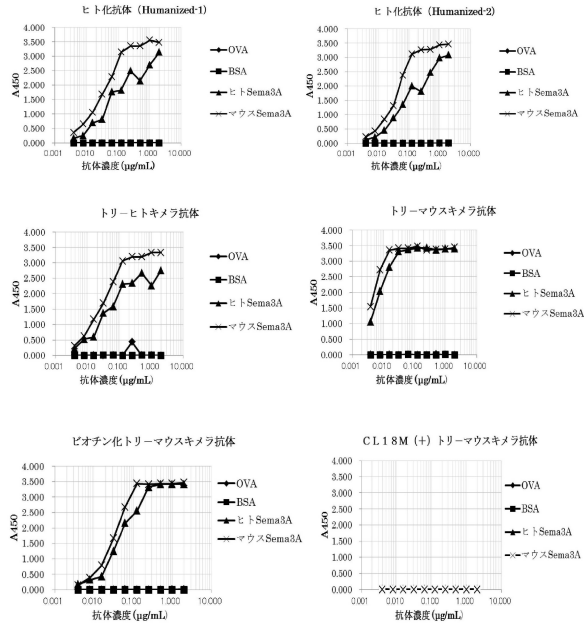


- 1: ヒト化抗体 (Humanized-1)
- 2: ヒト化抗体 (Humanized-2)
- 3: トリー ヒトキメラ抗体
- 4: トリー マウスキメラ抗体
- 5: CL18M (+) トリー マウスキメラ抗体 (コントロール)

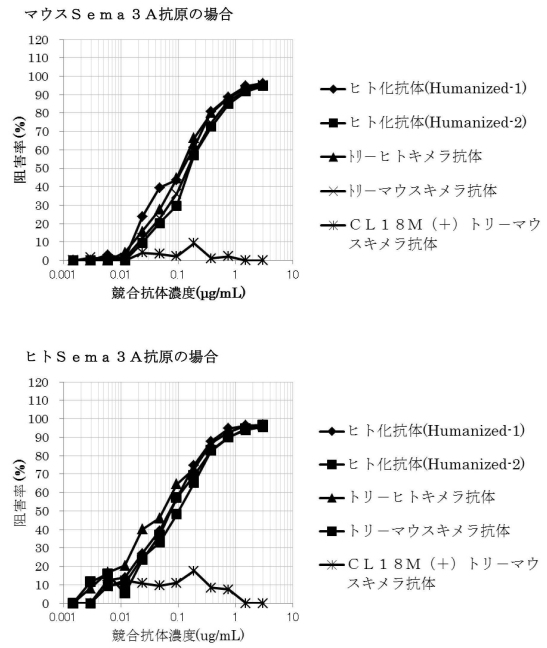
【図2】



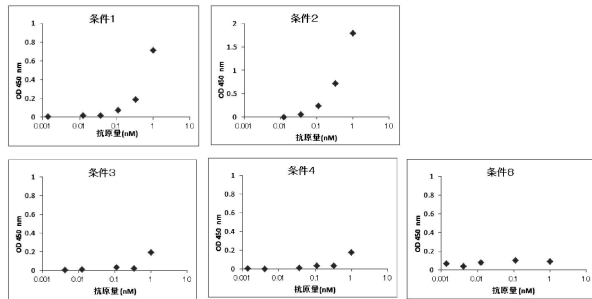
【 図 4 】



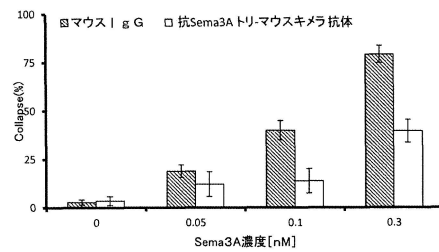
【 図 5 】



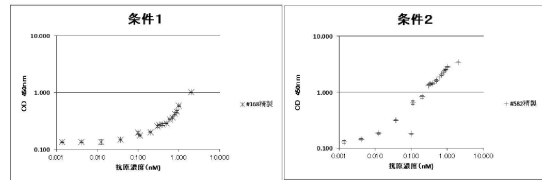
【 図 6 】



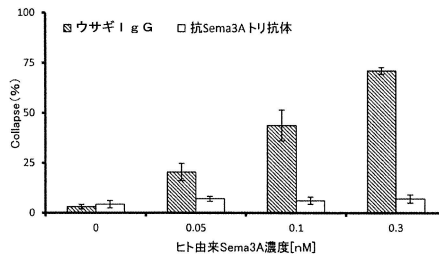
【 図 9 】



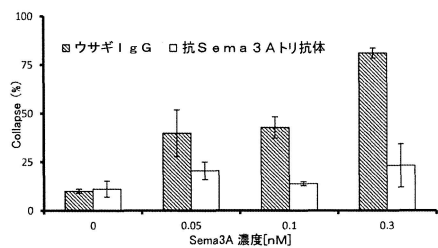
【 図 7 】



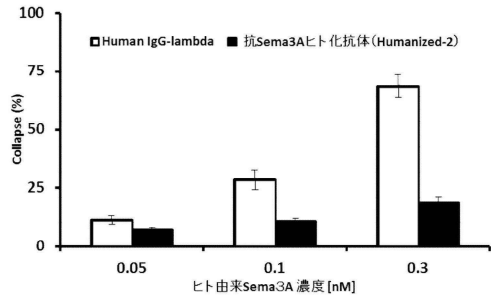
【 図 10 】



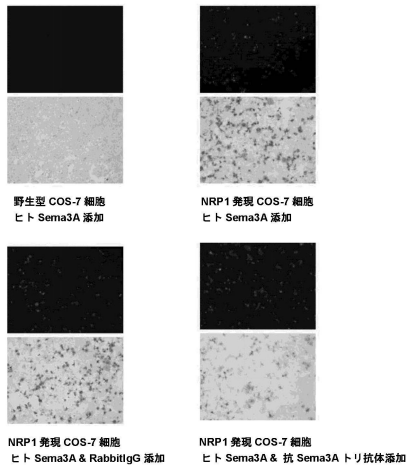
【 図 8 】



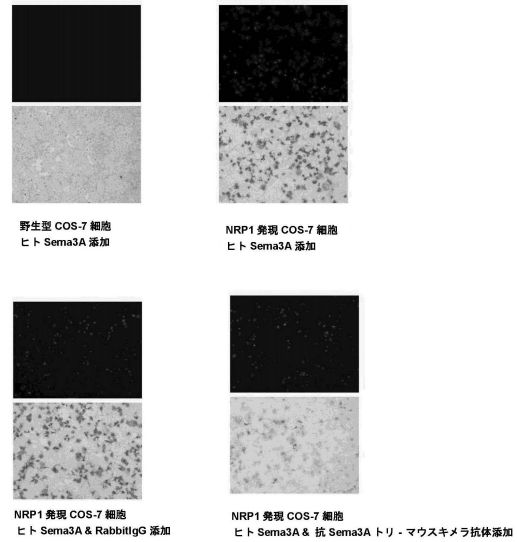
【 図 1 1 】



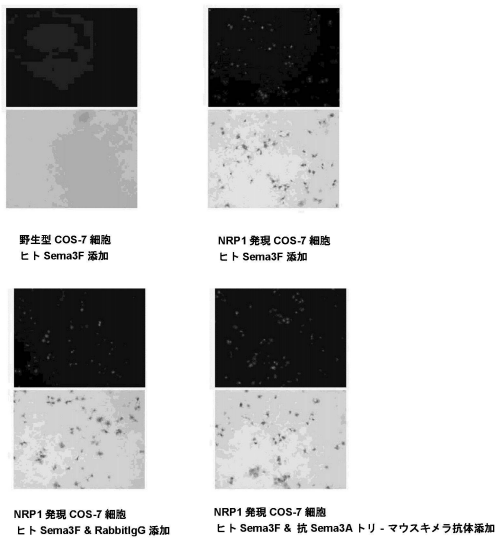
【 図 1 2 】



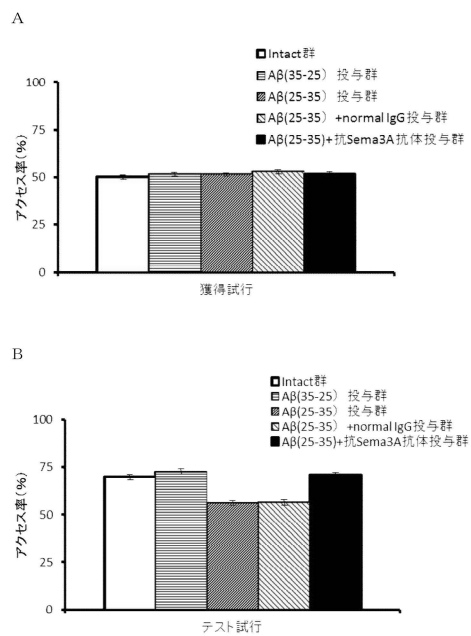
【 図 1 3 】



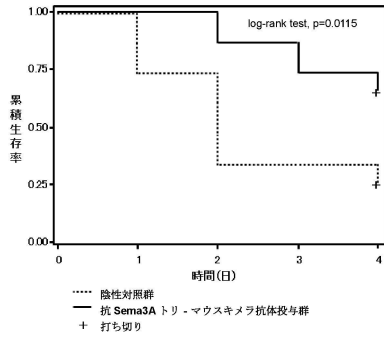
【 図 1 4 】



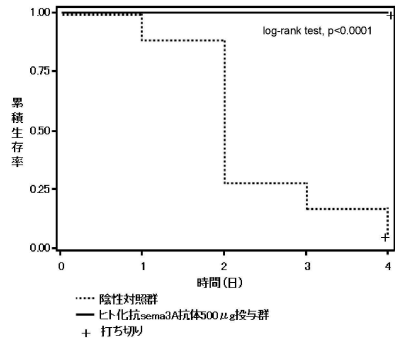
【 図 1 5 】



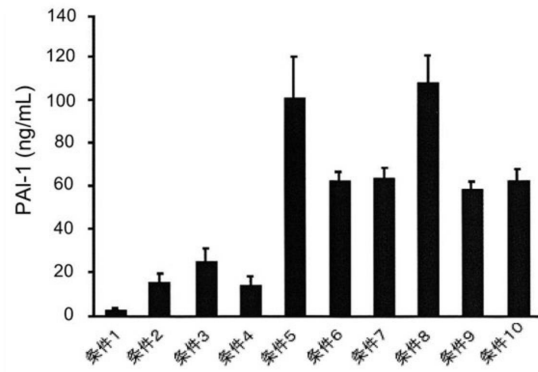
【図16】



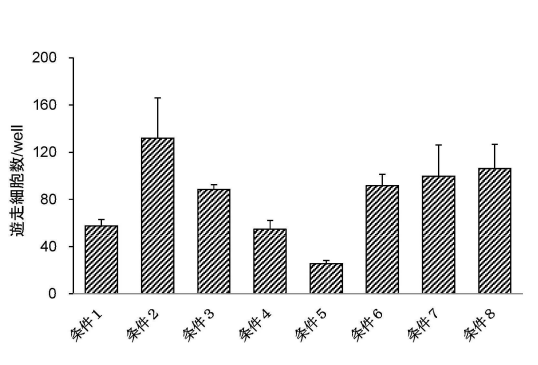
【図17】



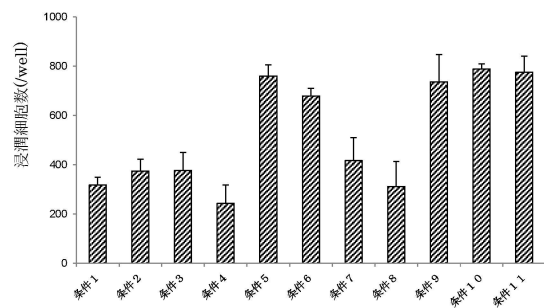
【図18】



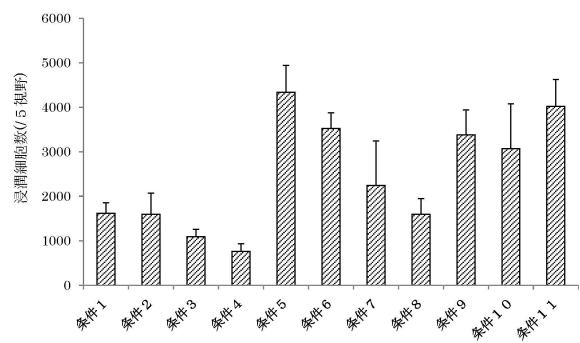
【図19】



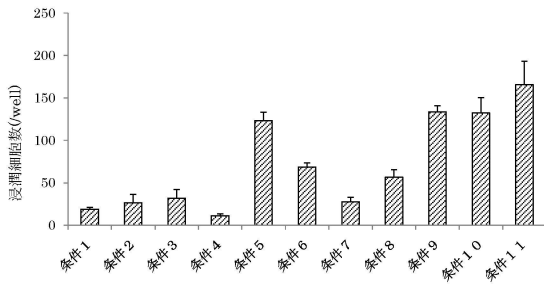
【図20】



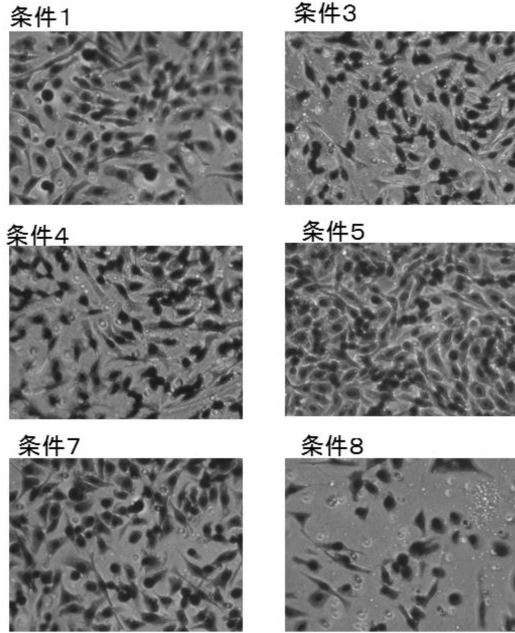
【図22】



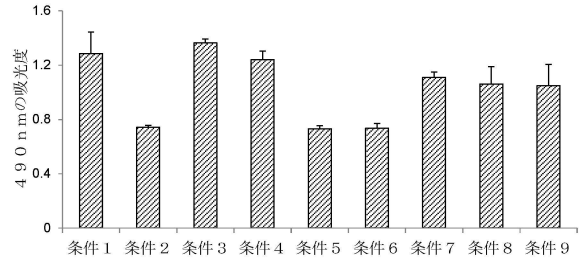
【図21】



【図 2 3】



【図 2 4】



【配列表】

0006372040000001.app

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 11/02	(2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 27/14	(2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 27/14	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/13	

- (72)発明者 五嶋 良郎  
 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内
- (72)発明者 中村 史雄  
 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内
- (72)発明者 山下 直也  
 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内
- (72)発明者 瀬尾 秀宗  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内
- (72)発明者 橋本 修一  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内
- (72)発明者 村上 孝司  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内
- (72)発明者 高橋 直樹  
 千葉県柏市柏1353-11
- (72)発明者 笹倉 由貴江  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 国際公開第2003/007803(WO, A2)  
 国際公開第2011/055550(WO, A1)  
 国際公開第2011/066284(WO, A1)

株式会社カイオム・バイオサイエンス(press release), 2012年12月26日, URL, <http://contents.xj-storage.jp/contents/45830/T/PDF-GENERAL/140120121226054007.pdf>

株式会社カイオム・バイオサイエンス(press release), 2012年4月2日, URL, <http://minkabu.jp/announcements/4583/140120120402004082.pdf>

Expert Opin. Ther. Targets, 2012年, vol.16, no.9, pp.933-944

BMC Musculoskelet. Disord., 2013年1月, vol.14, no.40, pp.1/11-11/11

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46

C12N 15/00 - 15/90

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

专利名称(译)	抗semaphorin 3A抗体，和使用它的治疗阿尔茨海默病和免疫炎症疾病		
公开(公告)号	<a href="#">JP6372040B2</a>	公开(公告)日	2018-08-15
申请号	JP2014560799	申请日	2014-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	公立大学法人横浜市立大学 凯奥目生物科学株式会社		
申请(专利权)人(译)	公立大学法人横浜市立大学 有限公司Chiome生物科学		
当前申请(专利权)人(译)	公立大学法人横浜市立大学 有限公司Chiome生物科学		
[标]发明人	五嶋良郎 中村史雄 山下直也 瀬尾秀宗 橋本修一 村上孝司 高橋直樹 笹倉由貴江		
发明人	五嶋 良郎 中村 史雄 山下 直也 瀬尾 秀宗 橋本 修一 村上 孝司 高橋 直樹 笹倉 由貴江		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/08 A61P35/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/14 A61P21/00 A61P19/02 A61P3/10 A61P1/04 A61P31/04 A61P11/06 A61P1/16 A61P31/14 A61P31/16 A61P11/02 A61P27/14 A61P17/00 A61P35/02 G01N33/53 C12P21/08 C12N15/13		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/14 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/14 A61P31/16 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/18 C07K2317/22 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/76 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/08 A61P35/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/14 A61P21/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P3/10 A61P1/04 A61P31/04 A61P11/06 A61P1/16 A61P31/14 A61P31/16 A61P11/02 A61P27/14 A61P17/00 A61P35/02 G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/13		
代理人(译)	田中纯弥		
优先权	2013021309 2013-02-06 JP		
其他公开文献	JPWO2014123186A5 JPWO2014123186A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

Semaphorin 3A蛋白质技术领域本发明涉及能够有效预防和/或治疗神经退行性疾病，自身免疫性疾病，炎症性疾病，癌症，传染病和弥散性血管内凝血综合征等Sema3A蛋白质疾病的信号素3A蛋白质。并提供针对其的抗体。具有特定氨基酸序列的CDR的抗体 ( SEQ ID NO : 1至6,60至62,64至66,68至70,72至74,76至78,80至82,84至86和88至90 ) Sema 3A抗体可有效预防和/或治疗涉及Sema 3A蛋白的疾病，如神经退行性疾病，自身免疫性疾病，炎症性疾病，癌症，传染病和弥散性血管内凝血综合征，随之而来的症状得到显著改善。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6372040号 (P6372040)
(45) 発行日 平成30年8月15日 (2018. 8. 15)	(24) 登録日 平成30年7月27日 (2018. 7. 27)	
(5) Int. Cl. F I		
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	Z N A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
請求項の数 24 (全 60 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-560799 (P2014-560799)	(73) 特許権者 505155528	
(86) (22) 出願日 平成26年2月6日 (2014. 2. 6)	公立大学法人横浜市立大学	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/052758	神奈川県横浜市金沢区瀬戸 2 2 番 2 号	
(87) 国際公開番号 W02014/123186	(73) 特許権者 505368531	
(87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)	株式会社カイオム・バイオサイエンス	
審査請求日 平成28年2月6日 (2017. 2. 6)	東京都渋谷区本町三丁目 1 2 番 1 号	
(31) 優先権主張番号 特願2013-21309 (P2013-21309)	(74) 代理人 100124431	
(32) 優先日 平成25年2月6日 (2013. 2. 6)	弁理士 田中 順也	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	100156845	
	弁理士 山田 威一郎	
	100124039	
	弁理士 立花 謙治	
	100112896	
	弁理士 松井 宏記	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 抗セマフォリン3A抗体、並びにこれを用いたアルツハイマー病及び免疫・炎症性疾患の治療		